

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px) DEL PLASMA SEMINAL DE CERDO EN VERACRUZ, MÉXICO

Hernández A.¹, Hernández A.K.¹, Barrientos M.¹, Cervantes P.¹,
Domínguez B.¹, Absalón-Medina V.A.²

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. * anhernandez@uv.mx.

²University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine.

RESUMEN

Los cerdos desarrollan adaptaciones genéticas para resistir las condiciones medioambientales como el calor elevado (CE), tal es el caso de cerdos mantenidos en granjas en clima tropical de Veracruz, México (AW), con razas comerciales adaptadas por más de 40 años al clima extremo de la región. Para determinar la influencia del estrés oxidativo asociado al CE y su efecto sobre el manejo reproductivo de las granjas, se utilizó semen descongelado de ocho verracos de la región para evaluar la viabilidad de sus espermatozoides (motilidad en masa, morfología así como integridad acrosomal), luego de haber adicionado o no un 20% de plasma seminal (PS) autólogo u homólogo, para asociarlo con la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y GlutatióN Peroxidasa (GSH-Px) del PS. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía y factorial, la prueba de LSD Fisher y la correlación de Sperman. La media de la actividad enzimática del PS fue de 76.41 ± 0.31 U/mL y de 9.83 ± 0.25 U/g proteína para SOD y de 0.27 ± 0.01 U/mL y de 0.03 ± 0.002 U/g proteína para GSH-Px. La correlación de la actividad enzimática del PS con la viabilidad espermática resultó ser baja-media, sin significancia estadística ($p > 0.05$). Se concluye que la adición de PS homólogo incrementa en seis puntos porcentuales la viabilidad en semen descongelado y que dicha viabilidad no está asociada con la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GSH-Px del PS.

Palabras clave: Porcicultura tropical; Antioxidantes; Criopreservación; Viabilidad Espermática; Integridad acrosomal.

ACTIVITY OF ENZYMES SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) AND GLUTATHIONE PEROXIDASE (GSH-Px) OF BOAR SEMINAL PLASMA IN VERACRUZ, MEXICO.

ABSTRACT

The pigs develop genetic tests to withstand environmental conditions such as high heat (EC) adaptations, as in the case of pigs kept on farms in tropical climate of Veracruz, Mexico (AW), with commercial breeds adapted for more than 40 years of extreme weather region of. To determine the influence of oxidative stress associated with the EC and its effect on reproductive management of farms, thawed semen eight boars in the region was used to assess the viability of their sperm (motility in mass, morphology and acrosome integrity) after having added or 20% of seminal plasma (PS) autologous or homologous, to associate with the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) PS enzymes. The results were analyzed by one-way ANOVA and factorial, Fisher LSD test and Spearman correlation. Mean PS enzyme activity was 76.41 ± 0.31 U / mL and 9.83 ± 0.25 U / g protein for SOD and 0.27 ± 0.01 U / mL and 0.03 ± 0.002 U / g protein for GSH-Px. The correlation of the enzymatic activity of PS with sperm viability was found to be low-medium, not statistically significant ($p > 0.05$). It is concluded that the addition of PS counterpart increased by six percentage points in thawed semen viability and that such viability is not associated with the activity of SOD and GSH-Px antioxidant enzymes PS.

Keywords: Tropical swine farm; Antioxidants; Cryopreservation; Sperm viability; Acrosome integrity.

INTRODUCCIÓN

La producción de semen porcino está influida por muchos factores, entre los que se encuentran el fotoperiodo y la temperatura, ambos causantes de variaciones marcadas en la calidad del mismo. El semen se caracteriza por contener una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga fácilmente oxidables y requiere una defensa antioxidante eficaz. Entre las diversas condiciones que determinan alteraciones en el semen se ha señalado al estrés oxidativo como una condición asociada con la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Surai y Fisinin, 2015; Kumar *et al.*, 2015). Además se ha demostrado que los fluidos del tracto reproductivo crean un ambiente favorable para los espermatozoides durante su tránsito, maduración en el epidídimo y en la eyaculación gracias a una matriz de sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos, en los que la Superóxido Dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) y la

Glutación Peroxidasa (GSH-Px) son las principales enzimas antioxidantes. Dichas enzimas constituyen el grueso de la protección de los espermatozoides contra un ataque mediado por ROS, afectación que se considera una causa frecuente de trastornos de la fertilidad en los mamíferos (Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011); estos eventos no sólo alteran la integridad de ADN del espermatozoide, sino que limitan el potencial fertilizante de estas células como resultado del daño colateral a las proteínas y lípidos en su membrana plasmática (Aitken *et al.*, 2014).

