



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE L-CARNITINA Y ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA DE LOS EYACULADOS DE VERRACOS Y EFICIENCIA
EN LA IA DE CERDAS.**

**TESIS PRESENTADA
PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PRESENTA

JAVIER IVAN MONTOYA OSORIO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CLAUDIA LETICIA MORALES EVANGELISTA

CODIRECTORES

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

**MPA. JESÚS MANUEL CORTÉZ
SÁNCHEZ**

ASESOR PRINCIPAL

JORGE EZEQUIEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

**El Salado, Tecamachalco, Puebla, a
agosto del 2024**

Índice

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1.- Anatomía funcional del aparato reproductor del verraco.....	2
2.2.- Espermatozoide	4
2.2.1.- Estructura del Espermatozoide	4
2.2.2.- Membrana plasmática.....	5
2.2.3.- Mitocondrias.....	6
2.3.- Generación de ATP en las mitocondrias del espermatozoide	6
2.3.1 Catabolismo de ácidos grasos por Beta Oxidación.....	7
2.4.- Espermatogénesis	8
2.5 Fertilidad	9
2.5.1.- Potencial de fertilización espermática.....	10
2.6.- Calidad Espermática.....	10
2.6.1.- Volumen.....	10
2.6.2.- Movilidad Espermática.....	11
2.6.3.- Concentración Espermática.....	11
2.6.4.- Morfología.....	11
2.6.5.- Integridad de la membrana plasmática (viabilidad).....	11
2.6.6.- Integridad del acrosoma.....	12
2.6.7.- Integridad del ADN	12
2.7.- Estrés oxidativo.....	12
2.7.1.- Especies Reactivas de Oxígeno.....	12
2.7.2.- Radicales y radicales libres.....	13
2.8.- Estrés oxidativo en espermatozoides.....	13
2.8.1.- Generación de ERO en el espermatozoide.....	13
2.8.2.- Lipoperoxidación.....	15
2.8.3.- Daño en proteínas.....	15
2.8.4.- Daño al ADN.....	16
2.9.- Antioxidantes.....	16
2.9.1.- L- Carnitina	17

2.9.1.1.- L-Carnitina y su efecto sobre la calidad y potencial de fertilidad de los espermatozoides.....	18
2.9.2.- Ácido Ascórbico.....	19
2.9.2.1.- Ácido Ascórbico y su efecto sobre la calidad y potencial de fertilidad de los espermatozoides.....	20
2.10.- Fertilidad de la cerda reproductora	21
2.11.- Asociación entre parámetros de calidad espermática y fertilidad en cerdas.....	21
2.12.- Importancia de la calidad de las dosis seminales en la IA	22
III. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	23
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS	23
5.1.- Objetivo general	23
5.2.- Objetivos específicos	23
VI. HIPÓTESIS	24
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1.- Preparación de la dieta experimental.....	25
7.2.- Obtención y valoración de eyaculados	27
7.3.- Análisis estadístico.	28
VIII. RESULTADOS	29
IX. DISCUSIÓN.....	33
X. CONCLUSIÓN.....	38
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	39

ABREVIATURAS

AA. Ácidos grasos
ATP. Adenosín trifosfato
ADP. Adenosín difosfato
AMPc. Monofosfato de adenosina cíclico
A• Radical ascorbilo
CASA. Computer-Assisted Semen Analysis.
CAT. Catalasa
CO₂ Dióxido de carbono.
ERO. Especies reactivas de oxígeno.
EO. Estrés oxidativo.
FAD. Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada).
FADH₂ Flavín adenín dinucleótido (forma reducida).
FSH. Hormona folículo estimulante,
GTP. Guanosin trifosfato
GnRH. Hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas.
GSH. Glutatión.
GPx. Glutatión peroxidasa.
G₆PD Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
IA. Inseminación artificial.
ICSH. Hormona estimulante de células intersticiales
LNT. Lechones nacidos totales
NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido. (forma reducida).
NAD⁺. Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).
NOX5. NADPH oxidasa 5.
OXPHOS. Fosforilación oxidativa.
O₂⁻ Anión superóxido
O₂ Oxígeno molecular
O₂• Radical superóxido
P. Fosfato
SOD. Superóxido dismutasa
TRA. Técnica de reproducción asistida

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Aparato reproductor del verraco	3
Figura 2. Estructura del espermatozoide.....	5
Figura 3. Generación del ATP en la mitocondria.....	7
Figura 4. Esquema de la espermatogénesis.....	9
Figura 5. Formación de ERO en el espermatozoide.....	14
Figura 6. Papel de Carnitina en el transporte de ácidos grasos en la membrana mitocondrial.....	18
Figura 7. Medias de volumen bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.....	29
Figura 8. Medias de movilidad total bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.....	30
Figura 9. Medias de concentración espermática bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.....	31
Figura 10. Medias del porcentaje de fertilidad en el grupo control, y en los periodos 1 y 2.....	32
Cuadro 1: Descripción de los tratamientos con sus respectivas concentraciones	26
Cuadro 2: Identificación de los sementales con el tratamiento aplicado	26

RESUMEN

La inseminación artificial (IA) es una técnica de reproducción asistida (TRA) con gran presencia en los sistemas de producción porcina. Para ello, se tiene que eficientizar la calidad espermática de los sementales, esto se puede lograr al adicionar micronutrientes que funcionan como sustrato energético para la biosíntesis y movilidad celular, además de su actividad antioxidante. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la adición en la dieta de L-Carnitina y Ácido Ascórbico sobre la calidad espermática y fertilidad de dosis seminales en 6 verracos de diferentes líneas genéticas. El experimento consistió en un periodo con dieta control (2 kg/día) para los 6 sementales durante 8 semanas y un periodo experimental que consistió en la dieta base, más la suplementación con Ácido Ascórbico a dosis de 250 mg/kg (2 verracos), L-Carnitina a dosis de 250 mg/kg (2 verracos) y Ácido Ascórbico + L-Carnitina a dosis de 125 mg/kg + 125 mg/kg (2 verracos) durante un lapso de 8 semanas dividido en dos periodos. De los eyaculados obtenidos se realizó la valoración de las características macroscópicas y microscópicas del cual se recopiló los datos correspondientes a volumen, concentración, morfología, movilidad espermática y vigor, las muestras que presentaron buena calidad espermática fueron procesadas para realizar dosis seminales y proceder a inseminar a las cerdas reproductoras, registrando los datos de la cerda y de la dosis utilizada para su inseminación. Se tomó registro de la tasa de fertilidad y del número de lechones nacidos totales (LNT) para correlacionar la fertilidad de las dosis elaboradas de los diferentes tratamientos. Se compararon los datos obtenidos en los tres modelos experimentales, haciendo uso de las medias de los tres periodos para determinar si existen diferencias significativas entre estos. En el presente estudio se encontró que la adición con L-Carnitina y la combinación de ácido ascórbico + L-Carnitina en dieta de verracos presentan mejoras significativas en el volumen del eyaculado (327 ± 15.2) y (250 ± 10.7) respectivamente, al compararlo con su periodo control (239 ± 18.7) y (185 ± 13.1), además se registraron aumentos en los valores de movilidad espermática para los verracos suplementados con Ácido Ascórbico y Ácido Ascórbico + L-Carnitina sin ser estos cambios significativos. Los parámetros de concentración, morfología, LNT y tasa de fertilidad permanecieron constantes sin mostrar variación.

I. INTRODUCCIÓN

La industria porcina ha tenido un crecimiento exponencial en las últimas décadas, atribuible a los avances técnicos y tecnológicos, que ha permitido una mejora sustancial en parámetros productivos, sanitarios y reproductivos (Zuidema *et al.*, 2021).

La IA es considerada una TRA (Gibbons *et al.*, 2019). En la actualidad alrededor del 90% de las montas se realiza por IA (Waberski *et al.*, 2019), esto se adjudica al aumento del valor genético, optimización en la bioseguridad en el control de enfermedades, y mejora en la eficiencia laboral y productiva (Mellagi *et al.*, 2022).

Diversos estudios se han orientado en mejorar la calidad espermática en diferentes especies, por ejemplo, los beneficios de la suplementación de Carnitina en la dieta de humanos (Nazari *et al.*, 2021; Haseen *et al.*, 2017) y en cerdos (Balogun *et al.*, 2022; Yeste *et al.*, 2010), incluso se ha probado el efecto de su adición en diluyentes para gallos (Fattah *et al.*, 2017), búfalos (Longobardi *et al.*, 2017), y cerdos (K. Yang *et al.*, 2020).

Ácido Ascórbico o Vitamina C, es un nutriente esencial relacionado con la fertilidad por sus efectos sobre la producción hormonal y acción antioxidante, dada su función para evitar la lipoperoxidación (Baqir Al-Dhalimy *et al.*, 2021; Alamaary *et al.*, 2020). Además de ocupar un papel fundamental en la función y proliferación de las células de Sertoli (Y. Yang *et al.*, 2020).

El utilizar dosis seminales con excelente potencial fertilizante en las TRA, depende de la capacidad reproductiva del semental, la cual se compone de tres componentes: libido, capacidad de monta y calidad espermática (Rangel, 2018), todo esto garantiza incrementar la fertilidad en las unidades productivas.

De acuerdo con lo anterior, el propósito del presente estudio es evaluar el efecto de la adición en la dieta del Ácido Ascórbico y L-Carnitina sobre la calidad espermática y el potencial fertilizante de dosis seminales de verracos, utilizadas para IA en cerdas.

II. ANTECEDENTES

2.1.- Anatomía funcional del aparato reproductor del verraco

El aparato reproductor del macho está constituido por los testículos, el epidídimo, ducto deferente, glándulas sexuales accesorias, parte distal de la uretra, pene, prepucio y escroto (Páramo, 2008), (Figura 1).

Los testículos tienen como función principal la producción espermática y hormonal, en ellos se diferencian la túnica albugínea constituida por tejido conectivo que encapsula al parénquima testicular el cual alberga a los túbulos seminíferos contorneados en los que ocurre la espermatogénesis, microscópicamente en la luz de estos túbulos se encuentran las células germinales y las células de Sertoli cuya función es la nutrición, sustentación y control endocrino de las espermatogonias, el espacio intersticial está conformado por vasos sanguíneos, linfáticos y células intersticiales de Leydig responsables de la producción de testosterona. Cada túbulo es continuo con los túbulos seminíferos rectos que finalizan en una red de pequeños tubos llamado rete testis que posteriormente se dirigirán al epidídimo mediante los conductos eferentes (Páramo, 2008; Rangel, 2018).

El epidídimo es una estructura encargada del transporte, almacenamiento y maduración de las células espermáticas que está formado por las circunvoluciones del ducto epididimario fijado a uno de los bordes del testículo y se conforma por tres partes: la cabeza que recibe a los conductos eferentes y es en donde ocurre la maduración, el cuerpo y la cola en la que se da origen al ducto deferente (Páramo *et al.*, 2008). Este ducto se une a los vasos sanguíneos testiculares para formar el cordón testicular el cual atraviesa el canal inguinal, pasa ventralmente al uréter y por la cara dorsal de la vejiga para atravesar la próstata y entrar a la uretra (Hafez, 2002).

Las glándulas sexuales accesorias son: la ámpula del ducto deferente que produce una secreción mucoide y viscosa rica en carbohidratos; la glándula vesicular que es par y sus secreciones son ricas en fructosa, fuente de energética para los espermatozoides; la próstata es una glándula túbulo - alveolar compuesta, secretora de proteínas que neutralizan el plasma seminal e inicia el desplazamiento de los espermatozoides eyaculados; la glándula bulbouretral es una glándula par cuya secreción es un líquido

mucoso proteico que forma un tapón en el cérvix que impide el reflujo del eyaculado (Hafez, 2002).

El pene tiene como funciones primordiales la eliminación de orina y el depósito de eyaculado en el aparato genital de la hembra, se origina en el hueso isquion y se extiende hasta el glande rodeando la parte final de la uretra, el cuerpo se encuentra conformado por el cuerpo cavernoso y puede agrandarse cuando aumenta la irrigación sanguínea, en cerdos este se clasifica como fibroelástico lo que le permite mantenerse firme aun en ausencia de erección, en cuanto al glande en esta especie tiene un peculiar forma de sacacorchos (Páramo, 2008).

El prepucio constituye la piel del pene y tiene la función de envolver y protegerlo; además contiene una abertura en la parte dorsal dando origen al divertículo prepucial que acumula restos de orina y residuos epiteliales. El escroto envuelve y protege a los testículos, está formado por piel en la pared externa, internamente el tabique escrotal divide la cavidad en dos compartimentos, en porcinos se encuentra ventralmente con relación a el ano y no son pendulantes (Páramo, 2008).

