

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



**EFEECTO DE LA FUENTE DE ZINC EN LA
MORFOMETRÍA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIA,
ASÍ COMO SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN
Y CALIDAD SEMINAL DEL VERRACO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Adelfa del Carmen García Contreras

Bajo la dirección de los doctores

Carlos García Artiga
Jaime Gosálvez Berenguer

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-2678-4

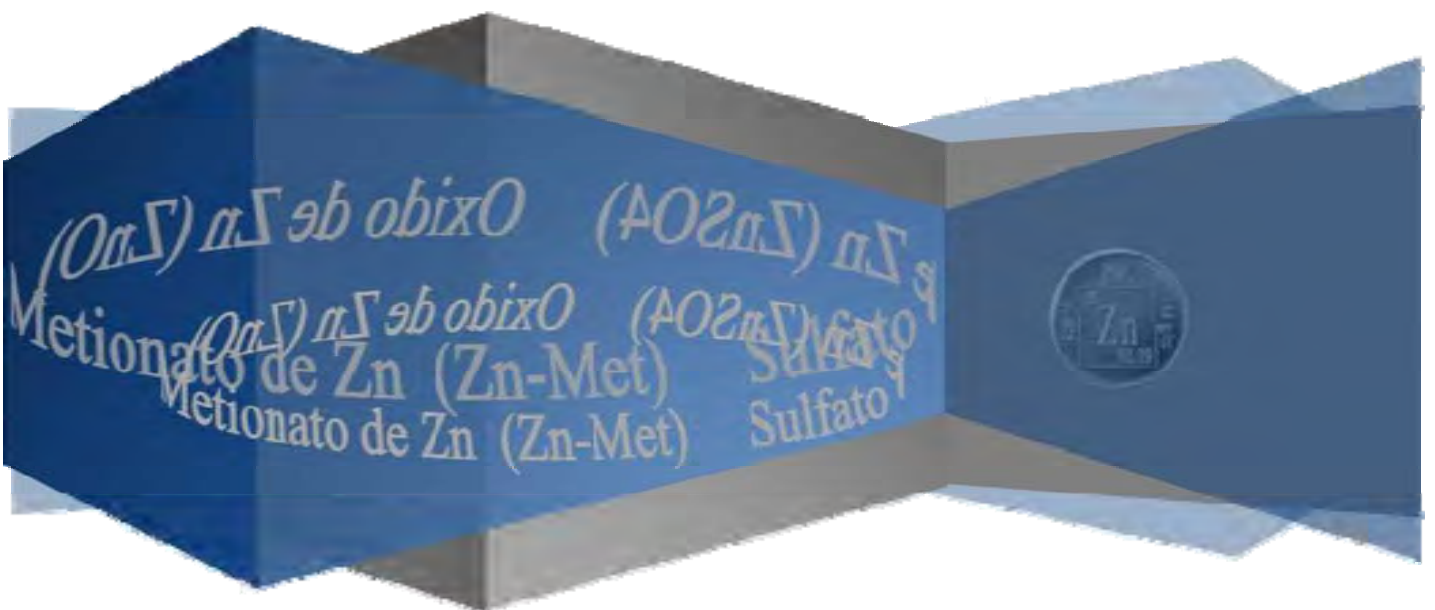
© Adelfa del Carmen García Contreras, 2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)
UNIDAD DOCENTE DE ZOOLOGÍA

EFECTO DE LA FUENTE Y NIVEL DE ZINC EN LA
MORFOMETRÍA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIA, ASÍ
COMO SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN Y
CALIDAD SEMINAL DEL VERRACO

ADELFA DEL CARMEN GARCÍA CONTRERAS



TESIS DOCTORAL
2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)
UNIDAD DOCENTE DE ZOOLOGÍA



Tesis Doctoral

**EFEECTO DE LA FUENTE Y NIVEL DE ZINC EN LA
MORFOMETRÍA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIA, ASÍ
COMO SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN Y
CALIDAD SEMINAL DEL VERRACO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Adelfa del Carmen García Contreras

Bajo la dirección de los Doctores:

**Carlos García Artiga, Jaime Gosálvez Berenguer y
Antonio Palomo Yagüe**

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)
UNIDAD DOCENTE DE ZOOLOGÍA



**EFFECTO DE LA FUENTE Y NIVEL DE ZINC EN LA
MORFOMETRÍA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIA,
ASÍ COMO SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN
Y CALIDAD SEMINAL DEL VERRACO**

Tesis Doctoral

Adelfa del Carmen García Contreras

Madrid, 2010

Carlos GARCÍA ARTIGA, Profesor Titular del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal), U.D. de Zoología de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid; **Jaime GOSÁLVEZ BERENGUER**, Catedrático de Genética del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid y **Antonio PALOMO YAGÜE**, Profesor Asociado del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **Efecto de la fuente y nivel de Zinc en la morfometría testicular y epididimaria, así como su relación con la producción y calidad seminal del verraco**, de la que es autora la M en C **ADELFA DEL CARMEN GARCÍA CONTRERAS** ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

Madrid, 1 de septiembre de 2010

CARLOS GARCÍA
ARTIGA

JAIME GOSÁLVEZ
BERENGUER

ANTONIO PALOMO
YAGÜE

Esta tesis fue posible gracias al apoyo recibido por: Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP); División de Ciencias Biológicas y de la Salud y POLIVET-AZ de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Universidad Complutense de Madrid, Grupo SETNA Nutrición, Universidad Autónoma de Madrid. Fundación GG.



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta parte del documento es algo tan público, pero a la vez tan particular, tan íntimo que me da miedo iniciar. Estoy segura que no solo los conocimientos científicos vertidos en él son importantes. Estos agradecimientos serán leídos en años venideros por alguien que se dará cuenta de lo importante que es tener al lado un tremendo equipo de personas generosas y entusiastas.


La parte del ser humano, de lo que significa para cada uno el realizar un trabajo de esta naturaleza, y a quien van dirigidos los agradecimientos tal vez no sea lo más importante en este documento, tampoco es fundamental como lo expresas, pero lo que sí es realmente importante es decirle a las personas que compartieron contigo este proyecto: Gracias.

Así que no sé cuántas hojas desde este momento escribiré, solo dejare que el movimiento de mis manos sobre el teclado de la computadora produzcan la aparición de palabras o frases, no pensare en la gramática, o en los términos correctos, la referencia bibliográfica o el año en que se dijo, yo solo sacare mis sentimientos de alegría, combinados de agradecimiento y añoranza, los cuales dirigirán la escritura de algo que indique con precisión los resultados que tienen una correlación significativa entre las variables agradecimiento, amor, amistad e ilusión. Creo que la referencia bibliográfica sobre el tema Gracias, siempre es actual, vigente y pertinente, por eso no me preocupa demasiado referirla, aunque es probable que sea la más antigua de todas, por ello prefiero no ponerla, para que no me tachen de obsoleta.

Iniciare compartiendo con ustedes un pedazo de mi alma, en donde mi padre me pregunto un día en que regresábamos de su pueblo ¿Que ves?, y le respondí, un campo lleno de flores y arboles, una montaña con una cruz muy grande colocada en la punta. Él me cuestiono diciendo: ¿Cuál crees que sea la forma más rápida de llegar a esa cruz? En avión, le dije. Pero no creo que se pueda aterrizar sobre la montaña, así que lo más seguro es ir caminando. Él respondió, porque siempre te quedas con lo más simple, porque no piensas que debes llegar a donde deseas, aunque eso te ocupe tiempo y requiera de astucia, sagacidad y trabajo. No se te olvide que las cosas no siempre son fáciles y sino aprendes a luchar por lo que quieres, necesitas o debes hacer, nunca lograras ser feliz. **Gracias Profesor Ricardo García Peña** (qepd).

Otro día mi madre, ante una inminente cirugía a corazón abierto, me dijo: Hija no se te olvide que sólo el estudio, el conocimiento te hará libre, y que el obtenerlo requiere dedicación, honestidad y compromiso. No pierdas tu tiempo, ya que lo que no aprendas hoy, será difícil que lo aprendas mañana. Porque la vida te exigirá haber aprendido en su momento las cosas. Recuerda que si me voy, lo único que te puedo dejar como herencia es tu educación. Por siempre mi amor. **Profesora. Adelfa Contreras Villegas** (qepd).

Mis padres a los cuales amo, y respeto, me decían esto y no lo entendí hasta ahora que soy madre. A ambos los he perdido, a mi madre justo antes de terminar la maestría. A mi padre ahora, estando lejos haciendo el doctorado. Pero ambos me dejaron estas dos



lecciones de vida, y espero que mis hijos las recuerden. También me dejaron tres tesoros hermosos, que son mis hermanos adorados: **MVZ. Ricardo, Lic. Sofía Magda e Ing. Abraham García Contreras**. Los amo y gracias por compartir conmigo este proyecto, haciéndose cargo de todo, evitando que yo me preocupara, para que me dedicara a estudiar. Gracias a mis sobrinos, **Ricardo, Alejandro y Sofía del Carmen**, por ser parte de mi familia. Los amo y necesito.

Esta dedicatoria tiene 25 años de espera. Esos 25 años son los mismos que hemos tenido de ilusión por obtener el doctorado y compartir juntos un camino que recorrimos cuando hicimos la maestría. Habrían de pasar esos años y muchas cosas más para llegar a este punto.

Una vez más, me aseguro de aprender que solo la muerte te puede quitar de la cabeza las cosas que con certeza son necesarias para que seas feliz. Tú y yo compartimos un mismo proyecto de vida, y con él hemos vivido, así que gracias por no desfallecer en el proceso, gracias por esperarme para estudiar juntos una vez más, gracias por ser mi esposo, compañero y amigo. Tú eres el más caustico de mis críticos, pero también el más paciente y honesto. Esta investigación no sería posible si no fuera un proyecto conjunto, de pareja. Si Dios permite, espero tener 25 años más junto a ti, de lucha constante, triunfos, aprendizaje, esfuerzo y ejemplo. Espero la tuya en pronto tiempo, y ahí estaré para ayudarte en todo lo que se haga necesario, como tú lo has hecho conmigo. Te amo **M en C. Ing. Jesús Alberto Guevara González**.

Jesús Adolfo, gracias por compartir esta aventura con tus padres. Le doy gracias a Dios por permitirme enseñarte con ejemplo, que no se deben dejar de lado los sueños, que hay que luchar por ellos, con trabajo, honestidad y amor. Gracias por ser tan buen hijo, pero recuerda que no hay tiempo. No lo pierdas en cosas vanas y tontas. Ponte metas y piensa en ser feliz.

Adelfa Zarai, eres mi niña adorada, gracias por soportar la ausencia, y por tratar de entender lo mucho que significa para mí tu apoyo. Pero necesito que no olvides que venimos de mujeres que luchan y cumplen metas, y que por suerte somos felices por hacer lo que nos gusta. Eres un tesoro, un triunfo más gracias a tu comprensión.

Doña Chofi, mujer emblemática, luchadora incansable, madre ejemplar y abuela abnegada, que con su ejemplo me dio la oportunidad de no declinar, cuando las cosas se veían difíciles. Gracias a mi suegra, doña **Consuelo González de Guevara**, por ser tan arriesgada, por gozar con nosotros este viaje y ser tan buena conmigo.

Laura Clima

Este espacio que nos dan a los que logramos llegar a este punto, siempre nos parece corto y no queremos olvidar a nadie. Por ello pido disculpas si me olvido sin querer de alguien, ya que uno siempre deja esta parte hasta el último minuto, pensando que es el broche que cierra el cofre del tesoro que uno fue descubriendo durante el tiempo que duro la investigación.

Mi cariño y reconocimiento a los españoles que me han dado la oportunidad de hacer realidad los sueños de obtener un grado de Doctora. Esta historia nace del amor que dos personas me mostraron en el trabajo cotidiano del ser veterinario, profesor, investigador, pero ante todo amigo, el **Dr. Ramiro Ramírez Necochea** y el **Dr. Santiago Martín Rillo** (qepd).

Mi estancia en España no ha sido fortuita, fue planeada durante mucho tiempo, tanto que cuando me di cuenta, la persona con la que yo trabajaría había iniciado el camino que no tiene retorno. Pero como todos los seres humanos que saben que solo sembrando se puede cosechar, el **Dr. Santiago**, dejo sembrado un camino lleno de amigos, que aprendieron a dar sin tapujos, ni prejuicios. Por ello al iniciar mi nueva búsqueda para venirme a estudiar el doctorado me encontré en una oficina de la UCM, a un profesor de voz fuerte, pero de mirada noble, y que a la postre se convertiría en mi Director de Tesis, el **Dr. Carlos García Artiga**, que siguiendo la escuela de entusiasmo, amor a los cerdos, y bondad que le legó **Santiago**, y sin medir consecuencia alguna, acepto ser mi Director. No considero que con esa decisión se echaba a cuestras un trabajo que va a cumplir cuatro años de iniciado el próximo 5 de septiembre, y que ha tenido como sustento el cariño, la buena voluntad, la amistad y las ganas de hacer un trabajo interesante y lleno de oportunidades.

Por ello quiero agradecer al **Dr. Carlos García Artiga**, no solo su apoyo profesional e institucional, sino su amistad que es hoy día lo que más aprecio de las personas que Dios me permite elegir para estar y compartir, su espíritu bondadoso siempre empapa a las personas que conviven con él.

Me queda menos tiempo, por ello lo invierto con aquellos seres que valen la pena:

Gracias Jefe Charly

Quiero expresarle a mi incansable amiga, compañera, colaboradora, y un mucho mi hija, **DEA. MVZ. Yasmin Guadalupe De Loera Ortega**, mi amor y agradecimiento. Gracias por compartir esta aventura, por dejar todo para apoyarme y aprender conmigo el camino de la tolerancia, pero principalmente por cuidar con tanto amor este proyecto y en particular a mi persona. Te quiero fiel amiga, esto no se ha terminado, la historia continuará. Nos falta la tuya.

Hace 25 años, usted me dijo que hay que jugar a ganar, que no es recomendable dejar las cosas trucas. Gracias **Dr. José Guadalupe Herrera Haro**, nunca olvido sus consejos y jamás dejare de agradecer su apoyo incondicional. Aprecio muy especialmente su deseo de compartir conmigo al menos por diez meses esta aventura *in situ*. Espero que sean muchas más en nuestro lindo país.

Dr. Antonio Palomo Yagüe, le doy las gracias por su apoyo, interés y actitud siempre positiva y dispuesta para que este proyecto avanzara. Pero principalmente por su amistad y palabras de confianza. Extensivo hago este reconocimiento a **Don Francisco**, dueño de la granja donde se desarrollo la fase experimental.

Dr. Jaime Gosálvez B., su apoyo espontaneo y su siempre interés en este proyecto me refrenda la idea que tengo de las personas que con gusto hacen su trabajo, que no escatiman esfuerzo y atención, y no pierden el tiempo en prejuicios mezquinos. Pero quiero expresarle mi admiración por ser un investigador que asume su compromiso con la ciencia y con la vida. Gracias.

Dra. Carmen López Fernández, tu amabilidad, tu sonrisa y humildad, me conmueven, pero lo que más admiro de ti y me sorprende gratamente, es tu espíritu docente, que permite que compartas lo mucho que sabes. Soy afortunada por conocerte. Estimada **Paqui** es interesante como haces tu trabajo, pero para mí lo más importante es que lo haces con calidad y entusiasmo. Gracias por compartir tu espacio.

Dr. Emilio Martínez y Dra. M. Antonia Gil, mi admiración y respeto por su calidad profesional, y su generosidad. Es un verdadero privilegio el que me hayan apoyado. Felicidades por ser un equipo de investigadores de primera línea.

Querido angelito, sabes que te quiero, que veo en ti a una hermana. Mi gratitud y mi cariño eterno por tu compañía, apoyo, ayuda y consejos, en los momentos más difíciles de mi estancia en tu país. **Vet. Roció Hernández-Gil**.

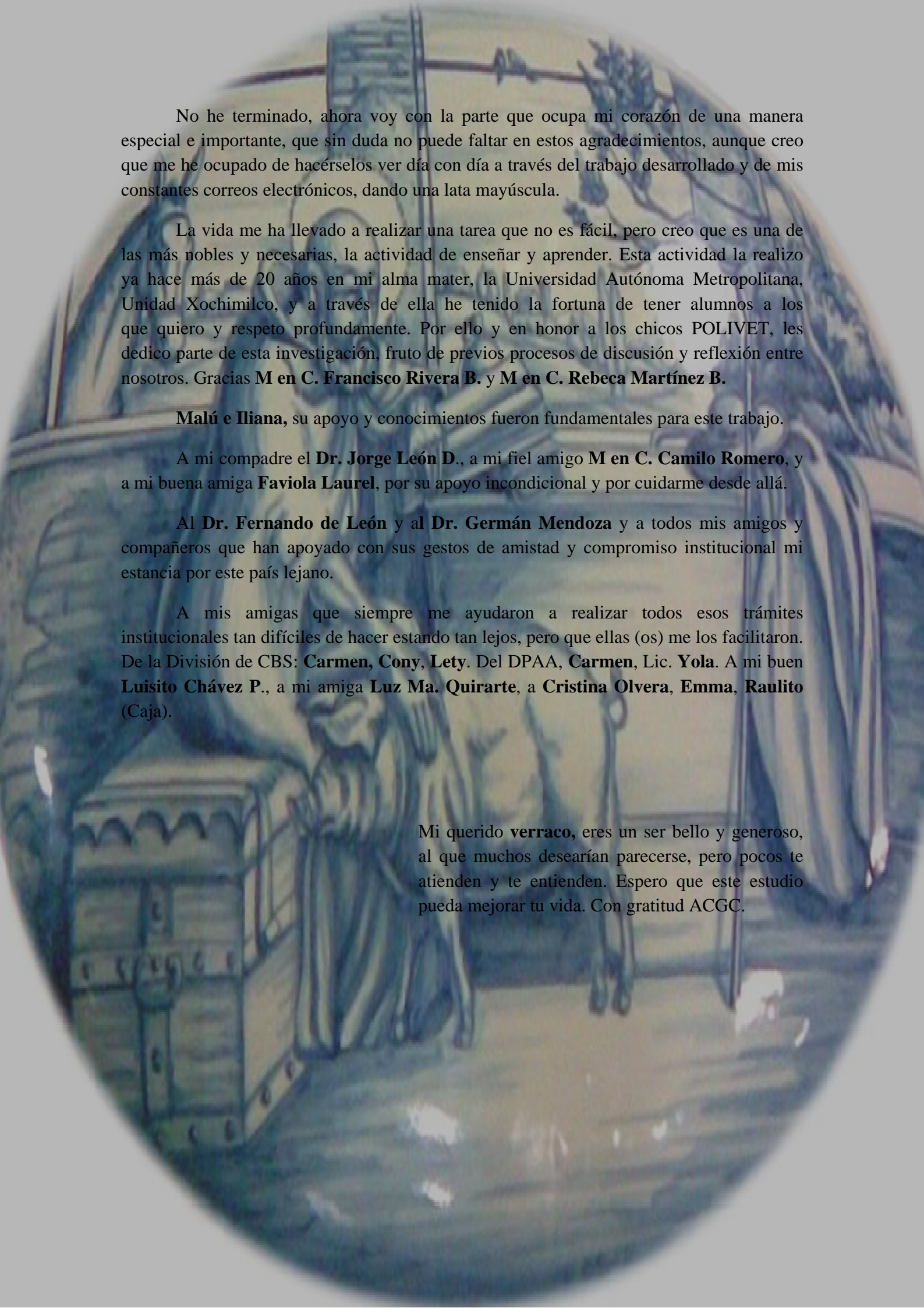
Gracias **Ing. Luis Soler de la Mano**, por permitirme utilizar el laboratorio de control de calidad de SETNA que con gran calidad diriges, pero principalmente por tus atenciones y amistad.

Conocer personas que sean cálidas y atentas no es difícil encontrar, pero que además dispongan su tiempo para implicarse, eso es muy complicado, es sorprendente tu generosidad y afecto. Gracias **Dra. Beatriz Isabel R.**

Dr. Juan Carlos Fontanillas y Dra. Isabel García-Cuenca. Es muy bonito llegar a un lugar en donde no conoces a nadie y de repente te encuentras con personas que son generosas, y te ofrecen su apoyo incondicional, que un vinculo de amistad que en la vida cotidiana del ir y venir de un pasillo no dice nada, pero se hace notar cuando menos te lo esperas. Gracias por ello y por compartir estos cuatro años. Asimismo, en los inicios de esta investigación hubieron dos personas a las cuales les quiero agradecer su apoyo: **Vet. Belén Lleó y Vet. María**.