El papel del plasma seminal (PS) en función de los espermatozoides de mamíferos sigue siendo en gran medida un tema de especulación en cuanto a que se han encontrado tanto efectos inhibidores como estimulantes. Los componentes específicos del PS, particularmente proteínas, se adsorben sobre la superficie del espermatozoide eyaculado a medida que pasan a través de los tractos reproductivos femeninos y masculinos. Estos componentes de revestimiento del espermatozoide parecen tener la importante función de mantener la estabilidad de la membrana hasta el proceso de capacitación (factores de decapitación), por lo que deben ser eliminados, modificados o enmascarados antes que los espermatozoides se sometan a la reacción del acrosoma, un proceso esencial para la fertilización exitosa.

Durante el proceso de criopreservación, las bajas temperaturas a las que se someten los espermatozoides alteran su función debido al estrés oxidativo y la formación de cristales de hielo produciendo daños en las membranas acrosomal y plasmática; por lo que el estrés por choque frío reduce su competitividad frente al semen refrigerado, ya que a este último no se le retira el PS, antes de y/o después del enfriamiento y esto es capaz de minimizar los efectos de dicho proceso (Muiño – Blanco *et al.*, 2008).

En las regiones cálidas de Veracruz, al oriente de México, grupos de granjeros porcícolas, han mantenido, por cuarenta años, unidades de producción con grupos genéticos comerciales, que se han adaptado a las temperaturas elevadas de la zona, empleando para la reproducción la inseminación artificial con semen refrigerado obtenido de animales propios. El trabajo se diseñó para estudiar la importancia del estrés oxidativo en semen congelado de verracos, correlacionando la viabilidad posterior al descongelamiento con la actividad de las enzimas de estrés oxidativo SOD y GSH-Px.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en un clima cálido húmedo Aw2, con lluvias en verano y un índice de humedad de 75%, con temperatura media anual de 25°C y una precipitación pluvial de 1400 mm (García, 1988). Se utilizaron 8 sementales porcinos identificados con letras progresivas de la A a la H, de líneas genéticas

comerciales, en edad reproductiva y con un protocolo de recolección de semen de una vez a la semana.

El manejo de los animales consideró la observancia de las recomendaciones del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Universidad Veracruzana. Las muestras de semen se obtuvieron por medio de la técnica de la mano enguantada (Martín-Rillo *et al.*, 1996); se obtuvieron dos eyaculados de cada semental, a los que se realizó la evaluación de motilidad, viabilidad, y concentración.

La estimación de la motilidad en masa se basó en el vigor de las ondas espermáticas, clasificándolas en valores entre 0 – 5; los eyaculados con una valoración menor a 3 no fueron utilizados en el estudio; de la misma manera se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo 0 a 100% y se utilizaron solo aquellas muestras que mostraban 70% o más de este tipo de movilidad (Hernández *et al.*, 2007). Para evaluar la viabilidad, se utilizó la tinción de eosina nigrosina (EN) diferenciando aquellas células con membrana plasmática alterada por permitir que el colorante penetre al interior dando una coloración púrpura total o parcial, mientras aquellos espermatozoides con membrana intacta no permiten la penetración del colorante y por lo tanto no presentan coloración (Bamba, 1988).

Para evaluar la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática se realizó la prueba hipo-osmótica (HOST), la cual se basa en las modificaciones que se producen en la cola (hinchamiento) cuando los espermatozoides se incuban en un medio hipo- osmótico (Schilling *et al.*, 1984). De cada eyaculado se tomaron dos muestras de 30 ml; una muestra de semen sin diluir y una muestra se diluyó con Vitasem LD (Magapor[®], España) en un volumen 1:5 (semen: diluyente), registrándose simultáneamente la temperatura ambiental (°C). Para congelar se utilizaron muestras diluidas, Se utilizó el método de congelación descrito por Westendorf (1975) modificado por Carvajal (2004), con una concentración final del 6% de glicerol. Por otro lado, para obtener el PS de cada semental, cada muestra de eyaculado sin diluir se centrifugó a 800 g x 10 min, se separó y filtró el sobrenadante a través de un filtro de nylon de 10 µm, para eliminar los restos de células espermáticas. Una vez filtrado se observó en el microscopio para descartar la presencia de espermatozoides (Hernández *et al.*, 2007).