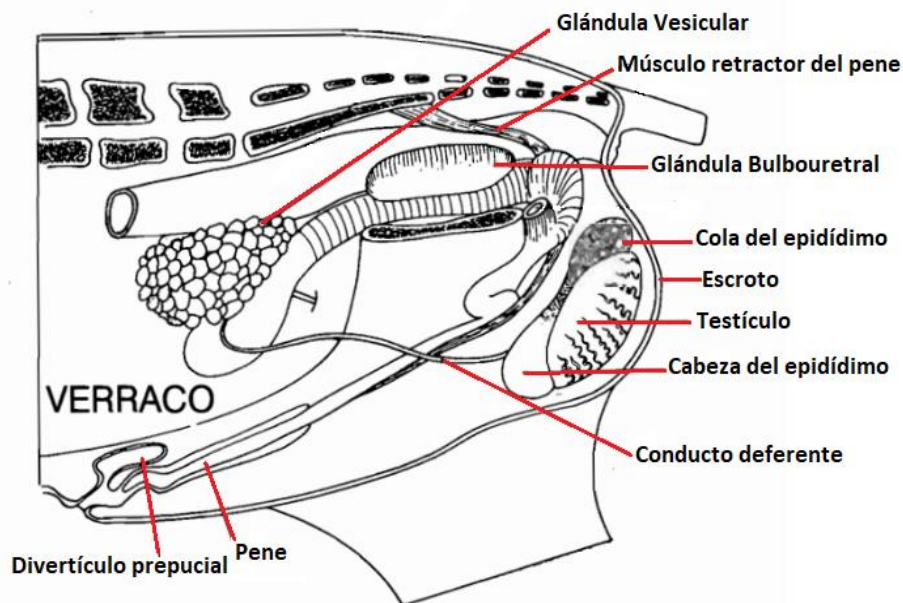


Figura 1. Aparato reproductor del verraco. Modificado de Hafez *et al.*, (2002).

2.2.- Espermatozoide

2.2.1.- Estructura del Espermatozoide

La célula espermática se divide en dos regiones que se diferencian funcional y morfológicamente en cabeza y cola (flagelo), rodeada totalmente por su membrana plasmática (Garner y Hafez, 2002), (Figura 2).

En la región de la cabeza se ubica el núcleo que contiene al ADN hipercondensado por medio de proteínas especializadas (protaminas) envuelto por una envoltura nuclear. La teca perinuclear actúa como una cubierta rígida compuesta de proteínas estructurales que rodea parcialmente al núcleo a excepción del sitio de inserción del flagelo, además contiene un conjunto de proteínas claves en la señalización celular al entrar en contacto con el citoplasma del óvulo. El acrosoma es una vesícula secretora dispuesta en forma de capuchón sobre el 80% del núcleo, contiene acrosina, hialuronidasa, hidrolasa y esterases importantes en el proceso de fecundación por interacciones con la zona pelúcida del ovocito (Mosqueda, 2021; Garner y Hafez, 2002).

La pieza de conexión o cuello une la región de la cabeza con el flagelo, inició en la base del núcleo hasta la primera mitocondria del flagelo por medio de la estructura llamada *capitulum* que se articula a la fosa de implantación (Mosqueda, 2021).

El flagelo se puede dividir en: pieza media, pieza principal y pieza final. En la pieza media se encuentra el axonema, que es una estructura de la maquinaria motriz espermática conformado por 9 dobletes de microtúbulos que rodean a un par central, las fibras densas externas son estructuras de citoesqueleto conformadas por 9 columnas que rodean al axonema y van desde la pieza intermedia al primer tercio del segmento principal, protegiendo a la célula y optimizando la conversión energética para el movimiento flagelar, la vaina mitocondrial se conforma de un gran número de mitocondrias ordenadas de manera helicoidal rodeando el axonema. La pieza principal la estructura que predomina es la vaina fibrosa, compuesta por dos columnas longitudinales siendo responsable del movimiento ondulante del flagelo. Por último, la pieza terminal se encuentra conformada únicamente por el axonema rodeado por la membrana plasmática (Mosqueda, 2021; Garner y Hafez, 2002).

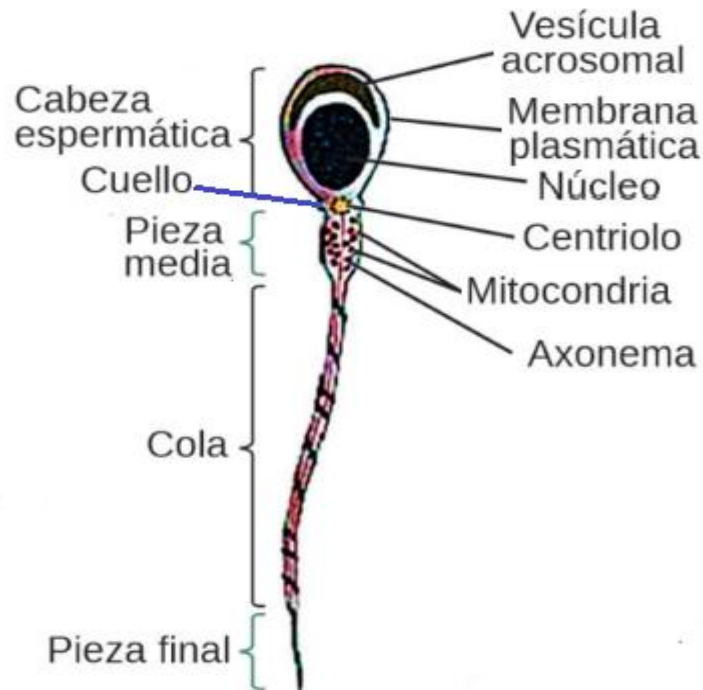


Figura 2. Estructura del espermatozoide. Modificado de Iglesias & Gutiérrez (2021).

2.2.2.- Membrana plasmática.

Rodea al espermatozoide en su totalidad, está conformada por una capa doble de lípidos (bicapa lipídica) en la que los ácidos grasos saturados e insaturados son las unidades funcionales, y proteínas de membrana inmersas en ella. Las principales moléculas lipídicas son los fosfolípidos, el colesterol y los glucolípidos que se encuentran distribuidos de forma asimétrica. Hay una proporción de plasmalógenos (glicerofosfolípidos con enlace vinil-éter) asociados con la protección contra estrés oxidativo. En el espermatozoide del porcino el principal ácido graso es el ácido docosahexaenoico, además, el colesterol se encuentra en un porcentaje bajo con mayor concentración en la monocapa externa, dándole mayor sensibilidad a bajas temperaturas (Mosqueda., 2021; Alberts *et al.*, 2002).

2.2.3.- Mitocondrias.

Son orgánulos celulares importantes en la producción de energía de las células eucariotas, en ellas la glucosa derivada de la glucólisis convertida en piruvato es oxidada por el oxígeno molecular obteniendo de su metabolismo 30 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por cada molécula de glucosa. De acuerdo con el tipo de célula estas tienen la facultad de asociarse en filamentos móviles o de fijarse en una posición en la que la demanda de energía sea inusualmente anormal, por ejemplo, en el flagelo de los espermatozoides. (Alberts *et al.*, 2002).

Estructuralmente se conforma por una matriz que posee diferentes enzimas para oxidar piruvato y ácidos grasos, además de material genómico para la expresión de genes mitocondriales (Alberts *et al.*, 2002). Posee dos membranas separadas por un espacio intermembrana, la membrana mitocondrial externa es la que regula el paso de iones y metabolitos mediante proteínas llamadas porinas, y la membrana mitocondrial interna es donde se produce el ATP mediante la metabolización de piruvato y ácidos grasos por procesos metabólicos como el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Moraes y Meyers, 2018).

En la célula espermática se encuentran localizadas en el flagelo en forma helicoidal formando a la vaina mitocondrial cuyo fin es proporcionar energía necesaria para promover el movimiento, en espermatozoides de mamíferos el número de mitocondrias generalmente es de 50 a 75 (Moraes y Meyers, 2018).

2.3.- Generación de ATP en las mitocondrias del espermatozoide

Por medio de las enzimas presentes en la matriz mitocondrial el piruvato, y los ácidos grasos son oxidados hasta convertirse en acetil CoA en donde las enzimas del ciclo del ácido cítrico reaccionan con ella obteniendo GTP, Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), dinucleótido de flavina y adenina (FADH₂) y dióxido de carbono (CO₂). NADH Y FADH transfieren sus electrones que en combinación con el oxígeno generan energía en la cadena respiratoria mediante cuatro complejos presentes en la membrana interna mitocondrial. En la fosforilación oxidativa la cadena respiratoria se encarga de bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico, este gradiente es usado, entre otras cosas, para la síntesis de ATP

(quimiosmosis) por medio de la *ATP sintasa* para que retorne a los protones del gradiente electroquímico a la matriz mitocondrial haciendo uso de adenosín difosfato (ADP) y P (fosfato) (Alberts *et al.*, 2002), (Figura 3).

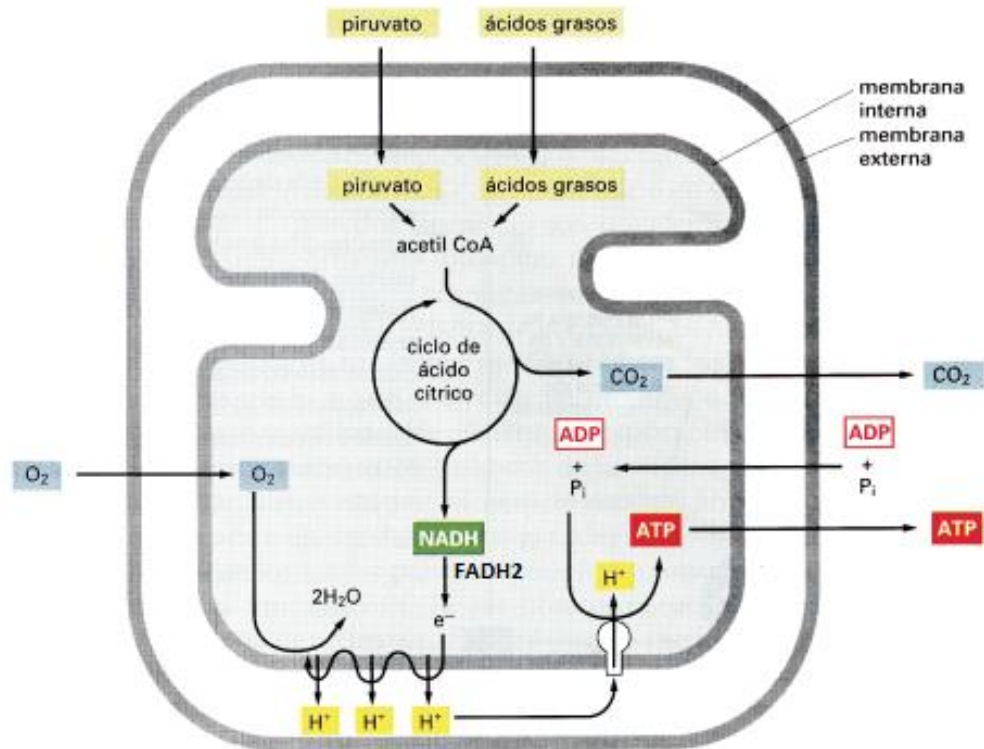


Figura 3. Generación del ATP en la mitocondria. Modificado de Alberts (2002).

2.3.1 Catabolismo de ácidos grasos por Beta Oxidación.

Del catabolismo de los ácidos grasos (AA) se obtiene como producto final acetil-CoA, también se obtiene NAD^+ y FAD como coenzimas que generan ATP. Para iniciar el proceso de la beta oxidación, en el citosol celular los AA se activan uniéndose con CoA como Acil-CoA, estos se unen a la Carnitina para poder ingresar a la mitocondria por medio de un sistema de transporte en la membrana interna. Posteriormente se inicia la degradación mediante la ruta catabólica Hélice de Lynen de donde por medio de 4 reacciones se liberan los carbonos en forma de Acetil-CoA, el proceso se repite hasta la liberación de todos los carbonos, obteniendo como productos finales de cada vuelta 1 molécula de $FADH_2$, 1 de $NADH$ y Acetil-CoA. EL Acetil-CoA tomará la ruta del Ciclo de

Krebs del que se obtendrá 1 Guanosin trifosfato (GTP) y 3 coenzimas de NADH+H⁺ y 1 de FADH₂, estas coenzimas más los obtenidos en la Beta oxidación se oxidaran en la cadena de transporte mitocondrial para obtener ATP mediante la fosforilación oxidativa. La cantidad de ATP obtenido dependerá de la cantidad de carbonos del ácido graso en cuestión (Rowell *et al.*, 2018).

2.4.- Espermatogénesis

Es el proceso mediante el cual se producen las células sexuales masculinas, inicia desde el desarrollo embrionario con la migración de las células germinales primordiales a los testículos para entrar en estado de latencia, y es hasta la madurez sexual cuando inicia la producción espermática con la acción de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) que a su vez influye en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) que promueve la función de las células de Sertoli y la hormona estimulante de células intersticiales (ICSH) que actúa sobre las células de Leydig aumentando la producción de testosterona (Iglesias y Gutiérrez, 2021).

Es en el epitelio de los túbulos seminíferos donde ocurre este proceso el cual se diferencia en una fase de división mitótica, una fase de división meiótica y otra de diferenciación (Alberts *et al.*, 2002).

