



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFFECTO DE ANANDAMIDA SOBRE LA
CAPACITACION PREMATURA DE
ESPERMATOZOIDES PORCINOS
SOMETIDOS A CONGELACION**

María Elizabet Buriticá Henao

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal
Medellín, Colombia
2016

EFEECTO DE ANANDAMIDA SOBRE LA CAPACITACION PREMATURA DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS SOMETIDOS A CONGELACION

María Elizabet Buriticá Henao

Trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Maestría en Ciencias Agrarias

Director:
Delmis Omar Camargo Rodríguez
MVZ, MS, PhD

Línea de Investigación:
Reproducción Animal
Grupo de Investigación:
GENES GAMETOS Y EMBRIONES

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal
Medellín, Colombia
2016

Dedicatoria

*A mi esposo e hijos por la paciencia y apoyo
para lograr la culminación de esta etapa.*

Agradecimientos

A mi familia por acompañarme en este proceso, con su paciencia y amor.

A la empresa Alimentos Cárnicos S.A.S., por facilitar las muestras de semen para la realización del trabajo.

Al Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y al Laboratorio de Reproducción de la SIU de la Universidad de Antioquia por facilitar los equipos para la realización del trabajo.

A todas aquellas personas que me ayudaron en este proceso con su apoyo, acompañamiento y paciencia.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Anandamida (AEA) como factor anticapacitante del espermatozoide congelado-descongelado. Se usó el semen de 12 reproductores porcinos, cada eyaculado se dividió en 4 fracciones correspondientes a 4 tratamientos, de los cuales hubo un control y tres concentraciones de AEA (1 μM -A1-, 10 μM -A10- y 100 μM -A100-), Se procedió a la congelación. En el semen pos-descongelación se evaluaron los siguientes parámetros: movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), integridad de membrana plasmática (IMP), funcionalidad de membrana plasmática (HOST), espermatozoides sin reacción acrosómica (NRA), espermatozoides no capacitados (NCAP), parámetros de velocidad, parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza . En los resultados obtenidos del semen congelado – descongelado, no se encontraron diferencias significativas en las variables evaluadas ($p>0,05$). Se encontró correlación de NCAP, HOST, NRA y IMP con los parámetros cinéticos, indicando la importancia de la integridad y funcionalidad de las membranas espermáticas para activar su función de capacitarse, tener reacción acrosómica y fertilizar. No hubo correlación entre HOST con NCAP, NRA e IMP. Como conclusión, la AEA puede ser utilizada en los procesos de crio-congelación de espermatozoides porcinos para controlar la presentación de crio-capacitación de espermatozoides congelados – descongelados.

Palabras clave:

Capacitación espermática, Criopreservación Semen, Reproducción, Semen congelado, Verraco.

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of anandamide (AEA) as decapacitation factor of frozen-thawed sperm. Semen from 12 boar was used, each ejaculate was divided into 4 fractions corresponding to 4 treatments, one as control and three levels of AEA (1 μ M-A1-, 10 μ M-A10- y 100 μ M-A100-), after treatment, semen was frozen. Semen after thawing was valued using the following parameters: Total motility (TM), progressive motility (PM), plasma membrane integrity (PMI) functionality plasma membrane (HOST), sperm without acrosome reaction (NAR), sperm do not capacitated (NCAP), speed parameters, angularity and swing parameters of the head. No significant differences in the variables assessed ($p>0,05$), There was correlation between NCAP, HOST, NAR and PMI with the kinetic parameters, indicating the importance of integrity and functionality of sperm membrane to activate its role capacitating, have acrosome reaction and fertilizing. No correlation between HOST with NCAP, NRA and PMI. In conclusion, the AEA can be used in the process of freeze pig sperm to control the presentation of cryo – capacitation of frozen - thawed sperm.

Keywords: Boar, Frozen semen, Reproduction, Sperm capacitation, Semen cryopreservation.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	15
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1 Espermatozoide.....	19
1.1.1 Estructura Espermiática	20
1.1.2 Membrana Plasmática y Membrana Acrosomal	21
1.2 Maduración Espermiática.....	21
1.3 Eyaculado	22
1.3.1 Plasma Seminal.....	22
1.3.2 Espermatozoides	23
1.4 Evaluación Espermiática.....	23
1.5 Capacitación Espermiática	23
1.6 Reacción Acrosómica.....	26
1.7 Integridad de membrana plasmática	26
1.8 Funcionalidad de membrana plasmática.....	27
1.9 Hiperactivación Espermiática – Análisis Espermiático por Computador	28
1.10 Movilidad Espermiática - Análisis Espermiático por Computador	29
1.11 Crío_capacitación	29

1.12 La Anandamida: aspectos moleculares	30
2. METODOLOGÍA.....	33
2.1 Reproductores.....	33
2.2 Recolección y congelación de semen	33
2.2.1 Tratamientos con Anandamida.....	35
2.2.2 Tazas de enfriamiento.....	36
2.2.3 Protocolo de descongelación	36
2.3 Evaluación de la movilidad	37
2.4 Hipermovilidad	37
2.5 Funcionalidad de membrana plasmática	39
2.6 Análisis de citometría de flujo	39
2.6.1 Integridad de membrana plasmática	40
2.6.2 Capacitación espermática	40
2.6.3 Reacción de membrana acrosómica	41
2.7 Diseño Experimental	41
2.8 Análisis Estadístico	43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4. CONCLUSIONES	50
Bibliografía	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1. Paso de una espermatogonia a espermatozoide maduro durante su proceso espermatogénico, logrando ser capaz de fertilizar el ovocito dentro del oviducto de la hembra.....	19
Figura 1.2. Estructura espermática	20
Figura 1.3. Ubicación de la membrana plasmática y acrosomal en la cabeza del espermatozoide.....	21
Figura 2.2.1. Proceso de recolección de semen, evaluación y centrifugación del semen	34
Figura 2.2.1.1. Adición a las alícuotas del eyaculado cada tratamiento de AEA (concentraciones: 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Alcanzado los 5°C se procede a empacar y sellar las pajillas.....	35
Figura 2.2.2.1. Descenso de temperatura en vapores de nitrógeno antes de ser sumergidos en el nitrógeno líquido.	36
Figura 2.4.1. Terminología estándar para las variables medidas por los sistemas de CASA.....	38
Figura 2.5.1. Reacción del espermatozoide al estar en un medio hiposmótico, enrolla las colas, lo que indica una membrana plasmática funcional.	39
Figura 2.7.1. Diseño experimental	42

Lista de tablas

	Pag.
Tabla 1. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de la AEA de semen congelado – descongelado en la cinética del espermatozoide.....	45
Tabla 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de la AEA de semen congelado – descongelado en las variables de viabilidad espermática.....	46
Tabla 3. Correlación entre la viabilidad espermática con la cinética espermática de semen congelado - descongelado.....	47
Tabla 4. Correlación entre las variables asociadas a la viabilidad del espermatozoide de semen congelado - descongelado.....	48

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

<i>AEA</i>	<i>Anandamida</i>
<i>A 1</i>	<i>Anandamida 1 μM</i>
<i>A 10</i>	<i>Anandamida 10 μM</i>
<i>A 100</i>	<i>Anandamida 100 10 μM</i>
<i>ALH</i>	<i>Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza</i>
<i>AMPc</i>	<i>Adenosín monofosfato cíclico</i>
<i>AMT</i>	<i>Transportador de membrana de anandamida</i>
<i>BCF</i>	<i>Frecuencia del desplazamiento de la cabeza</i>
<i>C</i>	<i>Carbón (elemento de la tabla periódica)</i>
<i>Ca⁺⁺</i>	<i>Ión de calcio</i>
<i>CASA</i>	<i>Análisis espermático asistido por computador</i>
<i>CB1R</i>	<i>Receptor de canabinoide tipo 1</i>
<i>CB2R</i>	<i>Receptor de canabinoide tipo 2</i>
<i>CD46</i>	<i>Proteína reguladora del complemento asociada a membrana</i>
<i>CIA</i>	<i>Centro de Inseminación Artificial</i>
<i>DI</i>	<i>Diluyente I</i>
<i>DII</i>	<i>Diluyente II</i>
<i>DIII</i>	<i>Diluyente III</i>
<i>FAAH</i>	<i>Amida de ácido graso hidrolasa</i>
<i>H⁺</i>	<i>Ión de hidrógeno</i>
<i>HDL</i>	<i>Lipoproteína de alta densidad</i>
<i>HOST</i>	<i>Test hipo osmótico</i>
<i>KDa</i>	<i>Dalton (unidad de masa molecular)</i>
<i>IMP</i>	<i>Integridad de membrana plasmática</i>
<i>LIN</i>	<i>Coefficiente de linealidad</i>
<i>ml</i>	<i>Mililitro</i>
<i>mm</i>	<i>Milimetro</i>
<i>mOsm</i>	<i>Mili osmoles</i>
<i>Met-AEA</i>	<i>Metanandamida</i>
<i>MP</i>	<i>Movimiento progresivo</i>
<i>MT</i>	<i>Movimiento total</i>
<i>N</i>	<i>Nitrógeno (elemento de la tabla periódica)</i>
<i>Na⁺</i>	<i>Ión de sodio</i>
<i>NAP-PLD</i>	<i>N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa específica D</i>
<i>NArPE</i>	<i>N-araquidonoilo fosfatidiletanolamina</i>
<i>NCAP</i>	<i>No capacitados</i>

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

<i>NRA</i>	<i>Sin reacción acrosómica</i>
<i>PI</i>	<i>Propidio de Yodo</i>
<i>PKA</i>	<i>Proteín kinasa</i>
<i>RMA</i>	<i>Reacción de membrana acrosómica</i>
<i>SRI141716</i>	<i>Antagonista selectivo del receptor canabinoide CB1R</i>
<i>STR</i>	<i>Coefficiente de rectitud</i>
<i>SYBR14</i>	<i>Fluoróforo (tinción)</i>
<i>TRPV1</i>	<i>Receptor de potencial transitorio V1</i>
<i>TTO</i>	<i>Tratamiento</i>
<i>V1</i>	<i>Vaniloide tipo 1</i>
<i>VAP</i>	<i>Velocidad media</i>
<i>VCL</i>	<i>Velocidad curvilínea</i>
<i>VSL</i>	<i>Velocidad lineal</i>
<i>WOB</i>	<i>Coefficiente de bamboleo</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Micro Molar</i>
$\mu\text{m/s}$	<i>Micrometro/segundo</i>
<i>M540</i>	<i>Meriocianina 540</i>
<i>8Br</i>	<i>8-bromo-adenosina-5'-monofosfato</i>

Introducción

El sector porcícola ha ido realizando importantes esfuerzos en términos del desarrollo de la productividad de la industria de la carne de cerdo, buscando mejorar su competitividad al interior de la cadena productiva, con miras a fortalecer su participación en el mercado interno y crear opciones en el mercado externo de proteína animal. Esto se ha visto reflejado en el crecimiento del sector, los avances en la tecnificación de las explotaciones porcícolas y en el mejoramiento de los parámetros productivos, dando como resultado un producto de excelente calidad, contribuyendo en un aumento del consumo de carne de cerdo (Asociación Colombiana de Porcicultores - Fondo Nacional de la Porcicultura, 2016).

A pesar de casi 40 años de investigación en la congelación de semen porcino, los resultados de fertilidad no son suficientemente satisfactorios para uso comercial debido a que no ha alcanzado los resultados obtenidos con semen refrigerado (Williams S., et al., 2015). No obstante los adelantos logrados en materia de congelación de semen en mamíferos, la congelación de semen porcino, pese a sus potenciales bondades, es aun hoy un proceso ineficiente dada la elevada sensibilidad de estas células espermáticas a las bajas temperaturas de congelación y al tiempo y temperatura de descongelación (Williams S., et al., 2015).

La inseminación artificial con semen congelado como técnica reproductiva aporta una serie de ventajas, tales como: una amplia difusión del material genético del verraco seleccionado que alcanza para inseminar un mayor número de hembras (Gadea, J., 2004; Yeste, M., 2015); se evalúa continuamente la capacidad de los verracos de producir espermatozoides de calidad suficiente para asegurar la fecundación; se puede mejorar el control de los resultados reproductivos de la explotación; disminución en el número de

verracos por hembra, por tanto se reduce los costos de adquisición, alojamiento, alimentación, etc., ese dinero ahorrado puede ser destinado a la compra de verracos de mejor calidad genética; permite el intercambio de material genético a larga distancia y durante un periodo muy largo (años); creación de bancos genéticos, de interés evidente en el caso de la conservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o extirpes de especial interés (Thilmant, 2010; Williams S., et al., 2015; Yeste, M., 2015).

No obstante, la inseminación con semen congelado es muy limitada, no más del 1% de las inseminaciones realizadas a nivel mundial usan este tipo de semen mientras el 99% de las restantes, son realizadas con semen preservado de 15 a 18°C en forma líquida (Williams S., et al., 2015). Históricamente, a nivel mundial, el uso del semen congelado ha permanecido muy bajo. De menos del 0,5% en 1985 a aproximadamente 1% a principios de siglo, no obstante se vislumbra un enorme potencia (Bailey, et al., 2008). Hoy en día se ha alcanzado mejoras en los resultados en el porcentaje de parición (81,1%) y lechones nacidos totales ($13,0 \pm 4$), llegando a ser cerca de los resultados con semen refrigerado (81,1% y $13,8 \pm 3,6$) (Didion, Braun, & Duggan, 2013). Por esto existe un enorme interés por parte de las empresas genéticas en el logro de mayores desarrollos de esta biotecnología [Revisado por (Saravia, 2008); Knox, 2016)]. El principal factor que ha frenado la expansión de esta biotecnología es la disminución significativa de la vida media de los espermatozoides congelados/descongelados (Ramíó, et al., 2008), lo cual se traduce en tasas de preñez de 70-80% en condiciones de apareamiento controlado, cuando las logradas con inseminación artificial con semen líquido refrigerado son de más del 90% (Bolarín, et al., 2006; Eriksson, Petersson & Rodriguez-Martinez, 2002; Williams S., et al., 2015). Otro factor en contra de esta aplicación biotecnológica es el menor tamaño de camada obtenido, siendo de 1 a 3 lechones menos que los obtenidos cuando el semen líquido refrigerado es usado (Almlid & Hofmo, 1996; Williams S., et al., 2015).