El PS se colocó en microtubos cónicos de centrífuga con capacidad de un 1,5 ml y se conservaron a -20°C hasta el momento de utilizarse para realizar la adición al semen descongelado o la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes GSH-PX y SOD. Un total de 9 pajillas de semen de 0,5 ml de cada semental se descongelaron colocándolas en baño de agua a 37°C por 30 segundos, e inmediatamente después el contenido de las pajillas se colocó en un microtubo cónico de centrífuga de 2 ml (Roca *et al.*, 2005). A una de ellas se le adicionó un

20% de plasma seminal autólogo (semental donador de los espermatozoides), a 7 de homólogo (semental diferente al donador de los espermatozoides) y una última muestra sin adición de PS se consideró como testigo; las muestras se incubaron 60 min a 37°C (Vadnais y Roberts, 2007). Las muestras de PS de cada semental se descongelaron a temperatura ambiente hasta que no presentaban cristales de hielo. La actividad de la enzima SOD en el plasma seminal, se determinó mediante un método colorimétrico que emplea Xantina y Xantina oxidasa para formar radicales superóxido midiendo la actividad de la SOD por el grado de inhibición, empleando reactivos comerciales (RANSOD, RANDOX[®]).

La actividad de la enzima fue expresada en unidades por mililitro (U/mL). La actividad de la enzima GSH-Px en el plasma seminal descongelado, se determinó mediante un método cinético UV NADPH-dependiente, mediante el cual el glutatión oxidado (GSSG) producido por GSH-Px y el hidroxiperóxido se redujeron por glutatión reductasa y NADPH exógenos. Empleando reactivos comerciales (RANSEL, RANDOX[®]), según las instrucciones señaladas por el fabricante. La actividad de la enzima se midió por colorimetría a 340 nm y fue expresada en unidades por mililitro (U/mL), donde cada unidad representa la oxidación de 1 μ mol de NADPH por minuto por mL de plasma seminal. La concentración de las proteínas totales en el PS se determinó por espectrofotometría con la reacción de Biuret (Merck[®]) en donde las proteínas forman en una solución alcalina con iones cobre un complejo de color violeta (Fujimoto *et al.*, 1985).

Las proteínas totales fueron determinadas para expresar la actividad de las enzimas del PS por gramo de proteína (g/dL). Para el diseño del trabajo y análisis de los datos se consideraron las siguientes pruebas: evaluación espermática en semen fresco sin diluir, descongelado e incubado con y sin adición de plasma seminal; la adición de plasma seminal se realizó por una tabla de ocho x ocho, en donde los espermatozoides de cada semental fueron incubados con adición de PS del mismo animal y de cada uno de los otros 7 sementales en estudio.

Los datos fueron analizados con el uso del software STATISTICA 7 para Windows StatSoft, Inc. (2004), los resultados de las pruebas de viabilidad (EN y HOST) fueron expresadas en porcentajes transformados al arcoseno para su análisis con ANOVA por una vía y factorial con un nivel de significancia de $P < 0.05$. La diferencia en las medias entre los porcentajes de viabilidad por semental, por condición del semen (fresco, descongelado, incubado sin y con plasma seminal) y en la actividad de las enzimas antioxidantes GSH-Px y SOD del PS se determinó por la diferencia de medias LSD Fisher. Para la correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GSH-Px con los porcentajes de viabilidad del semen se utilizó la correlación de Spearman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la temperatura ambiental del periodo de muestra, cuyo comportamiento es similar a los reportados para el periodo indicado en la región. Los resultados de los estudios realizados en los eyaculados se presentan como media \pm error estándar en la evaluación de viabilidad espermática por la tinción de eosina nigrosina (EN) y la prueba HOST; de igual manera para la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GSH-Px.