Querida **Ing. Encarna Jiménez**, gracias por ser mi amiga, por tu inestimable ayuda. A los amigos: **Chema, Lucena y Fernando**, de la Universidad Politécnica de Madrid, por estar siempre atentos en el bienestar de mi familia. Con todo mi cariño a mi paisano **MVZ. José Antonio García R.** y a mi amiga **Virginia** por estar ahí compartiendo la dulzura de ser madres.

A **José y Sonia** por su ayuda, nobleza y desprendimiento, mi eterno agradecimiento.



No he terminado, ahora voy con la parte que ocupa mi corazón de una manera especial e importante, que sin duda no puede faltar en estos agradecimientos, aunque creo que me he ocupado de hacérselos ver día con día a través del trabajo desarrollado y de mis constantes correos electrónicos, dando una lata mayúscula.

La vida me ha llevado a realizar una tarea que no es fácil, pero creo que es una de las más nobles y necesarias, la actividad de enseñar y aprender. Esta actividad la realizo ya hace más de 20 años en mi alma mater, la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y a través de ella he tenido la fortuna de tener alumnos a los que quiero y respeto profundamente. Por ello y en honor a los chicos POLIVET, les dedico parte de esta investigación, fruto de previos procesos de discusión y reflexión entre nosotros. Gracias **M en C. Francisco Rivera B.** y **M en C. Rebeca Martínez B.**

Malú e Iliana, su apoyo y conocimientos fueron fundamentales para este trabajo.

A mi compadre el **Dr. Jorge León D.**, a mi fiel amigo **M en C. Camilo Romero**, y a mi buena amiga **Faviola Laurel**, por su apoyo incondicional y por cuidarme desde allá.

Al **Dr. Fernando de León** y al **Dr. Germán Mendoza** y a todos mis amigos y compañeros que han apoyado con sus gestos de amistad y compromiso institucional mi estancia por este país lejano.

A mis amigas que siempre me ayudaron a realizar todos esos trámites institucionales tan difíciles de hacer estando tan lejos, pero que ellas (os) me los facilitaron. De la División de CBS: **Carmen, Cony, Lety**. Del DPAA, **Carmen**, Lic. **Yola**. A mi buen **Luisito Chávez P.**, a mi amiga **Luz Ma. Quirarte**, a **Cristina Olvera, Emma, Raulito** (Caja).

Mi querido **verraco**, eres un ser bello y generoso, al que muchos desearían parecerse, pero pocos te atienden y te entienden. Espero que este estudio pueda mejorar tu vida. Con gratitud ACGC.

2010 Bicentenario de la Independencia de México

QUE IGUALMENTE SE SOLEMNICE
EL DÍA DE INDEPENDENCIA TODOS LOS AÑOS
COMO EL DÍA ANIVERSARIO EN 1821 EN
CUMPLIMIENTO DE LA LEY DE LA RESTAURACIÓN Y
NUESTRO PATRIOTISMO VIGILANTE.

*Suave Patria: Tu superficie es el maíz, tus minas el palacio del Rey de Oros,
Tu mutilado territorio se viste de percal y de abalorio
Tu barro suena a plata, y en tu puño su sonora miseria es
alcancía.*

*Cuando nacemos, nos regalas notas, después, un paraíso de
compotas y luego te regalas toda entera.*

*Al triste y feliz dices que sí, ¡Y tu cielo nupcial, que cuando
truenas de deleites frenéticos nos llena!*

*Oigo en tus quejas cruzar los esqueletos en parejas, oigo lo que
se fue, lo que aun no toca. Y oigo en el brinco de tu ida y venida,
oh trueno, la ruleta de mi vida.*

*Suave Patria: Te amo no cual mito, sino por tu verdad de pan bendito. Te doy
de tu dicha la clave: sé siempre igual, fiel a tu espejo diario.*

Extraído del Poema "La suave patria" de Ramón López Velarde

México

Espero regresarte aunque sea un poquito de lo mucho que nos das.



ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	3
1.1.1. Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Generalidades	5
2.2. Características físicas y químicas del Zn	7
2.3. Absorción y metabolismo de Zn	8
2.4. Almacenamiento del Zn	15
2.5. Secreción, reabsorción y excreción del Zn	17
2.6. Funciones del Zn	19
2.6.1. Funciones del Zn en las enzimas	19
2.6.2. Función del Zn en la reproducción	22
2.6.2.1. Efecto del Zn en el testículo	22
2.6.2.2. Efecto del Zn en el epidídimo	23
2.6.2.3. Efecto del Zn en la próstata	24
2.6.2.4. Efecto del Zn en el espermatozoide	24
2.6.2.5. Efecto del Zn en el desarrollo embrionario	27
2.7. Relación de Zn con otros micronutrientes	28
2.8. Efecto de la deficiencia de Zn	31
2.9. Efecto tóxico del Zn	32
2.10. Requerimientos nutricionales de Zn en verracos	33
2.11. Fuentes alimenticias de Zn para la elaboración de piensos de verraco	38
2.11.1. Contenido de Zn en los ingredientes del pienso	38
2.11.2. Fuentes alimenticias de Zn	39
2.11.2.1. Fuentes orgánicas	40
2.11.2.2. Fuentes inorgánicas	42
2.12. Espermatogénesis	46
2.12.1. Plasma seminal	51
2.13. Calidad seminal y pruebas de valoración	53
2.13.1. Volumen de eyaculado	53
2.13.2. Motilidad (Mot)	54
2.13.3. Concentración espermática	55
2.13.4. Morfoanomalías	55
2.13.4.1. Gotas citoplásmicas	56
2.13.4.2. Colas dañadas	57
2.13.4.3. Membranas espermáticas	57
2.13.5. Fragmentación del ADN espermático	59
2.13.6. Capacidad fecundante de los espermatozoides	61
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1. Diseño de la investigación	63
3.1.1. Material biológico	63
3.1.2. Piensos experimentales	65
3.1.3. Material de laboratorio	66
3.1.4. Productos químicos	68
3.1.5. Soluciones y medios para el análisis y cultivo celular	68

3.1.5.1. Diluyente BTS	69
3.1.5.2. Solución salina formolada	69
3.1.5.3. Solución PSA-FICT	69
3.1.5.4. Solución DABCO	69
3.1.5.5. Medio para la recolección y lavado de ovarios	70
3.1.5.6. Medio para lavado de ovocitos	70
3.1.5.7. Medio para lavado de espermatozoides	70
3.1.5.8. Medio de fecundación	70
3.1.5.9. Solución de Lacmoid	71
3.1.5.10. Fluorocromo	71
3.1.5.11. Solución de ácido clorhídrico (HCl 18.5%)	71
3.2. Instalaciones	71
3.3. Asignación de tratamientos	72
3.3.1. Periodo de adaptación	72
3.3.2. Periodo experimental	73
3.4. Metodología	73
3.4.1. Sistema de suministro de los tratamientos	73
3.4.2. Evaluación del comportamiento productivo del verraco	73
3.4.2.1. Ritmo de recogida del verraco (IE)	75
3.4.2.2. Medidas testiculares y de epidídimos	75
3.4.2.3. Índice gonadosomático (IG)	76
3.4.3. Recogida de semen	76
3.4.3.1. Evaluación básica del semen	76
3.4.4. Índice de fragmentación de ADN espermático (IF)	79
3.4.5. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	80
3.4.5.1. Muestras seminales	80
3.4.5.2. Ovocitos inmaduros para inseminación <i>in vitro</i>	81
3.4.5.3. Fecundación y cocultivo de gametos	82
3.4.5.4. Tinción y valoración microscópica de la FIV	82
3.4.6. Determinación de Zn	83
3.4.6.1. Obtención de muestras para AEAA	83
3.4.6.1.1. Muestras de testículos y epidídimos.	83
3.4.6.1.2. Muestras de plasma seminal (PS)	84
3.4.6.1.3. Muestras de sedimento espermático (SE)	85
3.4.6.2. Análisis de espectrofotometría de absorción Atómica (AEAA)	86
3.4.6.2.1. Digestión y dilución de muestras para AEAA	86
3.4.6.2.1.1. Muestras de testículo	86
3.4.6.2.1.2. Muestras de epidídimo	87
3.4.6.2.1.3. Muestras de sedimento espermático (SE)	87
3.4.6.2.1.4. Muestras de plasma seminal (PS)	87
3.4.6.2.2. Lectura de espectrofotometría de absorción atómica	88
3.5 Desarrollo de los experimento	89
3.5.1. Experimento 1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos	89
3.5.2. Experimento 2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermograma básico del eyaculado, y de la evaluación de la integridad acrosomal	92

3.5.3. Experimento 3. Evaluación del estado del ADN nuclear Espermático	94
3.5.4. Experimento 4. Evaluación de la capacidad fecundante <i>in vitro</i> (FIV) de espermatozoides de verracos tratados con diferente fuente y nivel de Zn	96
3.5.5. Experimento 5. Evaluación de la concentración de Zn en tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (PS) y sedimento espermático (SE)	98
3.6. Análisis estadísticos de los resultados	100
4.RESULTADOS	103
4.1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos	103
4.2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermiograma básico del eyaculado y de la evaluación de la integridad acrosomal	115
4.3. Evaluación del estado del ADN nuclear espermático	127
4.4. Evaluación de la capacidad fecundante <i>in vitro</i> (FIV) de espermatozoides de verracos tratados con diferente fuente y nivel de Zn	135
4.5. Evaluación de la concentración de Zn de tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (ZnPS) y sedimento espermático (ZnSE)	143
5.DISCUSION	149
5.1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos.	149
5.2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermiograma básico del eyaculado y de la evaluación de la integridad acrosomal	157
5.3. Evaluación del estado del ADN nuclear espermático	169
5.4. Evaluación de la capacidad fecundante <i>in vitro</i> de espermatozoides de verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn	174
5.5. Evaluación de la concentración de Zn en tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (PS) y sedimento espermático (SE)	179
6. CONCLUSIONES	185
7. RESUMEN	187
8. SUMMARY	191
9. ABREVIATURAS	195
10. BIBLIOGRAFÍA	199

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Necesidades diarias de Zn en verraco adulto.	35
Tabla 2.	Biodisponibilidad (BD) relativa de distintas fuentes de Zn en porcino.	44
Tabla 3.	Material fungible.	65
Tabla 4.	Material de laboratorio.	66
Tabla 5.	Ingredientes y valor nutritivo del pienso base (PB) para verracos en producción.	66
Tabla 6.	Tratamientos según fuente y nivel de Zn .	67
Tabla 7.	Reactivos para la realización de pruebas de laboratorio.	68
Tabla 8.	Diluyente BTS para semen de verraco.	69
Tabla 9.	Composición de la solución PBS .	70
Tabla 10.	Medio de fecundación (MF).	71
Tabla 11.	Periodo de experimentación.	73
Tabla 12.	Condición corporal (CC) en verracos.	74
Tabla 13.	Calidad de movimiento (CM) de los espermatozoides.	77
Tabla 14.	Variables evaluadas en el análisis de fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	83
Tabla 15.	Condiciones de operación del espectrofotómetro para determinar Zn .	88
Tabla 16.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de variables relacionadas con el comportamiento productivo de verracos alimentados con piensos que contenían diferentes fuentes y niveles de Zn .	103
Tabla 17.	Efecto de la fuente y nivel de Zn en la condición corporal (CC) y la frecuencia de presentación (%) en verracos.	106
Tabla 18.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto de pienso con diferente fuente y nivel de Zn en el tamaño de la región escrotal (testículo + epidídimo) de verracos.	108
Tabla 19.	Valores de correlación entre variables morfométricas testiculares en verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso.	111
Tabla 20.	Medias de mínimos cuadrados \pm errores estándar de medidas morfométricas testiculares y epididimales de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de Zn .	112
Tabla 21.	Coeficientes de correlaciones (r) entre las variables morfométricas testiculares y epididimarias de verracos alimentados con diferente fuente y nivel de Zn .	113
Tabla 22.	Coeficientes de correlaciones entre el peso vivo final (Kg) de los verracos y el peso testicular y epididimario.	114
Tabla 23.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las variables de producción y calidad básica del eyaculado de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de Zn .	115
Tabla 24.	Coeficientes de correlación entre peso testicular (PT), concentración espermática (Spz mL⁻¹) y volumen total de eyaculado (VT) de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y niveles de Zn .	119
Tabla 25.	Coeficientes de correlación entre peso epididimario (PE), volumen de la fracción pobre (FP) y total de eyaculado (VT) de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y niveles de Zn .	120
Tabla 26.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de tipo de morfoanomalías espermáticas de verracos según tratamiento.	125

Tabla 27.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de acrosomas íntegros (IAC), dañados (AD) y reaccionados (AR), de espermatozoides de verraco alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de Zn .	125
Tabla 28	Valores de regresión de la concentración de Zn (ppm) en sedimento espermático (ZnSE) y motilidad (Mot).	161
Tabla 29.	Frecuencia de presentación de índice de fragmentación de ADN espermático (IF) según intervalo y tratamiento.	131
Tabla 30.	Frecuencia de presentación de índice de fragmentación de ADN espermático (IF) durante un periodo de evaluación de 14 semanas con base a intervalos.	132
Tabla 31.	Medias de mínimos cuadrados \pm errores estándar del índice de fragmentación de ADN espermático (IF) de verracos durante el periodo de evaluación, con diferentes fuentes y niveles de Zn .	133
Tabla 32.	Medias de mínimos cuadrados y errores estándar (EEM) de ovocitos fecundados <i>in vitro</i> (FIV), espermatozoides ovocito ⁻¹ (EO), ovocito monospérmico (OM) y eficiencia de fertilización (EF) en verracos, según fuentes y niveles de Zn .	135
Tabla 33.	Proporción de pronúcleos (DPn), cabezas espermáticas (CE) y espermatozoides intactos (Spzo ⁻¹) en ovocitos de cerda, cultivados con espermatozoides de verraco tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn .	139
Tabla 34.	Modelos de regresión lineal relacionando motilidad, morfoanomalías (MA), integridad acrosomal (IAC) con ovocitos penetrados <i>in vitro</i> (FIV), ovocitos monospérmicos (OM) y desarrollo de pronúcleos (DPn) según tratamientos con Zn .	142
Tabla 35.	Correlaciones (r) entre ovocitos penetrados <i>in vitro</i> (FIV), índice de fragmentación de ADN espermático (IF), concentración de Zn en sedimento espermático (ZnSE) espermatozoides por ovocitos maduro (Spzo ⁻¹).	142
Tabla 36.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la composición química de testículos de verracos alimentados con fuentes y niveles distintos de Zn contenidos en el pienso.	144
Tabla 37.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la composición química de epidídimos de verracos alimentados con fuentes y niveles distintos de Zn contenidos en el pienso.	145

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Peso vivo (PV) por tratamiento durante el periodo evaluado. Las líneas representan medias semana ⁻¹	104
Gráfica 2.	Evaluación de la condición corporal (CC) por tratamiento durante el período evaluado.	106
Gráfica 3.	Crecimiento de la semicircunferencia (SC) testicular por tratamiento durante el periodo evaluado.	109
Gráfica 4.	Crecimiento longitudinal (LT) testicular de verracos durante el periodo evaluado.	110
Gráfica 5.	Producción de la fracción rica del eyaculado (FR) según tratamiento:.....	117
Gráfica 6.	Producción de la fracción pobre del eyaculado (FP) según tratamiento:.....	118
Gráfica 7.	Volumen total del eyaculado (VT) según tratamiento:.....	118
Gráfica 8.	Motilidad (Mot) según tratamiento:.....	121
Gráfica 9.	Calidad de motilidad espermática (CM) según tratamiento:.....	122
Gráfica 10.	pH del eyaculado:.....	122
Gráfica 11.	Concentración espermática (Spz mL⁻¹ x 10⁶) según tratamiento:.....	124
Gráfica 12.	Estado del acrosoma espermático según tratamiento:.....	126
Gráfica 13.	Acrosomas reaccionados (AR) según tratamiento:.....	126
Gráfica 14.	Efecto de la fuente y nivel de Zn en el índice de fragmentación de ADN espermático (IF) de verracos.	127
Gráfica 15.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del Índice de fragmentación de ADN espermático (IF), en verracos alimentados con diferentes fuentes de Zn .	128
Gráfica 16.	Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto del nivel de Zn en el índice de fragmentación de ADN espermático (IF) de verracos.	129
Gráfica 17.	Interacción de la fuente y nivel de Zn utilizado en piensos de verraco, y su efecto en el índice de fragmentación del ADN de espermatozoides (IF).	130
Gráfica 18.	Dinámica del índice de fragmentación de ADN en espermatozoides (IF) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn .	134
Gráfica 19.	Fragmentación de ADN espermático (IF) presente en eyaculados de verracos durante un periodo continuo de evaluación.	134
Gráfica 20.	Efecto de la fuente de Zn , en la proporción de ovocitos penetrados (FIV), obtenidos con semen de verraco.	136

Gráfica 21.	Efecto del nivel de Zn (ppm), en la proporción de ovocitos penetrados (FIV), utilizando semen de verraco.	137
Gráfica 22.	Efecto del nivel de Zn en el número de espermatozoides ovocito ⁻¹ (EO), con semen de verraco.	137
Gráfica 23.	Efecto del nivel de Zn , en la presencia de ovocitos monospermicos (OM), con semen de verraco.	138
Gráfica 24.	Efecto del nivel de Zn , en el desarrollo de pronúcleos (DPn), con semen de verraco.	140
Gráfica 25.	Efecto de la fuente de Zn , en el desarrollo de pronúcleos (DPn), utilizando espermatozoides de verracos.	140
Gráfica 26.	Concentración de Zn (ppm) en el sedimento espermático (ZnSE) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso.	147
Gráfica 27.	Concentración de Zn (ppm) en sedimento espermático (ZnSE) de verraco por semana.	147
Gráfica 28.	Concentración de Zn (ppm) en plasma seminal (ZnPS) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso.	148
Gráfica 29.	Concentración de Zn (ppm) en plasma seminal (ZnPS) de verraco por semana.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sitios de absorción y excreción de Zn , a partir de las primeras porciones del intestino delgado, y distribución en el organismo.	9
Figura 2.	Especificidad tisular y localización de los genes transportadores de Zn .	11
Figura 3.	Reacciones necesarias para la transformación de la glucosa en fructuosa a nivel espermatozoide.	20
Figura 4.	Representación esquemática de la absorción de Zn en el lumen intestinal y la competencia de Zn con otros cationes divalentes por el transportador de metales multivalentes.	29
Figura 5.	Diagrama del ciclo celular espermático.	47
Figura 6.	Eliminación del Zn de la cola del espermatozoide durante la maduración epididimaria.....	49
Figura 7.	Morfología del espermatozoide.	49

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Diseño general de la investigación	64
Esquema 2.	Representación del Experimento 1	91
Esquema 3.	Representación del Experimento 2	93
Esquema 4.	Representación del Experimento 3	95
Esquema 5.	Representación del Experimento 4	97
Esquema 6.	Representación del Experimento 5	99

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.	Mediciones morfométricas de la región escrotal en verracos.	74
Ilustración 2.	Mediciones de testículos y epidídimos de verracos.	75
Ilustración 3.	Espermatozoides teñidos con fluorocromo para determinar fragmentación de ADN . a. Espermatozoides no fragmentados; b. Espermatozoides fragmentados.	79
Ilustración 4.	Mezclas seminales (a) y dilución de las mismas (b) para la inseminación <i>in vitro</i> de ovocitos.	80
Ilustración 5.	Ovarios de cerdas prepuberes para la obtención y evaluación de ovocitos para su utilización en la FIV.	81
Ilustración 6.	Obtención de cenizas (C).	84
Ilustración 7.	Obtención de plasma seminal (PS).	85
Ilustración 8.	Obtención de sedimento espermático (SE) y almacenamiento.	85
Ilustración 9.	Filtrado de las muestras digeridas y matraces con dilución de las muestras para su lectura con el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.	86
Ilustración 10.	Digestión de sedimento espermático (SE). a. Muestras de SE almacenadas en eppendorf. b. SE en HCl18.5% . c. Solución digerida de SE .	87
Ilustración 11.	Dilución de muestras de plasma seminal (PS).	88
Ilustración 12.	Espectrofotómetro de absorción atómica.	89



INTRODUCCIÓN

Zinc del griego *sphaleros*, engañoso

1. INTRODUCCIÓN

El interés por mejorar y hacer más eficiente el uso de verracos en los centros de inseminación artificial, fomenta el desarrollo de investigaciones, generando información sobre cómo aumentar la calidad y cantidad de eyaculado, prolongar el tiempo de conservación de las dosis seminales, y obtener mayores índices de fertilidad y fecundidad. Por tanto, se hace necesario tener información sobre aspectos fundamentales como son la nutrición y alimentación de los verracos. Dentro del ámbito de la porcicultura, la nutrición y alimentación de los verracos ha recibido escasa atención y la información disponible para balancear de forma correcta las raciones que se administran a los machos reproductores es insuficiente.