Uno de los problemas que se presenta al congelar semen porcino es la presencia en la membrana plasmática del espermatozoide de una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, una menor relación colesterol:fosfolípidos y una mayor relación

fosfolípidos:proteínas, lo que hace de la membrana celular del espermatozoide porcino una de las más sensibles al enfriamiento entre las especies domésticas (Williams S., et al., 2015). La desestabilización de la membrana plasmática y la capacitación prematura de los espermatozoides, son los signos derivados del enfriamiento y la congelación que más se han documentado (Cerolini, et al., 2001). Los endocannabinoides están presentes en el organismo tanto en el macho como en la hembra para prevenir la capacitación prematura de los espermatozoides antes de llegar al oviducto (istmo), en donde se debe realizar este proceso (Bernabò, et al., 2012) Un espermatozoide se debiera capacitar una vez se ubica en el oviducto (istmo) (Sansegundo, 2008), poco antes o durante la ovulación. La capacitación prematura del espermatozoide como consecuencia del enfriamiento y/o los radicales libres, conlleva a reacciones acrosomales espontáneas, al acortamiento de la vida media del espermatozoide y en consecuencia a la disminución de su capacidad fecundante (Bailey, et al., 2008).

En cuanto al efecto regulatorio ejercido por los endocannabinoides sobre la capacitación de espermatozoides, existen varios reportes relacionados con la temática. El primer trabajo relacionado específicamente con el efecto regulador negativo de los endocannabinoides sobre movilidad (Rossato, 2008) y la capacitación de los espermatozoides porcinos fue publicado en 2005 (Maccarrone, et al., 2005). Aunque las publicaciones relacionadas con las funciones de los endocannabinoides sobre la fisiología reproductiva son crecientes (Grimaldi, et al. 2009; Talevi, et al., 2010; Francavilla, et al., 2009; Gervasi, et al., 2009; Taylor, et al., 2007; Rossato, 2008; Aquila, et al., 2010; Aquila, et al., 2010 a).

En la última década se ha producido un aumento significativo en la evaluación del papel de los endocannabinoides en la regulación de la reproducción de los mamíferos, se ha identificado diferentes receptores específicos para los endocannabinoides y la demostración que la mayoría de especies pueden producir diferentes endocannabinoides tales como la anandamida (AEA) (Rossato, 2008).

La acción biológica de la AEA está controlada a través de mecanismos celulares que aún no se han caracterizado totalmente. En los últimos años la AEA ha emergido como un

actor esencial en la participación de la supervivencia de los espermatozoides, movilidad, capacitación y reacción acrosómica (Maccarrone, 2009 a).

El espermatozoide para adquirir la capacidad de fertilización después de ser eyaculado, debe someterse a cambios bioquímicos, procesos que implica la modificación de iones intracelulares (Macarrone, 2009 a), morfológicos (remodelación lipídica de la membrana plasmática). Así mismo, es necesario que haya una fluidez de la membrana plasmática, metabolismo y movilidad (Macarrone, 2009 a), eventos conocidos como capacitación (Rossato, 2008). La capacitación se da por cambios ocurridos en dos sitios: 1) en la cabeza del espermatozoide que le permite unirse a la zona pelúcida e induce la reacción del acrosoma; y 2) en el flagelo, donde se facilita la motilidad hiperactivada del espermatozoide (Wang, et al., 2006). Se ha evidenciado que estos procesos son inhibidos por los endocannabinoides a través de la de la activación de receptores CB1R y TRPV1 en el espermatozoides (Macarrone, 2009). Rossato (2008) ha demostrado que la AEA induce disminución de la actividad mitocondrial del espermatozoide (Rossato, et al, 2005, Macarrone, 2009 a), afectando la movilidad del espermatozoide sin afectar la viabilidad de éste.

En el presente trabajo se buscó identificar el efecto de la AEA para inhibir la capacitación prematura de los espermatozoides porcino post descongelación, permitiendo así aumentar su viabilidad e integridad de membranas del espermatozoide durante el proceso de congelación, utilizando tres diferentes concentraciones.

Como objetivo general fue evaluar comparativamente tres concentraciones de AEA en relación con su efecto sobre la inhibición de la capacitación de los espermatozoides porcinos sometidos a congelación.

Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la AEA sobre la capacitación prematura de los espermatozoides porcinos post descongelación.

- ✓ Determinar el efecto de la AEA sobre la integridad de membrana plasmática en espermatozoides porcinos post descongelación.
- ✓ Medir el grado de capacitación en espermatozoides porcinos post descongelación tratados o no con AEA mediante:
 - Integridad de la membrana plasmática (IMP),
 - Capacitación espermática
 - Hipermovilidad del espermatozoide
 - Reacción de membrana acrosómica (RMA)
 - Funcionalidad de Membrana por medio del test hipo osmótico (HOST)

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Espermatozoide

Gameto masculino, el cual a través de cambios originados desde una célula somática (célula primordial germinal o espermatogonia) se convierte en una célula especializada (espermatozoide) capaz de fecundar un ovocito (De Jonge & Barratt C, 2006) (Figura 1.1).

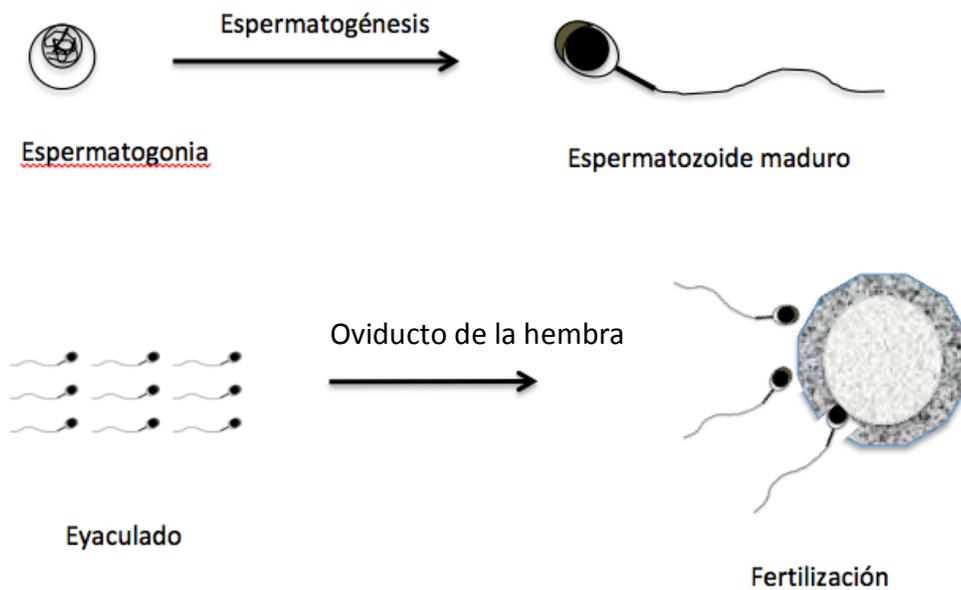


Figura 1.1. Paso de una espermatogonia a espermatozoide maduro durante su proceso espermatogénico, logrando ser capaz de fertilizar el ovocito dentro del oviducto de la hembra.

1.1.1 Estructura Espermática

Durante la espermatogénesis se da el reordenamiento de las estructuras de la célula para transformarse en un espermatozoide. El espermatozoide está formado por cabeza y cola o flagelo y ambas están cubiertas por una membrana plasmática (De Jonge, & Barratt, 2006).

En la cabeza encontramos el acrosoma, necesario para penetrar el ovocito cuando reacciona y el núcleo, el cual lleva el material genético transferido por el macho.

La cola se divide en tres porciones: la pieza intermedia en donde se ubican las mitocondrias encargadas de generar el movimiento del espermatozoide, la pieza principal y pieza terminal encargados de dar la dirección del espermatozoide al momento de moverse (Barth & Oko, 1989).

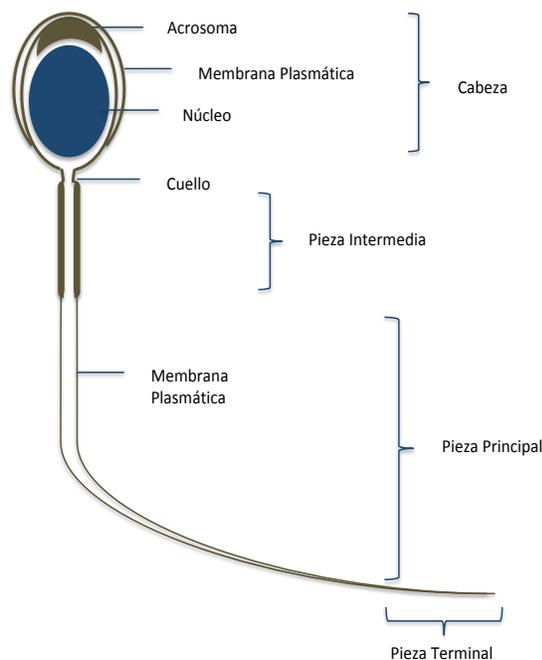


Figura 1.2 Estructura espermática: Compuesto de cabeza en donde encontramos el núcleo y el acrosoma; el cuello que es la unión de la cabeza con el flagelo o cola; la pieza intermedia compuesta por las mitocondrias encargadas de generar el movimiento del espermatozoide; la pieza principal y pieza terminal encargadas de dar la dirección durante el desplazamiento del espermatozoide.

1.1.2 Membrana Plasmática y Membrana Acrosomal

Los espermatozoides de los mamíferos eutarianos poseen una membrana plasmática que recubre su cabeza y cola (De Jonge, & Barratt, 2006). La membrana plasmática es un sistema sofisticado y organizado que incluye diferentes dominios (Toshimori, 2009; Toshimori, 2011). En esta membrana hay una variedad de funciones moleculares que juegan un papel importante en los eventos que conllevan a la fertilización (Thosimori, 2011).

Ambas membranas están formadas por proteínas lípidos activos, capaz de responder a ciertas señales permitiendo modificar las funciones del espermatozoide. Una de estas funciones es la reacción acrosómica, es un evento que ocurre cuando se da la unión del espermatozoite con el ovocito, permitiendo que el espermatozoide penetre sus capas. (Rios, et al., 2010)

En la figura 1.3 observamos la ubicación en la cabeza de la membrana plasmática y acrosomal.

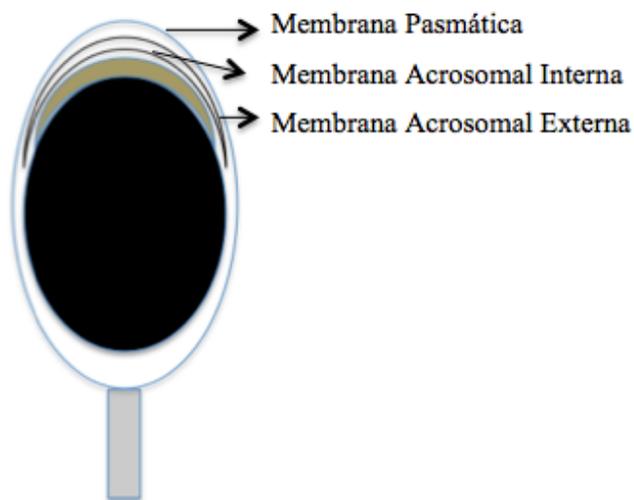


Figura 1.3 Ubicación de la membrana plasmática y acrosomal en la cabeza del espermatozoide.

1.2 Maduración Espermática

Los espermatozoides de mamífero se someten a modificaciones morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e inicialmente en el testículo (maduración testicular) y más tarde en el epidídimo (maduración del epidídimo) (Toshimori, 2003; Dacheux, Gatti & Dacheux, 2003). Estos cambios madurativos son proporcionales a los eventos funcionales que se producen en el desarrollo de las células germinales y la maduración de espermatozoides. El último paso de la maduración espermática se lleva a cabo en él a lo largo de los túbulos del epidídimo donde hay funciones de secreción y reabsorción muy activas, siendo capaz de crear cambios secuenciales en la composición del fluido luminal produciendo cambios en el espermatozoide, hasta llevarlo a su total maduración (Dacheux, Gatti & Dacheux, 2003). Varios pasos de los procesos de maduración en la membrana plasmática del espermatozoide están mediadas por enzimas y secreciones externas derivadas del epitelio de revestimiento del tracto genital. La degradación de algunas de las proteínas constituyentes y la eliminación de los espermatozoides defectuosos son controlados por el sistema de degradación. Estas modificaciones son necesarias para la maduración de espermatozoides para convertirse en células competentes para fertilizar (Toshimori, 2003).

1.3 El Eyaculado

El eyaculado del reproductor porcino se compone de espermatozoides (fracción rica) que provienen de la cola del epidídimo y de plasma seminal (fracción pobre) proveniente de las glándulas sexuales accesorias. Durante la recolección del semen, el eyaculado se realiza en varias fases. La primera fase proveniente de las glándulas accesorias, principalmente las bulbouretrales, su función es limpiar el conducto uretral, la cual no se recoge debido a que es una porción contaminada y sin espermatozoides, la segunda fase es espermática y secreciones de las vesículas seminales y próstata, la tercera fase es proveniente de las glándulas sexuales accesorias principalmente de la próstata y vesículas seminales y contiene pocos espermatozoides (Saravia, 2008; Rodríguez-Martínez, et al., 2011).