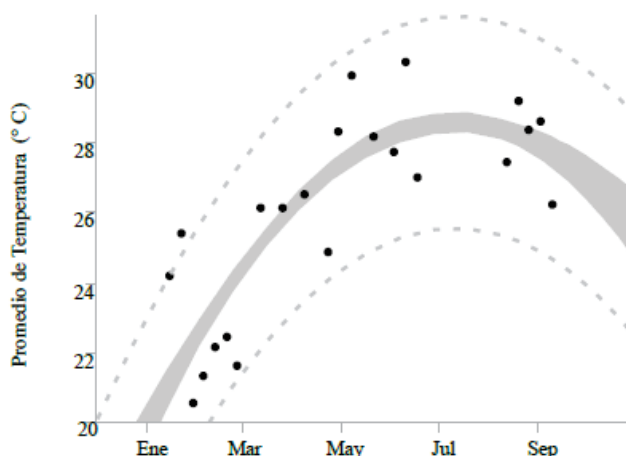


Figura 1. Temperatura media en el momento de la toma de muestra; un efecto cuadrático que representa el patrón típico de la temperatura observada en el tiempo en Veracruz, México. Las líneas de puntos indican el límite de la curva de confianza individual y el campo sombreado corresponde al ajuste del modelo de confianza ($R^2=0.68$; $p<0.01$) [*Mean temperature at the time of sampling; a quadratic effect that represents the typical pattern of observed temperature over time in Veracruz, Mexico. The dotted lines indicate the limit of the individual confidence curve and shading field corresponds to adjustment the confidence model ($R^2=0.68$; $p<0.01$)*]. *(Hernández DAK., et al., 2015).

Con relación a la viabilidad espermática en semen fresco, la figura 2 muestra la proporción de espermatozoides con membrana íntegra y la proporción con membrana funcional en el semen fresco determinadas por la tinción de eosina-nigrosina y la prueba HOST, respectivamente.

La media general en la tinción de EN fue de $60.8 \pm 0.95\%$ y para la prueba hiposmótica fue de $37.27 \pm 1.58\%$, se observan diferencias significativas entre los sementales en la prueba de viabilidad y HOST ($P < 0.05$). Los sementales A, D y H fueron los de mayor proporción de espermatozoides viables, el B y el F los de menor proporción y el C y el G presentaron porcentajes intermedios en la tinción de EN. Por otro lado, los sementales B y D fueron los mejores para la prueba HOST, C, E y F los peores, y A, G y H presentaron valores intermedios. El semental E presentó los valores más bajos en ambas pruebas de viabilidad con

valores de 49 ± 1.32 y $30 \pm 3.57\%$ para EN y HOST, respectivamente.

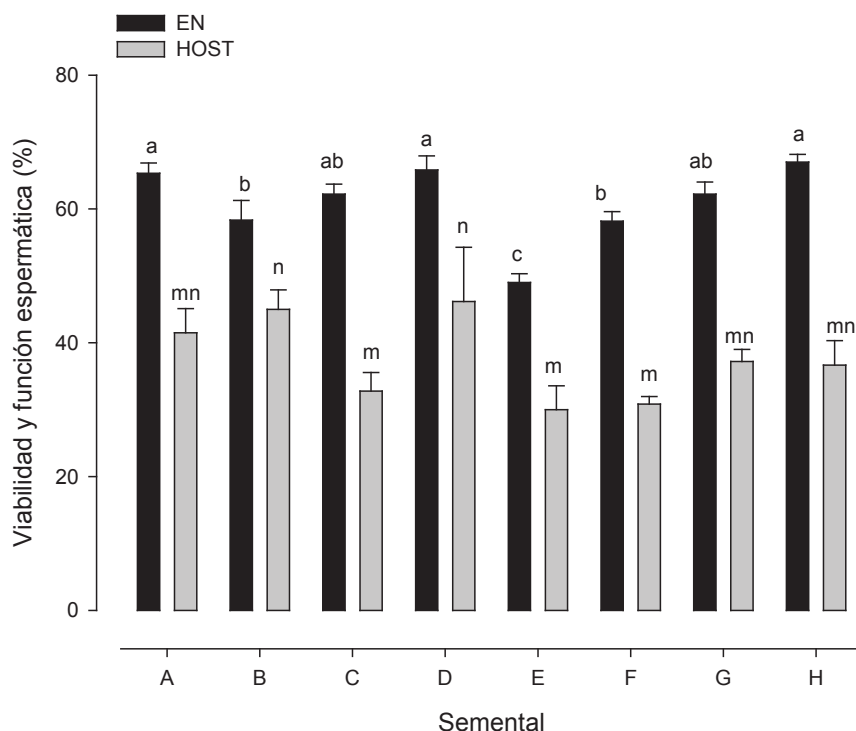


Figura 2. Viabilidad y función espermática de 16 muestras de semen diluido, de 8 cerdos (A-H) previo al proceso de criopreservación, observadas por medio de la tinción de eosina-nigrosina (EN) y la prueba hipoosmótica (HOST) (a, b, c: $P < 0.05$, m, n; $P < 0.05$) [*Viability and sperm function in 16 diluted semen samples from 8 pigs (A-H) prior to cryopreservation process observed by the eosin-nigrosin staining (EN) and the test hypoosmotic (HOST) (a, b, c: $P < 0.05$, m, n; $P < 0.05$)*].