En la fase de mitosis tiene lugar la espermacitogénesis en donde las espermatogonias derivadas de las células primordiales inician su división por mitosis, estas espermatogonias pueden tomar dos rumbos diferentes: 1) como células madre con la capacidad de seguir dividiéndose indefinidamente, o 2) como células en maduración que luego de otra mitosis darán lugar a los espermátocitos primarios, iniciando en la meiosis (Alberts *et al.*, 2002; Iglesias y Gutiérrez, 2021).

En la fase de meiosis los espermátocitos primarios como células haploides detienen el proceso en el preleptoteno de la profase para duplicar su contenido de cromosomas para convertirse en células diploides, ocurre un intercambio de material genético para después dividirlo a la mitad finalizando la división meiótica y resultando así en espermátocitos secundarios. En una segunda división de meiosis los espermátocitos secundarios pasan a ser espermátidas haploides (Alberts *et al.*, 2002; Iglesias y Gutiérrez, 2021).

En la fase de diferenciación ocurre la espermiogénesis en la que una serie de cambios como la formación del acrosoma por medio del aparato de Golgi, compactación del núcleo y por tanto del material genético, eliminación de una parte del citoplasma y la formación del flagelo con su respectiva equipación mitocondrial obteniendo así a los espermatozoides. Después de la liberación a la luz de los túbulos seminíferos, las células son transportadas al epidídimo en donde terminará el proceso de maduración (Alberts *et al.*, 2002; Iglesias y Gutiérrez, 2021), (Figura 4).

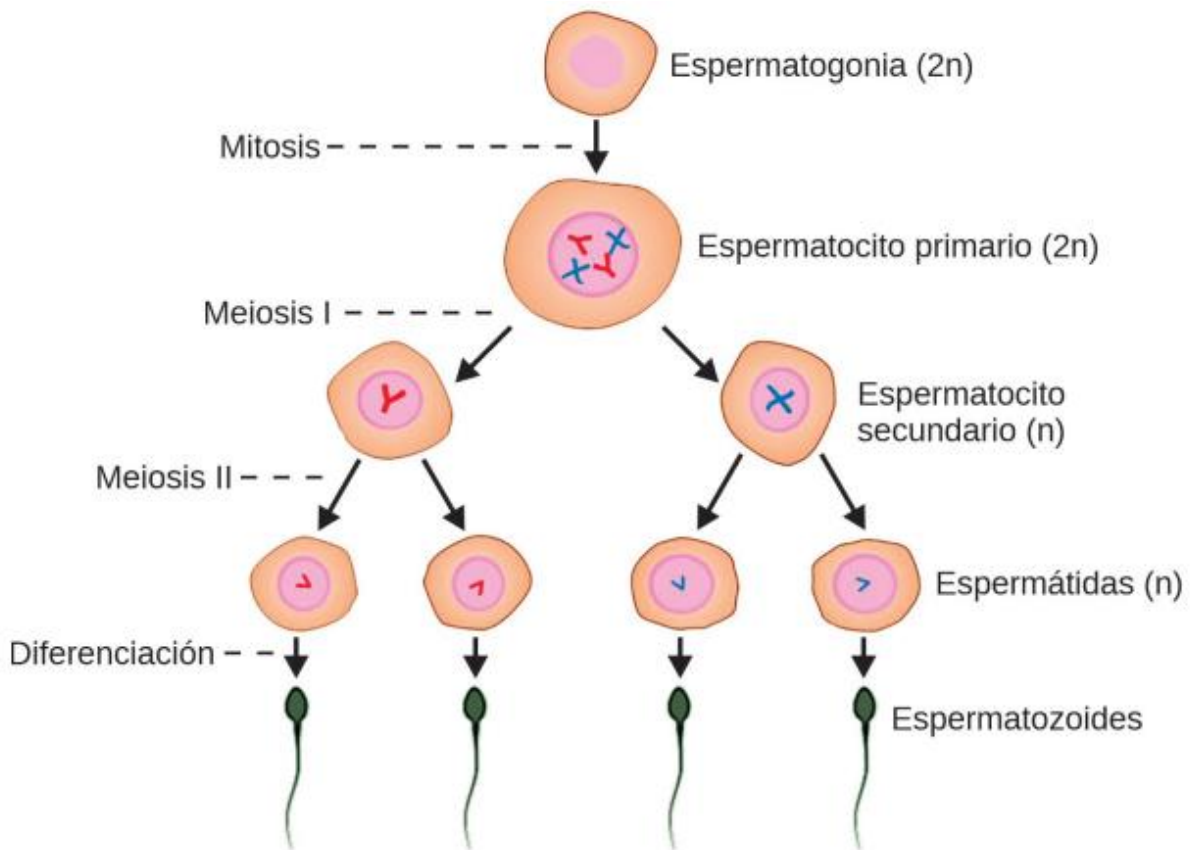


Figura 4. Esquema de la espermatogénesis. Tomado de Iglesias y Gutiérrez (2021).

2.5 Fertilidad

Se define fertilización al proceso mediante el cual la célula sexual masculina (espermatozoide) y femenina (ovocito) crean a un nuevo organismo mediante la fecundación. En este punto se transmiten los genes de los progenitores a la descendencia

y a nivel ovocito, inicia en el citoplasma una serie de reacciones para el desarrollo de este proceso (Gilbert, 2000).

2.5.1.- Potencial de fertilización espermática.

A la capacidad de una población determinada de células espermáticas para fertilizar exitosamente se le conoce como potencial de fertilización (Amann y Hammerstedt, 2002). Existen una serie de atributos que requiere el espermatozoide para tener dicha capacidad. Por ejemplo, una estructura normal; la función completa de las vías metabólicas para la producción energética, estrechamente ligado a los requerimientos de movilidad que es necesaria para el paso en el cérvix, la unión uterotubal y penetración del ovocito; en la membrana plasmática las proteínas integrales para el reconocimiento y unión con la zona pelúcida y membrana vitelina del ovocito; enzimas acrosomales inhibidas y predispuestas para su acción en la penetración del ovocito; la capacidad de la membrana para alterarse y fusionarse con la membrana del gameto femenino; un ADN correctamente estabilizado y compactado pero perfectamente capaz de descondensarse al momento de la fertilización (Amann, 1989).

2.6.- Calidad Espermática

Es el análisis de las características cualitativas y cuantitativas del semen por medio de la evaluación de parámetros macroscópicos (volumen, olor, color, pH) y microscópicos (concentración, movilidad, integridad de la membrana plasmática (viabilidad), integridad del acrosoma, morfología e integridad del ADN), que al evaluar de manera simultánea, permite determinar la calidad de un eyaculado e identificar posibles problemas en la capacidad de fertilidad de los espermatozoides (Porras, 2018).

2.6.1.- Volumen.

Parámetro que determina la cantidad total de semen obtenido por eyaculado en ml, se determina por medio de un recipiente graduado o por pesaje en relación gr/ml. El volumen varía entre las diferentes especies, en el cerdo puede ser de 150 a 400 ml (Porras, 2018; Iglesias, 2021).

2.6.2.- Movilidad Espermática.

Es la evaluación de la viabilidad del semen por medio del tipo de movimiento de los espermatozoides, se evalúa de manera subjetiva mediante microscopio, donde los rasgos a evaluar son: el porcentaje de espermatozoides en movimiento, porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y vigor con una escala del 0 al 5. Otra manera de evaluar es con el uso del sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) que analiza diferentes parámetros cinemáticos (Maside *et al.*, 2023)

2.6.3.- Concentración Espermática.

Determina la cantidad de células espermáticas en un volumen determinado generalmente por mililitros y por eyaculado. Existen diferentes métodos para calcularlo, por ejemplo, el hematocitómetro (cámara de Neubauer), espectrofotómetro, fotocolorímetro y el sistema CASA (Maside *et al.*, 2023; Ax *et al.*, 2002).

2.6.4.- Morfología.

Mide la cantidad de espermatozoides anormales en un eyaculado, la evaluación se puede realizar mediante microscopio de contraste de fase o campo claro evaluando 100 - 200 células espermáticas dependiendo el método aplicado, (cámara de Neubauer o tinción eosina nigrosina). Por otra parte, muchos sistemas CASA tienen la función de evaluar este parámetro. Las anomalías más comunes en cerdos son gotas citoplasmáticas y cola doblada. En animales sanos se espera un porcentaje de anomalías menor al 20% (Iglesias, 2021; Maside *et al.*, 2023).

2.6.5.- Integridad de la membrana plasmática (viabilidad).

Atributo esencial para la función espermática con gran valor predictivo en la fertilidad. En la especie porcina la composición alta en ácidos grasos poliinsaturados y baja en colesterol de la membrana la vuelve susceptible a daños, especialmente ante métodos de conservación en líquido y congelado. La evaluación se realiza con la tinción eosina-nigrosina en microscopio de campo claro, o mediante las tinciones SYBR-14 (fluorocromo de ADN permeable a la membrana) que tiñe de verde a las células viables y PI (yoduro de propidio, fluorocromo nuclear impermeable) que tiñe de rojo a las células dañadas mediante excitación con láser (Maside *et al.*, 2023).

2.6.6.- Integridad del acrosoma

El acrosoma contiene un conjunto de enzimas responsables de la digestión de estructuras del óvulo como la zona pelúcida, un daño en esta estructura implica fallas en la capacidad de fecundar del espermatozoide. Este parámetro se puede evaluar mediante tinciones especializadas por ejemplo la tinción Giemsa, con un proceso de fijación con barrido de una muestra de semen (Iglesias, 2021).

2.6.7.- Integridad del ADN

Al ser importante para la fertilización y posterior desarrollo embrionario, es viable la evaluación de esta estructura. Una forma para realizarlo es mediante el método SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) que desnaturaliza con medio ácido al ADN, al ser el ADN fragmentado más susceptible a estas condiciones emite un color rojo con la tinción naranja de acridina (Maside *et al.*, 2023).

2.7.- Estrés oxidativo

Se define como la condición en la que los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) supera a la capacidad antioxidante del organismo, provocando daño a diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) dando paso a disfunción de las células y en casos más agravados la muerte de esta (Li *et al.*, 2016). Las causas de esta condición pueden ser un alto recambio de agentes oxidantes entre las células, o por bajos niveles de moléculas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (Gharagozloo y Aitken, 2011).

Hernández *et al.*, (2019) mencionan que los agentes causales del estrés oxidativo (EO) son las especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Definiendo que mientras algunas ERO son radicales libres, otras dan origen a alguna de ellas.

2.7.1.- Especies Reactivas de Oxígeno.

El término Especies reactivas de oxígeno engloba a aquellas especies reactivas que contienen oxígeno (Li *et al.*, 2016). Por lo tanto; son moléculas que contienen oxígeno en diferente reactividad química, siendo metabolitos de oxígeno con gran capacidad oxidante que pueden ser un radical libre o no serlo (Carvajal, 2019). En el organismo es

producido en el organismo es de forma natural como subproducto de los procesos metabólicos que usan oxígeno (Vicenta *et al.*, 2015).

2.7.2.- Radicales y radicales libres.

Hernández *et al.*, (2019) definen como radical a una molécula con un electrón desapareado en el último orbital, y a un radical libre cuando esta se encuentra libre de otras moléculas.

Carvajal (2019), define que un radical libre es una especie reactiva que contiene uno o dos electrones no apareados en su órbita, este posee una tendencia a donar o robar electrones de otras moléculas en busca de estabilidad, generando así una reacción en cadena.

2.8.- Estrés oxidativo en espermatozoides

En pequeñas cantidades las ERO tienen una función fisiológica en la capacitación de los espermatozoides, por ejemplo, contribuyen en el aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que mejora la movilidad en el proceso de hiperactivación, además de participar en la activación de la reacción acrosomal (Guthrie y Welch, 2012), (Adewoyin *et al.*, 2017). Cuando la producción de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante del organismo, se entra en estado de estrés oxidativo, causando daño lipoperoxidativo de la membrana plasmática, a proteínas y al ADN nuclear y mitocondrial del espermatozoide (Guthrie y Welch, 2012).

2.8.1.- Generación de ERO en el espermatozoide

En el espermatozoide la principal ERO formada es el anión superóxido (O_2^-) por medio de dos formas principales. 1. Por medio del complejo enzimático NADPH oxidasa 5 (NOX5) que cataliza la reducción de oxígeno a anión superóxido por medio de NADPH que actúa donando electrones (Silvestre *et al.*, 2021). 2. En mitocondria mediante metabolismo aeróbico a nivel de la cadena de transporte de electrones debido a una fuga de los mismos, provocando la reducción de Oxígeno a O_2^- , este radical reacciona consigo mismo por dismutación o reacciona con la enzima superóxido dismutasa (SOD) y dar origen a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) un no radical considerado ERO que puede desplazarse hacia el citoplasma por canales aniónicos dependientes de voltaje, o

reaccionar con el catión Cu^{2+} y Fe^{2+} formando el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a través de la Reacción de Fenton. (Silvestre *et al.*, 2021; Castellini *et al.*, 2021).