Hoy en día, las recomendaciones nutricionales para verracos están basadas en las que se realizaron hace 30 años, así como de los resultados obtenidos en la práctica, relacionados con aspectos generales de calidad seminal, sin tenerse en cuenta la morfología y fisiología de los espermatozoides de una manera más profunda e integral. Otro hecho importante es que las recomendaciones nutricionales publicadas para la formulación de pienso para verracos son similares a las de las hembras reproductoras. Se asume erróneamente que el pienso de cerdas en lactación, cubre los requerimientos de los verracos en producción.

Una circunstancia evidente al formular el pienso, es que las recomendaciones nutricionales suelen variar ampliamente, dependiendo de la fuente de información que se utilice (**NRC, 1998, PIC, 2008; FEDNA, 2006; NSNG, 2010**). Algunas de las recomendaciones pueden tener diferencias de más del 30%, ejemplo de ello son los requerimientos de minerales y vitaminas. Por su parte, la industria alimentaria ofrece una gran variedad de productos con los que se puede formular el pienso. Estos productos tienen diferente biodisponibilidad (**BD**) como es el caso de las fuentes minerales. Estas fuentes minerales suelen ser clasificadas según su origen o tipo, lo cual además se relaciona con la **BD** que ofrecen. Actualmente se ha fomentado el uso de minerales con alta **BD**, para evitar que los animales eliminen al ambiente un alto porcentaje de ellos. Las fuentes con mayor **BD** son las de origen orgánico, pero su uso es limitado debido a su alto coste. Además, en verracos el estudio del efecto de estas fuentes

orgánicas (**FO**) es incipiente, por lo que se siguen utilizando las fuentes inorgánicas (**FI**) de forma mayoritaria.

La nutrición mineral en verraco debería estar relacionada con los tres aspectos productivos más importantes:

- a) El efecto de los minerales en el desarrollo de órganos reproductores primarios y secundarios para un funcionamiento adecuado de los mismos.
- b) Potenciación de la producción de eyaculados de calidad.
- c) La capacidad de producir altas tasas de fertilidad y fecundidad.

Sin embargo, no hay que olvidar que todos ellos deben estar relacionados con el aumento de su longevidad en función de la eficiencia reproductiva y del menor impacto ambiental que se obtenga.

Uno de los microminerales más importantes e involucrados con la capacidad reproductiva del verraco es el Zinc (**Zn**). Este micromineral está relacionado con la formación de la cromatina a través de metaloenzimas; confiere estabilidad a la cromatina a través de la formación de los “dedos de **Zn**”; forma parte de estructuras celulares como las fibras densas externas del espermatozoide (**ODF**) y se une a proteínas que permiten la estimulación de genes de transcripción (**Maret, 2001; Henkel et al., 2003; Jackson et al., 2008**).

El **Zn** debe ser suministrado a través del pienso a los animales, utilizando las **FI** como el ZnO y el ZnSO₄ u orgánicas como el lisinato de **Zn** (Zn-Lis), metionato de **Zn** (Zn-Met), levaduras enriquecidas con **Zn**, o moléculas de carbohidratos unidas al **Zn**, las cuales tienen gran difusión en la industria alimentaria animal (**Rojas et al., 1995; Mateos et al., 1998; Edwards y Baker, 1999**).

A la luz de los nuevos paradigmas de eficacia productiva, bienestar animal e impacto ambiental, el **Zn** como potente regulador biológico ha demostrado una estrecha relación con la función reproductiva. Sin embargo, el efecto que la inclusión de **Zn** en el pienso de verracos posee sobre la edad, genética, ritmo de trabajo, impacto ambiental y efecto en la actividad morfológica espermática, están por determinarse. Por todo ello, los objetivos planteados en la presente investigación fueron:

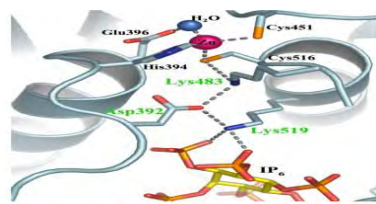
1.1. Objetivo General

- ❖ Determinar el efecto de la fuente y nivel de **Zn** sobre la eficiencia reproductiva de verracos.

Para el cumplimiento del objetivo general, se realizaron cinco experimentos que tuvieron como objetivos particulares los que se describen a continuación:

1.1.1. Objetivos Específicos

- ❖ **Experimento 1.** Evaluar el comportamiento productivo de verracos, alimentados con piensos que contenían diferentes fuentes y niveles de **Zn**, a través de la ganancia de peso, condición corporal, consumo de pienso y desarrollo de órganos reproductivos.
- ❖ **Experimento 2.** Analizar la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermograma básico del eyaculado, y de la evaluación de la integridad acrosomal (**IAC**).
- ❖ **Experimento 3.** Determinar el estado del **ADN** nuclear de espermatozoides sin diluir.
- ❖ **Experimento 4.** Evaluación de la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides (**FIV**).
- ❖ **Experimento 5.** Evaluación de la concentración de **Zn** en tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (**PS**), y sedimento espermático (**SE**).



REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades

Numerosos estudios relacionados con los requerimientos nutricionales en cerdos realizados durante la década de los años 60 y 70 se siguen utilizando actualmente. Sin embargo, es lógico pensar a la luz del desarrollo genético de los animales, los nuevos modelos de crianza y la variedad de fuentes alimenticias hoy existentes, que dichos requerimientos hayan sido modificadas, con la misma rapidez y eficiencia que las características y exigencias de crianza de los animales (**Close y Cole, 2000**). La investigación en verracos ha sido menor, por lo que la información sobre ellos es escasa y las necesidades nutricionales no son claras. Esto, impide tomar decisiones con certeza para mejorar su eficiencia reproductiva (**Audet et al., 2004**). En particular, el área de micronutrientes ha sido poco estudiada y dentro de ellos en especial el **Zn**.

El **Zn**, es un mineral esencial para la vida (**Hahn y Baker, 1993**), encontrado normalmente en los ingredientes utilizados en la formulación de los piensos, ya sea como **FI** y/o **FO**, y que evitan posibles signos carenciales en los animales (**Cao et al., 2002; Jahanian et al., 2008**). El **Zn** puede ser excretado a través de las heces o de la orina, dependiendo de la **BD** del mineral en el pienso. Hoy día se exige la utilización de piensos que eviten o disminuyan la excreción de **Zn**, ya que este mineral incide negativamente en el medio ambiente. Un pienso que contiene niveles de 100 a 250 mg de **Zn Kg⁻¹**, produce en los purines una concentración de 850 a 1300 ppm de **Zn Kg⁻¹** de materia seca (**MS**) (**Revy et al., 2003**).

La Sociedad Británica de Ciencia Animal (**BSAS**), en **2003** estableció las recomendaciones sobre el uso mínimo de minerales adicionados a los piensos de los cerdos, sin considerar los niveles aportados por las materias primas, su **BD** o su origen (orgánico o inorgánico). En otros países se han tomado como válidos los requerimientos publicados por diversos organismos como el **National Research Council (NRC)**, l'nstitut National de la Recherche Agronomique (**INRA**) o la, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (**FEDNA**), los cuales están en concordancia con las normativas para la elaboración de piensos para el uso animal. Es el caso de la normativa No^{.1334/2003} (Official Journal of the

European Union, 2003) de la Comisión de Regulación de la Unión Europea, en donde se expone que el nivel máximo de **Zn** en el pienso para todas las etapas productivas de los cerdos, debe ser 150 mg Kg⁻¹, y el reglamento 767/2009, que será obligatorio atender a partir del 1º de septiembre de 2010, en donde se señala que el etiquetado de piensos deberá declarar el nivel y fuente de **Zn**. **Hernández (2006)** comparó los niveles de **Zn** recomendados para el pienso en cerdos, encontrando diferencias hasta de un 30%, y señaló que las normativas no consideran aspectos relacionados con el impacto ambiental, bienestar animal, eficiencia productiva, y/o sistemas de producción, por lo que concluye que las normativas sólo representan un límite, sin justificación real ante las distintas etapas productivas y los diversos sistemas de producción existentes actualmente.

En los programas de alimentación de verracos, se enfatiza el cuidado de la formulación en nutrientes como proteína, energía, lisina, metionina, calcio (**Ca**) y fósforo (**P**), pero no siempre se observa el contenido de vitaminas y minerales que están incluidos en la premezcla vitamínico-mineral, la cual debería estar en concordancia con la condición fisiológica y a las exigencias de trabajo a las que están expuestos los verracos.

El contenido de **Zn** en el pienso está presente en cantidades diversas, que puede ir desde 20 ppm hasta 220 ppm. **Mateos et al. (1998)** señalan que las necesidades de **Zn** en el cerdo son altas en la mayoría de las etapas fisiológicas, y que se debe poner especial atención cuando la ración esté formulada con materias primas de origen vegetal, debido al contenido de fitatos, o con fuentes de **Zn** de baja **BD**, sin dejar de lado las posibles interacciones entre minerales que disminuyen la absorción del **Zn** (**Hernández, 2006**). Por su parte **Close y Cole (2000)** mencionan que las restricciones alimentarias en verracos, particularmente de minerales, producen un efecto más severo en ellos, debido a que disminuye el consumo de nutrientes necesarios para su óptima reproducción y condición corporal (**CC**), particularmente de minerales. Por lo tanto, el uso de fuentes de **Zn** con una mayor **BD**, y utilizadas para balancear el pienso a partir de la consideración del estado productivo del animal, salud, ambiente, sistema de alimentación y ritmo de trabajo, deberían ser el referente para obtener un pienso acorde con la función reproductiva del verraco. Por otra parte, el aparente ineficaz sistema de absorción de **Zn** que tienen los cerdos, sólo permite obtener alrededor del 30% del **Zn** suministrado en el pienso (**NRC, 1998**). Por ello, el uso de fuentes

de **Zn** con mayor **BD** se ha generalizado, apostando por las **FO** dada su: facilidad de absorción, menor impacto ambiental, y mejora en el rendimiento de los cerdos (**Apgar et al., 1995; Schiavon et al., 2000; Smits y Henman, 2000; Mullan et al., 2002**).

2.2. Características físicas y químicas del Zn

El **Zn** es un ión metálico esencial para la vida, pequeño, hidrofílico, incoloro y diamagnético, constituyente de un gran número de proteínas, incluidas las enzimas distribuidas en todos los tejidos del organismo (**Maret, 2001**). Por lo tanto, es necesario para el buen funcionamiento de proteínas (metaloproteínas), con las que forma complejos (Zn-proteína), en las que participan reiteradamente la histidina y la cisteína. Estas metaloproteínas intervienen en procesos de catálisis enzimática, desempeñando un papel estructural que se caracteriza por la formación de los “dedos de **Zn**”, los cuales unen, estabilizan y fortalecen la estructura de la cromatina. De hecho el contenido de **Zn** puede oscilar en estas metaloproteínas entre el 4 y 10% (**Jackson et al., 2008**). **Andreini et al. (2006)** y **Murakami e Hirano (2008)** señalan que del total de **Zn** en el organismo, el 40% está ligado a proteínas y cubren funciones como factores de transcripción para la regulación de genes (\approx 2000 factores de transcripción incluidos) y el 60% a enzimas y proteínas que involucran el transporte del ión. El **Zn** es el encargado de establecer que la proteína tenga una estructura terciaria o cuaternaria. Es un metal que no sufre reacciones de óxido-reducción (redox), lo que le confiere una capacidad de estabilidad importante (**Ebert y Altman, 2008; Jackson et al., 2008**). Involucra procesos de transferencia de electrones, pero debido a su carga eléctrica, no puede cruzar las membranas biológicas por mecanismos de difusión pasiva (**Hortin et al., 1993; McMahon y Cousins, 1998**). El **Zn** es un micronutriente crítico, desde el punto de vista fisiológico, ya que sus funciones son amplias y abarcan una infinidad de actividades, tales como: almacenamiento y liberación de insulina; confiere integridad a la membrana celular; interviene en procesos de maduración sexual y en la reproducción; participa en actividades de sensibilidad olfativa y gustativa; activo componente de la función tiroidea y de los procesos de coagulación sanguínea, y crucial para la respuesta inmunitaria (**Maret, 2001; Andreini et al., 2006; Molokwu y Li, 2006**). **Fukada et al. (2008)** mencionan que al **Zn** se le reconoce como una molécula de señalización

intracelular, por lo que se le ha dado el nombre de segundo mensajero (**Regalla y Lyons, 2005; Yamasaki et al., 2007; Murakami e Hirano, 2008**). Por otra parte, el análisis del genoma humano, ha mostrado que entre el 3 y el 10% de todos los genes pueden codificar proteínas que se unen a **Zn** (**Maret, 2001; Jackson et al., 2008**).

2.3. Absorción y metabolismo de Zn

En el aparato digestivo, el **Zn** que se encuentra en forma libre, está en pequeñas cantidades ya que la mayoría se une a fosfatos, aminoácidos y otros ácidos orgánicos, los cuales son absorbidos principalmente en la región duodenal y parte proximal del yeyuno (**Krebs, 2000**). La absorción de **Zn** se realiza a través de los enterocitos, y a través de su membrana basolateral se transporta hacia la circulación portal (**Figura 1**). Por tanto, el primer sistema de control homeostático corporal del **Zn** es el sistema gastrointestinal (**Hernández, 2006**).

Los mecanismos que absorben el **Zn** exógeno han sido poco estudiados, aunque se reconoce la existencia de procesos de saturación-insaturación del mineral que intentan establecer la homeóstasis metabólica del mineral (**Krebs, 2000**), y que se relacionan con el consumo de **Zn**, la **BD** de las fuentes, las necesidades del organismo por el mineral, y la excreción del **Zn** endógeno. La absorción del **Zn** a nivel intestinal ocupa sistemas de transporte activo saturable, así como un proceso no-saturable de difusión pasiva. Este proceso depende del gradiente de concentración del catión de **Zn** que esté disponible para su absorción. Por lo tanto, se cree que existen múltiples factores que influyen en la absorción de **Zn** debido a lo siguiente:

- a) El aumento de la concentración de **Zn** satura el sistema de transporte activo.
- b) La tasa de absorción de la mucosa intestinal puede verse reducida, debido a procesos patológicos.
- c) La presencia de otros cationes divalentes (Ejemplo: **Ca**) los cuales compiten por el canal no específico de **Zn**, llamado canal polivalente (**Molokwu y Li, 2006**).

El proceso de homeóstasis de **Zn** en la célula, se controla a través de los mecanismos de absorción, eliminación y secuestro intracelular, estando asociados con la expresión de genes transportadores de **Zn** y con proteínas llamadas genéricamente metalotioneina (**MT**) (**Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006**). **Cousins et al. (2006)** describieron que el consumo de **Zn** regula la excreción de este ión, ya que consumos en cantidades extremadamente altas, no incrementan proporcionalmente el **Zn** en tejidos y **PS**, debido a que el mineral es excretado vía las heces, siendo este el primer mecanismo homeostático del **Zn**, el cual permanece durante el tiempo que dure este suministro (**Krebs, 2000**). Por otra parte el hígado, páncreas e intestino se convierten en mecanismos de excreción de **Zn**, evitando con ello toxicidad por parte de este mineral (**Cousins et al., 2006**).

La evaluación de los mecanismos de homeóstasis debe ser observada durante un periodo largo, ya que la tasa de absorción del mineral aumenta en un primer momento, para luego disminuir. La restricción en el consumo de **Zn**, suelen aumentar la eficiencia de absorción en 90%, aunque al restituir el nivel normal de **Zn**, suele encontrarse una absorción normal en un tiempo menor al generado por la restricción (**Krebs, 2000**).

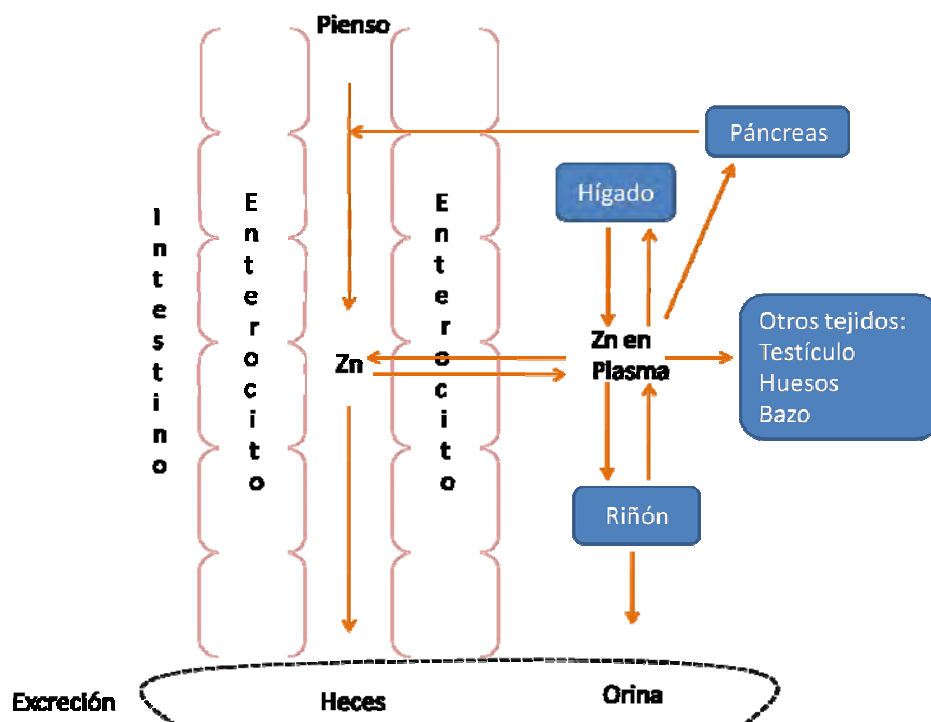


Figura.1. Sitios de absorción, excreción y distribución de **Zn** a partir de las primeras porciones del intestino delgado, y su distribución en el organismo.

La concentración de **Zn** en las células eucariotas según **Maret (2001)**, es muy alta, alrededor de 200 μM , pero la cantidad de **Zn** que se localiza en estado libre en la célula, se registra en concentraciones pequeñas. La homeóstasis de **Zn** es fundamental en todos los tejidos y se mantiene a través de sensores que se activan por la presencia de una baja o alta concentración de **Zn**. Esta homeóstasis incluye mecanismos de regulación y expresión de genes de transcripción, los cuales codifican la transportación de **Zn** a través de la membrana plasmática, de las membranas intracelulares y de la **MT (Jackson et al., 2008)**.

El conocimiento de la existencia de estos genes transportadores (**ZnT y Zip**) ha aclarado algunas preguntas sobre qué es lo que sucede en los procesos de absorción de **Zn**, aunque no se conocen todos los mecanismos que intervienen durante el transporte de **Zn** por el organismo (**Figura 2**) (**Ohana et al., 2009**).

En mamíferos, la familia génica que se conoce como **ZnT** está constituida por diez miembros (**Cousins et al., 2006; Ohana et al., 2009**). Muchos de estos genes relacionados con el transporte de **Zn**, se encuentran en distintos tejidos para regular el contenido mineral en los diferentes compartimentos celulares, por lo que se asocian a endosomas, aparato de Golgi, o retículo endoplásmico (**Figura 2**) y por ello se les ha dado el nombre de “secuestradores” de **Zn**, ya que estos permiten almacenar el ión en compartimentos para que el citoplasma no se sature (**Ohana et al., 2009**). La identificación del gen para la proteína transportadora **ZnT-1** ha mostrado su importancia en el tránsito entrada-salida de **Zn** en la célula, es la única localizada en la membrana plasmática y es la responsable de la expulsión del **Zn** intracelular, previniendo un efecto citotóxico por parte del **Zn (Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006)**. Un elevado consumo de **Zn** afecta la actividad de la proteína transportadora **ZnT-1** en algunos tejidos, ya que este modifica la resistencia de la membrana celular y los canales de transferencia mineral, ocasionando la exportación del **Zn** intracelular (**McMahon y Cousins, 1998; Krebs, 2000; Iguchi et al., 2004**). Sin embargo, este mecanismo no siempre ocurre cuando disminuye el **Zn (McMahon y Cousins, 1998; Cousins et al., 2006)**. El único mecanismo bien estudiado en mamíferos, que detecta y regula las condiciones que guarda el **Zn** intracelular es el aportado por el gen regulador de los factores de transcripción **MFT1 [MRE** (elemento-respuesta al

metal) vinculante al factor de transcripción 1] (McMahon y Cousins, 1998; Jackson *et al.*, 2008). Este factor de transcripción, actúa regulando al gen **ZnT** y a la **MT**. Las **MFT1** están conservadas en los dominios de unión de los “dedos de Zn” presentes en el **ADN**.