De acuerdo con estos resultados, los valores de viabilidad del semen fresco resultaron bajos al compararlos con los valores óptimos ($> 80\%$) recomendados (Roca *et al.* 2006) como adecuados para ser utilizados en el proceso de criopreservación. Se considera que el 70% de la variabilidad de los porcentajes de viabilidad en el semen descongelado se explica a partir de la variable semental, sin embargo, dicha variabilidad en los sementales ha sido minimizada al congelar espermatozoides epididimarios, entre los cuales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$); por el contrario, estas diferencias fueron manifiestas en los espermatozoides de un eyaculado completo, condición que sugiere que la variabilidad de los eyaculados puede asociarse a la exposición de los espermatozoides a las secreciones procedentes de las glándulas sexuales accesorias en el plasma seminal al momento de ser eyaculados (Rath y Niemann, 1997).

A pesar de que para el estudio se han utilizado eyaculados $>70\%$ de motilidad progresiva, las pruebas de viabilidad (EN y HOST) indicaron resultados bajos.

Esto concuerda con López (2012), quien clasificó eyaculados de cerdos según su motilidad evaluada de forma visual ($> 80\%$ y $< 80\%$) como de buena o mala calidad espermática, respectivamente, pero al realizar la tinción de EN para evaluar la integridad de la membrana obtuvieron un valor inferior (75.5 ± 12.6 y $79.3 \pm 7.4\%$, respectivamente).

La figura 3, muestra la actividad de la enzima SOD en el plasma seminal descongelado expresada en unidades por ml (U/ml) y en unidades por gramo de proteína (U/g proteína). La media general para los sementales de estudio fue de 76.415 ± 0.310 U/ml y de 9.833 ± 0.252 U/g proteína, encontrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los sementales. Siendo los sementales A y C los que presentan los valores más altos en la actividad enzimática expresada en U/ml (77.63 ± 0.94 y 77.77 ± 0.13 U/ml, respectivamente); en tanto que, el semental G presentaron el valor más alto al ser expresado por gramo de proteína.

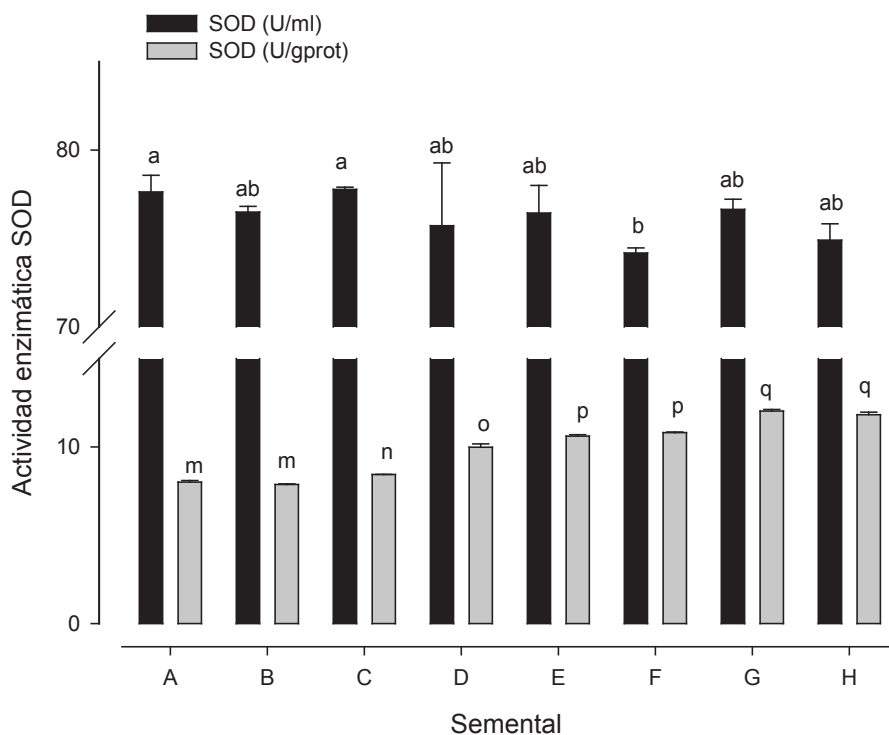


Figura 3. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 16 muestras de plasma seminal procedentes de 8 cerdos (A-H), expresada en U/ml y U/gramo de proteína ($P > 0.05$) [Activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) in 16 seminal plasma samples from 8 pigs (A-H) expressed in U/ml and U/gram protein ($P > 0.05$)].