Además, la presencia de gotas citoplasmáticas pueden ser un factor de producción de ERO pues presentan glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G_6PD) promotora en la producción de NADPH. Por otra parte, contienen SOD que también promueve la generación de H_2O_2 , y ácido láctico deshidrogenasa que produce NADH que en un aumento de su síntesis sobrecarga el complejo I de la cadena de transporte de electrones, produciendo O_2^- liberado en la matriz mitocondrial favoreciendo el estrés oxidativo (Castellini *et al.*, 2021), (Figura 5).

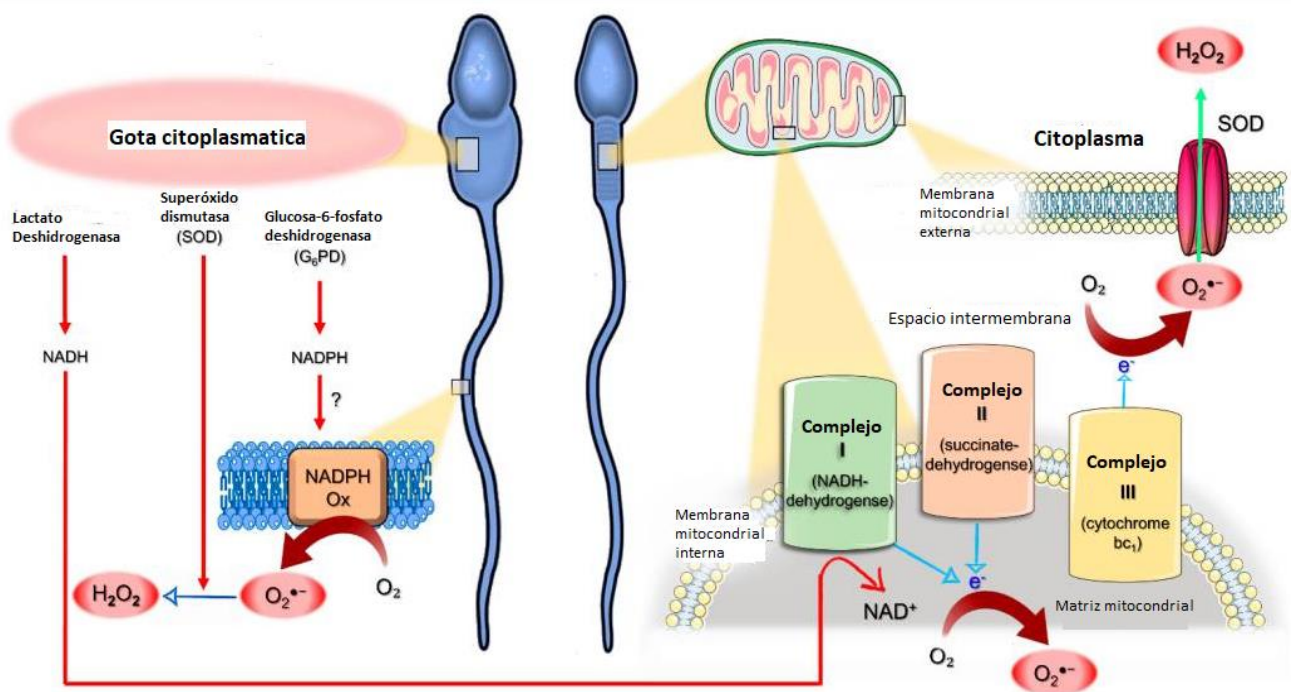


Figura 5. Formación de ERO en el espermatozoide. Modificado de Castellini *et al.*, (2021).

2.8.2.- Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso por el cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares (Membrillo *et al.*, 2003).

Zenteno y Saldaña (2008) dividen el proceso de lipoperoxidación en tres etapas: Iniciación, propagación y terminación. En el periodo de iniciación, un residuo de un ácido graso poliinsaturado de la membrana es intervenido por una ERO que toma un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, quedando como un radical libre centrado en carbono, este radical tiene un arreglo molecular dando lugar a un dieno conjugado que reacciona con oxígeno molecular para convertirse en el radical peróxilo, este radical tiene acción oxidante que le permite tomar un hidrógeno de un ácido graso adjunto y quedar como un hidroperóxido. En la propagación, la molécula a la que se le ha quitado un hidrógeno repetirá el proceso por el que fue sometido a un ácido graso poliinsaturado adyacente, creando así una reacción en cadena en los lípidos de la membrana. En la terminación del proceso finaliza cuando el radical reacciona con otra molécula que puede ser otro radical, formando un agregado o dímero que termina por alterar la permeabilidad membranal, o bien, reacciona con una molécula antioxidante que generalmente dona un átomo de hidrógeno poniendo fin a la reacción.

2.8.3.- Daño en proteínas

Las ERO tienden a causar modificaciones en las proteínas de la célula por medio de oxidación en aminoácidos como la lisina, arginina, prolina, treonina, histidina, y principalmente cisteína y metionina (Carvajal, 2019).

Los sitios de daño en la proteína son: 1) En el esqueleto de carbono que generalmente inicia con la intervención de un radical $\bullet\text{OH}$ que toma un átomo de hidrógeno formando H_2O dejando un radical centrado en carbono, este reacciona con oxígeno molecular (O_2) formando un radical alquilperoxil, este puede dar lugar a un radical alquilperóxido que a su vez dará origen a un alcoholirradical y este a una hidroxilproteína, algunos de estos intermediarios pueden desarrollar cambios en otros aminoácidos para formar un radical centrado en carbono (Zentella y Piña, 2008). 2) En las cadenas laterales de las proteínas donde una gran cantidad de residuos de aminoácidos son susceptibles a la oxidación por $\bullet\text{OH}$ principalmente, el tipo de reacción puede variar a la vez que los productos de dichas

reacciones serán diferentes según el tipo de aminoácido alifático, aromático o azufrado. Por su parte, la metionina y la cisteína son extremadamente sensibles a la mayoría de ERO. La fragmentación del esqueleto y la oxidación de las cadenas laterales terminan por promover la dimerización de la molécula proteica (Zentella y Piña, 2008).

2.8.4.- Daño al ADN

El radical superóxido ($O_2 \bullet$) es un producto alterno derivado del oxígeno molecular tras una reducción incompleta en el transporte de electrones a nivel mitocondria y retículo endoplasmático, a pesar de tener poca reactividad con el ADN, tiene importancia al dar origen al especie H_2O_2 que en presencia de metales de transición reducidos es convertido por medio de la reacción Fenton en el radical $\bullet OH$ con propiedades altamente oxidantes, por ejemplo, abstrae moléculas de hidrogeno, se adhiere a las bases para formar aductos que generan una gran cantidad de daños (Medeiros, 2008).

La fragmentación del ADN es uno de los daños más significativos provocados por el EO, pues contribuye en el proceso de apoptosis de la célula y en consecuencia disminuye la concentración espermática. $\bullet OH$ es el principal radical inductor de este fenómeno, la desoxirribosa es el componente del ADN más sensible a su reacción que en un primer estadio forma 8-OH-guanina y 8-OH-2' deoxiguanosina que da origen posteriormente a la fragmentación del ADN de cadena doble generando daño irreversible al material genético (Vicenta *et al.*, 2015). Otro tipo de daño del radical $\bullet OH$ y Oxígeno es consecuente a la reacción con las bases nitrogenadas generado alteraciones como sustituciones, deleciones e inserciones especialmente en el par guanina - citosina pudiendo generar rompimiento de cadena sencilla y mutaciones (Medeiros, 2008).

2.9.- Antioxidantes

Los antioxidantes son aquellas sustancias con la facultad de reparar, reducir o prevenir los efectos adversos ocasionados por las ROS, estas se pueden encontrar de manera natural en el organismo de diferentes especies y también los hay de naturaleza exógena (R. Li *et al.*, 2016). De acuerdo con su mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican en: 1) No enzimáticos siendo moléculas de bajo peso molecular que eliminan radicales libres, son de naturaleza endógena o exógena. 2) Enzimáticos que catalizan reacciones que eliminan radicales libres. Además, existen proteínas que se unen a

metales y secuestran iones de hierro y cobre libres limitando la formación de ROS (Silvestre *et al.*, 2021).

2.9.1.- L- Carnitina

La L-Carnitina, es un derivado de los aminoácidos lisina y metionina, sintetizada en el organismo, (Longobardi *et al.*, 2017) y presente en el epidídimo de los mamíferos en grandes cantidades (Nazari *et al.*, 2021). Es un antioxidante natural que protege a las células del estrés oxidativo manteniendo el nivel de especies reactivas de oxígeno en valores fisiológicos, a nivel mitocondrial es un factor en la generación de energía mediante el transporte de ácidos grasos al transportarlos a través de la membrana mitocondrial, formando un éster de acetil Carnitina de cadena larga transportado por la Carnitina palmitoiltransferasa I y la Carnitina palmitoiltransferasa II ubicadas en las membranas mitocondriales externa e interna, lo que permite que completen la vía de β -oxidación (K. Yang *et al.*, 2020; Silvestre *et al.*, 2021) (Figura 6), esencial para impulsar la movilidad espermática por su papel en la producción de ATP (Nesci *et al.*, 2020). En la espermatogénesis estimula la absorción de glucosa en las células de Sertoli, de esa manera proporciona energía útil para el desarrollo de células germinales. A nivel epidídimo favorece la viabilidad estabilizando a la membrana plasmática por medio de la inhibición del consumo de oxígeno y la reducción de la reacción acrosomal espontánea (Kooshesh *et al.*, 2023). Además, es un factor antiapoptótico interfiriendo vía extrínseca con la intervención de señales apoptóticas desencadenadas por Fas y con la prevención de la generación de ceramidas, y vía intrínseca inactivando a los efectores de la apoptosis (caspasas 3, 7 y 8). Protege al ADN del estrés oxidativo que es capaz de alterar su perfil epigenético, lo hace modulando la expresión de genes implicados en la metilación del ADN (Kooshesh *et al.*, 2023). Posee propiedades antioxidantes contra ROS producidas por la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, mediante la eliminación de radicales, quelación de iones de hierro y favoreciendo la expresión de antioxidantes como SOD, GSH, CAT y GPx (Kooshesh *et al.*, 2023).

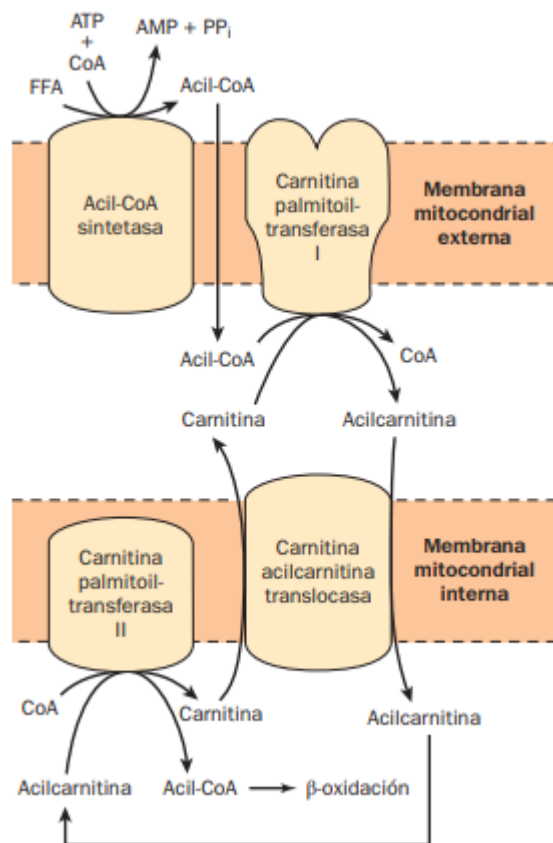


Figura 6. Papel de Carnitina en el transporte de ácidos grasos en la membrana mitocondrial. Tomado de Rowell *et al.*, (2018).

2.9.1.1.- L-Carnitina y su efecto sobre la calidad y potencial de fertilidad de los espermatozoides.

Se han realizado diversos estudios con la finalidad de determinar el efecto de L-Carnitina en algunos rasgos en la calidad y capacidad fértil de los espermatozoides utilizados para IA, agregando en la dieta o sobre el eyaculado de forma *in vitro* en diluyentes en diferentes especies. Yeste *et al.* (2010) suplementaron la dieta con L-Carnitina en una concentración de 625 gr por día en sementales de la raza Pietrain, Duroc y Lague White, comparándose con un grupo bajo dieta control durante 20 semanas, en el cual evaluaron parámetros de calidad espermática (volumen, concentración, viabilidad, integridad del acrosoma, movilidad, morfología y resistencia osmótica) correlacionando los resultados con la raza y el aumento del fotoperiodo y la temperatura.

Por su parte Přebilová *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la suplementación de L-Carnitina sobre parámetros de calidad espermática (volumen, concentración, motilidad y porcentaje de espermatozoides anormales), adicionando 500 mg por kilogramo de alimento en la dieta de 12 verracos comparándolo con un grupo bajo una dieta control del mismo número.