1.3.1 Plasma Seminal

El plasma seminal se obtiene de las glándulas sexuales accesorias, su contenido proporciona fructosa, péptidos, proteínas, prostaglandinas, entre otros (Cotton & Fisher, 2015). El plasma seminal tiene una participación del 95% del volumen del eyaculado (Saravia, 2008). Las proteínas del plasma seminal tienen una amplia acción, y algunos parecen responsable de establecer la viabilidad y fertilidad del espermatozoide (Rodríguez-Martínez, et al., 2011).

1.3.2 Espermatozoides

Los espermatozoides eyaculados son los que se encuentran almacenados en la última porción del epidídimo (cola del epidídimo). Están presentes en la segunda fracción del eyaculado (Rodríguez-Martínez, et al., 2011), denominada como fracción rica de espermatozoides.

1.4 Evaluación Espermática

La evaluación espermática es importante para determinar de cierta forma la calidad y viabilidad de los espermatozoides para llegar a fertilizar. Tradicionalmente la calidad del semen ha sido evaluada por medio del espermograma clásico, basado en el análisis macroscópicos (volumen, color, olor, pH) y microscópicos (Gadea, 2001; Gadea, 2008; Saravia, 2008; Acosta, J., 2005). Se realiza evaluaciones rutinarias en donde se mide:

- Evaluación del volumen y concentración espermática.
- Evaluación de la movilidad y desplazamiento del espermatozoide.
- Evaluación de la morfología por medio de tinción espermática donde se determina el porcentaje de espermatozoides normales.

1.5 Capacitación Espermática

El espermatozoide porcino, como la mayoría de los espermatozoides de euterianos, no tienen la capacidad de fertilizar inmediatamente después de ser eyaculados. Para poder fertilizar, los espermatozoides requieren de un periodo de permanencia en el tracto reproductivo femenino por algunas horas antes de la ovulación. Durante este periodo de permanencia los espermatozoides sufren unas modificaciones fisiológicas y ultraestructurales como parte de un proceso al que se le ha llamado capacitación y el cual finalmente los habilita para fertilizar a un oocito ovulado (Austin, 1952; Chang, 1951; Rossato, 2008).

Los principales signos de capacitación son el remodelamiento de la superficie de la célula espermática y la hiperactivación de su movilidad. Dentro de los cambios en la arquitectura de la membrana espermática se encuentran:

- La aparición en el área de la zona apical de microdominios de lípidos similares (balsas lipídicas o parches), altamente enriquecidos con proteínas necesarias para la unión a la zona pelúcida y para la reacción acrosomal (Boerke, et al., 2008; Khalil, et al., 2006; Shadan, et al., 2004). La asociación glicoesfingolípidos-colesterol encontrada allí está involucrada con vías transduccionales específicas (Buffone, et al., 2009; Tanphaichitr, et al., 2007).
- La activación de las enzimas que “desestabilizan” la membrana (flip-flop) las cuales hacen que:
 - i) Se pierda la normal asimetría transversal de los fosfolípidos de la membrana con la consecuente exposición de la fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina en la cara externa de la bicapa lipídica (Harrison & Gadella, 2005),
 - ii) Se facilite la remoción del colesterol por parte de la albúmina (Flesch, et al., 2001).

- iii) Se facilite la entrada de calcio (Córdoba, et al., 1997; Zhou, et al., 1990; Tanja & Sabine, 2007; Baldi, et al., 1991; Breitbart, 2002; Collin, et al., 2000).
- La exposición de los espermatozoides a moléculas capacitantes (bicarbonato, calcio, albúmina o lipoproteínas de alta densidad –HDL), causan la salida de colesterol, activación del eje AMPc-PKA y fosforilación de residuos de tirosina (p-Y) en proteínas específicas ricas en este aminoácido (Travis & Kopf, 2002; Visconti et al., 1999). Corriente abajo el efecto se caracteriza por desorganización y desestabilización de la membrana con el consecuente aumento de su fluidez, disminución de su permeabilidad y aumento de su fusogenicidad (entre membrana plasmática y membrana acrosomal externa). La fosforilación de las proteínas (Dube, et al., 2003; Krapf, et al., 2010; Morgan, et al., 2008; Satorre, et al., 2007; Satorre, et al., 2009; Visconti, 2009) la pérdida de la asimetría transversal (exposición externa de fosfatidilserina) (Boarelli, et al., 2007; Flesch, et al., 2001; Saravia, et al., 2007), la pérdida de la homogeneidad externa (formación y reorganización de balsas lipídicas) (Van Gestel, et al., 2005; Cross, 2004; Selvaraj, et al., 2007) y el aumento de la permeabilidad (aumento intracelular de calcio) (Córdoba, et al., 1997; Zhou, et al., 1990; Tanja & Sabine, 2007; Baldi, et al., 1991; Breitbart, 2002; Collin, et al., 2000), son considerados marcadores moleculares de la capacitación.
 - La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional que le permite a la célula regular varios procesos celulares. El espermatozoide maduro es altamente compartimentalizado, transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar nuevas proteínas. Por lo tanto, la modificación de proteínas ya existentes es un importante medio para modificar la función espermática (Grasa, et al., 2009). En varias especies, incluyendo el ratón (Visconti, et al., 1995), el humano (Luconi, et al., 1996), los bovinos (Galantino-Homer, et al., 1997) y los cerdos (Flesch, et al., 1999) ha sido bien documentado que la capacitación parece estar asociada con la fosforilación de tirosinas de proteínas espermáticas. En cerdos, la fosforilación de tirosinas de una o más proteínas con masas moleculares de 32 KDa podrían estar asociadas con la capacitación (Tardif, et al., 2001; Dube, et al., 2003).

1.6 Reacción Acrosómica

El espermatozoide alcanza su total madurez al tener la cualidad de capacitarse, indicando su preparación para realizar su reacción acrosómica cuando esté en contacto con la zona pelúcida del ovocito (Florman, Jungnickel & Sutton, 2008; Young, et al., 2009). Las moléculas presentes en el acrosoma generan una respuesta fisiológica adecuada para el reconocimiento entre el espermatozoide y el ovocito, logrando así producirse la reacción acrosómica. (Ríos, et al., 2010; Tanphaichitr, et al., 2007). A nivel morfológico el acrosoma contiene enzimas hidrolíticas, capaz de producir una exocitosis la cual es regulada por el metabolismo de fosfoinosítidos, Ca^{++} , entre otros, generando una fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, quedando la membrana acrosomal interna como la nueva membrana acrosomal, en el proceso se forman unas vesículas encargadas de liberar su contenido enzimático a medida que penetra la zona pelúcida del ovocito (Ríos, et al., 2010; Tanphaichitr, et al., 2007).

Una cascada de acontecimientos ocurre cuando se da la reacción acrosómica, en donde uno de ellos es la entrada de Ca^{++} provocando un aumento de Na^+ intracelular y la salida de H^+ , dando como resultado un aumento en el pH intra acrosomal, activándose determinadas enzimas necesarias para traspasar la zona pelúcida del ovocito (Ríos, et al., 2010; Darszon, et al., 1999)

1.7 Integridad de membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática es importante no solo para garantizar el metabolismo de la célula espermática, sino que los cambios que ocurre en ella son necesarios para el proceso de fecundación (Gadea, 2008; Rubio-Guillén, Quintero-Moreno & González-Villalobos, 2009; Rios, et al., 2010). Entre las funciones principales de la membrana plasmática, está la de poseer fluidez (Macarrone, 2009 a). El proceso al que se somete el espermatozoide de congelación – descongelación afecta la integridad de la membrana (Rubio-Guillén, Quintero-Moreno y González-Villalobos, 2009).

Para la medición de la integridad de membranas se han utilizado varios métodos como las tinciones vitales como la eosina – nigrosina (Gadea, 2008), en donde solo se tiñen los espermatozoides que tienen su membrana plasmática dañada y tinciones fluorescentes como el SYBR14-PI, actuando como indicador de la integridad de la membrana plasmática, el SYBR14 tiñe de verde las cabezas de espermatozoides cuando la membrana es íntegra es permeable y el PI tiñe de rojo la cabeza del espermatozoide cuando la membrana plasmática está dañada (Medrano & Holt, 1998; Nagy, et al 2003).

1.8 Funcionalidad de membrana plasmática

La integridad funcional y estructural de la membrana plasmática espermática es crucial para la viabilidad de los espermatozoides (Lechniak, Kedzierski, & Stanislawski, 2002; Rubio-Guillén, et al., 2009).

Para analizar la funcionalidad de las membranas se han desarrollado diversas técnicas entre las que se encuentran el test de endósmosis o hiposmótico (Gadea, 2008). La evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática se realiza por medio del principio del HOST, se basa en el transporte de agua a través de la membrana de cola de los espermatozoides bajo condiciones hipo osmóticas. La prueba permite evaluar el estado funcional de la membrana de esperma, al estar la membrana funcional ocurre una expansión esférica de la membrana que cubre la cola y esto hace que el flagelo reaccione provocando que se enrolle (Lechniak, Kedzierski, & Stanislawski, 2002; Gadea 2008). La capacitación implica varios cambios como la eliminación de las moléculas que recubren la membrana de la cabeza del espermatozoide, los cambios en la fluidez de la membrana y la concentración de iones intracelular (Green & Watson, 2001). Por lo tanto la integridad de la membrana, así como su funcionalidad puede verse afectada por el proceso de congelación y descongelación como lo demuestra Harrison, Ashworth & Miller (1996).

1.9 Hiperactivación Espermática - Análisis Espermático Por CASA

En cuanto al otro signo relacionado con la capacitación, la hiperactivación, se propone que es disparada por el aumento del calcio en el interior de la célula espermática (Suarez, Vincenti, & Ceglia, 1987; Marquez, Ignatz, & Suarez, 2007; Xia, et al., 2007; Ren & Xia, 2010; Harayama, H., 2013). Un espermatozoide hiperactivado se caracteriza por su batido flagelar asimétrico y de mayor amplitud y su desplazamiento progresivo (Suarez, 2008; Suarez, et al., 1992; Schmidt & Kamp, 2004; Kay & Robertson, 1998; Harayama, 2013). Estas tres condiciones son necesarias para que el espermatozoide se libere del epitelio del reservorio espermático en el itsmo, ascienda nadando por el moco oviductal hasta la unión itsmo-ampular (Rodríguez-Martínez, 2007; Harayama, 2013) y una vez frente al ovocito maduro, penetre su cúmulo oophorus y finalmente su zona pelúcida (Suarez, 2008). La movilidad espermática, no obstante las posibles inconsistencias (Rodríguez-Martínez, 2006), es el parámetro más frecuentemente usado para medir la viabilidad de un eyaculado o el potencial fértil de una muestra de espermatozoides (Rodríguez-Martínez, 2006; Tomlinson, Kessopoulou & Barratt, 1999). La población espermática total presente en el eyaculado de cerdo es muy heterogénea en cuanto a movilidad (Abaigar, et al., 1999; Abaigar, Barbero & Holt, 2005; Harayama, H., 2013), lo cual permite subdividirla, según este parámetro, en diferentes subpoblaciones (Ramíó, et al., 2008).

En la mayoría de los casos la determinación, cuantificación y análisis de la movilidad se realiza mediante un examen visual subjetivo. Aunque es un método práctico, barato y rápido y con una correlación probada con la fertilidad, los resultados obtenidos son contradictorios (Tardif, et al., 1999; Sellés, et al., 2003) y variables (Popwell & Flowers, 2004; Gadea, Sellés & Marco, 2004). La Medición de la movilidad está sujeta a gran variación intra e inter observadores. Aunque el análisis espermático asistido por computador (CASA) no está exento del todo de estos sesgos comunes (Amann & Katz, 2004; Mortimer, 2000) y otros exclusivos (Katkov & Lulat, 2000), se ha reconocido su gran utilidad sobre todo cuando se trata de determinar el grado de cambio en la movilidad

de una población espermática bajo procesamiento (antes/después) discriminado inclusive por subpoblaciones (Suarez, 2008).

1.10 Movilidad Espermática - Análisis Espermático Por Computador

El CASA adelanta sus evaluaciones con base en los parámetros de la cinética de espermatozoides individuales reconstruidos a partir únicamente del movimiento de sus cabezas. La instrumentación del CASA usualmente no permitía el análisis del movimiento flagelar producto de la hiperactivación espermática (Mortimer, 1997), hoy en día se ha mejorado el sistema permitiendo identificar la cinética espermática (Amann & Waberski, 2014). Adicionalmente, un umbral mínimo para la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza también debe ser programado el cual se relaciona con la distancia recorrida por la cabeza del espermatozoide en su movimiento lado a lado a medida que este avanza y se considera como una medición indirecta de la amplitud del batido flagelar (Suarez, 2008). Una vez definidos y programados los valores umbrales para diferenciar entre espermatozoides hiperactivados y no-hiperactivados es posible determinar cuáles de ellos lo están mediante la cuantificación con el CASA del desplazamiento lateral de sus cabezas, velocidad curvilínea, linealidad y bamboleo (Schmidt & Kamp, 2004). Otra ventaja final atribuida a esta ayuda diagnóstica asistida por computador es que puede medir detalladamente estos parámetros en cientos de espermatozoides simultáneamente en menos de un minuto.