De manera inversa, los sementales F y B fueron los de valores más bajos, con 74.18 ± 0.28 U/ml y 7.87 ± 0.03 U/g proteína, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados por Kowalowka *et al.* (2008), quienes concluyeron que

la actividad de SOD cambia conforme aumenta la edad del animal, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) la actividad de SOD en cerdos menores de 2 años comparados con cerdos de más de 2 años de edad (94.2 ± 2.3 vs 87.4 ± 1.3 U/mL, respectivamente); encontrándose actividad de SOD en PS incluso en cerdos de edad de madurez sexual temprana (8-12 meses), por lo cual se sugiere que el nivel adecuado de la secreción de SOD concuerda con la madurez sexual en los verracos. En el presente estudio la edad no fue considerada, pero se sugiere que los cerdos se encontraban en una edad reproductiva apta para la reproducción (> 8 meses, < 36 meses). Dado que Koziorowska *et al.* (2011), reportan la actividad enzimática de 81.40 ± 5.84 U/mL en semen diluido y de 55.73 ± 5.88 U/mL en no diluido y en este estudio se obtuvieron valores similares a los del PS de semen no diluido (76.415 ± 0.310 U/mL).

Los valores de la actividad enzimática expresada en unidades por gramo de proteína en nuestro estudio son inferiores (9.833 ± 0.252 U/g proteína) a los reportados por Hernández *et al.* (2007), en PS descongelado de cerdos clasificados como mal (54.9 ± 1.3), moderado (37.5 ± 0.3) y buen congelador (25.8 ± 1.6 y 96.9 ± 0.4 U/g proteína). De acuerdo a la clasificación de Hernández *et al.* (2007), los sementales de este estudio están clasificados como malos congeladores por tener valor de viabilidad espermática por debajo de 40% en semen descongelado. Sin embargo, Hernández *et al.* (2007), determinaron que la actividad enzimática no tiene un patrón definido relacionado con la viabilidad del semen descongelado en los sementales de estudio.

De acuerdo con Villa *et al.* (2008), una escasa actividad de la enzima SOD en el plasma seminal puede deberse a una deficiencia en los precursores para su síntesis, a patologías asociadas a deficiencias en los minerales (cobre, zinc y magnesio) que catalizan su formación, o por disminución de su síntesis en las glándulas sexuales accesorias y en el testículo, pero cabe señalar que los sementales utilizados en el presente estudio se encontraban clínicamente sanos sin patologías asociadas al tracto reproductor masculino y con un calendario de vacunación, desparasitación y administración de vitaminas (principalmente ADE) adecuado a su especie.

La figura 4 muestra la actividad de la enzima GSH-Px en el plasma seminal de los sementales expresada en unidades por ml (U/ml) y en unidades por g de proteína (U/g proteína). La media general de los sementales fue de 0.274 ± 0.011 U/ml y de 0.034 ± 0.002 U/g proteína en la actividad de la enzima, mostrándose diferencias ($P < 0.05$) entre los sementales. El semental E fue el que presentó los valores de actividad enzimática más altos expresada en U/ml (0.365 ± 0.046 U/ml) en tanto que el semental C (0.237 ± 0.010 U/ml) y los sementales A y C (0.025 ± 0.001 y 0.025 ± 0.001 U/g proteína, respectivamente) presentaron la actividad enzimática más baja.