Balogun *et al.* (2022) realizaron la adición de L- Carnitina (625 mg) sobre la dieta de 64 verracos durante 12 semanas comparado con un periodo bajo dieta control mediante la evaluación de parámetros de calidad espermática (volumen, aglutinación, concentración y motilidad bajo sistema CASA), en dos fases, una post colecta y otra a los 5 días post conservación a 17 °C.

Además de los valores de calidad espermática, se ha buscado determinar el impacto de la L-Carnitina sobre la capacidad fértil de los espermatozoides ante factores que competen a las condiciones del organismo femenino, Mazzilli (1999) relacionó el contenido de Carnitina intra espermática con la capacidad de supervivencia de movilidad del espermatozoide humano *in vitro* en moco cervical bovino y en medio de cultivo (solución Tyrode).

2.9.2.- Ácido ascórbico

El ácido ascórbico con fórmula molecular $C_6H_8O_6$ es descrito como un sólido blanco, inodoro y con gran solubilidad en agua que recibe su carácter de ácido por 2 de sus 6 carbonos ionizables, y por su estructura química se asemeja a la glucosa (Bourges, 2008). Elimina de forma directa una amplia gama de radicales libres como el hidroxilo, superóxido y peroxinitrito obteniendo de esta reacción al radical ascórbico ($A\bullet$) (Machado de Almeida y Fernandes, 2008). En su forma como ácido ascórbico o como $A\bullet$ posee un potencial oxidorreductor gracias a su facilidad de donar electrones a diversas moléculas radicales y oxidantes (Machado de Almeida y Fernandes, 2008), además disminuye la formación de hidroperóxidos lipídicos (Silvestre *et al.*, 2021). Abastece de electrones a formas reducidas en estado activo de otros antioxidantes como el α -tocoferol, glutatión y β -caroteno (Bourges, 2008). Interviene en la producción de algunas hormonas (Baqir Al-Dhalimy *et al.*, 2021). Protege lipoproteínas y lípidos plasmáticos de la peroxidación

neutralizando al radical peroxilo y regenerando al tocoferol (Bourges, 2008). Es un co-sustrato de enzimas como la Carnitina en conjunto con el hierro (Bourges, 2008).

2.9.2.1.- Ácido Ascórbico y su efecto sobre la calidad y potencial de fertilidad de los espermatozoides.

Ácido ascórbico es compuesto altamente estudiado en su efecto sobre los parámetros de calidad espermática y capacidad de fertilidad de los espermatozoides en diferentes especies, además como compuesto en extensores para eyaculados destinados a la IA. Baqir Al-Dhalimy *et al.*, (2021), evaluaron el efecto del Ácido Ascórbico y el selenio sobre los parámetros de calidad del semen en 40 ratas macho de la raza Wistar ante factores de estrés, usando una dosis de 50 mg/kg de peso vivo. Mediante disección del epidídimo se obtuvo la muestra espermática y se evaluó los parámetros de movilidad, concentración, viabilidad, integridad del acrosoma y morfología. Abdel-Khalek *et al.*, (2023), determinaron el impacto de la suplementación dietética con Ácido Ascórbico sobre el rendimiento reproductivo y capacidad de mitigación ante el estrés oxidativo en machos cabríos, agregando a la dieta 2g/kg de ácido ascórbico durante 8 semanas, para lo cual evaluó parámetros de calidad del semen (volumen, motilidad, concentración y morfología). Egbuniwe *et al.*, (2020), adicionaron Ácido Ascórbico en la dieta de polluelos de codorniz de 14 días de edad a una dosis de 200 mg/kg durante un periodo de 56 días, para posteriormente evaluar su efecto sobre la concentración de gonadotropina sérica, las características histológicas testiculares y la calidad del esperma (motilidad, viabilidad, morfología y concentración).

Se ha estudiado el efecto de la implementación de ácido ascórbico sobre las tasas de fertilidad de diferentes especies, Jabbar *et al.*, (2015) utilizó como objeto de estudio a 20 gallos y 100 gallinas de la raza Aseel, realizó colecta de semen cada 2 semanas y conservó el semen con extensores que contenían Ácido Ascórbico en diferentes concentraciones (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 y 1,5% p/v), se conservó a 4°C y evaluó la calidad espermática en periodos de 0, 6, 12 y 24 hrs. post colecta. Se seleccionó os eyaculados con la concentración más efectiva (1%) y realizó IA una vez por semana durante tres semanas en 50 gallinas contra un grupo control del mismo número, se colectaron 100 huevos por grupo y se incubaron para su posterior evaluación de fertilidad a los 14 días mediante técnica de contraluz. En humanos M. Li *et al.*, (2019) mediante un

estudio de cohorte prospectivo recopilaron los datos de 171 pacientes sometidos a un tratamiento de fertilidad con Ácido Ascórbico, asociándolos con las tasas de fertilización de sus respectivas parejas para determinar si la asociación entre tratamiento y fertilidad es positiva.

2.10.- Fertilidad de la cerda reproductora

En la hembra la fertilidad se interpreta como la capacidad para producir descendencia en cuanto a número y período se refiere según sea conveniente para el sistema de producción (Fuentes *et al.*, 2006). En cerdas reproductoras se define mediante un conjunto de parámetros cuantitativos, los principales son el tamaño de la camada, lechones nacidos vivos, lechones nacidos muertos o momificados y tasa de partos/concepción (Barquero, 2021). La productividad numérica medido por el tamaño de crías por camada, es una de las medidas más integrales del comportamiento reproductivo, siendo dependiente del nivel de ovulación, fertilización y mortalidad intrauterina aspectos relacionados con la nutrición, edad, raza y el efecto macho (Fuentes *et al.*, 2006).

2.11.- Asociación entre parámetros de calidad espermática y fertilidad en cerdas.

Barquero *et al.*, (2021), buscaron determinar la relación entre la calidad espermática haciendo énfasis en la cinemática con la tasa de fertilidad en porcinos. Se recolectaron muestras de semen en 11 verracos y analizados mediante un sistema CASA, posteriormente a la elaboración de dosis seminales se evaluaron 816 inseminaciones triples en 272 cerdas. Para la estimación de fertilidad se usó el dato del % de hembras preñadas/total de hembras inseminadas, y como variables se hizo uso de los parámetros de lechones nacido por camada, lechones nacidos vivos, muerte fetal, número de momias y peso de camada. Sutkeviciene *et al.*, (2009), evaluaron la calidad espermática de 19 verracos utilizados para IA y correlacionó los resultados con la fertilidad en hembras inseminadas por medio de los datos de tasa de no retorno dentro de los 60 días posteriores a la primera inseminación, y el tamaño de la camada (número total de lechones nacidos). Tsakmakidis *et al.*, (2010), en su experimento evaluó rasgos de la calidad espermática (morfología y la inestabilidad de la cromatina) en 7 verracos de los

cuales se obtuvo el eyaculado y se realizaron dosis para inseminación artificial aplicadas en 1350 cerdas multíparas. Posteriormente al periodo de gestación se registraron y analizaron la tasa de partos (% de cerdas inseminadas que parieron) y el tamaño de la camada (número total de lechones nacidos vivos en una camada) para evaluar la relación de los parámetros de calidad con la fertilidad del semen.

2.12.- Importancia de la calidad de las dosis seminales en la IA

La IA permite el uso de machos con alto valor genético, permitiendo engendrar una mayor cantidad de crías en comparación con la monta natural (Flowers, 2021).

En las especies ganaderas, la evaluación de la fertilidad masculina por medio de métodos como la genómica y la medición de los parámetros de la calidad espermática permite tomar medidas para aumentar la productividad de la IA. Implementar parámetros espermáticos de calidad relacionados con una mayor capacidad de almacenamiento y tolerancia al método de conservación impactará positivamente la vida útil de la dosis seminal (Zuidema *et al.*, 2021).

III. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Debido a que, durante el proceso de obtención de eyaculados, evaluación espermática y la preparación de dosis seminales se puede afectar la calidad espermática, se requiere agregar aditivos en la dieta de los sementales que garanticen la viabilidad espermática que influye en parte en los porcentajes de fertilidad de las unidades de producción porcina.

IV. JUSTIFICACIÓN

La adición de micronutrientes como vitaminas, minerales, ácidos grasos o derivados en una dieta balanceada, pueden intervenir en los procesos de biogénesis, maduración y capacitación de las células espermáticas potenciando su capacidad reproductiva (Flowers, 2021).

Ante la necesidad de ofrecer material espermático de calidad a las cerdas reproductoras en el proceso de IA, para una correcta concepción de progenie, la adición de L-Carnitina y Ácido Ascórbico en la dieta de verracos podría significar una herramienta para obtener espermatozoides con mayor viabilidad y resistencia a el procesamiento de dosis seminales y su posterior almacenamiento, hasta su utilización en TRA.

V. OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición en la dieta con L-Carnitina y Ácido Ascórbico sobre la calidad espermática y la fertilidad de dosis seminales de verracos, utilizadas para IA en cerdas.

5.2.- Objetivos específicos

Evaluar el volumen, concentración, morfología y movilidad espermática de eyaculados de verracos, en donde se adicione o no L-Carnitina y Ácido Ascórbico.

Realizar la inseminación a cerdas con dosis seminales de verracos con adición en la dieta o no de L-Carnitina y Ácido Ascórbico.

Determinar el porcentaje de fertilidad mediante diagnóstico de gestación de cada dosis seminal de verracos con adición en la dieta o no de L-Carnitina y Ácido Ascórbico.

VI. HIPÓTESIS

La adición de L-Carnitina y Ácido Ascórbico en la dieta de verracos, mejorará la calidad de dosis seminales utilizadas para IA.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación del presente estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensionismo en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en Jilotepec, Estado de México.

Se seleccionaron seis verracos de diferentes líneas; tres de la línea materna (Yorkshire x Pietrain y Landrace x Yorkshire), y tres de la línea terminal: (Pietrain y Pietrain x Duroc). De acuerdo con el registro de las evaluaciones espermáticas, entre edades de dos y tres años, con un peso aproximado de 200 kg. Los sementales se encontraban alojados en una nave cerrada por las condiciones climáticas, con sementaleras individuales provistas de bebederos y comederos en cada una, el agua se proporcionaba a libre acceso y la ventilación estaba controlada por extractores de aire y contaban con suficiente iluminación.

Se revisó los registros correspondientes a dos meses de la evaluación espermática en donde fueron alimentados con la dieta base (dieta control), que es un alimento comercial concentrado marca NUSEM® cuyos ingredientes son: cereales (sorgo/maíz), pastas de oleaginosas, harina de pescado, salvado, grasas de origen animal y vegetal, macro y microminerales, aminoácidos, factores biológicos (*Saccharomyces cerevisiae*), vitaminas A, D, E, K y del complejo B, realizada en el CEIEPP por el nutriólogo.

7.1.- Preparación de la dieta experimental.

Los antioxidantes que se utilizaron fueron: ácido ascórbico y L-Carnitina (presentación en sal pura), se adicionaron a el alimento comercial concentrado marca NUSEM® al mezclarlos durante cinco minutos, para proceder a envasar en bolsas de 1kg con el rotulado del tratamiento que le corresponde, almacenándolas en contenedores para su uso posterior, de los cuales se tomó para la alimentación de los sementales dos veces al día 1kg de la dieta control o con el tratamiento a las 8:00 am y 14:00 pm. por el responsable de la alimentación de los sementales.

El efecto de la adición en la dieta de ácido ascórbico, L-Carnitina y Ácido Ascórbico con L-Carnitina se evaluó comparando la dieta control en un periodo de 8 semanas y los mismos valores en dos periodos divididos de 4 semanas cada uno (Total 8 semanas, periodo 1 y 2) para la dieta experimental.

Cuadro 1: Descripción de los tratamientos con sus respectivas concentraciones:

Tratamientos (Txs)	Concentración	Abreviatura
Dieta control + Ácido Ascórbico	250 mg/kg	C+Asc
Dieta control + L-Carnitina	250 mg/kg	C+Carnt
Dieta control + Ácido Ascórbico + L-Carnitina	125 mg/kg + 125 mg/kg	C+Asc+Carnt

Los sementales identificados por nombre y número ID, fueron asignados a los diferentes tratamientos de la siguiente manera:

Cuadro 2: Identificación de los sementales con el tratamiento aplicado.