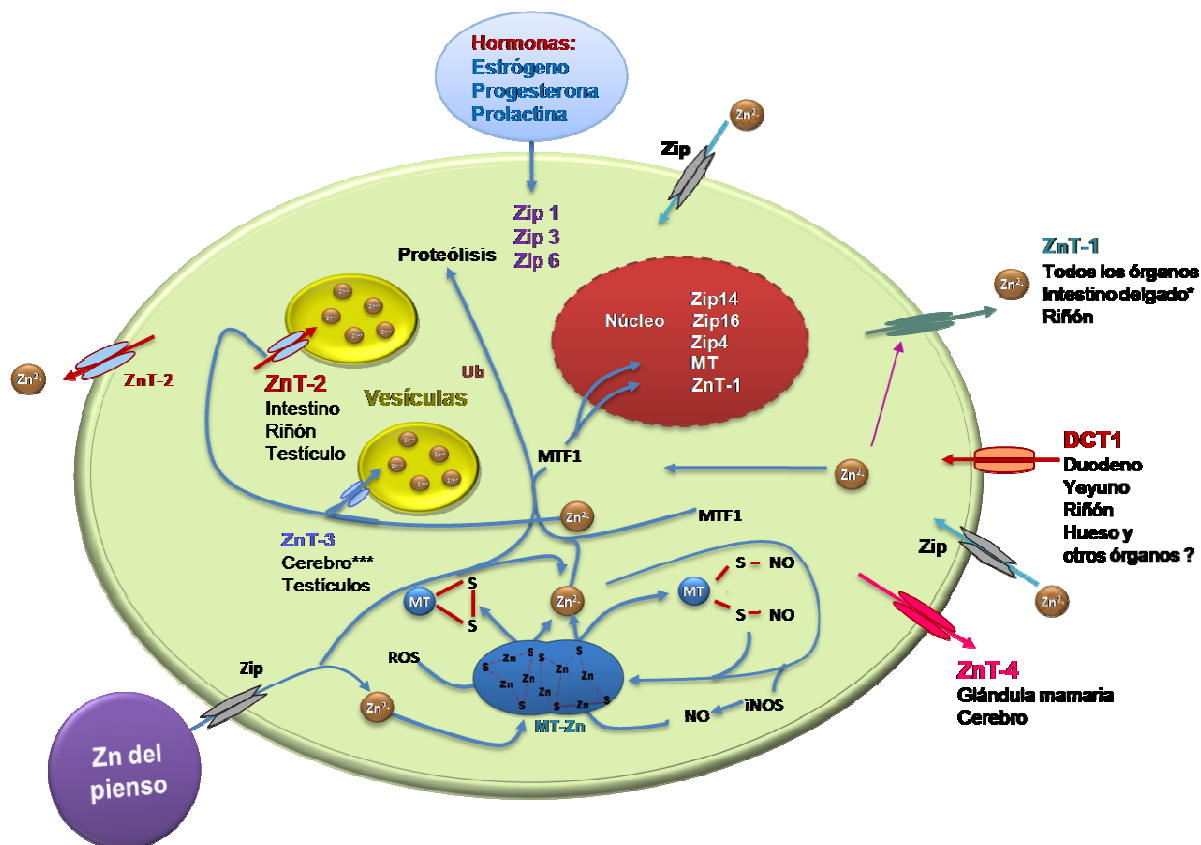


Figura. 2. Especificidad tisular y localización de las proteínas transportadoras de Zn. Se observan las vías de señalización que regulan los genes y que son influenciados por el Zn intracelular. Los mecanismos no ocurren en todas las células y aún no se conocen bien. La concentración de Zn intracelular libre (círculos marrón), probablemente sea menor a 1 nmol L^{-1} . El Zn intracelular potencial esta dentro de las vesículas (verde olivo). La proteína transportadora ZnT-1 está localizada en la membrana plasmática y sus funciones son la exportación de Zn en prácticamente todos los órganos. ZnT-2 puede estar asociado con las vesículas de Zn o la exportación celular en muchos órganos. ZnT-3 está asociado con el Zn vesicular y con el de sistema nervioso y tejido testicular. ZnT-4 probablemente este localizado en la membrana plasmática de la glándula mamaria y cerebro. DCT1 es un transportador de metales con una afinidad mayor al Fe, Zn, y otros cationes que funcionan como importadores celulares de metales en muchos órganos. Cambios en el contenido de Zn en el pienso, influyen en la expresión de ZnT-1, ZnT-2, Zip y Metalotioneína (MT). El MTF1 controla a la MT y al ZnT-1. Los Mecanismos de stress incrementan la presencia del oxido nítrico (NO) y la liberación del Zn^{2+} por la MT (azul), activando la MTF1. Los eventos que inducen a iNOS (síntesis del óxido nítrico) dirigen a la MT a procesos de tionitrosación, pero puede ser revertido con el aumento de Zn^{2+} . En contraste, la oxidación del MT es irreversible cuando es causada por las especies reactivas de oxígeno (ROS), dirigiéndolo a la degradación (proteólisis), probablemente vía ubiquitinización (Ub). Existe un efecto hormonal en la expresión de algunos genes transportadores Zip. Las líneas sólidas indican modelos positivos de activación, mientras que las líneas punteadas indican un proceso inhibitorio. Localizados por técnicas de inmunohistoquímica en la membrana de los enterocitos (*) basolaterales y células tubulares renales (**) o vesículas sinápticas (***).

Fuente: Modificado de McMahon y Cousins, 1998; Cousins *et al.*, 2006.

Las proteínas transportadoras **ZnT-2 y ZnT-3** están restringidas a ciertos tejidos en los mamíferos. La **ZnT-2** está involucrada en la captura del **Zn** dentro de las vesículas (compartimentos endosómicos y lisosómicos) en el intestino, riñón, y testículos. Estos compartimentos están relacionados con la posibilidad de que el **Zn** almacenado en la célula no produzca toxicidad o en su caso lo almacena en altas concentraciones sin provocar daño a la célula (**McMahon y Cousins, 1998; Iguchi et al., 2004**). La proteína transportadora **ZnT-3** se expresa en el cerebro y en los testículos. En el cerebro, es responsable de acumular **Zn** en las vesículas sinápticas y tal vez podría tener una función importante dentro de la espermatogénesis, en la formación de vesículas de **Zn** (**McMahon y Cousins, 1998; Ohana et al., 2009**). La proteína **ZnT-4**, se ha encontrado en gran cantidad de tejidos, su mecanismo se ha asociado con la expulsión o compartimentalización en la glándula mamaria y es esencial para la regulación del contenido de **Zn** en la leche (**Iguchi et al., 2004; Murakami e Hirano, 2008**). La **ZnT-5** se localiza en las vesículas secretoras de las células pancreáticas y en la membrana apical de los enterocitos. Por ello, se relaciona con el crecimiento, contenido graso y función muscular. En ratones donde existe una alteración de la expresión del gen para la proteína transportadora **Zn-T5**, se observó escaso crecimiento, disminución de la grasa corporal, osteopenia, debilidad muscular y bradicardia (**Cousins et al., 2006; Murakami e Hirano, 2008**). El gen para el transportador **ZnT-8** está expresado exclusivamente en las células β -pancreáticas (**Murakami e Hirano, 2008**). En el caso del gen para **ZnT-9** se encuentra en el núcleo durante la mitosis (**Tabuchi et al., 2000**) y el gen para el transportador **ZnT-10** podría estar relacionado con el transporte en la membrana plasmática(**Cousins et al., 2006**).

De manera general, la familia de los genes transportadores **ZnT**, apoya a través de las capas lipídicas de la célula el transporte de este mineral, existiendo factores de oxidación celular, cambios en la concentración de otros minerales, y factores inmunológicos que pueden competir por los transportadores o inhibir la expresión de los mismo (**McMahon y Cousins, 1998**).

La familia de genes **Zip** en mamíferos consta de 14 miembros (**Figura 2**) (**Cousins et al., 2006; Murakami e Hirano, 2008**). Según su función de “importación” de **Zn** al interior de la célula, la familia de proteínas asociadas

puede ser dividida en cuatro subfamilias: **Zip I**, **Zip II**, **gufA**, y **LZT**. La absorción de **Zn** puede ser un proceso facilitado e impulsado por un gradiente de concentración. Algunas proteínas importadoras **Zip** pueden transportar diversos metales divalentes pero, particularmente en mamíferos, el **Zn** tiene factores o elementos **Zip** específicos para este metal. La mayoría de las proteínas transportadoras que regula la familia génica **Zip**, se han localizado en la membrana plasmática, sin embargo, la **Zip7** está presente en el aparato de Golgi (**Ohana et al., 2009**). Los productos de la familia génica **Zip** pueden cambiar con base a las condiciones fisiológicas o a la disponibilidad biológica del **Zn**. También se ha observado que las hormonas pueden regular tanto la expresión de los genes **Zip**, como **ZnT** (**Cousins et al., 2006**).

La proteína importadora **Zip1** se encuentra identificada en la próstata, está regulada por la prolactina y la testosterona, y puede estar relacionada con la presencia atípica de altos niveles de **Zn** en este tejido (**Cousins et al., 2006**). Las proteínas **Zip6** y **Zip10**, están involucradas en mecanismos de migración celular, por lo que es probable que intervengan en el desarrollo adecuado de las gónadas (**Murakami e Hirano, 2008**).

Otro mecanismo celular para controlar la concentración de **Zn** son unas pequeñas proteínas llamadas metalotioneinas (**MT**), ricas en cisteína, las cuales se unen al **Zn** e intervienen en el proceso de absorción, distribución, almacenaje, liberación y transporte de este mineral (**Krebs, 2000; Iguchi et al., 2004**). La **MT** se une al **Zn** para estabilizar a la célula, llevándola a un estado redox (**Maret y Vallee, 1998; citado por Maret, 2001**). La base molecular para esta unión es la vinculación a los átomos de azufre (**S**) del aminoácido donante (cisteína) el cual le confiere actividad redox sobre el átomo de **Zn** que también la contiene. El cambio de este potencial en la célula bajo condiciones oxidantes induce una cinética flexible de **Zn**, para transferirse contra gradiente o a sitios donde es menos afín, pero es requerido para actuar como un antioxidante (**Maret, 2001**).

Una alta concentración de **Zn** activa el **MTF1** induciendo la expresión de **MT**, que luego secuestra al **Zn** (**Murakami e Hirano, 2008**). Posteriormente la **MT** dona el **Zn**, lo que le confiere una actividad desintoxicante. La **MT** también está presente en la célula en su forma apo de tioneina (**T**) en cantidad diversa con respecto a **MT** (**Yang et al., 2001**). La **T** es un eficiente agente quelante endógeno y un receptor eficaz de **Zn**. Este hecho es importante ya que la relación **MT/T**, así

como la regulación de la **MT** proporciona un medio para controlar la disponibilidad de **Zn**. Además, es de resaltar que la célula eucariota compartimentaliza el contenido de **Zn** (**Figura 2**), y de la misma manera lo hace con la **MT** (**Maret, 2001**). La expresión de **MT** es particularmente alta en las células del parénquima del intestino, páncreas, riñón e hígado. En su estructura está contenido el aminoácido cisteína que envuelve al **Zn**. Se ha comprobado que la **MT** es afectada por los niveles de **Zn**, y en menor medida por la fuente utilizada en el pienso (**Carlson et al., 2004; Hernández, 2006**) que se consume, aunque puede observarse que en situaciones de estrés, glucocorticoides, citoquinas, inflamación, presencia de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, **ROS**), hormonas androgénicas, óxido nítrico (**NO**) y/o restricción de **Zn**, pueden disminuir la concentración de **MT** (**Figura 2**) (**Krebs, 2000; Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006**). El **MTF1** suele apoyar de forma positiva el estímulo que realiza el **Zn** sobre la **MT**, por lo que se sugiere que el **MTF1** es expresado en condiciones basales ante la presencia de **Zn** e interviene en la expresión de **MT** y **ZnT-1** (**Cousins et al., 2006; Murakami e Hirano, 2008**).

Aparentemente los niveles de **Zn** afectan la presencia de los genes **ZnT** y de la **MT**, pero no se observa relación entre la presencia de los genes **ZnT** y la **MT** (**Krebs, 2000; Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006**). La **MT** por lo tanto, puede funcionar como una respuesta celular para limitar la concentración de **Zn** libre dentro de límites muy estrechos, además de funcionar como un regulador de las concentraciones de **Zn** en la célula (**Krebs, 2000**). Sin embargo, la **MT** también regula al cobre (**Cu**) intracelular, lo que puede impedir que la **MT** regule solamente la absorción de **Zn** y este se una a los sitios naturales, incrementando el **Zn** circulante en el organismo (**Hernández, 2006**). Cuando se incrementa el **Zn**, puede causar en las proteínas transportadoras un bloqueo el cual puede llevar a un desequilibrio, implicando desfavorablemente al metabolismo de lípidos y carbohidratos (**Smith et al., 1997**). Otra situación descrita es que la presencia de **MT** puede variar, dependiendo del periodo en que fue consumida una cantidad o fuente de **Zn** en el pienso (**Hernández, 2006**).

Hedemann et al. (2006) demostraron que el **Zn** incrementa el mucus de la superficie gastrointestinal tal vez, como un mecanismo de regulación de la expresión génica de **ZnT** en el intestino delgado. Por lo tanto, se supondría que el **Zn** también regula la expresión de los genes secretores de mucina.

Otra proteína transportadora de metales divalentes es la **DCT1** (divalent cation transporter 1) es la **Nramp2** (proteína asociada a la resistencia natural de los macrófagos), la cual es altamente hidrofóbica, forma parte de las glicoproteínas de membrana, participa en el transporte de metales del ambiente extra e intracelular, ligados principalmente al **Zn**, hierro (**Fe**), manganeso (**Mn**), cadmio (**Cd**), cobalto (**Co**), níquel (**Ni**), plomo (**Pb**) y **Cu** (**Gruenheid et al., 1999; Tabuchi et al., 2000; Iguchi et al., 2004**). En el ovocito se ha demostrado que la **Nramp2** puede transportar los mismos cationes divalentes en un ambiente dependiente del potencial de hidrógeno (**pH**). Las **Nramp2** pueden presentar mutaciones, disminuyendo la actividad de transporte del metal (**Gruenheid et al., 1999**). El **DCT1** se encuentra en el duodeno específicamente en las criptas y vellosidades menores del intestino. Este gen apoya la absorción de iones metálicos. En los ovocitos el **DCT1** ha demostrado transportar **Zn** al interior, sin embargo, aun no está bien caracterizado (**McMahon y Cousins, 1998; Krebs 2000**).

2.4. Almacenamiento del Zn

Una vez absorbido el **Zn**, es transportado por la albúmina del plasma sanguíneo, y por algunas proteínas vinculantes como la transferrina, glicoproteínas ricas en histidina, y tal vez la **MT** (**Cousins, 1996**). **Regalla y Lyons (2005)** estudiaron la forma en que se distribuye el **Zn** en la célula, y encontraron que el **Zn** es lábil, cambia rápidamente de ligaduras, y por ello se disocia y asocia con facilidad. El **Zn** por lo tanto se distribuye y poco tiempo se mantiene libre. El glutatión es un mediador que facilita el cambio rápido del **Zn** de un sitio a otro. El **Zn** se absorbe y almacena reguladamente por todo el cuerpo en las vesículas citoplásmicas (zincosomas), y la concentración puede variar de especie a especie (**Figura 2**). **Hernández (2006)** señala que el nivel de **Zn** almacenado está más relacionado con la cantidad que con la fuente de **Zn**, ya que la expresión de **MT** se incrementa en los animales que contienen mayor nivel de **Zn**. Asimismo, el hecho de que las células entren en fase estacionaria permite que la concentración de **Zn** no cambie. Bajo estas condiciones se han encontrado de 600,000 a 3 millones de átomos de **Zn** por célula (**Regalla y Lyons, 2005**). Sin embargo, el **Zn** libre en la célula es muy bajo, llegando a ser de un átomo por célula, en *E. coli*. En humanos, el contenido de **Zn** es de 2 a 3 g y se encuentra

distribuido en músculo (60%), tejido óseo (30%) y piel (5%). (**Molokwu y Li, 2006**).

En un estado de carencia, los primeros sitios de almacén que pierden este ión son los zincosomas del hígado, riñón y páncreas (**Spears, 1996**). El almacenamiento de **Zn** suele variar según la fuente y edad de los animales (**Krebs, 2000**). Esto es debido a las diferencias que existen en el metabolismo, adicionando a estas el hecho de que las **FO** se distribuyen y almacenan de forma distinta. Se ha demostrado que las **FO** de **Zn** suelen almacenarse en mayor proporción en hígado, bazo, corazón e intestino delgado, que las **FI** (**Spears, 1996**). A este respecto, **Rojas et al. (1995)** observaron que el **Zn** de la **FO** **Zn-Lis** se almacena en cantidades altas en los mismos tejidos que **Spears (1996)** había señalado, pero preferentemente en hígado, restándole importancia a los otros órganos (**Krebs, 2000**).

Aunque, el aparato reproductor no suele ser elegido para almacenar grandes cantidades de **Zn**, su contenido mineral se afecta según sea el consumo y absorción. En la medida en que se aumenta el consumo, se eleva la concentración en el tejido testicular, epididimario y prostático, así como en sus secreciones. En el caso de los testículos, cuando una dieta es baja en **Zn**, suelen generar una disminución aproximadamente del 11% de este mineral en el parénquima (**Evenson et al., 1993**). La concentración de **Zn** en la glándula prostática es elevada cuando se suministra **Zn** en las cantidades recomendadas y esto favorece la concentración que se observa en el **PS** (**Iguchi et al., 2004**). Estos autores determinaron que los niveles de **Zn** disminuyen en la próstata, cuando existe crecimiento de células cancerígenas. Además, se ha relacionado esto con la pérdida de concentración de **MT**, tal vez debido a la proteólisis de esta proteína, a través de su relación con la presencia de **ROS** (**Figura 2**). Por su parte **Cousins et al. (2006)**, describieron que los cuadros de prostatitis bacteriana, están asociados directamente con la disminución del contenido de **Zn** plasmático debido a la disminución de la proteína **Zip1**. El almacenamiento de **Zn** en cantidades suficientes en la próstata, favorece la acumulación de **Zn** en los espermatozoides al mezclarse estos con las secreciones de la próstata durante la eyaculación (**Evenson et al., 1993**). Esta mezcla confiere a las células su capacidad de movimiento. En el **PS** el contenido de **Zn** ronda los 2.06 mM

en humanos, 349 μM en cerdos, 1.04 mM en perros y 600 μM en conejos (**Aonuma et al., 1978**).

La concentración de hormonas androgénicas, también potencializa la expresión de **MT** (**Cousins et al., 2006**), por lo que en la medida que se inicia la actividad sexual, también aumenta la producción de **MT**, y se incrementa la capacidad de almacenamiento y las necesidades de **Zn**.

2.5. Secreción, reabsorción y excreción de Zn

Existen mecanismos metabólicos que contribuyen a la eliminación de **Zn**, como son la obstrucción de la absorción, o la excreción celular (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). Las células expulsan el **Zn** a través de mecanismos de activación de genes transportadores. Las secreciones pancreáticas, biliares, gastroduodenales, del flujo transepitelial de los enterocitos intestinales o de otro tipo de células, así como las descamaciones de las células de la mucosa (**Cousins et al., 2006**), se convierten en una fuente endógena de **Zn** excretado que actúa equilibrando el contenido celular de dicho ión.

Los procesos que acompañan el desarrollo de la homeóstasis del **Zn** celular, como son la absorción-excreción-retención del ión, son dependientes de la cantidad de **Zn** que se pierde vía endógena y de su capacidad de absorción. Se ha demostrado que la cantidad de **Zn** excretado puede ser superior o igual a las cantidades de **Zn** exógeno. Por ello, cuando existe un exceso de **Zn** en el pienso de los animales, este, se convierte en el mecanismo regulador de la absorción a nivel intestinal (**Cousins, 1996**).