1.11 Crio-capacitación

Los procesos de refrigeración y congelación inducen en los espermatozoides cambios similares a la capacitación los cuales se cree son responsables de su reducida vida media y en consecuencia de su reducida capacidad fertilizante (Cormier, et al., 1997; Bailey, Bilodeau, & Cormier, 2000; Maxwell & Johnson, 1997). Los Espermatozoides

congelados/descongelados no requieren de periodos de incubación preliminar para adquirir la capacidad fertilizante (Fuller & Whittingham, 1996), sufren fácilmente reacción acrosomal (Clarke & Johnson, 1987; Gillan, et al., 1999) y exhiben una vida media acortada en tracto reproductivo femenino.

Dependiendo del método usado para evaluar la capacitación, estos cambios pueden o no pueden ser detectados. Peña, et al., (2004) y Green & Watson (2001) encontraron que aunque la congelación-descongelación no incrementó los espermatozoides capacitados (basados en la prueba de Merocianina-540) (Peña, et al., 2004; Green & Watson, 2001), los cambios en la concentración intracelular de calcio si fueron similares a los observados en la capacitación espermática (Green & Watson, 2001). Un enfriamiento moderado de los espermatozoides (a 10°C) acelera los signos de capacitación en cuanto a la respuesta a los ionóforos (Petrunkina, et al., 2005). En esas células desestabilizadas en donde las modificaciones de la membrana plasmática y la entrada de calcio suceden muy rápidamente, la capacitación ocurre muy temprano seguida en consecuencia de degeneración de sus membranas antes de la unión con el ovocito (Petrunkina, et al., 2005a). Así, la vida media del espermatozoide congelado - descongelado una vez en el tracto reproductivo femenino es más corta que la de los espermatozoides depositados allí mediante un eyaculado fresco. Se estima que los procesos en los mejores protocolos de criopreservación preservan la sobrevivencia celular en un 50% (Holt & Medrano, 1997; Johnson, et al., 2000; Bailey & Cormier, 2000). A este proceso de capacitación irregular inducido por el enfriamiento se le conoce como “crio-capacitación” (Watson, 1995; Black, 2015).

1.12 La Anandamida: aspectos moleculares

La anandamida (araquidonoiletanolamida, AEA) pertenece a un grupo de los lípidos endógenos, que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, denominado colectivamente 'endocannabinoides' (Mechoulam, 2002; De Petrocellis, Cascio & Di Marzo, 2004). Une a receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2

(CB1R y CB2R), lo cual le confiere la capacidad de realizar múltiples y variadas acciones en el sistema nervioso central (Fride, 2002) y en el periférico (Parolaro, et al., 2002) sistemas nerviosos. La AEA ejerce su acción después de su captación por parte de la célula la cual se lleva a cabo mediante un transportador de membrana de AEA llamado AMT (AEA-membrane transporter -AMT) (Hillard & Jarrahian, 2003), seguido por la degradación a etanolamina y ácido araquidónico por la ácido graso amida hidrolasa (FAAH) (Bisogno, De Petrocellis & Di Marzo, 2002; Bracey, et al., 2002). Los receptores vaniloideos tipo 1 (ahora llamado receptores de potencial transitorio V1 o TRPV1), proteínas de seis pasos trans-membranales con sus terminales N y C intracelulares (Jordt & Julius, 2002), han demostrado ser activados por AEA (De Petrocellis, et al., 2001) por lo cual este lípido es considerado también un verdadero 'endovaniloide' (Van der Stelt & Di Marzo, 2004).

La AEA es sintetizada en huevos de erizo de mar (Bisogno, et al., 1997) y en los testículos de roedores, oviducto y útero (Schuel, et al., 2002a). Cabe destacar que el útero contiene los más altos niveles de AEA detectados en los órganos de mamíferos, incluyendo el cerebro (Paria y Dey, 2000). Por su parte, se ha demostrado que las células espermáticas del verraco tienen la NAPE-PLD, enzima sintetizadora de AEA (Okamoto, et al., 2004), y que, además, contienen AEA endógena.

En el pasado se ha demostrado que los testículos de rata sintetizan AEA (Sugiura, et al., 1996), compuesto que también se ha detectado en el plasma seminal humano a concentraciones nanomolares (Schuel, et al., 2002a). La presencia de los receptores CB1 en células de Leydig y su participación en la secreción de testosterona ha sido demostrada en ratones, mientras que se ha demostrado que las células de Sertoli de ratón también poseen receptores CB2, AMT y FAAH (Wenger, et al., 2001). Estos hallazgos han conducido a la hipótesis que la red endocannabinoide puede jugar un papel en la regulación de la fertilidad masculina (Maccarrone, et al., 2003). Se ha sugerido que la señalización asociada a la AEA regula las funciones de los espermatozoides necesarias para la fertilización en humanos (revisado en Schuel, et al., 2002b), tesis reforzada por los continuos hallazgos de CB1R en estas células (Rossato, et al., 2005).

La administración crónica a animales del principio activo de la cannabis, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, induce impotencia (Murphy, et al., 1994), reduce la producción y secreción de testosterona así como la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Hall & Solowij, 1998). La unión de AEA a un receptor CB presente en espermatozoides de erizo de mar ha demostrado reducir su capacidad de fertilización (Chang, et al, 1993; Schuel, et al., 1994), y homogeneizados de estos animales fueron capaces de convertir N-arachidonoyl-fosfatidiletanolamina (NArPE) en AEA (Bisogno, et al., 1997).

Se ha reportado que AEA reduce la motilidad del espermato humano mediante la reducción de la actividad mitocondrial, y que también inhibe la reacción del acrosoma inducida por la capacitación (Rossato, et al., 2005). Estos efectos de la AEA fueron impedidos por la SR141716, antagonista de la CB1R antagonista, lo que sugiere que la activación requiere CB1R (Rossato, et al., 2005).

En lo que a capacitación se refiere, la anandamida se considera inhibitoria. Espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de Met-AEA fallan en sufrir reacción acrosomal inducida por extractos de zona pelúcida. La capacitación, consistente en una serie de modificaciones funcionales y estructurales de la célula se caracterizan por un aumento en los niveles de AMPc intracelulares. La capacidad de bicarbonato para estimular de capacitación *in vitro* se ha relacionado con la activación de la adenilato ciclasa en la célula spermática (Chen, et al., 2000). Se sugiere que el efecto inhibitorio de Met-AEA sobre la capacitación depende de su capacidad para reducir los niveles intracelulares de cAMP, un efecto típico mediado por CB1R (Di Marzo, et al, 2002; Howlett, et al, 2002). Los efectos del antagonista selectivo SR141716 CB1R y del análogo permeable 8Br-AMPc apoyan la hipótesis de que la actividad de la AEA en la capacitación espermática está mediada por CB1R (Maccarone, et al., 2005). Estos últimos datos dan fondo bioquímico a las observaciones anteriores sobre espermatozoides humanos, cuya motilidad se reduce por Met-AEA (Schuel, et al., 2002), por Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Whan, et al., 2004) o por AEA (Rossato, et al ., 2005).

2 METODOLOGIA

2.1 Reproductores

Se utilizaron 12 verracos maduros entre 1 y 2,5 años de edad, de la líneas genética de Alimentos Cárnicos, con fertilidad probada en campo, mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo, alojados en corrales de 6 m², con disponibilidad de agua a voluntad y con alimento balanceado nutricionalmente para reproductores, ubicados en las instalaciones del Centro de Inseminación Artificial (CIA) de la granja porcícola La Genética, de la empresa Alimentos Cárnicos S.A.S., en la vereda El Chuscal del municipio de La Ceja, departamento de Antioquia.

2.2 Recolección y congelación de semen

El protocolo utilizado por la granja fue el propuesto por Peña et al. (2006). Se recogió a partir de la segunda fracción del semen eyaculado (rica en espermatozoides) hasta terminar su eyaculación, obteniéndose por el método manual (mano enguantada) y recibido en un recipiente termo aislado con filtro de tela no tejida. Se le hizo recolección de semen a 12 reproductores porcinos con fertilidad probada en campo. Los eyaculados para ser incluidos en el trabajo debieron cumplir con un mínimo de 70% de espermatozoides con movilidad individual (Saravia, et al., 2005), evaluado en el laboratorio del CIA y un 75% de espermatozoides normales (Saravia, et al. 2005) evaluado por medio de tinción de eosina-nigrosina. El eyaculado fue filtrado durante su recolección usando un filtro de tela no tejida. La concentración, fue estimada en una cámara de Bürker y la movilidad individual, fue estimada en porcentaje por un mismo observador utilizando un microscopio de luz dotado de platina térmica, fue determinada al momento de la recolección. El semen recolectado fue transportado en una nevera de termo regulada de Schipper ® a 15°C hasta el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia ubicada en la vereda el Tablacito del municipio de Rionegro, departamento de Antioquia. Luego de llegar el semen al Laboratorio de Reproducción Animal, la movilidad individual fue

estimada de nuevo a los de 60 minutos de estar en incubación en su plasma seminal a temperatura ambiente (20 – 22°C), la muestra se precalentó a 37°C para su evaluación de movilidad por medio del software CASA (HTM-IVOS versión 12.3 de HAMILTON THORNE), comprobando que no se afectó su movilidad inicial. El semen se diluyó en una proporción 1:1 con GOLD LIFE (diluyente comercial de Schipper ®) diluyente I (DI) a 20°C, se empacó en tubos cónicos de 50 ml, se llevó a incubación en una centrífuga refrigerada (ThermoFisher Scientific, Modelo Sorvall ST 16R, Germany) a 15°C por 3 horas, para luego ser centrifugado a 800 g / 10 minutos a 15°C (Saravia, et al., 2005; Gadea, et al., 2005; Matás, et al., 2007; Eriksson, & Rodriguez-Martinez, 2000).

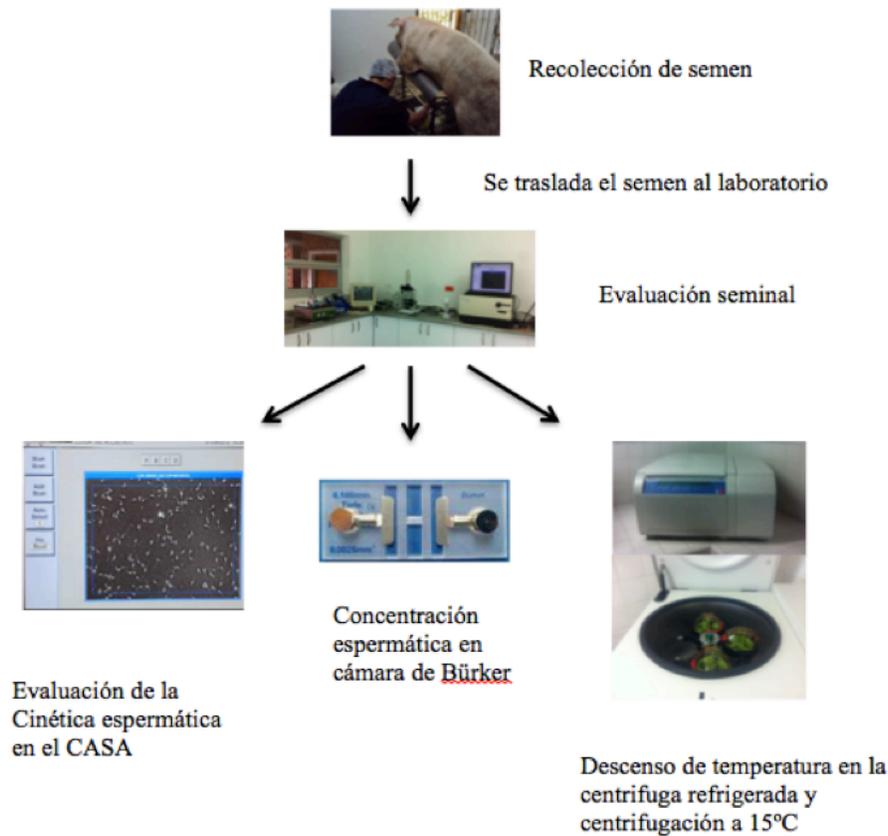


Figura 2.2.1. Proceso de recolección de semen, evaluación y centrifugación del semen.

2.2.1 Tratamientos con Anandamida

Luego de la centrifugación, el sobrenadante de los tubos se descartó y se midió su volumen y concentración espermática (Cámara de Bürker) para estimar la cantidad de espermatozoides descartados, que fue descontada de la población espermática inicial. El precipitado se diluyó con un segundo diluyente (DII: 80 ml (80% (v/v) 310 mM β -lactosa + 20 ml yema de huevo) en relación de una parte de semen por dos de diluyente (Saravia, et al., 2005). El semen diluido se dividió en cuatro alícuotas para ser suplementado así: tratamiento 1: control sin AEA; tratamiento 2: 1 μ M de AEA; tratamiento 3: 10 μ M de AEA; tratamiento 4: 100 μ M de AEA. A los 4 tratamientos se le adicionó 500 μ M de α – tocoferol como parte del diluyente de congelación (figura 2.2.1). Se realizó un segundo descenso de temperatura de 15°C a 5°C a razón de 0.2°C/minuto. Luego de alcanzar los 5°C el semen se diluyó con un tercer diluyente (D III) compuesto de 89.5 ml de DII + 9 ml glicerol y 1.5 ml Equex STM (Nova chemicals Sales Inc., Scituate, MA, USA, el cual es equivalente al Orvus Es Paste) en una proporción de dos partes de semen y una de DIII, para una concentración final de 3% de glicerol y a una concentración espermática final de 1×10^9 espermatozoides/ml (Saravia, et al., 2005; Gadea, et al., 2005), las alícuotas se empacaron en pajillas francesas IMV de 0.5 ml y selladas con ultrasonido (empacadora y selladora IMV, France) antes de iniciar el proceso de congelación a una temperatura de 5°C.