ID	Tratamiento
45	Control + Ácido ascórbico
51	Control + Ácido ascórbico
46	Control + L-Carnitina
50	Control + L-Carnitina
40	Control + Ácido ascórbico + L-Carnitina
36	Control + Ácido ascórbico + L-Carnitina

7.2.- Obtención y valoración de eyaculados

Semanalmente se obtuvieron eyaculados de cada verraco con la técnica de la mano enguantada, la cual consiste en que el técnico encargado de la colecta se coloque doble guante de nitrilo, previo aseo del área genital y prepucio con toallas sanitas y una solución desinfectante aunado a la limpieza del divertículo. Para comenzar con el estímulo del verraco se le proporciona un ligero masaje. Una vez que el semental sube al maniquí y el pene se comienza a protruir, se procede a retirar el primer par de guantes para que se utilice para la limpieza y así evitar el riesgo de la contaminación en la obtención del eyaculado (Peñafiel *et al.*, 2021)

La colección del semen se realizó en bolsas de colección de semen con filtro US Bag, Minitube® y en un jarro de colección completo para BoarMatic, Minitube® al cual se le depositó previamente en el fondo una bolsa con agua atemperada a 37 °C. De las tres fracciones de los eyaculados, únicamente se trabajó con la fracción rica en espermatozoides, por lo que se desecharon las dos fracciones restantes, la fracción pre-espermática y post-espermática. Inmediatamente después de obtener los eyaculados, fueron diluidos con un diluyente comercial Androstar plus®, (Minitube, Alemania). El diluyente se preparó de la siguiente forma, se depositaron el contenido total del diluyente en un matraz y se aforo a 1000 ml, con agua destilada, previamente atemperada a 37°C y se mantuvo en agitación durante 15 minutos en una placa de calentamiento, previo a su utilización para la dilución de las dosis de semen (Minitube, 2024)

La evaluación de las características macroscópicas se realizó de acuerdo con el manual de la Organización Mundial de la salud (OMS, 2021), dentro del cual se consideraron las siguientes características volumen, color, pH, temperatura y las características microscópicas como movilidad total, morfología y concentración espermática. Para el análisis macroscópicos se realizó de la siguiente manera: el volumen se procedió a pesarlo mediante balanza granataria con relación 1g = 1ml; el pH mediante el uso de tiras reactivas; tipo de olor a caracterizarlo como *suís generis* y color caracterizando de blanco a blanco cremoso; las características microscópicas evaluadas fueron la movilidad total y vigor con microscopio de campo claro, para lo cual se agregó una gota de la muestra

sobre un portaobjetos y cubriendo con cubreobjetos atemperados a 37°, determinando el porcentaje de células con movimiento y el tipo de movimiento en escala 1-5, la concentración espermática se determinó mediante fotómetro SDM 6 Minitube® realizando dos veces la evaluación por eyaculado, y el porcentaje de células anormales se evaluó con cámara de Neubauer, de acuerdo con la previa evaluación los eyaculados con buena calidad espermática fueron procesados en dosis seminales para IA en las cerdas del CEIEPP-UNAM, de acuerdo con su disponibilidad por prueba de celo positiva (Gutiérrez, 2009.)

Siguiendo el protocolo de la institución se registró a la cerda inseminada y las dosis con las que fueron cubiertas, posteriormente se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonido para capturar los datos con el software PigCHAMP®. Mediante esta herramienta se recopilaron los datos correspondientes a las cubriciones de las cerdas (dosis con las que fueron inseminadas, fecha de inseminación) y el diagnóstico de gestación y el registro de LNT. Se hizo relación de los datos obtenidos con los de la colecta, evaluación y elaboración de dosis seminales, para después clasificarlas por semental, periodo experimental y tipo de dieta, por último, se ordenaron por fecha y se dividieron en los bloques anteriormente mencionados (Control y Periodo 1 y Periodo 2) con el fin de recopilar la base de datos para el análisis estadístico (Přibilová *et al.*, 2018).

7.3.- Análisis estadístico.

Cada eyaculado de cada verraco se consideró como un caso estadístico ($n = 180$). Los datos obtenidos se analizaron con Kruskal-Wallis para la comparación de medias por Dunn's a través del software GraphPad Prism 5.0. Los parámetros de calidad del espermatozoide se probaron para determinar la normalidad y la homocedasticidad mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene (con un nivel de significancia establecido en 5%) (GraphPad software Inc., San Diego, California, E.U.).

VIII. RESULTADOS

En los resultados obtenidos de la evaluación del volumen en los eyaculados, no se encontró un aumento en los valores en ml de las muestras de los sementales cuya dieta fue adicionada con L-Carnitina en el periodo 1 (249 ± 20.7) comparadas con su control (239 ± 18.7) a diferencia del periodo 2, en el cual se encontró diferencia significativa (327 ± 15.2). En aquellos sementales cuya dieta incluyó Ácido Ascórbico + L-Carnitina también se observan aumentos en los valores respecto al periodo control (185 ± 13.1), obteniendo en el periodo 1 (238 ± 17.5), y en el periodo 2 (250 ± 10.7) ($P > 0.05$). En cuanto aquellos con la dieta adicionada con Ácido Ascórbico, no hubo diferencias significativas (Figura 7).

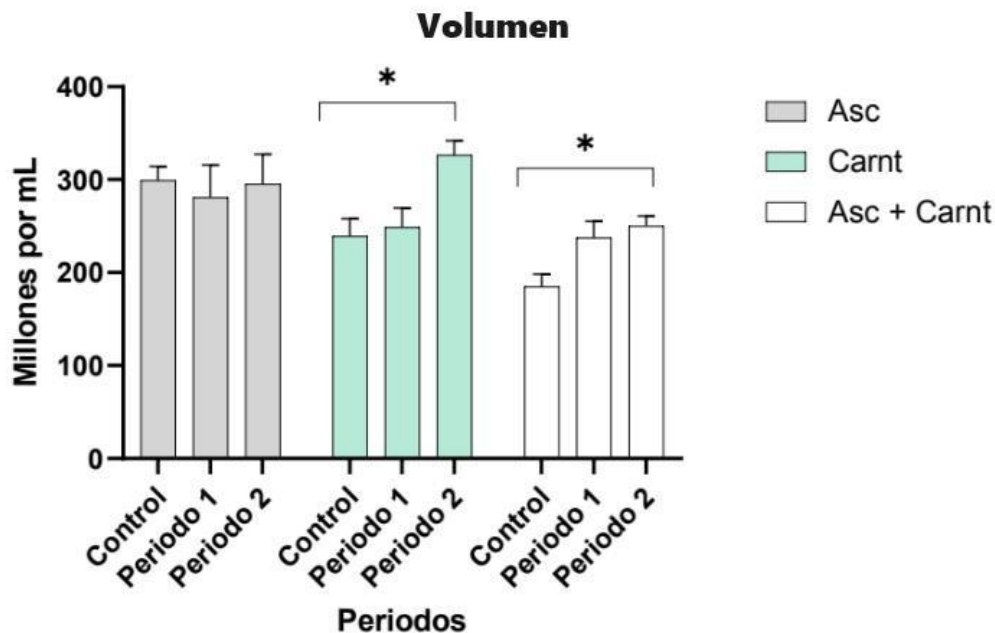


Figura 7. Medias de volumen bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.

En movilidad los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en los tres modelos experimentales, sin embargo, se registraron aumentos en los valores para las tres dietas en el periodo 2 respecto a su periodo control, Ácido Ascórbico (88 ± 1.20) vs (90 ± 1.49), L-Carnitina (88 ± 1.24) vs (89 ± 1.37) y Ácido Ascórbico + L-Carnitina (87 ± 1.54) vs (92 ± 1.78), (Figura 8).

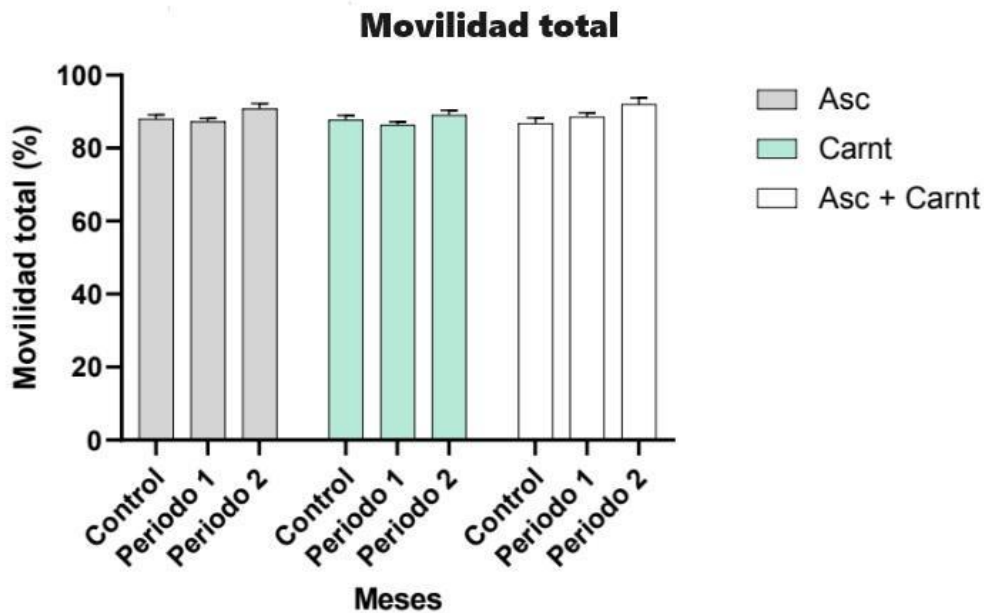


Figura 8. Medias de movilidad total bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.

En el apartado de concentración, la dieta suplementada con ácido ascórbico es la única que presenta registros positivos en los valores, comparado con el periodo control (287 ± 26) vs periodo 1 (343 ± 77.6), sin embargo, en el periodo 2 hay un decremento (304 ± 68.1). Para las dietas suplementadas con L-Carnitina y Ácido Ascórbico + L-Carnitina los valores registrados respecto al periodo control fueron menores para los periodos 1 y 2 (Figura 9).

El porcentaje de células espermáticas con morfología normal no presentaron diferencias significativas para el modelo experimental con ácido ascórbico. Para la dieta con L-Carnitina se registra un pequeño decremento en los valores ($P > 0.05$), comparando el periodo control (92 ± 2.27) con el periodo 2 (85 ± 6.85), de forma similar ocurre con el modelo experimental con Ácido Ascórbico + L-Carnitina cuyo periodo control (93 ± 1.42) es mayor al periodo 2 (87 ± 3.50), sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$).

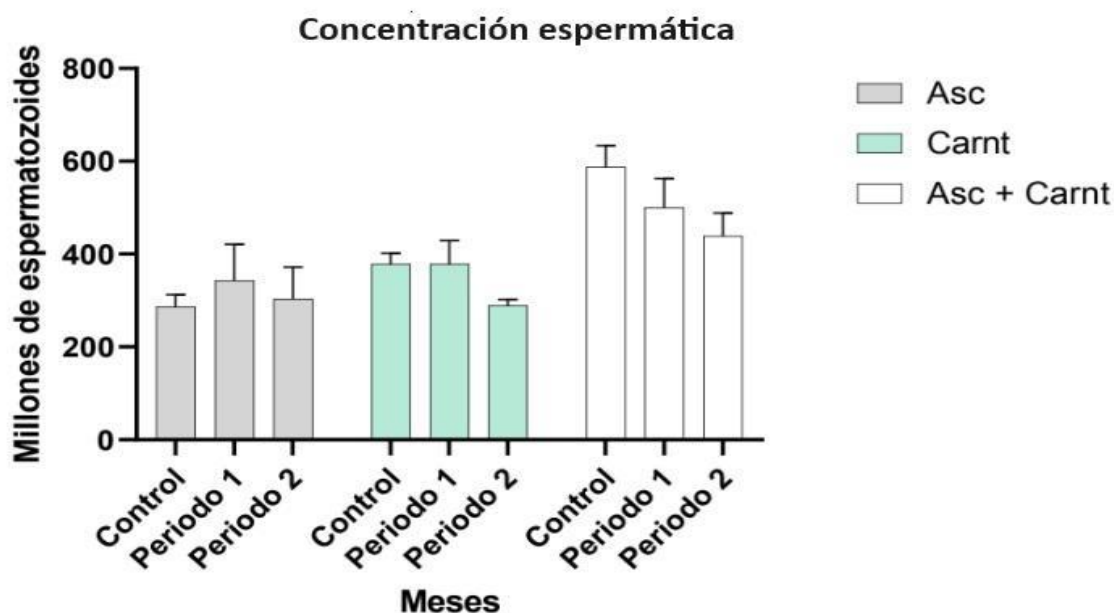


Figura 9. Medias de concentración espermática bajo los tres modelos experimentales, en el grupo control; periodos 1 y 2.

Los datos de LNT en la dieta suplementada con Ácido Ascórbico registra en el grupo control (10.35 ± 0.93) vs el periodo 2 (11.17 ± 1.62) sin diferencia significativa. Para la dieta con L-Carnitina el periodo control (11.12 ± 1.23) vs el periodo 2 (14.29 ± 2.27) muestra una ligera mejora sin ser estadísticamente significativa. Por último, para la dieta con Ácido ascórbico + L-Carnitina el periodo control (9.82 ± 0.88) vs el periodo 2 (11.40 ± 1.88) muestra mejoras en los valores sin diferencias ($P > 0.05$).