El **Zn** excretado vía digestiva puede ser reabsorbido en la fracción más distal del intestino, dependiendo de la forma y cantidad de **Zn** presente, así como de los factores intraluminales y del lugar del intestino delgado donde se localice el ión (**McMahon y Cousins, 1998; Krebs, 2000**). La presencia de fitatos y grasa suele inhibir la reabsorción de **Zn** en el intestino ocasionando con ello un efecto de lavado (**Krebs, 2000**). **McMahon y Cousins (1998)**, afirman que el transporte de **Zn** es un proceso sensible al tiempo, a la temperatura y al **pH**, pudiendo ser un mecanismo saturable o no. El transporte de este ión es probable que requiera energía y en algunos casos se puede transportar como un ión libre, pero el **Zn**

que está unido o ligado es más difícil de ser transportado al interior de la célula y con ello afectar significativamente su entrada y distribución en la célula.

Otro mecanismo de la célula que evita la expulsión de **Zn**, es la inestabilidad que muestran las proteínas transportadoras de la familia génica **ZnT** y que derivan en su proteólisis. Cuando ha existido una activación innecesaria de estas proteínas, se destruyen. En otros casos, cuando el **Zn** intracelular ha sido equilibrado con el extracelular, las proteínas transportadoras **ZnT** tienden a ser eliminadas. Por ello, la activación oportuna y la vida media de las proteínas transportadoras, asegura que su expresión ocurra sólo cuando los niveles intracelulares de **Zn** sean lo suficientemente altos para producir una gran cantidad, permitiendo la expulsión del **Zn** antes de producir daño celular como la inhibición del crecimiento celular o la desestabilización del **ADN** (Chivers, 2007).

El páncreas y la bilis son mecanismos eficientes para la eliminación del **Zn**, ya que al ser excretados a través de su función exocrina llega al intestino delgado y de ahí es eliminado vía heces (Gralak, 2002, citado por Hernández, 2006). La excreción de **Zn** se produce principalmente por vía fecal y aunque por la vía urinaria se excreta poca cantidad de **Zn**, esta suele ser definitiva y rápida, ya que en 24 horas cantidades entre 0.4 a 0.6 mg pueden ser desechadas. Otras vías de excreción son el cabello, sudor, descamación de la piel, la bilis y el **PS** (Bedwal y Bahuguna, 1994; Chesters, 1997).

Con respecto al **PS Henkel et al. (2003)** demostraron que el **Zn** expulsado por los espermatozoides durante la espermiogénesis es reabsorbido principalmente en la cola del epidídimo, pudiendo continuar en la parte proximal de los conductos deferentes. Es posible suponer que este mecanismo de reabsorción puede funcionar como un regulador de la homeóstasis de **Zn** en las células, no sólo del epidídimo, sino también de los espermatozoides. A su vez, la salida de **Zn** del espermatozoide puede estar en función de la concentración de proteínas, ya que estas, responden a otras fuentes de **Zn**, evitando que los espermatozoides expulsen el **Zn** contenido en cola.

2.6. Funciones del Zn

Es probable que el **Zn** influya en la disminución de la tasa de crecimiento (**Chesters, 1997**) ya que existe evidencia del efecto de este ión con el apetito, debido al incremento en la producción de opiáceos, colecistoquininas o neuropéptidos. Tal vez por ello, el **Zn** tiene efecto sobre el centro de la saciedad en el hipotálamo o en la actividad de absorción en el intestino (**Cousins, 1996**).

2.6.1. Función del Zn en las enzimas

Se sabe que el **Zn** es necesario en la actividad enzimática. Se reconocen alrededor de 300 metaloenzimas, por lo que es el mineral que más enzimas activa, estando presente en las seis clases de enzimas (**Maret, 2001; Molokwu y Li, 2006; Murakami e Hirano, 2008**).

La mayoría de las enzimas que contienen **Zn**, se pueden clasificar en dos grupos básicos:

- a) La primera clase de enzimas, utilizan al **Zn** para coordinar los átomos de oxígeno (**O₂**) o **S** en las moléculas de agua, alcoholes o tioles. Asimismo el **Zn** coordina la polarización de las uniones oxhidrilo (**-OH**) y sulfhidrilo (**-SH**), lo que induce a la acidificación del protón, para que el aminoácido se una. Los grupos **-OH**, alcóxido o tiolato que se generan pueden actuar como nucleófilos en la catálisis.
- b) La segunda clase de enzimas utilizan al **Zn** como aceptor de electrones, al polarizar el grupo carbonilo. Esto hace al átomo de carbono más electrofílico (**Regalla y Lyon, 2005**).

El **Zn** está implicado en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, y lípidos, por ello mantener un estado de homeóstasis del ión es esencial para el normal desarrollo de los procesos de crecimiento y reproducción (**Mateos et al., 1998; Hedemann et al., 2006; Molokwu y Li, 2006**).

La enzima superóxido dismutasa (**SOD**) es el primer mecanismo antioxidante de la célula. Esta función está dada a través de la reorganización de

los átomos de la molécula, convirtiendo los radicales libres de O_2 , en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un radical menos dañino, dependiendo de la presencia de **Zn** como parte de su estructura. Sin embargo, la **SOD** también ocupa otros iones como **Cu** y **Mn**, siendo este último el que se utiliza en la **SOD** mitocondrial, mientras que **Zn** y **Cu** se encuentran en el citoplasma celular. El hecho de que la **SOD** se encuentre en la mitocondria, citoplasma y en los compartimentos extracelulares, permite garantizar que los superóxidos sean convertidos en H_2O_2 . La contribución de esta enzima radica en evitar el daño en membranas celulares y en el **ADN** causado por los **ROS**.

La fosfatasa alcalina (**FA**) es una metaloenzima, que incorpora tres átomos de **Zn** en su molécula, dos de los cuales son esenciales para su actividad y uno forma parte estructural de la molécula. Su función es hidrolizar enlaces éster fosfórico, entre un grupo fosfato y un radical orgánico en un **pH** básico, liberando **P** inorgánico, además de estar relacionada con la síntesis de **ADN**, en consecuencia, estimula el crecimiento celular (**Molokwu y Li, 2006**).

La aminoacil-RNAt-sintetasa, que es el primer paso en la biosíntesis de proteínas, es directamente activada por el **Zn** en el proceso de osteosíntesis. También es parte importante de la enzima sorbitol deshidrogenasa (**SoDH**) que interviene en la ruta que convierte la glucosa a sorbitol y posteriormente en fructosa, la cual es utilizada como energía en el desplazamiento de la célula espermática (**Figura 3**).

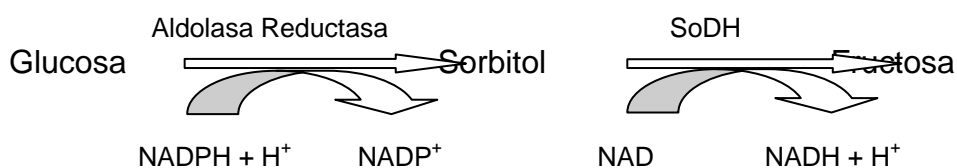


Figura 3. Reacciones necesarias para la transformación de la glucosa en fructosa a nivel espermatozoide.

La enzima convertidora de la angiotensina (**ACE**, Angiotensin converting enzyme), está asociada con el desarrollo del testículo y la espermatogénesis. Parece ser que la deficiencia de **Zn**, disminuye en primer lugar la actividad de **ACE**, produciendo posteriormente una reducción de la testosterona, afectando directamente a la espermatogénesis. Algunas investigaciones señalan un efecto directo sobre las células de Leydig y de Sertoli (**Bedwal y Bahuguna, 1994**).

En cerdos destetados, concentraciones elevadas de **Zn** suelen aumentar la secreción enzimática de la carboxilpeptidasa A y B [elimina el grupo carboxilo (**COOH**) de aminoácidos], quimiotripsina y tripsina; lipasa y amilasa pancreática entre 5 a 7 veces, favoreciendo la digestión de proteínas y el crecimiento de las microvellosidades intestinales, estimulando la síntesis enzimática de estas, mejorando la digestión y absorción de nutrientes, aumentando la eficiencia del crecimiento (**Hedemann et al., 2006**). En la próstata, el **Zn** inhibe la actividad enzimática de la aminopeptidasa N-uroquinasa y la actividad del activador del plasminógeno, ayudando así al control de la metástasis de las células cancerígenas en próstata (**Iguchi et al., 2004**).

Dentro de las enzimas que se encuentran en el espermatozoide, está la anhidrasa carbónica la cual, es una proteína monomérica que requiere de **Zn** en su sitio activo. Su actividad radica en la función del carbonato deshidratasa, la cual le confiere su actividad biológica sobre los compuestos de un solo carbono [Ejemplo: Ácido carbónico (**H₂CO₃**) y dióxido de carbono (**CO₂**)]. Se localiza en el citoplasma donde ejerce una acción buffer y de transporte de **CO₂**. Toma este **CO₂** de la célula y lo combina con agua para obtener **H₂CO₃**. Después desprende este **CO₂**. A través de este mecanismo permite al espermatozoide mantener el equilibrio hídrico y un **pH** constante. En el caso de la **FA**, la disminución de esta enzima está relacionada con la pérdida de tejido testicular y una disminución de la producción de espermatozoides. Por su parte la 5' nucleotidasa (**5'-ND**) es importante en la obtención de energía, la disminución de esta enzima disminuye el nicotinamida adenín dinucleótido (**NAD**) requerido para la motilidad espermática (**Mot**) (**Aonuma et al., 1978**).

La Lactato Deshidrogenasa (**LDH-X**) es una isoenzima del tejido germinativo de las gónadas. Pertenece a las metaloenzimas y está relacionada con la **Mot** ya que provee de energía a través de las reacciones de lactato y piruvato. La ausencia de esta enzima está correlacionada con anomalías en la región mitocondrial de la tracto intermedio de los espermatozoides y con una disminución de la concentración espermática. En humanos se ha observado que puede reducir la concentración espermática hasta en un tercio, cuando es menor a 20×10^6 . El nivel de **LDH-X** en fluidos seminales tiene una correlación (**r = 0.7**) con la concentración espermática (**Orlando et al., 1988**).

2.6.2. Función del Zn en la reproducción

2.6.2.1. Efecto del Zn en el testículo

El parénquima testicular está formado principalmente por los túbulos seminíferos, donde se encuentran las células germinales, células de Sertoli y de Leydig, los espacios intersticiales que contienen vasos sanguíneos, linfáticos y nervios **(Cole y Cupps, 1984; Hafez, 1984)**. El efecto del **Zn** en el parénquima testicular se ve reflejado en los conductos seminíferos, ya que una deficiencia afecta su desarrollo, además de intervenir en los mecanismos de inhibición de los factores de Müller y en la diferenciación testicular **(Bedwal y Bahuguna, 1994)**. Por lo anterior, se menciona que el **Zn** contribuye al desarrollo y densidad de los túbulos seminíferos y participa en el crecimiento de los testículos **(Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994; Mahan et al., 2002)**. La espermatogénesis, depende del número de células de Sertoli que se desarrollan en el testículo **(França et al., 2005)**. Una cantidad mayor de dichas células por gramo de testículo aumenta el número de células germinales **(NRC 1998; Lleó, 2000; Strzezek et al., 2000; Marchesi, 2004)**.

La concentración de **Zn** parece estar influenciada por la actividad sexual, por lo que el contenido de **Zn** en el parénquima testicular es mayor en los animales adultos que en los prepúberes **(Bedwal y Bahuguna, 1994)**. Estos mismos autores ponen de manifiesto que determinadas patologías que producen daños en el testículo, reflejan una disminución en la concentración de **Zn** posiblemente debido a una menor disponibilidad del mineral en el parénquima testicular. Asimismo, la falta de **Zn** puede afectar los procesos que regulan la síntesis de esteroides en las células de Leydig. **Mateos et al. (1997)**, pusieron en evidencia que la restricción de **Zn** produce un aumento de gotas de colesterol en dichas células, afectando negativamente la esteroidogénesis testicular **(Hesketh, 1982; Close y Roberts, 1991; Close, 1993a; Mahan et al., 2002)**.

2.6.2.2. Efecto del Zn en el epidídimo

Los cambios morfo-fisiológicos, metabólicos y bioquímicos que ocurren en los espermatozoides, como la condensación de la cromatina, el desarrollo y formación del acrosoma, la formación de las **ODF** (Outer dense fibres), así como los componentes de la membrana plasmática, son realizados desde las células germinales, continuando en el conducto epididimario hasta llegar a la porción distal del mismo, donde se almacenan. Estas modificaciones son necesarias para que el espermatozoide sea capaz de fecundar al ovocito.

El epidídimo secreta y absorbe proteínas a través de las células principales, realizando endocitosis, y secretando al lumen un medio ácido. Además, tienen un mecanismo de defensa provisto de las células basales con mecanismos de fagocitosis y antioxidación (**França et al., 2005**). **Henkel et al. (2003)**, descubrieron que existían dos proteínas en el epidídimo que unen al **Zn**, y señalaron que su concentración era cinco veces más grande en la cabeza que en la cola del epidídimo, sugiriendo que tienen una función biológica de movilizar al **Zn** una vez expulsado de la cola del espermatozoide. También, demostraron que el **Zn** que se encuentra en las células basales de epidídimo pertenece al espermatozoide. Existe por lo tanto una evidencia para explicar que si el epidídimo no produce estas proteínas o sus mecanismos de excreción-absorción, son disfuncionales, el **Zn** puede acumularse y producir la pérdida de la homeóstasis del ión. El **Zn** del espermatozoide puede ser desechado por las secreciones epididimales o en su defecto se libera un mecanismo de bloqueo para la expulsión del **Zn** por parte del espermatozoide. Estos autores también observaron que el **Zn** puede reabsorberse en pequeñas cantidades en secciones del epidídimo, como la cola. Estas cantidades de **Zn** se encuentran unidas de forma débil y difusa a través del epitelio, transportándolas hacia el torrente sanguíneo.

En el epidídimo, la actividad metabólica de los espermatozoides, células epiteliales y microorganismos puede derivar en una gran producción de **ROS**, lo que aumenta la posibilidad de que los espermatozoides sufran estrés oxidativo. Sin embargo, el epidídimo contiene mecanismos que evitan la oxidación de las membranas espermáticas y daños en el **ADN**. Estos mecanismos se

corresponden con la **SOD** y la glutatión peroxidasa (**GPx**), enzimas que tienen como parte importante de su molécula al **Zn**.

2.6.2.3. Efecto del Zn en la próstata

La próstata es considerada como el órgano que mayor contenido de **Zn** presenta en todo el organismo (**Quiles y Hevia-Méndez, 2004a, b**). La próstata disminuye su peso al disminuir la concentración de **Zn** en ella. El crecimiento celular de este órgano es controlado a través de la inhibición de la actividad de la aconitasa mitocondrial, regulada por el **Zn**. Asimismo, el contenido de **Zn** aumenta en el **PS**, cuando existe cambio en la absorción de este metal en el tejido prostático (**Iguchi et al., 2004**). **Jackson et al. (2008)** señalan que la pérdida de la homeóstasis en el contenido de **Zn** prostático, está relacionado con procesos de cáncer en este órgano en humanos (**Murakami e Hirano, 2008**). Por su parte, el **Zn** en el eyaculado es indispensable para unirse a la célula espermática que lo necesita para la formación de las **ODF** (**Henkel et al., 2003; Iguchi et al., 2004**).

2.6.2.4. Efecto del Zn en el espermatozoide

La cola del espermatozoide contiene más del 93% del **Zn** total del mismo, localizado especialmente en las **ODF**. Las **ODF**, se extienden a lo largo del 60% de la longitud de la pieza principal de la cola del espermatozoide y están constituidas de proteínas estructurales que contienen una gran cantidad de cisteína. En el testículo, el **Zn** se une al grupo **-SH** de la cisteína y forman el complejo **Zn-tiol**, con objeto de que las **ODF** no se oxiden. Durante la maduración en epidídimo, el 60% del contenido mineral es expulsado y a continuación el grupo **-SH** es oxidado para formar puentes disulfuro (**S-S**), estabilizando y endureciendo las **ODF** (**Henkel et al., 2003**).

Los espermatozoides tienen un sistema muy eficaz de utilización de la energía. La incorporación de grandes cantidades de **Zn** protegen a los **ODF** y la posterior expulsión del mineral, una vez que estos se hayan endurecido (durante la espermiogénesis), se convierten en un potencial regulador del gasto energético, a través de transformación de la energía en un movimiento vigoroso que desplaza a los espermatozoides de forma rápida y progresiva.

Los espermatozoides dependen del mecanismo intra y extraespermático, y del epitelio basal epididimal, para expulsar el **Zn** contenido en su cola. Este mecanismo depende de la capacidad de absorción de las células principales del epidídimo (**Henkel et al., 2003**). Adicionalmente al movimiento que se obtiene por la expulsión del **Zn**, este ión aparentemente tiene un papel importante en la función y generación del movimiento por las **ODF**. Esto en humanos está bien estudiado, ya que en la medida que se incrementa el contenido de **Zn** en el flagelo, la motilidad disminuye, especialmente la progresiva.

El contenido de **Zn** en la cabeza corresponde al 7% del contenido total. Este **Zn** se encuentra en el **ADN** estabilizando la cromatina (**Kvist et al. 1987, citado por Henkel et al., 2003; Evenson et al., 1993**). Este contenido es cuatro veces mayor al contenido en el **PS** (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). En los procesos de meiosis y espermiogénesis el **Zn** impide daños en la célula, ya que le confiere protección y apoya la síntesis de **ADN** espermático (**Molokwu y Li, 2006**). Durante la espermiogénesis las histonas son reemplazadas por proteínas de transición y finalmente por protaminas (**Evenson et al., 1999; Evenson, 2005; Ardón, 2005**). Los “dedos de **Zn**”, que comprenden la mayor clase de factores de transcripción en el genoma, tienen su estabilidad gracias a la presencia de **Zn** (**Yamasaki et al., 2007**).

EL **Zn** ha demostrado su trascendencia en condiciones donde existe tensión provocada por otros mecanismos. Este ión desempeña una función importante de fortaleza y estabilización que permite que las proteínas cuaternarias existentes en el **ADN** se mantengan intactas (**Iyer et al., 1988; De Ambrogi et al., 2006; Ebert y Altman, 2008**). El grado de compactación del **ADN** espermático es seis veces mayor al que muestran las células somáticas (**Ardón, 2005; De Ambrogi et al., 2006**). En esta función el papel que juega el aminoácido cisteína contenido en las protaminas es fundamental, ya que ayuda en la unión y enlace de la cromatina espermática. En los espermatozoides maduros, las nucleoproteínas son pequeñas, y se enriquecen del aminoácido arginina. Estos ayudan a la estabilización del **ADN** a través de la formación de un complejo con grupos tioles de las protaminas en colaboración con el **Zn**, las cuales son oxidadas a grupos **S-S**, y colocadas entre e intra-protaminas durante la maduración espermática en el epidídimo (**Evenson et al., 1993; Ardón, 2005**).

Este complejo protamina-**ADN**, se introduce en el surco principal de la cadena de **ADN**, lo que permite que al empaquetarse de forma lineal y no superenrollada, las fibras de cromatina se plieguen y entonces ocurra la inhibición total de la transcripción (**Rodríguez, 2008**).

Durante la remodelación de la cromatina, existen roturas transitorias en el **ADN**. La aparición de estas roturas, están consideradas como parte de los mecanismos normales de organización. La función de las roturas parece ser la eliminación del **ADN** superenrollado. Pero estas roturas son reparadas durante la maduración espermática, desapareciendo una vez que las protaminas están completas. La organización adecuada del **ADN** nuclear espermático es fundamental para la replicación del mismo (**Ardón, 2005**). En espermatozoides maduros los mecanismos de reparación del **ADN** suelen ser inexistentes y aunque la célula intentara reparar esos daños, dependerá del lugar y grado del daño para que exista una reparación favorable y con ello asegurar la viabilidad del espermatozoide. La célula confiere su seguridad a mecanismos como la compactación del **ADN** y la capacidad antioxidante que aporta el **PS** y el ambiente en el que está de forma natural la célula (**De Ambrogi et al., 2006; Boe-Hansen et al., 2008**).

Los aminoácidos cisteína e histidina controlan la liberación de **Zn**, permitiendo que el **ADN** se desempaquete para ayudar con los mecanismos antioxidantes pertinentes, cuando los espermatozoides inician su actividad motriz. El **Zn** controla la actividad del succinato el cual, a su vez controla la actividad respiratoria del espermatozoide durante su movimiento (**Aonuma et al., 1978**). Esta actividad respiratoria aumenta la generación de **ROS** los cuales son controlados por el **Zn**, gracias a su actividad antioxidante (**Aonuma et al., 1978; Evenson et al., 1993; Xu et al., 2003; De Ambrogi et al., 2006**). Asimismo, esta actividad antioxidante es apoyada por el efecto antibacteriano que tiene el **PS**, evitando que las bacterias aumenten la producción de **ROS** (**Iguchi et al., 2004**). La fuente más importante de **Zn** para el espermatozoide es el **PS**. Sin embargo, los métodos de extracción seminal limitan la función del mismo (**Aonuma et al., 1978**). Por otra parte, se ha observado que en la medida que aumenta el **Zn** en el **PS**, la capacidad de fecundación disminuye por la reducción de la capacitación acrosomal.