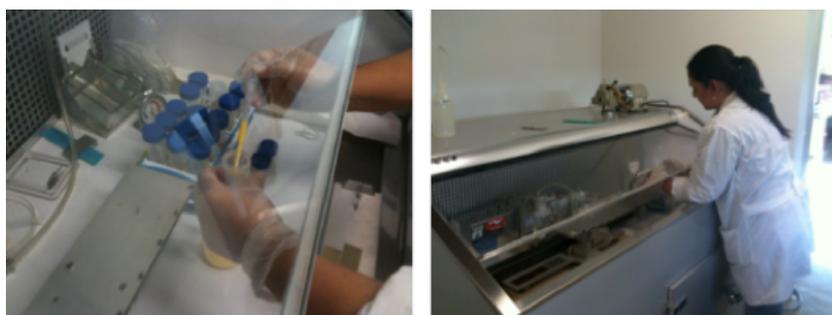


Figura 2.2.1.1. Adición a las alícuotas del eyaculado cada tratamiento de AEA (concentraciones: 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Alcanzado los 5°C se procede a empacar y sellar las pajillas.

2.2.2 Tazas de Enfriamiento

Cada tratamiento se sometió a enfriamiento entre 5°C y -5°C (figura 2.2.2) a una tasa de disminución de 3°C/minuto y entre -5°C y -120°C a una tasa de disminución de temperatura de 50°C/minuto, en vapores de nitrógeno utilizando una plataforma ubicada a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido, de acuerdo con la tasa de disminución de temperatura deseada. Las pajillas congeladas se dejaron estabilizándose durante cinco minutos a -120°C antes de sumergirlas en nitrógeno líquido a -196°C (Peña et al. 2006).



Figura 2.2.2.1. Descenso de temperatura en vapores de nitrógeno antes de ser sumergidos en el nitrógeno líquido.

2.2.3 Protocolo de Descongelación

La descongelación se realizó en un baño maría a 50°C por 12 segundos con el propósito de dar a la muestra una temperatura de 20°C a 25°C. Después del proceso de descongelación, las muestras se prepararon para las evaluaciones de movilidad individual, hipermovilidad, de vitalidad, vida media y estado de capacitación (integridad de membrana plasmática, funcionalidad de membrana de plasmática, reacción acrosómica y desorden de membrana lipídica) (Peña et al. 2006, Gadea, et al., 2005; Medina-Robles, et al., 2008).

2.3 Evaluación de la Movilidad

Las evaluaciones de movilidad individual pre y pos-descongelación se realizaron con el sistema de análisis espermático asistido por computador conocido como CASA (Hamilton Thorne semen analyser, HTM-IVOS versión 12.3, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, USA) dotado de platina térmica a 38°C. Para la evaluación de movilidad antes de la congelación se tomó una gota de semen diluido en DI, un volumen de 5 µL colocada en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos, ambos precalentados a 38°C. La evaluación pos-descongelación se realizó después de una semana de permanencia del semen dentro del contenedor a -196°C. El contenido de la pajilla descongelada fue colocada en tubos eppendorf precalentados a 38°C, se diluyó el semen en una proporción de 1:50 (1 µL de semen en 50 µL de DI) se dejó incubar a 38°C por 10 minutos (min). Se tomó como lectura el porcentaje total de movimiento (MT) y porcentaje de movimiento progresivo (MP).

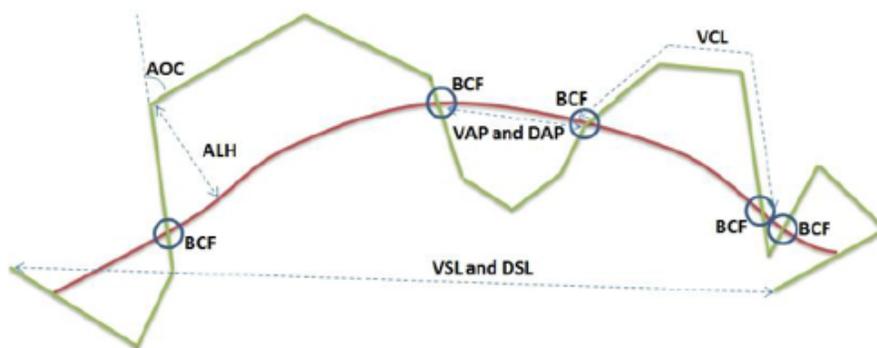
2.4 Hipermovilidad

Para la medición de la cinética pos-descongelación se usó el sistema de análisis espermático asistido por computador conocido como CASA (Hamilton Thorne semen analyser, HTM-IVOS versión 12.3, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, USA) (figura 2.4.1). Muestras de semen pos-descongelación de los respectivos tratamientos fueron incubadas a 38°C por 10 minutos luego de los cual una alícuota de 5 µL fue colocada sobre un portaobjetos atemperado a 38°C y cubierto con un cubreobjetos de 25 mm x 25 mm igualmente precalentado. Para este efecto se seguirá el procedimiento descrito por Ramió y colaboradores en 2008 (Ramió, L., et al., 2008).

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Velocidad curvilínea (VCL): la velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real (µm/s).

- Velocidad lineal (VSL): la velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta desde su primera a su última posición ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad media (VAP): la velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio ($\mu\text{m/s}$).
- Coeficiente de linealidad (LIN): $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$ (%).
- Coeficiente de rectitud (STR): $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$ (%).
- Coeficiente de oscilación (WOB): $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$ (%).
- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): promedio de los valores extremos (en el plano lateral) recorridos por la cabeza del espermatozoide en su cabeceo lado a lado en cada ciclo de batido (μm).
- Frecuencia del desplazamiento de la cabeza (BCF): frecuencia con la cual la trayectoria real del espermatozoide cruza el promedio del camino recorrido (Hz).



Fuente: Park, S. (2013).

Figura 2.4.1. Terminología estándar para las variables medidas por los sistemas de CASA.

2.5 Funcionalidad de la Membrana Plasmática

Se realizó la prueba de HOST (Test Hipo Osmótico), según lo descrito por Tartaglione y Ritta (2004). La solución consistió en una solución hipo osmótica de citrato de sodio (7.35

g / L, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y de fructosa (13,51 g / L, Sigma Chemical Co.), con una osmolaridad de 150 mOsm / L. La solución hipo osmótica final se llevó una osmolaridad final ajustada a 75 mOsm / L (Pérez-Llano, et al., 1998) mediante la preparación de diluciones seriadas, con un pH de 7,2. Para el semen descongelado se tomó 40 μ L de la muestra diluida en DI y mezclada en un tubo de 1,5 mL con 500 μ L de solución HOST, se incubó a 37°C por 15 minutos, un total de 200 espermatozoides por preparación se observaron en al menos cinco campos diferentes. En la figura 2.5.1 se toman como membrana plasmática funcional los espermatozoides que presenten las colas hinchadas y enrolladas.



Figura 2.5.1 Reacción del espermatozoide en un medio hipo-osmótico.

2.6 El análisis de citometría de flujo

Los análisis de citometría se realizaron en la Unidad de Citometría de la Universidad de Antioquia. La señal de fluorescencia se evaluó en el Citómetro de Flujo Coulter Epics XL. La fluorescencia fue medida para cada fluoroforo de acuerdo a sus características de excitación 488 nm (emisión, 525-625 nm en los canales FL-1, FL-2 y FL3) y los datos fueron analizados en el software WinMD 2.9. Siendo expresados como el porcentaje de

células positivas (marcadas) dentro del total de la población celular analizada (SIU, Laboratorio de Reproducción, Unidad de Citometría, Universidad de Antioquia, 2014).

2.6.1 Integridad de Membrana Plasmática

La integridad de la membrana plasmática (IMP) se evaluó con el kit comercial SYBR-14/PI (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit; Molecular Probes n° catálogo L7011 Eugene, OR, USA). El colorante SYBR-14 se acumuló dentro de las células vivas emitiendo fluorescencia verde y en las células afectadas, la membrana nuclear posibilita el paso del ioduro de propidio (PI), permitiendo que este agente intercalarte se uniera al DNA. La señal de fluorescencia se evaluó por citometría de flujo. Se tomaron aproximadamente 2×10^6 espermatozoides/mL, los cuales fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente con 3 μ L del colorante SYBR-14 (1:100) posteriormente se adicionó 1,5 μ L de PI y se incubó por 5 minutos. Los espermatozoides fueron lavados y llevados a un volumen final de 0.3 mL en PBS. La evaluación de la IMP se cuantificó como el porcentaje de células que se unían únicamente al SYBR-14 y emitían fluorescencia específica (SIU, Laboratorio de Reproducción, Unidad de Citometría, Universidad de Antioquia, 2014).

2.6.2 Capacitación espermática

La Merocianina 540 es un colorante hidrófobo que se puede emplear para controlar la modificación de composición de la fosfolípidos de la membrana plasmática, el aumento de la intensidad de fluorescencia está relacionado con el desorden de la membrana lipídica siendo un indicativo de la capacitación espermática (Harrison et al 1996; Gadella & Harrison, 2000). Para cada ensayo se tomaron aproximadamente 2×10^6 espermatozoides/mL a los que se les adicionó el 1 μ L del colorante Merocianina 540 de la solución stock 0.5mg/mL y fueron incubados por 20 minutos a temperatura ambiente (SIU, Laboratorio de Reproducción, Unidad de Citometría, Universidad de Antioquia, 2014)

2.6.3 Reacción de Membrana Acrosómica

Para detectar la reacción de membrana acrosómica (RMA) se utilizó el anticuerpo CD46 capaz de reconocer un antígeno de la membrana acrosómica interna de los espermatozoides. De cada tratamiento se tomaron aproximadamente 2×10^6 células espermáticas /mL, las cuales fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente con 10 μ L del anticuerpo monoclonal CD46-FITC (BD PharMingen San Diego, USA); los espermatozoides fueron lavados y llevados a un volumen final de 0.3 mL en PBS. Como control de la técnica se indujo la reacción acrosomal con 10 μ M de ionóforo de calcio A23187 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) por un período de incubación 3 horas a 37°C/5%CO₂. La evaluación de la RA se cuantificó como el porcentaje de células que se unieron al anticuerpo y emitían fluorescencia específica (SIU, Laboratorio de Reproducción, Unidad de Citometría, Universidad de Antioquia, 2014).

2.7 Diseño experimental

El eyaculado de cada reproductor fue diluido 1:1 con DI, se hizo descenso de temperatura a 15°C, en donde se centrifugó a 800 g x 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se adiciono el DII, luego de calcular la concentración de espermatozoides; se dividido en cuatro alícuotas en partes iguales, de las cuales 3 se les adicionó las diferentes concentraciones de AEA.

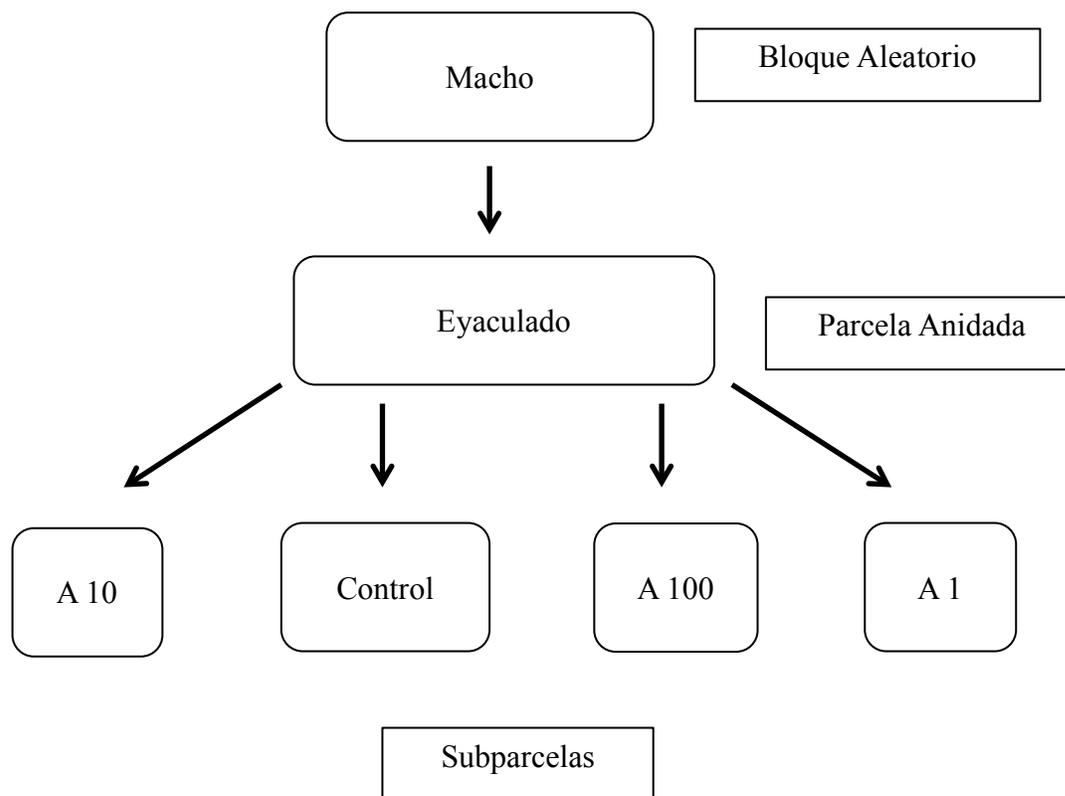


Figura 2.7.1. Diseño experimental

El diseño experimental correspondió a un diseño de bloques completos al azar, donde el macho actúa como bloque (aleatorio), cada eyaculado (aleatorio) actúa como una parcela anidada en cada bloque (macho) y como sub-parcelas están las porciones de cada eyaculado, las cuales se reparten al azar entre cada uno de los niveles del tratamiento de Anandamida y el control.