Para el porcentaje de fertilidad la dieta con Ácido Ascórbico registró un incremento de 8.6% comparando el periodo control (91.4 %) con el periodo 2 (100%), para la dieta con L-Carnitina el periodo control registró (88.3 %) y el periodo 2 (100%) con un incremento de 11.7%, y para Ácido Ascórbico + L-Carnitina el periodo 1 (100%) mostró un aumento del 12.1% respecto al control (87.9 %), para luego decrecer en el periodo 2 (90%), (Figura 10).

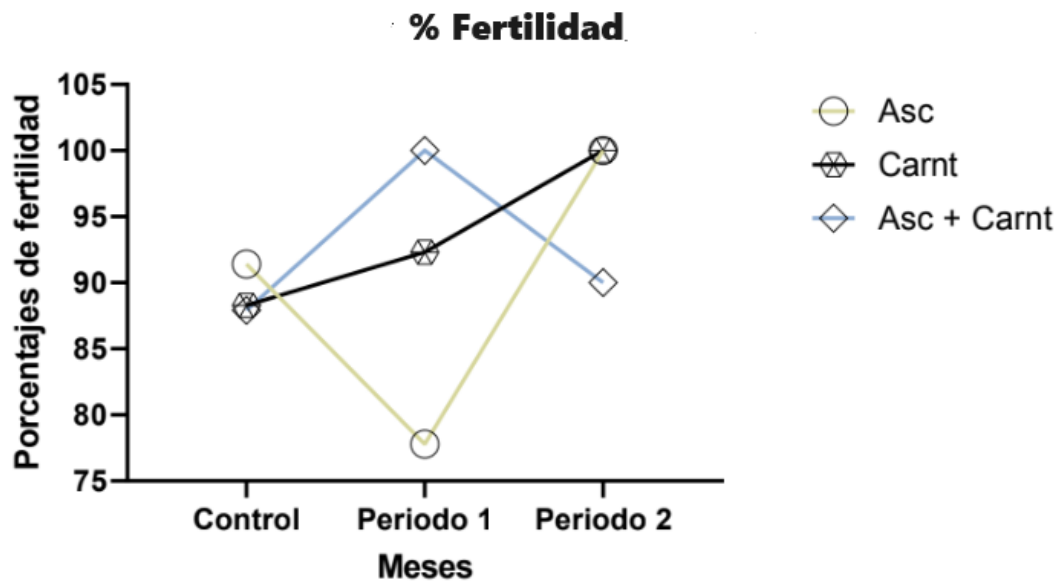


Figura 10. Medias del porcentaje de fertilidad en el grupo control, y en los periodos 1 y 2.

IX. DISCUSIÓN

La fertilidad del macho depende de factores como el medio ambiente, el estado clínico y físico del semental, de la funcionalidad del aparato reproductor y de la dieta, que juntos intervienen en la calidad espermática de los eyaculados que son utilizados en las TRA (Flowers, 2022).

En el presente estudio se observó que los tratamientos en la dieta de verracos L-Carnitina y L-Carnitina + Ácido Ascórbico incrementa significativamente el volumen de los eyaculados evaluados en el periodo 2 comparado con el grupo control, estos resultados coinciden con los resultados de Přebilová *et al.*, (2018) que encontraron un aumento de los valores de volumen en las semanas 10, 11 y 13 de su experimento con la adición de 500 mg x kg de Carnitina en la dieta de verracos, en cuanto a la adición de ácido ascórbico a la dieta. Abdel-Khalek *et al.*, (2023) reportaron que éste compuesto mejora el valor de volumen en machos cabríos a una ración de 2g x kg en un periodo de 8 semanas, atribuido a su capacidad para aumentar los valores séricos de testosterona que influye en el desarrollo y función sexual del macho, por ejemplo, el aumento de la circunferencia escrotal, asociado a una mayor producción de eyaculado. Al-Daraji y Tahir (2014) encontraron aumento en las concentraciones de suero sanguíneo de las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y testosterona en patos machos tratados con L-Carnitina, en conjunto estas hormonas potencian el proceso de espermatogénesis, además de influir en el tamaño del tejido testicular y en la diferenciación y maduración de células de Leydig y de Sertoli siendo un factor que mejora la calidad y cantidad de semen.

En el parámetro de movilidad espermática no presentó diferencias significativas en las tres dietas implementadas, sin embargo, se detectaron tendencias a mejorar los valores. Revisando antecedentes encontramos que Přebilová *et al.*, (2018) reportaron un aumento en los valores de movilidad con la adición de L-Carnitina en la dieta de verracos, en humanos Haseen *et al.*, (2017) encontraron una correlación positiva entre los niveles de Carnitina en plasma seminal y la movilidad espermática, al contrario, Balogun *et al.*, (2022) y Yeste *et al.*, (2010) no encontraron diferencias importantes en verracos a pesar de registros previos. Refiriéndose al Ácido Ascórbico, Al-Dhalimy *et al.*, (2021)

encontraron mejoras de este parámetro en espermatozoides de ratas Wistar en administración por vía oral, Abdel-Khalek *et al.*, (2023) también reportaron mejoras en machos cabríos, y Egbuniwe *et al.*, (2020) hicieron lo propio en codornices. Carnitina es un factor importante en la generación de energía a nivel mitocondrial pues transporta ácidos grasos a través de la membrana para la β -oxidación, proceso crucial para gran parte de la generación de ATP en el espermatozoide (K. Yang *et al.*, 2020; Silvestre *et al.*, 2021). Ácido Ascórbico por su acción antioxidante actúa frente a diferentes radicales previniendo problemas consecuentes al estrés oxidativo como la lipoperoxidación que tiende a afectar propiedades del espermatozoide como la movilidad (Machado de Almeida y Fernandes, 2008; Bourges, 2008).

En el parámetro de concentración espermática la dieta con ácido ascórbico fue la única de los tres modelos experimentales en demostrar mejoras en los valores comparados con el grupo control, aumentando en el periodo 1 y decreciendo en el periodo 2. En contraste las dietas adicionadas con L-Carnitina y Ácido Ascórbico + L-Carnitina mostraron pequeñas disminuciones en los valores obtenidos sin ser estas variaciones significativas respecto a su control. En modelos experimentales similares con la adición de L-Carnitina Yeste *et al.*, (2010) no encontraron cambios en la adición con Carnitina en la dieta a dosis de 625 mg x kg en 20 semanas, en cambio Balogun *et al.*, (2022) encontraron una tendencia a mejora en este parámetro con la misma dosis pero en un periodo de 12 semanas, por otra parte Přebilová *et al.*, (2018) no encontró mejoras en este parámetro usando una dosis de 500 mg x kg en la dieta en un lapso de 16 semanas, pero sí una relación entre el volumen y la concentración espermática, en el que el aumento del volumen implicaba una disminución en el valor de concentración. Se tiene registro de un aumento en los valores de concentración adicionando Ácido Ascórbico en la dieta de diferentes especies, Al-Dhalimy *et al.*, (2021) en ratas sometidas a estrés en dosis de 50 mg x kg, Abdel-Khalek *et al.*, (2023) en cabríos en dosis de 2 gr x kg en un periodo de 8 semanas y Egbuniwe *et al.*, (2020) en codornices a concentración de 200 mg x kg durante 56 días. El mecanismo por el que la L-Carnitina puede mejorar la concentración espermática es mediante el aumento de sustrato energético para la espermatogénesis y a sus efectos como agente antioxidante, sin embargo, los mejores

resultados se han percibido en pacientes con problemas fértiles como la azoospermia (Balogun *et al.*, 2022). El Ácido Ascórbico por sus efectos antioxidantes disminuye los daños causados por ERO en el estrés oxidativo el cual es capaz de alterar el proceso de espermatogénesis y por tanto la producción de espermatozoides (Al-Dhalimy *et al.*, 2021), además promueve la producción de hormonas como la testosterona que modula la espermatogénesis y se asocia con un mayor tamaño testicular importantes para la producción espermática (Abdel-Khalek *et al.*, 2023).

Los valores de morfología espermática no tuvieron cambios significativos a lo largo del periodo experimental en relación con el periodo control, salvo por una ligera mejora en el último bloque experimental con la adición de Ácido Ascórbico. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Balogun *et al.*, (2022) con L-Carnitina en la dieta, no así con lo registrado por Přebilová *et al.*, (2018) que encontró una disminución de los defectos del tipo primarios y secundarios, aunque no fueron significativos, y Yeste *et al.*, (2010) que encontró mejoras significativas en verracos de la raza Pietrain, lo cual asociaron con la capacidad de la L-Carnitina para proteger a los espermatozoides del daño por lipoperoxidación. Abdel-Khalek *et al.*, (2023) en cabríos y Egbuniwe *et al.*, (2020) en codornices, han reportado mejoras en el porcentaje de espermatozoide morfológicamente normales con la adición de Ácido Ascórbico, asociando dichos efectos a sus propiedades como antioxidante directo y como promotor en la producción de otras sustancias antioxidantes previniendo daño al ADN, a la membrana plasmática por lipoperoxidación y alteraciones en el proceso de espermatogénesis.

En el presente estudio se tomó registro de la tasa de fertilidad y del número de lechones nacidos totales (LNT) para correlacionar la fertilidad de las dosis elaboradas de los diferentes tratamientos. Los datos obtenidos respecto al parámetro LNT no mostraron variaciones significativas en las cerdas inseminadas con dosis de verracos alimentados con dietas que incluyeron Ácido Ascórbico y Acido Ascórbico + L-Carnitina respecto a las dosis aplicadas en el grupo control, sin embargo, las cerdas inseminadas con dosis correspondientes de sementales alimentados con la dieta con L-Carnitina mostraron un aumento en la cantidad de lechones nacidos en el periodo 2 (14.29 ± 2.27) respecto a las

correspondientes al grupo control (11.12 ± 1.23).

El porcentaje de fertilidad se midió como la cantidad de servicios exitosos del total de inseminaciones realizadas. Los resultados obtenidos mostraron variaciones importantes con aumentos en el porcentaje de éxito en la inseminación, para las cerdas inseminadas con dosis de verracos bajo cuya dieta incluyó Ácido Ascórbico en el periodo control se registró un 91.4%, 77.7% en el periodo 1 y 100% en el periodo 2. Para aquellas inseminadas con dosis de verracos tratados con L-Carnitina en el periodo control se registró un 88.3%, 92.3% para el periodo 1 y 100% en el periodo 2. Por último, las correspondientes al grupo tratado con Ácido Ascórbico + L-Carnitina presentaron su mayor aumento en el periodo 1 con 100% comparado al grupo control (87.9%) para después decrecer en el periodo 2 (90%).

En la presente investigación la hipótesis es que un aumento en los valores de calidad espermática con la adición de antioxidantes tiene relación con parámetros productivos de concepción como LNT y fertilidad al mejorar la capacidad fertilizante de las dosis seminales. Barquero *et al.*, (2021) determinaron la relación existente entre rasgos de calidad espermática con la tasa de fertilidad (hembras preñadas/número total de hembras inseminadas (%)) y parámetros como lechones totales nacidos por camada y lechones nacidos vivos, encontrando una posible relación con parámetros cinemáticos. Tsakmakidis *et al.*, (2010) buscaron la relación entre parámetros como morfología con tasa de concepción y tamaño de camada.

Se han reconocido subpoblaciones en el tipo de movilidad entre verracos, e incluso entre eyaculados de los mismo verracos, esta variabilidad puede ofrecer ventajas ante los obstáculos que representa el trayecto en el tracto reproductor femenino dando mayor probabilidad a la tasa de supervivencia, además se ha asociado a aquellos espermatozoides con movimiento más lento y menos direccional con baja fertilidad (Fernández *et al.*, 2022), lo que sustenta la importancia de esta cualidad en la capacidad fértil del eyaculado.

El plasma seminal tiene como primordial función la protección de los espermatozoides ante el ambiente del tracto reproductor femenino, que por medio de mecanismos de protección inmunológico, dificultan su transporte a través del moco cervical, por lo que resulta importante mantener la integridad estructural y de movilidad de los espermatozoides hasta el momento de la capacitación espermática donde un gradiente de moléculas modifican aspectos fisiológicos como el patrón de movimiento para optimizar el proceso de fecundación (Fernández *et al.*, 2022).

Barquero *et al.*, (2021) y Fernández *et al.*, (2022) coinciden en que la fertilidad es un fenómeno multifactorial, en el que para el macho y la hembra intervienen numerosos factores como las condiciones de alojamiento, estado nutricional, actividad endocrina, historial de la vida reproductiva, entre otros, lo que implica una dificultad para determinar el potencial de fertilidad de las dosis seminales después de la inseminación.