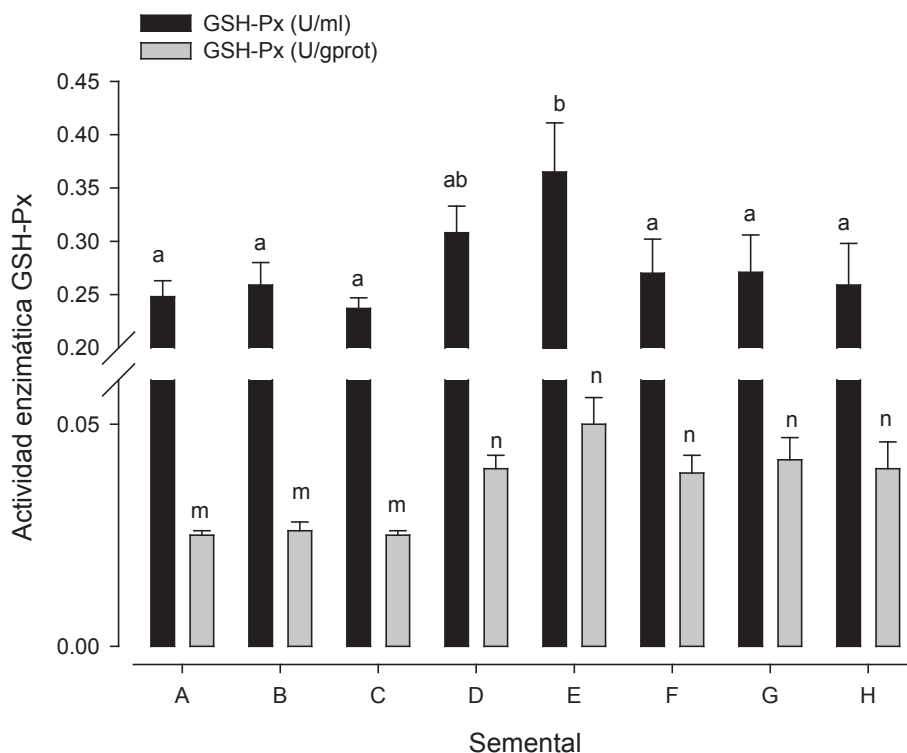


Figura 4. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) en 16 muestras de plasma seminal procedentes de 8 cerdos (A-H), expresada en U/ml y U/gramo de proteína ($P>00,5$) [*Activity of the enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) in 16 seminal plasma samples from 8 pigs (A-H) expressed in U/ml and U/gram protein ($P>00,5$)*].

Los valores encontrados de la actividad de la enzima GSH-Px (0.274 ± 0.011 U/mL) resultaron similares a los obtenidos por Kolodziej y Jacyno, (2004) en cerdos suplementados con selenio y vitamina E (0.5 y 60 mg/kg, respectivamente) con una actividad de GSH-Px en PS de 0.240 ± 0.085 U/mL, pero resultaron diferentes al grupo control 0.316 ± 0.146 U/mL. En dicho trabajo se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en los parámetros de viabilidad del semen fresco (motilidad, concentración espermática y proporción de espermatozoides con acrosoma normal) de los cerdos suplementados con respecto al grupo control, caso contrario para la actividad de GSH-Px en PS la cual disminuyó ($p<0.05$) un 32% en el grupo tratado con respecto al grupo control. Esto podría indicar que los valores de selenio y vitamina E en los sementales del presente estudio puede que se encuentren en los niveles adecuados. Además, los resultados coinciden en cuanto a que los sementales con viabilidad espermática alta presentan baja actividad de la enzima GSH-Px. De manera contraria, los resultados son inferiores a los que reportan Kozirowska *et al.* (2011), en PS de semen diluido y no diluido

(0.30 ± 0.002 y 0.44 ± 0.003 U/mL, respectivamente) ya que, la actividad enzimática en el presente estudio fue determinada en PS de semen sin diluir.

En las tablas I y II se muestran las correlaciones de las enzimas antioxidantes SOD y GSH-Px con los porcentajes de viabilidad espermática (EN y HOST) de los sementales de estudio en el semen fresco, descongelado e incubado con y sin PS autólogo y homólogo los cuales muestran una correlación de baja a media, sin significancia estadística ($p > 0.05$).

Tabla I. Correlación (r) entre la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutación Peroxidasa (GSH-Px) del plasma seminal porcino (PS) con la viabilidad espermática determinada mediante tinción eosina nigrosina (EN) en el semen fresco, descongelado e incubado sin y con PS homólogo [*Correlation (r) between the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme of seminal plasma porcine (PS) with the sperm viability by eosin nigrosine staining (EN) in fresh semen, thawed and incubated without and with homologous PS*]

Semen	SOD	GSH-PX
Fresco	-0.029	-0.333
Descongelado	0.003	-0.255
Incubado sin PS	-0.06	-0.084
Incubado con PS		
A	0.593	-0.173
B	0.608	0.133
C	-0.395	-0.088
D	0.275	-0.35
E	0.4	-0.104
F	0.232	-0.2
G	-0.106	0.049
H	-0.078	0.092

En general se podría comentar que los datos presentaron una tendencia a que sementales con viabilidad alta medido con EN (A, C) muestran actividad alta de la enzima SOD y baja para GSH-Px; de manera inversa, sementales con viabilidad baja (E, G, H) presentaron actividad baja para la enzima SOD (G, H) o alta en GSH-Px (E).