El modelo matemático usado fue:

$$X_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + E_{ij}$$

Donde:

Xij: Son las variables respuestas de la calidad espermática valoradas en MT, MP, IMP, HOST, NRA, NCAP, parámetros de velocidad (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB), parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza (ALH, BCF).

μ : Efecto de la media general.

Ti: Efecto del i-ésimo tratamiento (i = Control, A1, A10, A100)

Bj: Son los efectos del i-ésimo macho anidado en cada bloqueado dentro del i-ésimo tratamiento

Eij: Efecto del error experimental

2.8 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para identificar el efecto de las diferentes concentraciones de Anandamida sobre las variables dependientes planteadas, previa verificación de las presuposiciones de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas residuales utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y de Levenne, respectivamente; para el análisis se empleó el software del Sistema de Análisis Estadístico, versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008). El diseño del modelo utilizado fue el de bloques completos al azar, donde se bloqueó el efecto del macho, se utilizó el procedimiento GLM (Modelo Lineal General), considerando el efecto del tratamiento como variable independiente; se utilizó el test de medias de las diferencias entre los diferentes tratamientos, mediante el test Scheffe, para verificar las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Se realizó un análisis de Coeficientes de correlación Pearson entre las variables NCAP, NRA, HOST, IMP y el resto de las variables planteadas, usando el procedimiento Proc Corr, del software SAS mencionado anteriormente..

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los promedios obtenidos para MT y MP, la cinética del espermatozoide, HOST, NCAP, IMP y NRA (Tablas 1 y 2), se evaluaron en el semen congelado – descongelado de cada reproductor (12 reproductores) en cada uno de los tratamientos (4 tratamientos por reproductor), obteniendo los siguientes resultados:

No se encontró diferencia significativa entre la cinética espermática del semen congelación - descongelado entre cada uno de los tratamientos ($p > 0,05$) (Tabla 1). Según Juárez (2012), se clasifican como espermatozoides con movimiento rápido y progresivo aquellos que presentan las siguientes condiciones: $VSL \geq 40 \mu\text{m}/\text{seg}$, $LIN \geq 50\%$ y $STR \geq 75\%$; de otro lado se establece que espermatozoides con movimiento de hiperactividad, serán aquellos que presenten $VCL \geq 97 \mu\text{m}/\text{seg}$, $ALH \geq 3,5 \mu\text{m}/\text{seg}$ y $LIN \leq 35\%$ (Cremades, et al., 2005).

Comparando con los resultados obtenidos, encontramos que el VSL presenta valores mayores a $40 \mu\text{m}/\text{seg}$, la LIN es menor a 50% y el STR menor 75% , en cuanto a VCL, los valores fueron mayores que $97 \mu\text{m}/\text{seg}$, al igual que ALH y LIN, con valores superiores a $3,5 \mu\text{m}/\text{seg}$ y 35% , respectivamente.

Como se ha demostrado, la congelación - descongelación de semen porcino tiene un efecto negativo sobre la movilidad (Talebiyan, et al., 2015). Se ha documentado que el cambio en los parámetros de movimiento, lleva al espermatozoide a tener una baja viabilidad (Gadea, et al., 2005), debido a eventos fisiológicos producidos en el espermatozoide, probablemente por un aumento en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados durante el proceso de enfriamiento lento (de 15°C a 5°C) y puede estar relacionado con la extracción del plasma seminal y la desestabilización de la membrana plasmática, ocasionando un decrecimiento en la fluidez de la membrana plasmática, afectando su estructura y funcionalidad (Cremades, et al., 2005; Socol, et al., 2015).

Tabla 1. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de la AEA de semen congelado – descongelado en la cinética del espermatozoide.

CINETICA ESPERMATICA	TRATAMIENTO			
	A 1	A 10	A 100	CONTROL
% MT	69,33 (±19,48)	72,08 (±19,31)	60,83 (±18,99)	68,00 (±23,11)
% MP	30,41 (±14,61)	30,33 (±14,59)	24,25 (±19,00)	29,75 (±19,95)
% RAPIDO	39,50 (±14,87)	36,75 (±17,05)	32,41 (±22,02)	36,33 (±22,98)
% MEDIO	11,83 (±6,91)	15,83 (±9,59)	9,91 (±5,29)	11,41 (±4,33)
% LENTO	15,5 (±8,52)	19,33 (±11,41)	14,5 (±9,12)	16,91 (±12,10)
% ESTATICO	33,08 (±19,15)	28,00 (±19,22)	43,08 (±23,09)	35,08 (±22,80)
VAP $\mu\text{m/s}$	80,85 (±10,25)	77,00 (±10,66)	75,56 (±9,55)	72,11 (±12,30)
VSL $\mu\text{m/s}$	47,26 (±9,22)	50,53 (±14,36)	47,60 (±13,40)	43,78 (±9,23)
VCL $\mu\text{m/s}$	152,35 (±15,22)	137,12 (±17,84)	135,80 (±17,48)	137,03 (±26,98)
STR %	61,33 (±7,11)	65,50 (±10,27)	65,91 (±9,78)	63,25 (±0,98)
LIN %	34,08 (±6,48)	40,16 (±13,88)	41,00 (±12,24)	36,75 (±8,40)
WOB %	44,41 (±3,52)	44,41 (±2,71)	44,16 (±3,99)	43,41 (±1,72)
ALH $\mu\text{m/s}$	6,79 (±0,75)	7,04 (±1,06)	6,45 (±1,41)	6,79 (±2,97)
BCF Hz	38,51 (±3,74)	37,01 (±2,58)	53,90 (±3,10)	37,34 (±2,97)

AEA: Anandamida; A 1: Anandamida 1 μM ; A 10: Anandamida 10 μM ; A 100: Anandamida 100 μM ; %MT: %Movilidad Total; %MP: Movilidad Progresiva; VAP: la velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta desde su primera a su última posición ($\mu\text{m/s}$); VCL: velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real ($\mu\text{m/s}$); STR: Coeficiente de rectitud; LIN: Coeficiente de linealidad; WOB: Coeficiente de oscilación; ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: Frecuencia del desplazamiento de la cabeza. *Diferencia significativa, $p < 0,05$, **Diferencia muy significativa, $p < 0,01$

Talebiyan, et al. (2015) encontraron una reducción en la movilidad espermática al incrementar las concentraciones de AEA (10 nM a 1000 nM). Datos que no coincide con los encontrados en este trabajo, en donde no se encontró diferencias significativa en las concentraciones de AEA (1 μM , 10 μM y 100 μM) al evaluar la cinética espermática.

Se encontró diferencias muy significativas ($p < 0,01$) para la variable host entre los tratamientos (Tabla 2), a diferencia de Talebiyan, et al. (2015), que no encontró diferencia significativa entre las concentraciones de A10 nM y A100 nM para HOST, IMA y NCAP. Según Medeiros, et al. (2002), el proceso de criopreservación incrementa la capacitación y reacción acrosómica espermática, sin embargo, estas alteraciones afectan la capacidad fertilizante del espermatozoide aunque no afecta la movilidad.

Cambios en estos valores por encima o por debajo de los valores de referencia nos indica que tanto se está generando el proceso de crio-capacitación ocurrida en los espermatozoides congelados – descongelados (Cremades, et al., 2005).

Los resultados de la Tabla 2, indican que la A 1 y la A 100 tubo un efecto sobre la viabilidad espermática en cuanto al NRA y HOST. Sin embargo, los resultados obtenidos por Talebiyan, et al. (2015), no coinciden con lo encontrado en el presente estudio, ya que dichos autores, no encontraron que las diferentes concentraciones de AEA utilizadas en su trabajo afectara la viabilidad del espermatozoide congelado – descongelado.

Tabla 2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de la AEA de semen congelado – descongelado en las variables de viabilidad espermática.

TRATAMIENTO	VARIABLE			
	HOST	IMP	NCAP	NRA
A 1	50,16 ($\pm 9,12$) a	30,96 ($\pm 5,91$) a	74,59 ($\pm 4,32$) ab	86,08 ($\pm 2,89$) bc
A 10	44,83 ($\pm 8,68$) ab	28,61 ($\pm 5,92$) ab	74,14 ($\pm 5,20$) ab	87,57 ($\pm 4,08$) ab
A 100	39,08 ($\pm 11,69$) b	29,27 ($\pm 4,47$) ab	72,83 ($\pm 5,35$) b	88,62 ($\pm 4,23$) a
CONTROL	46,75 ($\pm 12,09$) a	27,61 ($\pm 5,07$) b	77,79 ($\pm 4,06$) a	85,44 ($\pm 3,07$) c

HOST: test de hipo-osmótico; IMP: integridad de membrana plasmática; NCAP: espermatozoides no capacitados y NRA: espermatozoides sin reacción acrosómica. A 1: Anandamida 1 μM ; A 10: Anandamida 10 μM ; A 100: Anandamida 100 μM . ^{a,b,c} Valores con diferentes letras indican diferencia muy significativa, $p < 0,01$.

Se ha documentado que durante el proceso de crio congelación se da cambios en los parámetros de integridad de membrana plasmática y acrosómica, llevando al espermatozoide a tener una baja viabilidad (Gadea, et al., 2005), provocando cambios en su estructura similares a la capacitación (Gadea, et al., 2005). Esto debido a las diferencias en la composición bioquímica de la membrana plasmática y específicamente en la relación de fosfolípidos y colesterol, dándole sensibilidad a los espermatozoides en los procesos de congelación. (Thurston et al., 2001).

Roca, et al. (2006), obtuvieron una IMP de $51,86 \pm 1,04\%$, valores muy por encima a los obtenidos en el presente trabajo en las diferentes concentraciones de AEA, datos que son similares a los obtenidos por Hernandez-Dominguez, A.K. (2013) de $28,92\%$. En cuanto a

HOST los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones de AEA fueron mayores a los obtenidos por Hernandez-Dominguez, A.K. (2013) ($24,59 \pm 1.18\%$).

Las estimativas de las correlaciones entre los parámetros de viabilidad espermática con la cinética de los espermatozoides congelados – descongelados (Tabla 3), fueron muy significativas ($p < 0,01$) en algunos casos y significativas ($p < 0,05$) en otros.

Tabla 3. Correlación entre la viabilidad espermática con la cinética espermática de semen congelado – descongelado.

	MT	MP	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	WOB	AHL	BCF
NCAP	0,238	0,449 **	0,260	0,348*	-0,017	0,297 *	0,316 *	0,249	-0,297 *	0,165
RA	-0,338 *	-0,466 **	-0,279	-0,302*	-0,146	-0,216	-0,144	-0,115	0,172	-0,286*
IMP	-0,243	-0,260	-0,097	-0,266	0,127	-0,282	-0,260	-0,048	0,346 *	-0,233
HOST	0,221	0,326 *	0,188	-0,047	0,497 **	-0,344 *	-0,436 **	0,013	0,422 **	-0,025

Valor de significancia * ($p < 0,05$). Valor de muy significativo ** ($p < 0,01$)

HOST: test de hipo-osmótico; IMP: integridad de membrana plasmática; NCAP: espermatozoides no capacitados y NRA: espermatozoides sin reacción acrosómica; MT: Movilidad Total; MP: Movilidad Progresiva; VAP: la velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio; VSL: velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta desde su primera a su última posición; VCL: velocidad media recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real ; STR: Coeficiente de rectitud; LIN: Coeficiente de linealidad; WOB: Coeficiente de oscilación; AHL: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: Frecuencia del desplazamiento de la cabeza.

Aquiles, et al. (2010 a), ha obtenido resultados donde muestra que la AEA tiene la capacidad de modular la supervivencia y la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide. La baja movilidad espermática que se produce luego de la congelación – descongelación está relacionada con una disminución en la fertilidad, convirtiéndose en un punto importante para buscar mejorar la movilidad de espermatozoides congelados – descongelados (Talebiyan, et al. 2015). A diferencia de Talebiyan, et al. (2015), se observó que con las concentraciones utilizadas de AEA los parámetros MT y MP fueron mejores para cada uno de los tratamientos. Cuando hablamos de la hiperactividad nos estamos referenciando en 3 parámetros, en donde encontramos valores por encima de la referencia de hiperactividad ($VCL \geq 97 \mu\text{m}/\text{seg}$, $AHL \geq 3,5 \mu\text{m}/\text{seg}$ y $LIN \leq 35\%$) (Cremades, et al., 2005), siendo diferente solo el %LIN para el tratamientos de A1 que fue menor. La

capacitación reduce la integridad de membrana plasmática (Lechniak, et al., 2002). Al relacionar estos datos con el efecto que tuvo el HOST, NCAP, NRA e IMP en cada uno de los tratamientos (sin observar diferencia significativa), observamos que hubo mejor comportamiento con A1.

Al correlacionar entre si las variables asociadas a la viabilidad (Tabla 4), se encontró una correlación negativa altamente significativa ($p < 0,01$) entre NCAP con IMP y NRA. La correlación de NRA es positiva y altamente significativa ($p < 0,01$) con IMP. No se encontró correlación entre HOST y los demás parámetros ($p > 0,05$). Estos resultados indican que es importante que los espermatozoides tengan la membrana plasmática intacta para que se de posteriormente la capacitación y reacción acrosómica del espermatozoide.