2.6.2.5. Efecto del Zn en el desarrollo embrionario

Una de las características fundamentales con las que se evalúa la calidad seminal en cerdos, es la tasa de partos y el tamaño de camada. Sin embargo, las técnicas rutinarias de evaluación de la calidad del semen, no incluyen el estado de la cromatina e integridad del **ADN**. Se ha demostrado que tanto la cromatina espermática como la integridad del **ADN**, guardan una estrecha relación con la capacidad de fecundación y el desarrollo embrionario (**Angelopoulou et al., 2007; Boe-Hansen et al., 2008**). Una correcta descondensación del **ADN**, permitirá la fusión del material genético de las dos células germinales. En los últimos años, se ha concedido especial atención a la presencia del **Zn**, ya que inhibe a las enzimas de degradación del **ADN**. **De Ambrogi et al. (2006)** señalaron la importancia de evaluar la estructura del **ADN**, debido a que una gran cantidad de muestras seminales que son consideradas como adecuadas tan sólo por su morfología, membranas celulares y porcentaje de **Mot**, tienen la posibilidad de que tengan daños en el **ADN**, produciéndose un efecto negativo tras la fecundación, en el desarrollo de pronúcleos y posterior desarrollo embrionario (**Ardón, 2005; De Ambrogi et al., 2006**). Esto puede ser explicado porque los espermatozoides con daño en **ADN** y cromatina, son capaces de penetrar los ovocitos, pero no de desarrollar el embrión ni iniciar el desarrollo genómico, provocando con ello el inicio de la apoptosis celular (**Ardón, 2005**). Por esta razón, los parámetros de calidad seminal no siempre están relacionados con el daño del **ADN** nuclear espermático (**Angelopoulou et al., 2007**). **De Ambrogi et al. (2006)**, observaron que a pesar de que las membranas espermáticas no estaban dañadas, la fertilidad y el desarrollo embrionario disminuían. El cigoto puede utilizar mecanismos de reparación que pueden corregir parcialmente daños existentes después de la fecundación pero, la eficiencia de esos mecanismos dependerá de la localización del daño (**De Ambrogi et al., 2006; Boe-Hansen et al., 2008**).

La fragmentación del **ADN** puede poner en grave riesgo el desarrollo embrionario (**Ardón, 2005**). Un mecanismo de daño en el **ADN** es la irradiación (**Boe-Hansen et al., 2008**). Sin embargo, el **ADN** puede ser liberado de los puentes **S-S** por la presencia de detergentes presentes en el medio de conservación, evitando que el espermatozoide llegue al proceso de fecundación

con el **ADN** en condiciones adecuadas para el desarrollo sincrónico de pronúcleos (**Evenson et al., 1993; Rodriguez, 2008**). **Matín-Rillo et al. (1996, 1999)**, admiten la posibilidad de que en el semen descongelado se presente una descondensación de la cromatina, originando una reducción de la **Mot**, pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de la actividad mitocondrial, así como un menor desarrollo embrionario en cerdas inseminadas con dichos eyaculados, lo que explicaría los bajos resultados obtenidos en fertilidad y en prolificidad (**Martín-Rillo et al., 1999; Evenson, 2005; Fraser et al., 2006**).

2.7. Relación de Zn con otros micronutrientes

De forma general, los minerales tienen distintas interacciones (**Ashmead, 1993**), que pueden interferir o coadyuvar su utilización en el tracto digestivo. Estas interacciones pueden ser descritas como:

- a. Interacciones que producen precipitados insolubles. Las sales son por lo general solubles en el estómago a **pH** ácido. Sin embargo, como el **pH** se incrementa en el intestino, la solubilidad se pierde, y el metal tiende a unirse a un anión o ligando. Por ejemplo, un compuesto orgánico como el ácido fólico o un compuesto inorgánico, como los fosfatos.
- b. Existe una competencia entre iones por el mecanismo de transporte activo de las células del lumen intestinal, para llegar hacia el citoplasma de las células intestinales. Debido a que los iones que se unen a las proteínas transportadoras para ser absorbidos pueden tener una competencia físico-química entre cationes por los sitios activos de las proteínas transportadoras (**Iguchi et al., 2004; Cousins et al., 2006**).
- c. Reducción de la capacidad de las células del cuerpo para sintetizar proteínas transportadoras (genes transportadores **Zip, ZnT, MT**). La sustitución de un mineral por otro metal en una enzima, por ejemplo, puede acelerar o bloquear la actividad de la enzima.
- d. Bloqueo por el transporte y la excreción de minerales en las células de la mucosa intestinal por procesos patológicos.

- e. Participación de interacciones y reacciones en cadena como consecuencia de los eventos descritos anteriormente (**Hernández, 2006**).

Cousins et al. (2006), describen los mecanismos por los cuales los minerales pueden competir por los sitios de absorción en el intestino, a través del canal de metal multivalente. Los sitios de absorción de **Zn** son los mismos que para el **Ca**, **Fe** y **Cu**. Por lo tanto, la ingesta excesiva de **Fe** o **Cu** puede interferir negativamente con la absorción de **Zn** (**Hernández, 2006**). Del mismo modo, la ingesta excesiva de **Zn** puede afectar la absorción de **Ca**, **Fe** y **Cu**. Se ha demostrado que existe un transportador de cationes divalentes en el borde de la membrana, el cual posee una amplia gama de sustratos como **Fe**, **Zn**, **Mn**, **Co**, **Cd**, **Cu**, **Ni** y **Pb**. En la **Figura 4**, se muestra una propuesta realizada por **Molokwu y Li (2006)** para los mecanismos de transporte e interferencia multivalente.

Close y Cole (2000), señalan que la utilización de **FO**, permite que no haya interferencias en la absorción y metabolismo de **Zn** con otros minerales. Sin embargo, son pocos los microminerales orgánicos que se ofrecen comercialmente para su utilización en la industria alimentaria animal. Además, se reconoce que los minerales contenidos en los ingredientes del pienso, pueden producir procesos de interferencia y/o asociación disminuyendo la absorción del mineral.

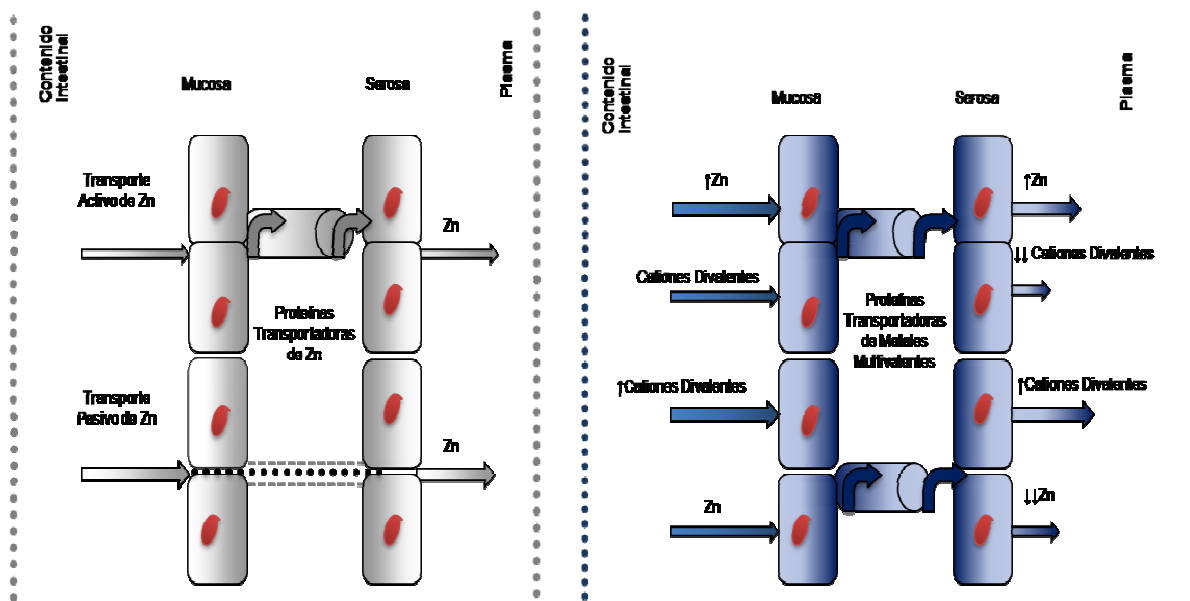


Figura. 4. Representación esquemática de la absorción de **Zn** en el lumen intestinal y la competencia del **Zn** con otros cationes divalentes por el transportador de metales multivalentes. El incremento de **Zn** inhibe la absorción de otros cationes, por competencia por los canales transportadores de metales. Fuente: **Molokwu y Li, 2006**.

Un mineral relacionado directamente con la actividad de **Zn** es el silicio (**Si**) (**Emerick y Kayongo-Male, 1990; Evenson et al., 1993**). Este micromineral se encuentra en fuentes vegetales en grandes cantidades, por lo que un pienso con un elevado contenido de fibra suele incrementar el contenido de **Si**. El estado carencial de **Zn**, provoca un efecto negativo en la cinética de la célula, tanto en la proliferación como en la diferenciación celular, debido a que se presenta un bloqueo, que impide que las células realicen normalmente sus procesos meióticos, impidiendo el desarrollo del siguiente estado de maduración celular. Esto se ha asociado con una disminución en la ganancia de peso corporal y el tamaño testicular, al igual que existe una reducción del número de células haploides y por tanto, del número de espermatozoides producidos (**Evenson et al., 1993**).

Se ha observado en piensos con bajo nivel de **Zn** y niveles de **Si** medios o altos, que las células epiteliales del testículo disminuyen la síntesis de **ADN**. Por otra parte si el **Si** está a bajas concentraciones, tiene un efecto potenciador de la actividad metabólica de **Zn** pero también, puede intervenir favoreciendo los excesos, y de esta manera provocar un efecto tóxico mayor (**Evenson et al., 1993**).

Otro micromineral relacionado estrechamente con **Zn** es el **Cu**. En procesos donde se presenta un daño celular del epitelio (vitíligo), el nivel de **Zn** y **Cu** en plasma sanguíneo se encuentran reducidos. En procesos de hiperpigmentación, existe evidencia de la presencia de un elevado nivel de **Cu**, debido al consumo de piensos sustancialmente deficientes de **Zn** (**Samuelson et al., 1999**). El **Cu** puede impedir que la **MT** transporte los iones de **Zn**. Al incrementarse la concentración de **Zn** en el pienso se favorece la producción de **MT**. Este gen es más afín al **Cu**, pero al encontrar mayor cantidad de **Zn**, este inhibe la unión del **Cu** con el **MT** provocando una deficiencia de **Cu**, y/o un desequilibrio **Zn:Cu** (**Smith et al., 1997**). Sin embargo, **Rojas et al. (1995)** encontraron que en células del intestino delgado, el **Cu** no bloquea el ingreso de **Zn** en la célula, probablemente debido a que tienen diferentes rutas de absorción. También indican que en cada especie la proporción de **MT** que es estimulada por estos minerales es diferente y la susceptibilidad a ser activada depende de factores intrínsecos entre otros la edad y la especie.

El **Fe** y el **Ca** cuando se encuentran en proporciones altas, también ejercen un efecto negativo en la absorción de **Zn** (**Krebs, 2000**).

2.8. Efecto de la deficiencia de Zn

Se han realizado numerosos estudios orientados a encontrar evidencias sobre los niveles de **Zn** que son necesarios para evitar efectos negativos por la deficiencia de este mineral. Se sabe que la disminución de **Zn** en el organismo originada por un bajo consumo, es rápidamente detectada a nivel celular. La evaluación del contenido plasmático de **Zn** en las células, es una técnica eficaz para determinar de forma inmediata cómo se realiza un proceso de apoptosis celular (**O`dell, 2000; Maret, 2001**).

El **Zn** es un citoprotector y evita la apoptosis celular a través del control de las caspasas. Por lo tanto, al existir una deficiencia de **Zn** se puede encontrar disminución en el crecimiento, pérdidas de peso, anomalías del esqueleto, anorexia, disfunción inmune, degeneración ocular macular (**AMD**), alopecia, dermatitis, retraso en la cicatrización de heridas, baja libido y oligospermia (**Mateos et al., 1998; Samuelson et al., 1999; Molokwu y Li, 2006**). La deficiencia de **Zn**, ha sido estudiada por **O`dell (2000)** con relación a la alteración de la membrana plasmática, respecto a cambios en el contenido de lípidos y proteínas, así como a la depleción de la actividad enzimática de esta región. Además, la capacidad redox de la membrana se pierde debido a la formación de grupos **-SH**, haciendo más pronunciada la inactividad de las enzimas involucradas como puede ser la **GPx**. Por su parte **Stohs y Bagchi (1995)** estudiaron el efecto de la deficiencia de **Zn** en la producción de **H₂O₂**, debido a la inestabilidad que se produce en el citocromo P-450, produciéndose daño en las membranas celulares del hígado.

Es probable que daños en piel estén relacionados con la disminución de la **MT** en el desarrollo de tejido conectivo (**Fukada et al., 2008**) en consecuencia una disminución del **Zn**. En cerdos en crecimiento, se observó que con 40 ppm de **Zn** contenidos en el pienso, sin suplemento y durante un periodo de cinco semanas, presentan signos de deficiencia, relacionados con paraqueratosis que incluían agrietamiento y endurecimiento de la piel (**Edwards y Baker, 1999; Underwood y Suttle, 1999**). **Underwood y Suttle (1999)**, demostraron que en

lechones puede producirse una reducción del tamaño y fuerza del fémur, debido a una pobre cantidad de **Zn** en la leche materna, y al inadecuado consumo de pienso sólido, durante la lactación y periodo de destete.

Iguchi et al. (2004), señalan la relación que tiene una deficiencia de **Zn** con el hipogonadismo, acompañada de la inhibición de la espermatocitogénesis por disminución de testosterona (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). El mecanismo que puede provocar el hipogonadismo y reducción en el desarrollo de los túbulos seminíferos, estaría relacionado con la inhibición de la división celular durante la mitosis ocasionada por la deficiencia de **Zn** (**Murakami e Hirano, 2008**). En los túbulos seminíferos el daño es irreversible, provocando esterilidad (**Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994**). **Evenson et al. (1993)**, señalaron que el exceso de **Zn** en el pienso tiene un efecto negativo en la estructura de la cromatina, pero menor al que se presenta en casos de deficiencia. **Underwood y Suttle (1999)**, indican pérdida de la libido en los verracos.

2.9. Efecto tóxico del Zn

El **Zn** es potencialmente tóxico por lo que debe mantenerse bajo estricto control celular y almacenado en el sitio exacto (**Regalla y Lyons, 2005**). Algunos mecanismos de toxicidad de **Zn** están relacionados con la sustitución de este ión por otros cationes en enzimas no dependientes, inactivándolas. Por ejemplo el caso donde el **Zn** compite con **Fe** para incluirse dentro de la porfirina a través de la ferroquelatasa. El **Zn** ha mostrado que a nivel mitocondrial produce inhibición de los sitios de unión con otros minerales. De cualquier forma, no se puede permitir el acúmulo de **Zn** sin control en el citoplasma (**Regalla y Lyons, 2005**). Para ello, deben producirse la expresión de los genes importadores-exportadores (**Zip/ZnT**), así como de la **MT** (**Chivers, 2007**). Los niveles de **Zn**, provocan un mecanismo de señalización hacia los procesos de transcripción que regulan la expresión de los genes que controlan a las proteínas transportadoras de **Zn** (**Yamasaki et al., 2007; Fukada et al., 2008**). El exceso de iones de **Zn**, se libera inducido por la presencia del **ZnT-1**. Estos mecanismos son tan sensibles que pueden detectar concentraciones menores a 10^{-14} M de **Zn**. Sin embargo, la célula es capaz de adaptarse fácil y rápidamente a los niveles de **Zn** a los que es expuesta (**Chivers, 2007**). Un lugar de desintoxicación de **Zn** son las vesículas a

las que las proteínas transportadoras de **Zn**, de la familia de los genes **ZnT** derivan y distribuyen el mineral (**Figura 2**).

Según **Szabo et al. (2004)** los cerdos tienen una alta tolerancia a consumos de **Zn** en exceso. Sin embargo, se ha observado que dependiendo de la fuente con la que se realice este exceso se puede presentar con mayor facilidad una toxicidad. Un ejemplo de esto es el uso farmacológico de ZnO a niveles de 3000 ppm, donde los cerdos nunca presentaron signos de intoxicación (**Hedemann et al., 2006**). Cerdos que han consumido excesos de **Zn** (>200 ppm), suelen incrementar la concentración de este mineral en hígado, riñón y páncreas. Sin embargo, en piel, hueso y músculo no se observa un aumento significativo (**Rojas et al., 1995; Schiavon et al., 2000; Hedemann et al., 2006**). El consumo de **Zn** a niveles de 2500 ppm, incrementa la actividad de las enzimas pancreáticas (**Hedemann et al., 2006**).

Por su parte **Evenson et al. (1993)**, demostraron que un exceso de **Zn** (500 mg Kg⁻¹) en el pienso puede desestabilizar las uniones **S-S** y los complejos de **Zn-SH** dentro y entre las protaminas, llevando a la desnaturalización de la estructura cuaternaria de la cromatina y presentando una mayor desestabilización del **ADN in situ**.

2.10. Requerimientos nutricionales de Zn en verracos

El **Zn** tiene propiedades multifuncionales que desempeñan un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo, inmunidad y en la reproducción, por lo que es importante una estimación precisa de las necesidades de este mineral diariamente.

El aporte de minerales en verraco suele ser el mismo que se ofrece a las hembras reproductoras, a pesar de las diferencias anatómo-fisiológicas entre ellos. También, el uso de fuentes de baja **BD** es recurrente en la elaboración de piensos para verracos, debido al mayor coste por Kg al incluir fuentes con mayor biodisponibilidad, a la aparente adaptación y a la gran resistencia que tienen los verracos ante un balance inadecuados del mineral. **Edwards y Baker (1999)** señalan que la mejor manera de elegir una fuente de **Zn**, está en el coste por unidad biodisponible del mineral. Pero desafortunadamente hay pocos estudios que ofrezcan información necesaria para tomar una buena decisión, por lo que

sólo se considera el precio de la fuente utilizada dentro del coste final del pienso para verracos.

Dentro de las necesidades nutricionales del macho reproductor, en el momento de elaborar un pienso sólo se toman en cuenta el estado de mantenimiento, proporcionando al semental un extra nutricional para reforzar sus actividades de ejercicio y monta, debido a que se considera que las condiciones de manejo y alojamiento del animal, no generan gastos mayores o necesidades superiores a las aportadas por el pienso. Aunque es deseable que durante la vida productiva del verraco, éste gane peso (**Mateos et al., 1997; Palomo et al., 1997**), existen otras necesidades que deben ser cubiertas como son: la calidad del eyaculado, la longevidad del animal, la edad, raza, estado de salud, peso, ritmo de trabajo, la calidad y fuente de **Zn**, el contenido de fitatos, y el sistema de alimentación (**Marchesi, 2005**). De forma rutinaria estas consideraciones no se toman en cuenta, y lo que es peor, con frecuencia, se suministra el pienso de hembras a los verracos, asumiendo que no hay diferencias, ni efectos adversos en el semental.

La técnica más común y aceptada para estimar las necesidades de minerales en cerdos es la utilización de modelos matemáticos. Desafortunadamente, no hay suficiente información científica para desarrollar un modelo preciso de requerimiento minerales que pondere todos los factores antes señalados. Por ello, el **NRC (1998)** y **FEDNA (2006)**, recomiendan la utilización de niveles nutricionales de minerales, obtenidos de estudios relacionados con el comportamiento productivo, los cuales no siempre consideran variables reproductivas consistentemente importantes en la calidad del eyaculado. Además, se asume de forma práctica, que las diferencias nutricionales entre machos no castrados y verracos pueden ser pequeñas, pero siempre superiores en los verracos, y estos a su vez iguales a las hembras reproductoras, por lo que se aumenta el contenido mineral incluyendo el **Zn**, en el pienso de verracos.