X. CONCLUSIÓN

La adición de L-Carnitina y Ácido ascórbico o su combinación en la dieta de verracos incrementa el volumen del eyaculado y mantiene la movilidad para la elaboración de dosis potencialmente fértiles. El incrementar las concentraciones de estos aditivos podría influir sobre aquellos parámetros de calidad espermática que en este estudio no se vieron afectados como la concentración y morfología. Considerando los resultados obtenidos se recomienda hacer uso de técnicas de evaluación más especializadas como el sistema CASA para una evaluación más objetiva. Si bien LNT y los porcentajes de fertilidad son parámetros utilizados para medir rasgos de productividad en la piara reproductora, relacionarlos directamente con la calidad de dosis espermáticas y del eyaculado, resulta ser complicado pues existen muchos factores de variabilidad dependientes de la hembra, del macho, del operario e incluso del ambiente, que influyen sobre el éxito de fertilización.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Khalek, A. E.; El-Maghraby, M. M.; Elbially, Z. I.; Al Wakeel, R. A.; Almadaly, E. A.; Shukry, M.; El-Badawy, A. A.; Zaghloul, H. K.; Assar, D. H. (2023). Mitigation of endogenous oxidative stress and improving growth, hemato-biochemical parameters, and reproductive performance of Zaraibi goat bucks by dietary supplementation with *Chlorella vulgaris* or/and vitamin C. *Tropical animal health and production*, 55(4), 267.
- Adewoyin, M.; Ibrahim, M.; Roszaman, R.; Isa, M. L. M.; Alewi, N. A. M.; Rafa, A. A. A.; Anuar, M. N. N. (2017). Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases*. 5(1), 9.
- Alamaary, M. S.; Haron, A. W.; Hiew, M. W.; & Ali, M. (2020). Effects of cysteine and ascorbic acid in freezing extender on sperm characteristics and level of enzymes in post-thawed stallion semen. *Veterinary medicine and science*. 6(4): 666–672.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. (2002) *Biología Molecular de la Célula*. 3era edición. Ediciones Omega.
- Al-Daraji, H; Tahir, A. (2014). Efecto de la suplementación con L-Carnitina sobre la calidad del semen de draco. *Revista Sudafricana de Ciencia Animal*. 44(1), 18-25.
- Amann, R. P.; Hammerstedt, R. H. (2002). Detection of differences in fertility. *Journal of Andrology*. 23 (3): 317-325.
- Amann, R. P. (1989). Can the fertility potential of a seminal plasma be predicted accurately?. *Journal of Andrology*. 10 (2): 89-98.
- Ax, R. L.; Dally, M. R.; Didion, B. A.; Lenz, R. W.; Love, C. C.; Varner, D. D.; Hafez, B.; Bellin, M. E. (2002). Evaluación del semen. En Hafez, E. S. E.; Hafez, B. (Eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (pp. 387-400). McGraw-Hill Interamericana.
- Balogun, K.; Lu, N.; Orlando, U.; Torborg, H.; Kleve-Feld, M.; Denton, N.; Stewart, K. (2022). Effects of dietary carnitine supplementation on semen output and quality of boars. *Translational animal science*. 6(4).
- Baqir Al-Dhalimy, A. M.; Alabsawy, S. K.; Al-Mousaw, M.; & Al-Dhalemi, D. M. (2021). Ameliorated Effect of Ascorbic Acid and Selenium against the Stress Effect on Sperm Quality of Rats. *Archives of Razi Institute*. 76(4): 1137-1142.
- Barquero, V.; Roldan, E. R. S.; Soler, C.; Vargas-Leitón, B.; Sevilla, F.; Camacho, M.; Valverde, A. (2021). Relationship between Fertility Traits and Kinematics in Clusters of Boar Ejaculates. *Biology*, 10(7), 595.
- Bourges, H. (2008). Aspectos nutriólogicos de la vitamina C. En Konigsberg, M. (Ed). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. (pp. 579-594). Manual moderno.

- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica*. 36 (1), 91-100.
- Castellini, C.; D'Andrea, S.; Cordeschi, G.; Totaro, M.; Parisi, A.; Di Emidio, G.; Tatone, C.; Francavilla, S.; Barbonetti, A. (2021). Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis. *Antioxidants*, 10(5), 695.
- Egbuniwe, I. C.; Uchendu, C. N.; Obidike, I. R. (2020). Effects of betaine and ascorbic acid supplementation on serum gonadotropin, testicular histological analysis and sperm quality in male Japanese quails during the dry season. *Theriogenology*, 158, 391-405.
- Fattah, A.; Sharafi, M.; Masoudi, R.; Shahverdi, A.; & Esmaeili, V. (2017). L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology*. 74:13-18.
- Fernández, P.; Garriga, J.; Casas, I.; Yeste, M.; & Bartumeus, F. (2022). Predicting fertility from sperm motility landscapes. *Communications biology*, 5(1), 1027.
- Flowers, W. (2021). Factors affecting the production of quality ejaculates from boars. *Animal reproduction science*. 246: 106840.
- Fuentes, M.; Pérez, L.; Suárez, Y.; Soca, M. (2006) Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. (8)1: 1-36.
- Garner, L.; Hafez, E. S. E. (2002). Espermatocitos y plasma seminal. En Hafez, E. S. E.; Hafez, B. (Eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (pp.98-112). McGraw-Hill Interamericana.
- Gharagozloo, P.; Aitken, P. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*. 26: 1628–1640.
- Gibbons, A. E.; Fernández, J.; Bruno-Galarraga, M. M.; Spinelli, M. V.; & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*. 16(4): 803-809. _
- Gilbert, S. F. (2000) Fertilization: beginning a new organism. En: Gilbert, S. F. (Eds). *Developmental Biology*. 6 edición. pp. 185-217. SINAUER.
- Guthrie, H. D.; Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 78(8): 1700–1708.

- Gutiérrez, P.O. (2009). Valoración in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol, Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma De México. Ciudad de México, México. 105 p.
- Hafez, E. S. E. (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. En Hafez, E. S. E.; Hafez, B. (Eds). Reproducción e inseminación artificial en animales. (pp. 3-12). McGraw-Hill Interamericana.
- Haseen, S.; Ahsan, S.; Iqbal, T.; & Ahmed, S. (2017). Relationship of seminal free L-Carnitine with functional spermatozoal characteristics: Results from an observational study conducted in a tertiary care hospital of Karachi, Pakistan. *Journal Of The Pakistan Medical Association*, 67(2): 280-284.
- Hernández, D.; Barrera, V.; Briz, O.; González, E.; Laguna, K.; Jardínez, A.; Sánchez, M.; Matuz, D. (2019). El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 62(3), 6-19.
- Iglesias, A. E.; Gutiérrez, O. (2021). Espermatogénesis. En Iglesias, A. E.; Mosqueda, M. (Eds). *Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco*. (pp. 21-25). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Iglesias, A. E. (2021). Evaluación seminal. En Iglesias, A. E.; Mosqueda, M. (Eds). *Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco*. (pp. 55-69). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Jabbar, A.; Abbass, W.; Riaz, A.; Sattar, A.; Akram, M. (2015). Effect of different concentrations of ascorbic acid on semen quality and hatchability of indigenous aseel chicken. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(5), 1222-1226.
- Kooshesh, L.; Nateghian, Z.; Aliabadi, E. (2023). Evaluation of L-Carnitine Potential in Improvement of Male Fertility. *Journal of reproduction & infertility*, 24(2), 69–84.
- Li, M. C.; Chiu, Y. H.; Gaskins, A. J.; Mínguez, L.; Nassan, F. L.; Williams, P. L.; Petrozza, J.; Hauser, R.; Chavarro, J. E. (2019). Men's intake of vitamin C and β -Carotene is positively related to fertilization rate but not to live birth rate in couples undergoing infertility treatment. *The Journal of nutrition*. 149 (11), 1977-1984.
- Li, R.; Jia, Z.; & Trush, M. A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *HHS Public Access*. 1(1): 9–21.
- Longobardi, V.; Salzano, Á.; Campanile, G.; Marrón, R.; Palumbob, F.; Vitiello, M.; Gasparrini, B. (2017). Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*. 88: 236-243.

- Machado de Almeida, E.; Fernandes, S. (2008). Potencial antioxidante del Ácido ascórbico. En Konigsberg, M. (Ed). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* (pp. 279-290). Manual moderno.
- Maside, C.; Recuero, S.; Huetos, A.; Maynou, J.; Yeste, M. (2023). Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. *animal.* 17.
- Mazzilli, F.; Rossi, T.; Ronconi, C.; Germini, B.; Dondero, F. (1999). L-Carnitina intraspermatica e survival della motilità nemaspermica (intraspermatic L-carnitine and survival of sperm motility). *Minerva ginecologica*, 51(4), pp. 129-134.
- Mellagi, A.; Will, K.; Quirino, M.; Bustamante-Filho, I.; Ulguim, R.; & Bortolozzo, F. (2022). Update on artificial insemination: Semen, techniques, and sow fertility. *Molecular Reproduction and Development*, 1-11.
- Membrillo, A.; Córdova, A.; Hicks, J.; Olivares, I.; Martínez, V.; Valencia, J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Asociación interciencia.* 12 (28), pp. 699-704.
- Medeiros, M. (2008). Daño al DNA. Konigsberg, M. (Ed). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.* (pp.119-134). Manual moderno.
- Minitube. 2024. Tecnologías de reproducción animal. En Línea. Disponible en <https://www.minitube.com/catalog/es/>. Consultado el día 12/05/2024.
- Moraes, C.; Meyers, S. (2018). The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions. *Animal Reproduction.* 194: 71-80.
- Mosqueda, M. (2021). Morfología espermática. En Iglesias, A. E.; Mosqueda, M. (Eds), *Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco.* (pp. 27-39). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Nazari, L.; Salehpour, S.; Hosseini, S.; Allameh, F.; Jahanmardi, F.; Azizi, E.; Hashemi, T. (2021). Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. *JBRA Assisted Reproduction.* 25(1): 76-80.
- Nesci, S.; Spinaci, M.; Giovanna, G.; Nerozzi, C.; Alessandra, P.; Cristina, A.; Tamanini, C.; Diego, B. (2020). Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology.* 144: 82-88.
- Páramo, M. (2008). Morfofisiología de los órganos genitales del macho y de la hembra. En Galina, C.; Valencia, J. (Eds). *Reproducción de animales domésticos.* Limusa.

- Peñafiel, M. J. S., González, J. A. G., De Loera Ortega, Y. G., De Lourdes Juárez Mosqueda, M., Pérez, Ó. G., Reyes, A. E. I., & Del Carmen García Contreras, A. (2021). *Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco*. Disponible en: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25193>. Consultado el 12/05/24.
- Přibilová, M.; Horký, P.; Urbánková, L.; Nevrkla, P.; Skládanka, J. (2018). Influence of L-carnitine daily supplement on qualitative and quantitative ejaculate indicators in boars during the summer period. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 66(5), 1199-1206.
- Porras, A. (2018). Examen de la capacidad reproductiva del semental. En Rangel, L.; Hernández, J. (Eds). *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos*. UNAM.1 edición.
- Rangel, L. (2018). Anatomía Reproductiva. En Rangel, L.; Hernández, J. (Eds). *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos*. UNAM.1 edición.
- Rowell, V.; Bender, D.; Botham, K.; Kennelly, P.; Weil, P. (2018). *Harper bioquímica ilustrada*. Lange.
- Silvestre, M. A.; Yániz, J. L.; Peña, F. J.; Santolaria, P.; & Castelló-Ruiz, M. (2021). Antioxidants (Basel, Switzerland), 10(7), 1096.
- Sutkeviciene, N.; Riskeviciene, V.; Jasnuskauskas, A.; Zilinskas, H.; Andersson, M. (2009). Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta veterinaria Scandinavica*, 51(1), 53.
- Tsakmakidis, I. A.; Lymberopoulos, A. G.; Khalifa, T. A. (2010). Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *Journal of veterinary science*, 11(2), 151–154.
- Vicenta, C.; Pavesi, A.; Feldman, R.; Bouvet, B. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Archivos de Medicina Interna*, 37(1), 7-14.
- Waberski, D.; Riesenbeck, A.; Schulze, M.; Weitze, K. F.; & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*.137: 2-7.
- World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (6th ed.). World Health Organization, pp.
- Yang, K.; Wang, N.; Guo, H.-T.; Wang, J.-R.; Sun, H.-H.; Sun, L.-Z.; Zhou, J.-B. (2020). Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of boar semen. *Asian-Australia Journal of Animal Sciences*. 33(11): 1763–1769.

- Yang, Y. W.; Chen, L.; Mou, Q.; Liang, H.; Du, Z.-Q.; & Yang, C.-X. (2020). Ascorbic acid promotes the reproductive function of porcine immature Sertoli cells through transcriptome reprogramming. *Theriogenology*. 158: 309-320.
- Yeste, M.; Sancho, S.; Briz, M.; Pinart, M.; Bussalleu, E.; & Bonet, S. (2010). A diet supplemented with l-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. *Theriogenology*. 73(5): 577-586.
- Zenteno, T.; Saldaña, Y. (2008). Daño a lípidos. En Konigsberg, M. (Ed). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (pp. 135-146). Manual moderno.
- Zentella, M.; Piña, E. (2008). Daño a proteínas. En Konigsberg, M. (Ed). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (pp. 97-118). Manual moderno.
- Zuidema, D.; Kerns, K.; & Sutovsky, P. (2021). An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination. *Animals (Basel) MDPI*. 11(12): 3563.