Tabla 4. Correlación entre las variables asociadas a la viabilidad del espermatozoide de semen congelado – descongelado

	HOST	IMP	NRA	NCAP
HOST	1	0,28345	-0,09971	-0,10075
IMP		1	0,48695**	-0,64119**
NRA			1	-0,66356**
NCAP				1

Valor de significancia * ($p < 0,05$). Valor de muy significativo ** ($p < 0,01$)

HOST: test de hipo-osmótico; IMP: integridad de membrana plasmática; NCAP: espermatozoides no capacitados y NRA: espermatozoides sin reacción acrosómica

En el análisis de correlación (Tabla 4) de los parámetros de viabilidad espermática, se observó que el HOST no tiene relación con NCAP, NRA e IMP, pero si hay una correlación entre estas tres. Se considera que la integridad de la membrana plasmática y acrosomal permite al espermatozoide lograr llegar a capacitarse y tener reacción acrosómica al momento de la fertilización del ovocito. El estado fisiológico de los espermatozoides, evaluado por la movilidad, la integridad del acrosoma y la unión a la zona pelúcida, es importante para predecir si estas células pueden someterse a la fertilización. (Battista, et al., 2008). La correlación que hay entre el HOST con MP, VCL, LIN y AHL, nos muestra que es fundamental que el espermatozoide tenga una membrana madura, funcional y fluida dado por una serie cambios en la estructura de la membrana

para favorecer el intercambio de iones y generar los cambios de movilidad en el espermatozoide (Gervasi, 2013). Para NCAP la correlación con MP, VSL, STR, LIN y AHL, nos indica que la variación de estos parámetros podría incidir en el inicio o no de la capacitación espermática (Cremades, et al., 2005). NRA está correlacionada con MT, MP, VSL y BCF y la IMP solo con AHL.

El efecto buscado con la AEA, al adicionarlo antes de la congelación, no fue muy claro, ya que se obtuvieron datos de la cinética espermática que nos indica hiperactividad en los espermatozoides congelados – descongelados, pero al mirar el efecto en los parámetros de viabilidad en cuanto a los NCAP y NRA, vemos que hay un efecto positivo, permitiendo que no se logre realizar el paso de capacitación y reacción acrosómica, similar a lo observado por Battista, et al., 2008. .

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que el proceso de congelación – descongelación conduce a la capacitación espermática, efecto similar obtenido por el proceso de la crio – capacitación, consiguiendo una reducción de la fertilidad en los espermatozoides congelados – descongelados (Leahy, & Gadella, 2011). Los datos también fueron consistentes a los reportados por Talebiyan, et al., 2015, en donde la AEA detiene la capacitación y la reacción acrosómica por la activación de receptores CB1, sin embargo a pesar de que hay una buena respuesta en la capacidad de la AEA en controlar este proceso, no se vio un efecto similar en la cinética del espermatozoide en donde se encontró que los resultados de la cinética espermática indican que hay hiperactivación en el espermatozoide, teniendo como referencia los datos de Cremades, et al., 2005. A pesar del aumento de las velocidades espermáticas y oscilación y amplitud de la cabeza encontrados en el trabajo, no hubo el desencadenamiento de capacitación y reacción acrosómica por este factor.

4. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente trabajo confirman que el endocanabinoide (AEA), es una posible fuente de control de capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides porcinos congelados – descongelados, reduciendo la crio – capacitación.
- Utilizar los endocanabinoides nos puede ayudar a mejorar la viabilidad del espermatozoide en el proceso de congelación – descongelación
- Debido a la variabilidad entre la calidad seminal de los reproductores, no podemos precisar cual es la concentración de AEA ideal para utilizar en los procesos de criocongelación de espermatozoides porcino, es necesario realizar más trabajos, incluyendo el macho como variable e identificar si ayuda a mejorar la congelabilidad de espermatozoides de reproductores de baja congelabilidad.

Bibliografía

- Abaigar, T., Holt, W. V., Harrison, R. A., & del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of reproduction*, 60(1), 32-41.
- Abaigar, T., J. Barbero, and W.V. Holt. (2005), Sperm heterogeneity as revealed by a new approach of sperm motility function. *Reproduction Domestic Animal*, 40, 332.
- Acosta, J. (2005), Técnicas de contraste en la evaluación del semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 12(3). Disponible en: http://cid.uveg.edu.mx/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=44060
- Almlid, T. & Hofmo, P.O. (1996). A brief review of frozen semen applications under Norwegian AI swine conditions. *Reproduction in Domestic Animals* 31(1), 169-73.
- Amann, R.P. and D.F. Katz. (2004). Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology*, 25(3), 317-325.
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.
- Aquila, S., Guido, C., Santoro, A., Gazzerri, P., Laezza, C., Baffa, M. F., Bifulco, M. (2010). Rimonabant (SR141716) induces metabolism and acquisition of fertilizing ability in human sperm. *Br J Pharmacol*, 159 (4), 831-841.
- Aquila, S., Guido, C., Santoro, A., Perrotta, I., Laezza, C., Bifulco, M., & Sebastiano, A. (2010a). Human sperm anatomy: ultrastructural localization of the cannabinoid1 receptor and a potential role of anandamide in sperm survival and acrosome reaction. *Anatomy Rec (Hoboken)*, 293 (2), 298-309.
- Asociación Colombiana de Porcicultores - Fondo Nacional de la Porcicultura (2013). Análisis de Coyuntura del Sector Porcícola. *Revista Porcicultura Colombiana*, 186(3), 16-30.
- Austin, C. R. (1952). The "Capacitation" of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170 (4321), 326-326.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1-7.
- Bailey, J.L.; Lessard, Ch.; Jactes, J.; Breque, Ch.; Dobrinski, I; Zeng, W.; Galantito-Homer, H.L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 10, 1016.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., & Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 12(5), 323-330.

- Barth, A. D. and Oko, R. J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. *United State of America. First edition*, 285.
- Battista, N., Rapino, C., Di Tommaso, M., Bari, M., Pasquariello, N., & Maccarrone, M. (2008). Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Molecular and cellular endocrinology*, 286(1), S17-S23.
- Bernabò, N., Palestini, P., Chiarini, M., Maccarrone, M., Mattioli, M., & Barboni, B. (2012). Endocannabinoid-binding CB1 and TRPV1 receptors as modulators of sperm capacitation. *Communicative & Integrative Biology*, 5(1), 68–70.
- Bisogno, T., Ventriglia, M., Milone, A., Mosca, M., Cimino, G. and Di Marzo, V. (1997). Occurrence and metabolism of anandamide and related acyl-ethanolamides in ovaries of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1345, 338-348.
- Bisogno, T., De, Petrocellis, L. and Di Marzo, V. (2002). Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. *Possible therapeutic implications. Curr. Pharm. Des.* 8, 533-547.
- Black, C. G. (2015). Practical Application of Inexpensive Rate Freezer for Bovine Semen *Tesis Doctoral, Texas Tech University*.
- Boarelli, P. V., Cattaneo, C. B., Monclus, M. A., & Fornés, M. (2007). Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana. *Revista Médica Universitaria. Facultad de ciencias médicas. UNCuyo*, 3(2), Disponible en: http://rmu.fcm.uncu.edu.ar/vol03_02/index.php [acceso Octubre 08 de 2010].
- Boerke, A., Tsai, P. S., Garcia-Gil, N., Brewis, I. A., & Gadella, B. M. (2008). Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*, 70(8), 1188-1196.
- Bolarín, A., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Hernández, M., Vázquez, J. M., & Martínez, E. (2006). Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*, 65(3), 669-680.
- Bracey, M. H., Hanson, M. A., Masuda, K. R., Stevens, R. C. and Cravatt, B. F. (2002). Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* 298, 1793-1796.
- Breitbart, H., (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 139-144.
- Buffone, M. G., Verstraeten, S. V., Calamera, J. C., & Doncel, G. F. (2009). High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa Are Associated With Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *Journal of Andrology*, 30(5), 552-558.
- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Pizzi, F. and Gliozzi, T. M. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, 121, 395–401.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168(4277), 697-698.
- Chang, M. C., Berkery, D., Schuel, R., Laychock, S. G., Zimmerman, A. M., Zimmerman, S., & Schuel, H. (1993). Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm

- and its role in blockade of the acrosome reaction. *Molecular reproduction and development*, 36(4), 507-516.
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V, Sinclair, M. L., Levin, L. R. and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-628.
- Clarke, R.N. and L.A. Johnson. (1987). Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *Gamete Res*, 16(3), 193-204.
- Collin, S., Sirard, M. A., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2000). Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *Journal of andrology*, 21(6), 938-943.
- Córdoba, M., Santa-Coloma, T. A., Beorlegui, N. B., & Beconi, M. T. (1997). Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. *IUBMB Life*, 41(4), 725-733.
- Cormier, N., M.A. (1997). Sirard, and J.L. Bailey, Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*, 18(4), 461-468.
- Cotton, R. W., & Fisher, M. B. (2015). Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on reproduction and contraception. *Forensic Science International: Genetics*.
- Cremades, T., Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Abaigar, T., Vazquez, J.M. & Martinez, E.A. (2005). Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26(5), 610 – 618.
- Cross Nicholas L. (2004). Reorganization of Lipid Rafts During Capacitation of Human Sperm. *Biology of Reproduction*, 71, 1367–1373.
- Dacheux, J. L., Gatti, J. L., & Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy research and technique*, 61(1), 7-17.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., & Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews*, 79(2), 481-510.
- De Jonge, C. J. & Barrat, C. L. R. (2006) The Sperm Cell, Production, Maturation, fertilization. *Regeneration*, 3-7.
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J. B., Finazzi-Agrò, A. and Di Marzo, V. (2001). The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 12856-12863.
- De Petrocellis, L., Cascio, M. G. and Di Marzo, V. (2004). The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br. J. Pharmacol.* 141, 765-774.
- Didion, B. A., Braun, G. D., & Duggan, M. V. (2013). Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Animal reproduction science*, 137(3), 189-196.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. and Bisogno, T. (2002). Anandamide receptors. Prostag. *Leukotr. Ess.* 66, 377-391
- Dube, C., Tardif, S., Leclerc, P., & Bailey, J. L. (2003). The Importance of Calcium in the Appearance of p32, a Boar Sperm Tyrosine Phosphoprotein, During In Vitro Capacitation. *Journal of Andrology*, 24(5), 727-733.

- Eriksson, B. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Animal reproduction science*, 63(3), 205-220.
- Eriksson, B. M., Petersson, H., & Rodriguez-Martinez, H. (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology*, 58(6), 1065-1079.
- Flesch, F. M., Brouwers, J. F. H. M., Nievelstein, P. F. E. M., Verkleij, A. J., van Golde, L. M. G., Colenbrander, B., & Gadella, B. M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 114(19), 3543-3555.
- Flesch, F. M., Colenbrander, B., van Golde, L. M., & Gadella, B. M. (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 262(3), 787-792.
- Florman, H. M., Jungnickel, M. K., & Sutton, K. A. (2010). Shedding light on sperm pHertility. *Cell*, 140(3), 310-312.
- Francavilla, F., Battista, N., Barbonetti, A., Vassallo, M. R. C., Rapino, C., Antonangelo, C., Maccarrone, M. (2009). Characterization of the Endocannabinoid System in Human Spermatozoa and Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Their Fertilizing Ability. *Endocrinology*, 150(10), 4692-4700.
- Fride, E. (2002). Endocannabinoids in the central nervous system-an overview. *Prostag. Leukotr. Ess.* 66, 221-233.
- Fuller, S.J. & D.G. Whittingham. (1996). Effect of cooling mouse spermatozoa to 4 (degrees) C on fertilization and embryonic development. *Reproduction*, 108(1), 139-145.
- Gadea, J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación'in vitro'. *Investigación agraria. Producción y sanidad animales*, 16(1), 63-78.
- Gadea, J. (2004). El uso de semen porcino congelado. *MG Mundo ganadero*. 169, 60-62.
- Gadea Mateos, J. (2008). 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". *Universidad de Murcia*.
- Gadea, J., Sellés E., and Marco M.A. (2004). The Predictive Value of Porcine Seminal Parameters on Fertility Outcome under Commercial Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 303-308.
- Gadea J, Garcia-Vázquez F, Matas C, Gardon IC, Canovas S. & Gumbao D. (2005). Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology*, (26), 396-404.
- Gadella, B.M. and R.A. Harrison. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, 127(11), 2407-2420.
- Galantino-Homer, H.L., P.E. Visconti, and G.S. Kopf, (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biology of Reproduction*, 56(3), 707-719.

- Gervasi, M. G. (2013). Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino (*Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*).
- Gervasi, M. G., Rapanelli, M., Ribeiro, M. L., Farina, M., Billi, S., Franchi, A. M., & Martinez, S. P. (2009). The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction*, 137(3), 403-414.
- Gillan, L., Skovgold, K., Watson, P. F., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (1999). Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(6), 309-315.
- Grasa, P., Colas, C., Gallego, M., Monteagudo, L., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. Á. (2009). Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*, 137(4), 655-667.
- Green, C. and P. Watson. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6), 889-898.
- Grimaldi, P., Orlando, P., Di Siena, S., Lolicato, F., Petrosino, S., Bisogno, T., Di Marzo, V., (2009). The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11131-11136.
- Hall, W. and Solowij, N. (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352, 1611-1616.
- Harayama, H. (2013). Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. *The Journal of reproduction and development*, 59(5), 421.
- Harrison, R.A., Ashworth, P.J. & Miller, N.G. (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*, 45(3), 378-91.
- Harrison, R.A.P. & Gadella, B.M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63(2), 342-351.
- Hernandez Dominguez, A.K. (2013). Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal. *Tesis de Maestría presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, Región Veracruz. México, 77. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/33713>*
- Hillard, C. J. and Jarrahan, A. (2003). Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br. J. Pharmacol.* 140, 802-808.
- Holt, W.V. and A. Medrano. (1997). Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *Journal Reproduction Fertility Supplement*, (52), 213-222.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R. et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161-202.