Los cerdos incluidos en programas de reproducción, deben continuar el crecimiento de sus órganos sexuales. Por ello, una práctica común es el suministro de **Zn** en cantidades superiores a las recomendadas para la etapa de finalización o cebo (100 ppm), garantizando con ello un adecuado desarrollo testicular y de glándulas sexuales (**Marchesi, 2005**). Sin embargo, esto no siempre va acompañado de una redefinición de los contenidos minerales

restantes, por lo que se puede llegar a tener interacciones negativas entre los minerales (**NRC, 1998**). Por otra parte, con la mejora genética animal, es probable que se aumenten las necesidades de **Zn** (**Hernández, 2006**). Por esta razón, en centros de inseminación se utiliza pienso con niveles de **Zn** mayores o en su defecto se utiliza **Zn** inyectado. En la **Tabla 1**, se pueden observar las recomendaciones de **Zn**, que sugieren los organismos internacionales dedicados al estudio de los requerimientos nutricionales.

Tabla 1. Necesidades diarias de **Zn** en verracos adultos.

Recomendación del nivel de Zn en el pienso de verraco							
INRA	Feedstuffs		Close	NRC	PIC	FEDNA	NSNG
1985	1989	2006	1993a	1998	2006	2006	2010
250	100	125	100	100	95-140	95-140	165
mg Kg ⁻¹	mg Kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg Kg ⁻¹	mg Kg ⁻¹	ppm	ppm	ppm

Fuente: l'institut national de la recherche agronomique (**INRA**), **National Research Council (NRC)**, **PIC Company**; Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (**FEDNA**); National Swine Nutrition Guide (**NSNG**).

Acorde con la información presentada en la **Tabla 1**, se elaboran comúnmente las premezclas minerales y estas a su vez están calculadas sobre un pienso base (**PB**), el cual es escaso o ausente de contenido mineral (**Marchesi, 2003**). Por ejemplo, para verracos jóvenes (8 a 12 meses de edad) se recomienda 100 ppm, con un máximo permitido por día de 150 ppm de **Zn** (**Mateos et al., 2005**). Además, es interesante recordar que no se tiene en cuenta la **BD** de los ingredientes utilizados para su elaboración (**Marchesi, 2003**). **D'Allaire y Lemman (1990)**, **Louis et al. (1994b)**, y **Lewis (1997)** mencionan que del 40 al 60% de los verracos utilizados en monta natural presentan problemas de sobrepeso, limitando su actividad reproductiva, siendo la causa de eliminación de la explotación. Por esta razón, una práctica rutinaria es la disminución de la cantidad de pienso suministrado. La formulación de una premezcla mineral está realizada con base a la unidad del pienso (Kg), y no sobre la cantidad de minerales por día que el animal debe consumir. Por tanto, si los verracos no consumen la cantidad de pienso necesaria, existirá un consumo deficiente de minerales, provocando en la mayoría de los casos, deficiencias marginales que no son detectados fácilmente, pero que conllevan una disminución en el rendimiento del animal (**Close y Cole, 2000**; **García et al., 2007**). **Close y Cole (2000)**

señalan que el sistema de alimentación restringido (1 vez día^{-1} , $2 \text{ a } 3 \text{ Kg día}^{-1}$) al que son sometidos los verracos, es potencialmente un mecanismo para producir deficiencias de minerales.

Las empresas dedicadas a la alimentación animal garantizan sus resultados utilizando niveles máximos permitidos por la normativa del país correspondiente, duplicando los requerimientos nutricionales sugeridos por alguno de los organismos oficiales (**NRC, 1998**), ocasionando además un incremento en la excreción de **Zn** a través de heces y orina (**Hernández, 2006**). Suponiendo que de esta manera no existirán signos de deficiencia en los verracos, se desconoce el efecto negativo que puede estar causando esta práctica en la producción y calidad del eyaculado. Para el veterinario clínico, la evidencia es que no se muestran efectos letales y dada la poca información sobre este tema, se admite que no hay efecto negativo en el eyaculado (**García y De Loera, 2007**).

Por otra parte, que el **Zn** sea utilizado en dosis altas (3000 ppm) y muestre una baja posibilidad de producir daños tóxicos en los cerdos, no es un referente para pensar que en los verracos suceda lo mismo. No hay que olvidar que el verraco produce células espermáticas que son muy sensibles a cambios metabólicos, sanitarios y ambientales (**Marchesi, 2004; García, 2007**).

Estudios realizados en cerdos en etapas tempranas, ofrecen resultados que demuestran los efectos de diferentes fuentes y niveles de **Zn**. Sin embargo, en hembras reproductoras y en verracos sigue habiendo una serie de interrogantes que con la información científica existente, aún no son del todo claras. Dentro de estas incógnitas están la importancia o repercusión que tiene la utilización de los diferentes tipos de fuentes (**FO vs FI**) en las funciones reproductivas del verraco, el nivel óptimo de **Zn** que requieren los verracos en producción, el efecto que tienen los suplementos inyectados y orales aplicados a los verracos y cómo repercute este mineral en los distintos parámetros que cuantifican el valor de un verraco destinado a la producción de dosis seminales para la Inseminación Artificial (**IA**), como la producción y calidad seminal, concentrándose particularmente en cómo actúa el **Zn** en la célula espermática, estimulando la acción y/o participación de genes transportadores (actividad epigénica) (**García, 2007**). En resumen se podría asumir que los requerimientos minerales en sementales son complicados de identificar, más que los relacionados con los cerdos en cebo, ya que en el caso particular del semental,

cada uno presenta un comportamiento diferente y sus eyaculados también son distintos (**Marchesi, 2003**).

Existen dos métodos básicos para evaluar las necesidades de minerales en los cerdos, ambos mediante modelos matemáticos; el primero se basa en la cantidad de minerales almacenados en los tejidos (utilizada principalmente en los EE.UU.) (**Wedekind et al., 1992; Wedekind et al., 1994**) y el método de balance o digestibilidad (utilizado en países europeos) (**Ammerman et al., 1995; Apgar y Kornegay, 1996; Hernández, 2006**). Cualquiera de ellos establece un proceso largo, que dificulta su aplicación, pero que en este momento se hace necesario, si se desea conocer más sobre las necesidades nutricionales en verracos. Los estudios de nutrición en los verracos, exigen además el uso de información al menos de dos ciclos celulares espermáticos completos (≈ 14 semanas) y realizar pruebas en condiciones ambientales distintas, debido a la susceptibilidad que tienen los animales ante diferentes situaciones medioambientales, golpes de calor o frío y de manejo (**Wedekind et al., 1992**).

Con base a lo anterior, se ha demostrado que bajo condiciones de estrés térmico (elevación de temperatura), un aumento de los niveles de **Zn** en el pienso, tres a cuatro veces, incrementa la libido y la concentración espermática. En dichos piensos debe aumentarse la concentración de **Ca**, ya que es posible la formación de quelatos entre **Zn** y **Ca** y por tanto, una disminución en la **BD** de ambos minerales (**Quiles y Hevia-Méndez, 2002**). Los niveles de **Zn** en el pienso entre 23 ppm hasta 100 ppm, no afectan las características de desarrollo e integridad del parénquima testicular, la libido y la producción espermática (**Louis et al., 1994b; Mateos et al., 1997**). **Riopérez (1991), Close y Roberts (1991) y Close (1993a, b)**, recomiendan que los cerdos consuman al menos un 20% más de **Zn**, llegando a 120 o 150 ppm de **Zn** en el **PB**. Con toda esta información, se puede deducir que utilizando un pienso que contenga entre 70 a 150 ppm, no hay problemas en el estado físico, producción y calidad seminal del verraco (**Close, 1998**). Pero es aquí donde existe un vacío de información, ya que sólo definen calidad a través de la evaluación básica del eyaculado. Por otra parte no hay que olvidar que la normativa europea sólo permite un pienso con no más de 150 ppm, aunque no limita el uso de cantidades similares o superiores con productos inyectados o complementos alimenticios aplicados directamente al verraco (**Mateo et al., 2005**).

2.11. Fuentes alimenticias de Zn para la elaboración de piensos de verraco

2.11.1. Contenido de Zn en los ingredientes del pienso

Los ingredientes naturales de las raciones para animales domésticos son frecuentemente deficientes en varios microminerales y vitaminas (**Hortin et al., 1993; Mateos et al., 1998, 2005**). Así, el contenido de **Zn** en los cereales y otras semillas, puede diferir poco entre variedades y especies, pero el contenido de **Zn** en el suelo donde se cultiva el cereal puede tener un efecto mayor (**Revy et al., 2003**). La concentración de **Zn** en los cereales es de 30 a 40 mg Kg⁻¹ de **MS**, pero varía según la fracción del mismo, ya que la distribución de **Zn** no es homogénea. La parte externa del cereal suele ser más rica que la interna (60-90 mg Kg⁻¹ de **MS**) (**Mateos et al., 2005**).

Las fuentes de proteína de origen animal (harina de carne, harina de carne y hueso, harina de pescado) son fuente importante de **Zn** (80-120 mg Kg⁻¹ de **MS**) pero también de otros minerales como el **Ca** el cual, compite con el **Zn**, reduciendo la absorción de este último (**Underwood y Suttle, 1999**).

En piensos que utilizan ingredientes de origen animal se observa un aumento de **Zn** biodisponible (100%) para el animal (**Hortin et al., 1993**), sin embargo, el **Zn** puede ser limitado por el contenido de fitatos, **Ca** y/o **P**. Por ello se recomienda utilizar una fuente externa de **Zn** en el pienso, dependiendo de la edad y estado fisiológico del animal (**Spears, 1996**). Las fuentes de proteína como la harina de soja, sésamo, algodón y cacahuete, son siempre más pobres en **Zn** (50 a 70 mg Kg⁻¹ de **MS**) que las harinas de origen animal, y la **BD** del mineral depende del contenido de fitatos. El hexafosfato inositol y pentafosfato (ácido fítico) se unen al **Zn** y forman un compuesto poco soluble que reduce la absorción de este mineral. Los fitatos están presentes en plantas como granos y legumbres en concentraciones variadas pero elevadas (**Hortin et al., 1993; Mateos et al., 1998**). El trabajo de **Spears (1996)** en novillas que consumían un **PB** con 24 ppm **Zn**, sin aporte externo de **Zn**, demostró que la ganancia de peso y eficiencia alimenticia disminuían en un 7.3 y 8.1% respectivamente, en comparación con las novillas que fueron alimentadas con 25 ppm más de **Zn** a

base de Zn-Met ó ZnO, y mejoraron su vida reproductiva, mientras que las novillas con el **PB**, nunca mostraron buenos resultados.

El agua consumida por los animales suele ser un vehículo de minerales, incluido el **Zn**, el cual llega por lixiviación del suelo, y por el tubo galvanizado utilizado en las instalaciones de las granjas porcinas (**Mateos et al., 2005**).

2.11.2. Fuentes alimenticias de Zn

Las premezclas minerales que incluyen al **Zn**, no consideran el contenido de los ingredientes utilizados para formular el pienso, y sólo se asume el aporte de la premezcla (**Hernández, 2006; García, 2007**). Para formular las premezclas de minerales es importante conocer las necesidades por etapa fisiológica, peso del animal y la disponibilidad de los micronutrientes de las fuentes minerales a utilizar (**Mateos et al., 1998**).

Para la elección de la fuente, la industria alimentaria debe considerar no sólo la forma, propiedades físicas (fluidez y almacenamiento) y químicas (contenido de **Zn**), sino el coste de la unidad de **Zn** biodisponible (**Edwards y Baker, 1999; García et al., 2007**). La **BD** de un micromineral se define como el porcentaje del mismo que es utilizado por el animal. Sin embargo, para determinar este valor es necesario tener en cuenta la raza, las características del pienso e interacciones entre minerales, así como la calidad de las fuentes y metodologías de valoración que se utilizan, ya que pueden modificar los resultados obtenidos. Debido a ello, existe una creciente investigación en este sentido, haciendo énfasis en la comparación de las fuentes con patrones que reflejen con mayor certeza la **BD**, absorción, metabolismo y almacenamiento del mineral, incorporando el control de calidad de las fuentes y la trazabilidad de estas (**Mateos et al., 1998; 2005**).

Las fuentes de **Zn** que hoy día se utilizan en la industria alimentaria animal se pueden dividir en dos grandes grupos, las fuentes orgánicas (**FO**) y las fuentes inorgánicas (**FI**).

2.11.2.1. Fuentes orgánicas

Dentro de las **FO** se encuentran los minerales químicamente unidos a un agente quelante o ligando (**O₂**, nitrógeno, amino, hidroxilo) el cual es capaz de donar un par de electrones para combinar a través de enlaces covalentes un metal, formando con ello una estructura de anillo heterocíclico con el metal (**Spears, 1996**). Cuando los ligandos se unen a un ión metálico a través de dos o más átomos de donantes, el complejo formado contiene uno o más anillos heterocíclicos y es llamado “quelato”. A medida que aumentan los anillos la molécula se estabiliza (**Acda y Chae, 2002**).

La clasificación de las **FO** mineralizadas utilizada por la **AAFCO (2002)**, define:

- a. Quelatos de aminoácidos con mineral. Es el producto resultante de la unión de un ión metálico con uno o máximo tres moléculas de aminoácido, unidos a través de enlaces covalentes. El peso molecular del quelato no debe exceder de 800 unidades. Un ejemplo de estos quelatos es: Metionato de **Zn** (Zn-Met), Lisinato de **Zn** (Zn-Lis).
- b. Proteinato metálico. Quelatos de una sal soluble, con proteínas parcialmente hidrolizadas (Ejemplo: Bioplex **Zn**®).
- c. Complejos polisacáridos. Es el producto de la unión de una sal metálica soluble, con una solución de polisacáridos (**Spears, 1996; Mateos et al., 1998; Mateos et al., 2005; Hernández, 2006**). La levadura enriquecida con **Zn**, está incluida en este grupo, y están generando interés por su **BD** y actividad potenciadora del sistema inmunológico.

La forma de acción propuesta de estas fuentes puede ser una ventaja que sustenta el uso de ellas, ya que si el quelato tiene una adecuada estabilidad y su peso molecular es bajo, el aminoácido utilizado para quelatarlo será resistente a la acción de las peptidasas que rompen el enlace peptídico interno, entre los aminoácidos o el péptido. Con ello, se favorece la absorción directa del quelato en el intestino delgado sin necesidad de un transportador (**Cousins, 1996; Hernández, 2006**). Por otra parte, el contenido de fitatos existente en el tracto

digestivo no entra en contacto fácilmente con el **Zn** ya que este se encuentra contenido en el quelato orgánico debido a la protección que le confiere la molécula biológica. Cuando el quelato llega al intestino y el **pH** aumenta, no afecta su absorción, ya que suele ser más rápida y los aminoácidos o prótidos protegen al ión para que no se una a otros minerales, aumentando así su peso molecular y haciéndolo no disponible. Otra vía propuesta es la donación por ionización de la mucina, que protege al **Zn** haciéndolo disponible para ser absorbido. Las **FO** son fácilmente canalizadas hacia los órganos y tejidos que los requieren (**Spears, 1996; Mateos et al., 2005**), se cree que tras la absorción del quelato intacto, la disociación de este se realiza directamente en el sitio de acción.

Las **FO** están asociadas a aminoácidos o pequeñas fracciones peptídicas, lo cual explica que tengan mayor **BD**, y que se encuentren mayores cantidades de **Zn** en la célula con mayor rapidez. Lo anterior puede deberse al hecho de encontrar en los aminoácidos **S**, el cual tiene alta afinidad con el **Zn** formando un complejo de bajo peso molecular, capaz de traspasar la membrana celular, aumentando así los índices de aparición en plasma sanguíneo con mayor rapidez, que las **FI** (**Krebs, 2000**). Se ha observado que el **S** de aminoácidos como cisteína y ácido glutámico favorece la absorción de **Zn** (**Hortin et al., 1993**). Además, el uso de **FO** ha mostrado una disminución en el nivel de inclusión en el momento de la formulación, sin afectar la eficiencia productiva de los animales, y disminuyendo la excreción de **Zn** a través de las heces y orina (**Spears, 1996; Mullan et al., 2002**).

Desde la perspectiva del impacto ambiental, la reducción en un 50% de las **FI** incorporadas al pienso, sustituyéndolas por proteínatos de **Zn**, reduce significativamente la excreción del mineral en las heces (506 y 1267 mg Kg⁻¹ de **MS**, en la **FO** e inorgánica respectivamente), además de obtenerse mayor eficiencia en el crecimiento. **Hernández (2006)** publicó una disminución de **Zn** del 41% excretado al sustituir el ZnSO₄ por un proteinato (Bioplex **Zn**®). Hay evidencias que señalan que cerdos en crecimiento alimentados con un pienso que contenía 100 mg Kg⁻¹ de Zn-Lis o ZnSO₄, tienen la misma tasa de absorción a nivel de intestino delgado (29.9 y 27.4% respectivamente) y a nivel de colon muestran la misma tendencia (28.1 y 24.7% respectivamente) (**Cheng et al., 1998**). Los trabajos que han realizado **Mavromichalis et al. (2000)** y **Case y**

Carlson (2002), señalan que no hay diferencias entre estas fuentes en la tasa de retención, por lo que proponen definir el valor de las fuentes en función de su efecto productivo. **Carlson et al. (2004)**, utilizaron niveles de 200 y 400 ppm de Bioplex Zn® observando que la tasa de retención de Zn era lineal con respecto al nivel utilizado. Sin embargo, estas diferencias no fueron registradas entre Bioplex Zn® y ZnO, a pesar de que este último fue incorporado a razón de 2000 ppm en lechones.

2.11.2.2. Fuentes inorgánicas

Las FI que se utilizan en la alimentación animal son en forma de sulfatos, carbonatos, cloruros y óxidos. Sin embargo, los iones libres son muy reactivos y pueden formar complejos con otras moléculas de la ración, dificultando así su absorción. Dentro de las fuentes comerciales más utilizadas en la industria animal, están el ZnSO₄, ZnO y ZnCl (**García et al., 2007**). El tipo de fuente puede ser distinto, así como su origen. Las hay grado alimentario, reactivo y analítico, que a pesar de ser similares, un amplio número de muestras presentan valores de concentración distintos que generan diferencias de BD del mineral (**NRC, 1998; Edwards y Baker, 1999; García et al., 2007**). Una calificación que se realiza en estas fuentes es el grado de BD, la permanencia en el organismo y la tasa de excreción. Esta última, es importante para los nuevos y necesarios controles de impacto ambiental que se realizan en los piensos, ya que el **NRC (1998)** indica que prácticamente el 50% de Zn consumido en el pienso, es excretado (**Edwards y Baker, 1999; Close, 2000; Krebs, 2000**).

Es frecuente que las fábricas de pienso prefieran utilizar las sales de óxido, ya que son menos reactivas y contienen el doble de concentración mineral, comparadas con los sulfatos, los cuales ocupan mayor espacio en la premezcla mineral, adicionada al pienso (**Mateos et al., 2005**). En el caso de la fuente carbonatada y oxidada de Zn son relativamente insolubles en soluciones acuosas y por tanto se absorben menos. Las fuentes de Zn contenidas en sulfatos y acetatos suelen ser mejor valoradas por su mayor BD y absorción (**Mateos et al., 1998; Edwards y Baker, 1999**), de acuerdo a los niveles encontrados en plasma sanguíneo y la concentración de Zn en los tejidos.

Las **FI** suelen estar contaminadas con metales pesados. Un estudio realizado por **Edwards y Baker (1999)**, observaron que las fuentes de **Zn** inorgánico contenían en el 68% de las muestras metales pesados, tan tóxicos como el **Pb**, arsénico (**As**) y **Cd**. Lo que genera una disminución de la calidad de la fuente, un bajo rendimiento en los animales, así como un aumento en su potencial tóxico. **Edwards y Baker (1999)** encontraron que el ZnO puede contener **Pb** (0,05%), **Fe** en forma de óxido (2.5 a 3.3%) o **Ca** oxidado (1.3 a 4%). El ZnO químicamente puro contiene 80.3% de **Zn**, por lo que estos minerales contenidos en un producto grado alimentario podrían ser un factor de disminución en la **BD**. Existen estudios donde el ZnO grado analítico resulta ser más eficiente que el ZnO grado alimentario, por lo que el primero se puede comparar al ZnSO₄ grado analítico, pero su coste es mayor (**Ammerman et al., 1998a; Edwards y Baker 1999**). En **1999, Edwards y Baker** describieron que las diferencias en la **BD** de las fuentes se debían a su composición química molecular, y al procesamiento de la fuente (**Krebs, 2000**). El ZnO mostró un 34% de **BD** al compararse con ZnSO₄·H₂O fabricado con una metodología Waelz, mientras que al compararlo con la misma fuente pero con grado alimentario tuvo una **BD** del 40% (**Edwards y Baker, 1999**).

En la **Tabla 2**, se observan algunas **FI** y **FO** frecuentemente utilizadas en la alimentación animal, donde su **BD** está proporcionada en función del mineral patrón (100% de **BD**) utilizado, que en este caso es el ZnSO₄·H₂O.