Tabla II. Correlación (r) entre la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutación Peroxidasa (GSH-Px) en plasma seminal porcino (PS) con la viabilidad espermática determinada mediante la prueba hipoosmótica (HOST) en el semen porcino fresco, descongelado e incubado sin y con PS Homólogo [*Correlation (r) between the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzymes in porcine seminal plasma (PS) with sperm viability, determined by hypoosmotic test (HOST) in the boar semen fresh, thawed and incubated with and without homologous PS*]

Semen	SOD	GSH-PX
Fresco	-0.264	-0.303
Descongelado	0.374	0.014
Incubado sin PS	0.405	-0.04
Incubado con PS		
A	-0.034	0.189
B	0.435	0.11
C	0.701	-0.017
D	0.084	-0.006
E	0.218	-0.239
F	-0.257	-0.385
G	-0.366	-0.116
H	-0.529	0.088

CONCLUSIONES

Las enzimas Superóxido Dismutasa y Glutación Peroxidasa del plasma seminal porcino presentan variaciones individuales entre sementales.

La incubación de espermatozoides porcinos descongelados con plasma seminal homólogo, puede influir en la viabilidad y función espermática.

La viabilidad y funcionalidad de espermatozoides porcinos descongelados no se correlacionan con la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutación peroxidasa del plasma seminal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la generosa participación del personal técnico y trabajadores de las granjas porcinas, “Piedra Negra”, “El Platanar” y “El Palenque” localizadas en Buenavista, municipio de Emiliano Zapata, Veracruz.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A. & De Iuliis G.N. 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology* 16, 31–38.

- Bamba K. 1998. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29, 1245-1251.
- Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vázquez J.M., Martínez E.A. & Roca J. 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl* 25, 389-396.
- Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Hernández DAK, Barrientos-Morales M, Cervantes AP, Hernández BA, Dominguez MB, and Absalón-Medina VA. 2015. Antioxidant Effects of Seminal Plasma on Cellular Morphological Viability of Swine Semen Post-Cryopreservation. *J Veterinar Sci Technol* 6, 3: 2 -7.
- Hernández M., Roca J., Calvete J., Sanz L., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J., Vázquez J. & Martínez E. 2007. Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl* 28, 689-697.
- Kolodziej A. & Jacyno E. 2004. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. *Electron. J. Pol. Agric. Univ., Animal Husbandry* 7(1), 1-6.
- Kowalowka M., Wysocki P., Fraser L. & Strzezek J. 2008. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 43, 490-496.
- Koziorowska GM., Kozioroski M., Fraser L. & Strzezek J. 2011. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod Dom Anim* 46, 527-533.
- Koziorowska-Gilun M., Koziorowski M., Strzeżek J. & Fraser L. 2011. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reproductive Biology* 11, 37 – 47.
- López A. 2012. Fresh boar semen: quality control and production. Thesis Doctoral. 60 Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. Belgium.
- Martín-Rillo S., Martínez, E., García-Artiga C. & De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Domest. Anim* 35, 519-526.
- Muiño-Blanco T., Pérez-Pé R. & Cebrián-Pérez J. 2008. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Domest Anim* 43, 18–31.
- Rath D. & Niemann H. 1997. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* 47, 785-793.
- Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez J.M. & Martínez E.A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84, 2692-2699.
- Roca J., Rodríguez M.J., Gil M.A., Carvajal G., García E.M., Cuello C., Vázquez J.M. & Martínez E.A. 2005. Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl* 26, 15-24.
- Sánchez M.A., Santiago E.O., Vargas L.A. & Mendoza N.V. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 29, 81-90.
- StatSoft, 2004. StatSoft Inc Statistica for Windows. Manual version 7.0. Tulsa, Oklahoma: StatSoft Inc. 2004.
- Surai P.F. & Fisinin V.I. 2015. Selenium in pig nutrition and reproduction: Boars and semen quality. *Asian Australas. J. Anim. Sci* 28, 730-746.

- Kumar R.M., Kumar S., Arora Bhale D.V., Mehta R. & Batra J. 2015. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. *International Journal of Health Sciences and Research* 5, 324 – 333.
- Vadnais M.L. & Roberts K.P. 2007. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J Androl* 28, 416-422.
- Villa N.A., Sánchez L.E. & Ceballos A. 2008. Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en plasma seminal y sangre en cerdos reproductores. *vet. zootec*, 3(1), 9-15.
- Westendorf P., Ritcher L. & Treu H. 1975. Deep freezing of boar semen: laboratory findings and insemination results with the “Hülseberger Pailletten” technique. *Deuts Tierarz Wochens* 82, 261-267.