- Juárez Moreno, J. D. (2009). Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de espermatozoides porcinos. *Tesis de Master, Universidad Politecnica de Valencia*. España, 98. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/14361>
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. (2000). Storage of boar semen. *Animal reproduction science*, 62(1), 143-172.
- Katkov, I.I. and A.G. Lulat, (2000). Do conventional CASA-parameters reflect recovery of kinematics after freezing? CASA paradox in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryo Letters*, 21(3), 141-148.
- Kay, V.J. and L. Robertson. (1998). Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(6), 776-786.
- Khalil, M. B., Chakrabandhu, K., Xu, H., Weerachayanukul, W., Buhr, M., Berger, T., Tanphaichitr, N. (2006). Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental Biology*, 290(1), 220-235.
- Knox, R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr Phosphatases Induces Capacitation-associated Signaling in the Presence of Src Kinase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 7977-7985.
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Capacitation and Capacitation-like Sperm Surface Changes Induced by Handling Boar Semen. *Reproduction in domestic animals*, 46(s2), 7-13.
- Lechniak, D., Kedzierski, A., & Stanislawski, D. (2002). The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in domestic animals*, 37(6), 379-380.
- Luconi, M., Krausz, C., Forti, G., & Baldi, E. (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 55(1), 207-216.
- Maccarrone, M., Cecconi, S., Rossi, G., Battista, N., Pauselli, R. and Finazzi-Agrò, A. (2003). Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal ageing and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology* 144, 20-28
- Maccarrone, M., Barboni, B., Paradisi, A., Bernabò, N., Gasperi, v., Pistilli, M.G., Fezza, F., Lucidi, P. and Mattioli, M., (2005). Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4393-4404.
- Maccarrone, M. (2009) El endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol favorece la formación de espermatozoides a través de la activación de los receptores cannabinoides-2. *Cannabinoids*, 4(4), 4-6. Disponible en: www.cannabis-med.org.
- Maccarrone, M. (2009 a). Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Progress in lipid research*, 48(6), 344-354.
- Marquez, B., Igotz, G. and Suarez, S.S. (2007). Contributions of extracellular and intracellular Ca²⁺ to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Developmental Biology*, 303(1), 214-221.

- Matás, C., García-Vázquez, F. A., Sansegundo, M., Coy, J. G. P., & Ruiz, S. (2007). Estudio de la capacitación espermática in vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *ITEA información técnica económica agraria*, 28, 30-32.
- Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48(2), 209-219.
- Mechoulam, R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostag. Leukotr. Ess.* 66, 93-99
- Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodríguez JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology*; 57: 327-344.
- Medina-Robles, V. M., Perez-Duarte, B. A., & Cruz-Casallas, P. E. (2008). Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Orinoquia*, 12(2), 149-161.
- Medrano, A., & Holt, W. V. (1998). Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Archivos de zootecnia*, 47(178), 319-327.
- Morgan, D. J., Weisenhaus, M., Shum, S., Su, T., Zheng, R., Zhang, C. & McKnight, G. S. (2008). Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20740-20745.
- Mortimer, S.T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction*, 3(5), 403-439.
- Mortimer, S.T. (2000). CASA—practical aspects. *Journal Andrology*, 21, 515-524.
- Murphy, L. L., Gher, J., Steger, R. W. and Bartke, A. (1994). Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on copulatory behavior and neuroendocrine responses of male rats to female conspecifics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48, 1011-1017.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., & Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of reproduction*, 68(5), 1828-1835.
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., & Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5298-5305.
- Paria, B. C. and Dey, S. K. (2000). Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem. Phys. Lipids* 108, 211-220
- Parolaro, D., Massi, P., Rubino, T. and Monti, E. (2002). Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostag. Leukotr. Ess.* 66, 319-332.
- Park S (2013). Effects of sow, boar, and semen traits on sow reproduction. Thesis for the Degree of Master of Science, University of Nebraska-Lincoln, 67. Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/animalscidiss>
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Martinez, H. R. (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12(02), 117-124.

- Peña, F.J., Saravia F., Núñez Martínez I., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez Martínez H. (2006). ¿Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. *Animal Reproduction Science*, 93, 101–113.
- Pérez-Llano, B.; Sánchez-Sánchez, R.; Lorancho-González, J. L. y García-Casado, P. (1998). A short versión of the osmotic resistance test for boar semen. In: *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, Birmingham, England, 5-9 July, 6.
- Pérez-Llano, B., Sánchez-Sánchez, R., Yenes, P., & García-Casado, P. (2001). Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15 C. In *6 th International Conference on Pig Reproduction. Missouri*, (6), 03-06.
- Petrunkina, A. M., Volker, G., Brandt, H., Töpfer-Petersen, E., & Waberski, D. (2005 a). Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1766-1782.
- Petrunkina, A. M., Volker, G., Weitze, K. F., Beyerbach, M., Töpfer-Petersen, E., & Waberski, D. (2005). Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology*, 63(8), 2278-2299.
- Popwell, J.M. and W.L. Flowers. (2004). Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Animal reproduction science*, 81(1), 97-113.
- Ramió, L., Rivera, M. M., Ramírez, A., Concha, I. I., Peña, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E. (2008). Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to “in vitro” capacitation and further “in vitro” acrosome reaction. *Theriogenology*, 69(4), 501-512.
- Ren, D. and J. Xia, (2010). Calcium Signaling Through CatSper Channels in Mammalian Fertilization. *Physiology*, 25(3), 165-175.
- Ríos, E. A., Ruiz, A. C., García, D. A., Rubio, P. J. P. Z., Tobón, A. R., & García, A. R. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS*, 78, 5-11.
- Roca, J.; Hernández, M.; Carvajal, G.; Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival. American Society of Animal Science. *Journal Animal Science*, 84: 2692-2699.
- Rodríguez-Martínez, H. (2006). ¿Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment?. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 2-10.
- Rodríguez-Martínez, H. (2006). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction. Fertility and Development*, 19(1), 91-101.
- Rodríguez-Martínez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68, S138-S146.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J. M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L. & Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2), 514-535.
- Rodríguez-Martínez, H., & Wallgren, M. (2011). Advances in Boar Semen Cryopreservation. *Veterinary Medicine International*, 2011, 396181. <http://doi.org/10.4061/2011/396181>

- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(s1), 11-22.
- Rossato, M., Ion Popa, F., Ferigo, M., Clari, G., & Foresta, C. (2005). Human sperm express cannabinoid receptor CB1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2), 984-991.
- Rossato, M. (2008). Endocannabinoids, sperm functions and energy metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286(1-2, Supplement 1), S31-S35.
- Rubio-Guillén, J., Quintero-Moreno, A., & González-Villalobos, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toro. *Revista Científica*, 19(4), 382-389.
- Sansegundo G. M. (2008). Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. *Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia*. España. 202.
- Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A. & Rodríguez Martínez H. (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, 63,1320-1333.
- Saravia, F. (2008). Cryopreservation of Boar Semen. Impact of the Use of Specific Ejaculate Portions, Concentrated Packaging, and Simplified Freezing Procedures on Sperm Cryosurvival and Potential Fertilising Capacity. *Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala*, 64.
- Saravia, F., Hernández, M., Wallgren, M., Johannisson, A., & Rodríguez-Martínez, H. (2007). Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *International Journal of Andrology*, 30(6), 485-499.
- SAS Sistema de Análisis Estadístico, versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008)
- Satorre, M. M. Breininger, E., Beconi, M. T., & Beorlegui, N. B. (2007). α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 68(7), 958-965.
- Satorre, M. M., Breininger, E., Beconi, M. T., & Beorlegui, N. B. (2009). Protein tyrosine phosphorylation under capacitating conditions in porcine fresh spermatozoa and sperm cryopreserved with and without alpha tocopherol. *Andrologia*, 41(3), 184-192.
- Schmidt, H. and G. Kamp, (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, 128(2), 171-179.
- Schuel, H., Goldstein, E., Mechoulam, R., Zimmerman, A. M., & Zimmerman, S. (1994). Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7678-7682.
- Schuel, H., Burkman, L. J., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, M. C., Giuffrida, A., ... & Makriyannis, A. (2002). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Molecular reproduction and development*, 63(3), 376-387.

- Schuel, H., Burkman, L. J., Lippes, J., Crickard, K., Forester, E., Piomelli, D. and Giuffrida, A. (2002a). N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem. Phys. Lipids* 121, 211-227.
- Schuel, H., Burkman, L. J., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, M. C., Giuffrida, A., Picone, R. P. and Makriyannis, A. (2002b). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 376-387.
- Sellés, E., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., & Ruiz, S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction in domestic animals*, 38(1), 66-72.
- Selvaraj, V., Buttke, D. E., Asano, A., McElwee, J. L., Wolff, C. A., Nelson, J. L., Klaus, A. V., Hunnicutt, G. R. & Travis, A. J. (2007). GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *Journal of andrology*, 28(4), 588-599.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A., & Jones, R. (2004). Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution During Capacitation of Boar Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 71(1), 253-265.
- SIU, 2014. Laboratorio de Reproducción, Unidad de Citometría, *Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.*
- Socol, C. T., Rusu, A. V., Criste, F. L., & Mihalca, I. (2015). Current aspects of boar semen cryopreservation. *Porcine Research*, 5(2), 44-50.
- Suarez, S. S., Dai, X. B., Demott, R. P., Redfern, K., & Mirando, M. A. (1992). Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of andrology*, 13(1), 75-80.
- Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction*, 14(6), 647-657.
- Suarez, S.S., Vincenti L., and Ceglia, M.W. (1987). Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *Journal of Experimental Zoology*, 244(2), 331-336.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Tonegawa, T., Nakane, S., Yamashita, A. and Waku, K. (1996). Enzymatic synthesis of anandamide an endogenous cannabinoid receptor ligand through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 113-117
- Talebiyan, R., Amidi, F., Samini, M., Mirshokraei, P. & Habibian Dehkordi, S. (2015). Effect of met-anandamide on prevention of hyperactivation, cryo-capacitation and acrosome reaction in ram semen cryopreservation. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal Home-Page*. Disponible en: <http://vetdergi.kafkas.edu.tr>, 545-551.
- Talevi, R., Barbato, V., De Iorio, S., Mollo, V., Capriglione, T., Ricchiari, L., Gualtieri, R. (2010). Is there a role for endocannabinoids in sperm-oviduct interaction? *Reproduction*, 140(2), 247-257.
- Tanja Semira, W. and Sabine S.-S., (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal reproduction science*, 102(3): p. 181-193.

- Tanphaichitr, N., Carmona, E., Bou Khalil, M., Xu, H., Berger, T., & Gerton, G. L. (2007). New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Frontiers in Bioscience*, 12, 1748-1766.
- Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., & Bailey, J. L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction*, 65(3), 784-792.
- Tardif, S., Laforest, J. P., Cormier, N., & Bailey, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52(3), 447-459.
- Tartaglione, C.M. and Ritta M.N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62, 1245-1252.
- Taylor, A. H., Ang, C., Bell, S. C., & Konje, J. C. (2007). The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, 13(5), 501-513.
- Thilmant, P. (2010). Semen congelado porcino. *XV Congreso Nacional. Porciaméricas*. Medellín, Julio 14, 15 y 16.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J. & Holt, W.V. (2001). Morphologically Distinct Sperm Subpopulations Defined by Fourier Shape Descriptors in Fresh Ejaculates Correlate With Variation in Boar Semen Quality Following Cryopreservation. *Journal of Andrology*, 22(3), 382 – 394.
- Tomlinson, M.J., E. Kessopoulou, and C.L. Barratt, (1999). The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *Journal of Andrology*, 20(5), 588-593.
- Toshimori, K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy research and technique*, 61(1), 1-6.
- Toshimori, K. (2009). Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Springer Science & Business Media*. (Vol. 204)
- Toshimori, K. (2011). Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. *Journal of electron microscopy*, 60(suppl 1), S31-S42.
- Travis, A. J., & Kopf, G. S. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 731-736.
- Van der Stelt, M. and Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.* 271, 1827-1834.
- Van Gestel R.A., Brewis I.A., Ashton P.R., Helms J.B., Brouwers J.F. and Gadella B.M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction*, 11(8), 583-590.
- Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 667-668.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P. & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4), 1139-1150.

- Visconti, P. E., Ning, X., Fornés, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., & Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental biology*, 214(2), 429-443.
- Whan, L. B., McClure, N. and Lewis, S. E. M. (2004). The effects of tetrahydrocannabinol (THC), the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on in vitro human sperm motility. *Proceedings of the 14th Annual Symposium on the Cannabinoids (22-27 June 2004, Paestum, Italy)*, p. 178.
- Wang, H., Dey, S. K., & Maccarrone, M. (2006). Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine reviews*, 27(5), 427-448.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- Wenger T1, Ledent C, Csernus V, Gerendai I. (2001). The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 8;284(2):363-8.
- Williams, S. I., Fernández, V., Gavazza, M. B., Marmunti, M. E., Zeinsteger, P. A., & Prenna, G. (2015). Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica. *Analecta Veterinaria*, 35.
- Xia, J., Reigada, D., Mitchell, C. H., & Ren, D. (2007). CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of reproduction*, 77(3), 551-559.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization, in In: *The physiology of reproduction.*, A. Knobil, Neill, J. D., Editor., Raven Press: New York, 189-317.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, 1, 189-317.
- Yeste, M. (2015). Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(S2), 71-79.
- Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C., & Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertility and sterility*, 91(5), 2230-2242.
- Zhou, R., Shi, B., Chou, K. C. K., Oswald, M. D., & Haug, A. (1990). Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. *Biochemical and biophysical research communications*, 172(1), 47-53.