Las fuentes de **Zn** normalmente son estudiadas en función de la respuesta que se obtiene ante su inclusión, en ganancia de peso (Kg), conversión alimenticia, producción enzimática, concentración en diversos tejidos y plasma sanguíneo. Pero la respuesta según **Edwards y Baker (1999)** y **Wedekind et al. (1994)**, puede variar según la **BD** de las fuentes, especie y la edad a la que es suministrada, así como la metodología con la que se realizan las valoraciones.

Tabla 2. Biodisponibilidad (**BD**) relativa de distintas fuentes de Zn en porcino.

Fuente	Compuesto	Concentración de Zn (%)	% ¹
Sulfato de Zn	ZnSO ₄ ·H ₂ O	35.5	100
Sulfato de Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.3	100
Carbonato de Zn	ZnCO ₃	56.0	100
Cloruro de Zn	ZnCl ₂	48.0	100
Zn elemental	Zn	100.0	130
Óxido de zinc	ZnO	72.0	50-80
Lisinato de Zn (Zn-Lis)	Zn, aminoácido	Variable	95-100
Metionato de Zn (Zn-Met)	Zn, aminoácido	Variable	95-100
Complejo Polisacárido-Zn	Zn, Polisacárido	Variable	-----
Proteinato de Zn	Zn, Proteína hidrolizada	Variable	100

¹Valor relativo a la fuente patrón a la que se le da el 100 %.

Fuente: Ammerman *et al.* (1998b); Mateos *et al.* (2005); NSNG (2010).

La diferencia en **BD**, que muestran las fuentes, suele estar acompañada de un comportamiento metabólico distinto (Rojas *et al.*, 1995), lo cual queda demostrado con el estudio de Ward *et al.* (1996), quienes agregaron 250 mg de Zn Kg⁻¹ de pienso como Zn-Met, 300 mg de Zn Kg⁻¹ como polisacáridos de Zn y observaron que este nivel equivalía a 2000 mg de Zn Kg⁻¹ de pienso utilizando como ZnO en cerdos destetados.

Rojas *et al.* (1995), estudiaron el efecto de Zn-Met y ZnO en ovinos, observando que se comportaban de forma similar en el intestino, pero una vez que se absorbía el Zn, este ión mostró diferencias en el comportamiento metabólico, así mismo encontraron que Zn-Lis y ZnSO₄ tenían mayor **BD**, ya que la concentración de Zn en el suero sanguíneo se presentaba más rápidamente y en mayor concentración que utilizando Zn-Met y ZnO. Edwards y Baker (1999), encontraron que la ganancia de peso de cerdos y pollos, utilizando piensos a los que se les incluyeron diferentes **FI** de Zn (ZnO, ZnSO₄·7H₂O), fue menor al utilizar ZnO, señalando que la **BD** era por tanto distinta. De la misma manera Sandoval *et al.* (1997) mostraron que la **BD** del ZnO en pollos era de tan solo 54 a 78 % con respecto a los valores encontrados para ZnSO₄·H₂O (81 a 99%). Wedekind y

Baker (1990) describieron el efecto del ZnO en pollos, obteniendo 39% menos en la ganancia de peso y una reducción del 44% en la concentración del mineral en hueso (tibia), con respecto al ZnSO₄·H₂O. La comparación en cerdos, mostró que ZnO tenía solo 68% de **BD**, con respecto a los valores encontrados con ZnSO₄·H₂O (**Wedekind et al., 1994; Edwards y Baker, 1999**).

De forma general se puede señalar que si bien la **BD** de las **FI** es diferente, también lo son las **FO**, y cuando los resultados han sido comparados indican que hay diferencias en el valor de cada una de las fuentes. Pero considerando la necesidad de unificar un criterio se sugirió una clasificación de las fuentes con base a su **BD**, con lo cual al ZnSO₄ se le dio un valor de 100%, al Zn-Met de 80%, ZnO de 74.4%, y al Zn-Lis 46.8%. Estos valores fueron otorgados según el contenido de **Zn** en hueso y plasma sanguíneo (**Schell y Kornegay, 1996**). Con estos resultados se observa que ninguna fuente superó la **BD** de ZnSO₄. Sin embargo, **Hahn y Baker (1993)**, ya habían demostrado que Zn-Met mostraba una concentración mayor de **Zn** en plasma, 1.2 veces más que ZnSO₄ y 2.2 veces con respecto a ZnO, en lechones de menos de 20 Kg de peso vivo (**PV**).

Trabajos en los que se incluyeron piensos sin la adición de alguna fuente de **Zn** (20 ppm) se encontró que los niveles de **Zn** en los tejidos y plasma sanguíneo, son menores a los obtenidos por cualquier fuente incluida en el pienso purificado. **Rojas et al. (1995)**, relacionan esto al contenido de fitatos y a la cantidad de fibra en el pienso. Por lo tanto, la recomendación es la adición de una fuente de **Zn** en el pienso durante las diferentes etapas de producción (**Rojas et al., 1995; Krebs, 2000**).

Antes de la década de los 80, dosis mayores a 200 ppm de **Zn** eran consideradas tóxicas en cerdos, debido a un efecto farmacológico del ZnO en lechones destetados (**Smith et al., 1997; Mateos et al., 1998; Edwards y Baker, 1999; Hollis et al., 2005**), generalizando el uso de esa fuente, en niveles tan altos como 3000 ppm. **Edwards y Baker (1999)**, identificaron que niveles de 1000 ppm de **Zn**, incrementan linealmente la concentración del mineral en plasma sanguíneo, pero excretan 16 veces más **Zn** que los cerdos que consumen 150 ppm (**NRC, 1998**) y cuando los niveles de 1000 ppm bajan a 100 ppm, la excreción disminuye a tan solo 4 veces. Por ello, se afirma que solamente es absorbido un 30% de **Zn** suministrado en piensos con altas concentraciones de ZnO. En otro trabajo donde se utilizó el mismo nivel de **Zn** pero a través de

ZnSO₄·H₂O, la concentración de **Zn** correspondió al 56% de la mostrada por el ZnO. Con lo anterior se concluye que las fuentes no sólo tienen diferente **BD**, sino que son absorbidas y utilizadas de forma distinta.

En los últimos años se han iniciado estudios a nivel molecular donde se identifica al **Zn** como una estructura epigenética, ya que ha mostrado una función activadora y/o reguladora de genes transportadores de este mineral en células de prácticamente todo el organismo (hígado, intestino, páncreas, testículos) (**McMahon y Cousins, 1998**). Estudios sobre los mecanismos del control ingreso-salida del mineral a nivel celular, han demostrado que las fuentes de **Zn** se comportan de forma distinta. Zn-Lisina produce mayor concentración de **MT** en tejidos como hígado, riñón y páncreas, seguidos de ZnSO₄ y Zn-Met (**Rojas et al., 1995**). Estos mismos autores señalan que a pesar de que Zn-Lis y Zn-Met son fuentes orgánicas, estas estimulan de forma diferente a la célula para que produzca **MT** (**Krebs, 2000**). Se observa que la concentración de **MT** en células de tejido hepático, intestinal y pancreático de animales que consumieron en el pienso ZnO es baja. Lo anterior demuestra que ZnO no sólo tiene una menor **BD**, sino que tiene un valor biológico pobre. Los valores de **MT** en esta fuente, fueron similares a los que se presentan en animales alimentados con piensos libres de fuentes de **Zn** (**Rojas et al., 1995; Krebs, 2000**).

2.12. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se generan las células sexuales o espermatozoides. En los mamíferos este proceso genera las únicas células que pueden ser expulsadas del organismo para realizar su función biológica de unión al ovocito maduro. Se inicia a partir de células germinales primordiales. En el caso del verraco el proceso de espermatogénesis inicia durante la pubertad, la cual ocurre alrededor de las 12 semanas de edad. A partir del inicio de la pubertad, la espermatogénesis se realiza ininterrumpidamente (**Rodríguez, 2008**) en los túbulos seminíferos de los testículos (**Figura 5**).

La espermatogénesis es un proceso compuesto de tres fases:

- Espermatogónica: Fase de proliferación ó mitótica, en la cual, se producen espermatoцитos primarios, debido a la activación de las espermatogonias que inician la meiosis.

- Espermatocitaria: Fase meiótica, que forma la espermátida con una dotación cromosómica haploide, ya que se divide dos veces sucesivas y se sintetiza el **ADN**, en esta fase se producen las espermátidas (1n, 1c), al final cada célula contará con un cromosoma homólogo recombinado. Es normal encontrar en esta etapa espermátidas con el núcleo aumentado de tamaño.
- Espermiogénica: Incluye la diferenciación de las espermátidas. Se realiza una serie de transformaciones (condensación de la cromatina nuclear, elongación del núcleo, formación de la cola o flagelo y desarrollo del capuchón acrosómico) (**França et al., 2005; Rodríguez, 2008**).

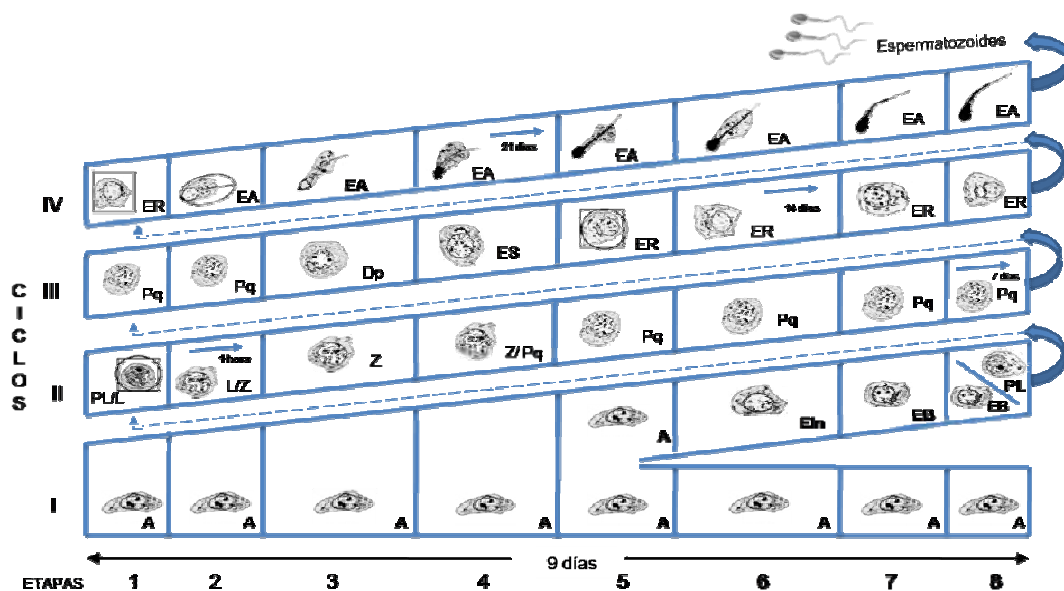


Figura. 5. Diagrama del ciclo celular espermático. Se muestra el tipo de células germinales en las ocho etapas del ciclo del epitelio de los túbulos seminíferos en testículos de cerdo. Espermatogonias tipo A (**A**), Espermatogonias intermedias (**EIn**), Espermatogonias tipo B (**EB**), Espermatocitos en preleptoteno (**PL**), Leptoteno (**L**), Zigoteno (**Z**), Paquíteno (**Pq**), Diploteno (**Dp**), Espermatocitos secundarios (**ES**), Espermátidas redondas (**ER**) y espermátidas alargadas (**EA**). Fuente: **França et al. (1998)**, **Almeida et al. (2006)** y **Zeng et al. (2006)**, modificado por **De Loera, 2010**.

Finalmente, los espermatozoides se liberan del túbulo seminífero en un proceso que se conoce como espermiación regulado por las células de Sertoli. Durante la espermiación los espermatozoides son desplazados al borde del lumen del túbulo seminífero mediante una compleja cooperación entre filamentos y túbulos citoplasmáticos de las células de Sertoli **(Rodríguez, 2008; Saavedra, 2009)**.

A partir de este proceso, y dado que la célula espermática está transcripcionalmente inactiva, requerirá realizar un cambio conformacional, el cual está relacionado con:

- I. Sustitución de las histonas por las protaminas (proteínas nucleares), para compactar el material genético y proteger al **ADN** de daño oxidativo, lo cual genera una disminución del volumen nuclear, de alrededor del 98% (una disminución de ≈ 500 a $10 \mu\text{m}^3$) por la pérdida de agua **(Fuentes-Mascorro et al., 2000a,b; França et al., 2005)**;
- II. Desarrollo del paquete enzimático hidrolítico localizado en la parte anterior de la cabeza espermática;
- III. Formación de las **ODF** del axonema, para producir **Mot (Figura 6)**;
- IV. Desarrollo de la membrana plasmática que presenta una polaridad extremadamente equilibrada debido a su bicapa lipoproteínica **(Saavedra, 2009)**.

Todas estas acciones deberán ser completadas en el epidídimo, produciéndose la maduración del espermatozoide. En el epidídimo el espermatozoide cambia las proteínas y lípidos de la membrana plasmática, gracias a las secreciones del epitelio epididimal, expulsa la gota citoplásmica **(GC)** y cambia el patrón de movimiento, el cual desde su salida del testículo es débil o nulo **(Ardón, 2005; França et al., 2005; Sansegundo, 2008)**. Estos cambios se realizan durante el tránsito por la cabeza y cuerpo del epidídimo, para posteriormente ser almacenado en la cola del epidídimo, donde se mantiene

inmóvil, pero con un movimiento potencial rectilíneo que será presentado al momento de la eyaculación.

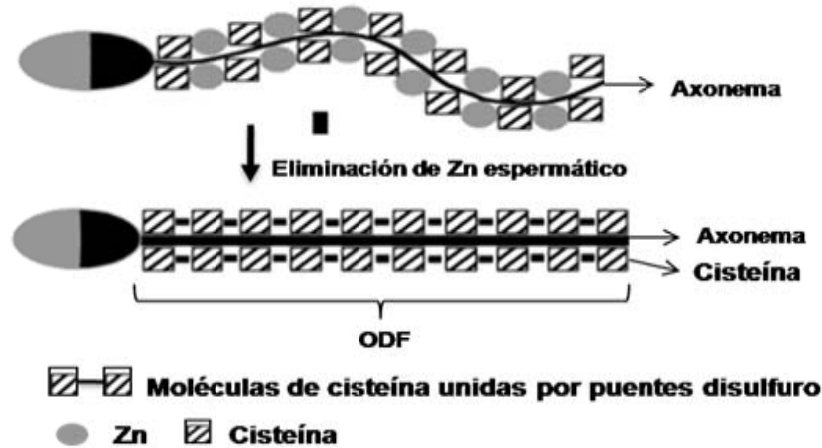


Figura 6. Eliminación del **Zn** de la cola del espermatozoide durante la maduración epididimaria, esencial para las funciones fisiológicas de las fibras densas externas (**ODF**: Outer dense fibers). La eliminación del **Zn** permite la formación de los puentes disulfuro (**S-S**) en las proteínas de las **ODF**, que endurecen esta subestructura de la cola. Fuente: **Henkel et al. (2000)**.

Los espermatozoides del cerdo miden 45 μm y morfológicamente se componen de cabeza en forma oval; cuello o pieza de conexión; y la cola o flagelo dividido en tres regiones: segmento intermedio o mitocondria, pieza principal y pieza terminal (**Figura 7**), rodeados por una membrana plasmática caracterizada por su composición de glicoproteínas y lípidos, que varía dependiendo de la región y su función (**Sansegundo, 2008**).

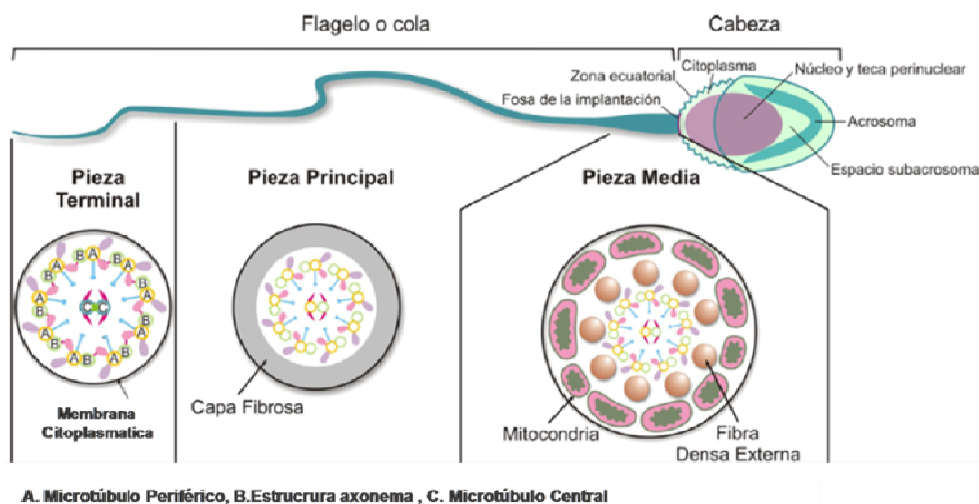


Figura 7. Morfología del espermatozoide. Fuente: **Olivera et al. (2006)**.

La cabeza del espermatozoide está formada por el acrosoma y el núcleo, ambos rodeados por la membrana plasmática. El acrosoma es una estructura con forma de capuchón que cubre los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoide y está delimitado por una membrana acrosomal interna y una externa que se divide en tres diferentes segmentos (apical, principal y ecuatorial), contiene enzimas hidrolíticas tipo acrosina, hialuronidasa, y otras hidrolasas y esterases (**Tulsiani et al., 1998**).

Fuentes-Mascorro et al. (2000b), señalan que el núcleo ocupa prácticamente todo el espacio de la cabeza y que debido a la forma y volumen del núcleo, la cromatina del espermatozoide maduro es refractario a enzimas hidrolíticas, tratamientos con tinciones, colorantes o fluorocromos. La cromatina espermática está fuertemente empaquetada en una estructura toroidal, con un diámetro externo de 900 Å, con 150 Å de diámetro interno y contiene alrededor de 60 Kb de **ADN**, unidos unos a otros por algunos tramos de **ADN** desenrollados. Existe evidencia que cuando se presenta una interacción excesiva entre protaminas, provocada por la cantidad de puentes o uniones, esto puede generar una cromatina altamente estable, difícil de descondensar, y por tanto con los consecuentes problemas de retraso o falta de desarrollo del embrión e inducción a una muerte temprana del mismo (**Fuentes-Mascorro et al., 2000a; Madrid-Bury et al., 2005 Fraser y Strzezek, 2007**).

En los verracos, cada ciclo de espermatogénesis dura 8.6 a 9.0 días, el transcurso que cubren dentro de epidídimo es de unos 9 a 12 días (3 a 5 días en cabeza y 2 días en el cuerpo), pudiendo quedar almacenado de 4 a 7 días en la cola, dependiendo de la actividad sexual en el macho (**França et al., 2005; Sansegundo, 2008**). La duración total de la espermatogénesis es de alrededor de 40 días, como resultado de dos semanas aproximadamente que dura cada una de las fases del proceso (**França et al., 2005; Rodríguez, 2008**).

La pérdida de células germinales (apoptosis) se produce normalmente durante la espermatogénesis, teniendo un papel crítico en la concentración de espermatozoides, ya que de cada espermátida que potencialmente puede producir 10 células, sólo se generarán 2 o 3. La apoptosis es también frecuente durante la meiosis y está probablemente relacionada con daño cromosómico. Mientras, el 15% de las células se pierden durante la espermiogénesis, debido

probablemente a la capacidad de las células de Sertoli para apoyar la maduración celular (**França et al., 2005**).

La capacidad que tienen las células de Sertoli para funcionar eficazmente está relacionada con la concentración de hormonas con las que se retroalimenta. Por ello, cuando existe una deficiencia de **Zn** y se reduce la actividad de la 5 α -reductasa, se observa que la dihidrotestosterona disminuye la producción de testosterona y por tanto, la espermatogénesis también se muestra reducida. (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Leake et al., 1984, citado por Henkel et al., 2003**).

2.12.1. Plasma seminal

El plasma seminal (**PS**) es definido como el medio líquido en el cual los espermatozoides se encuentran inmersos tras la eyaculación. En esencia se trata de una mezcla de las secreciones procedentes de los túbulos seminíferos, el epidídimo, y las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbo-uretrales o de Cowper). Este líquido está caracterizado por ser específico de especie y altamente variable entre individuos de la misma especie, así como entre eyaculados de un mismo individuo, pudiendo variar por diferentes procesos patológicos, época del año, nutrición y estado fisiológico del animal (**Caballero, 2007**). Con base al conocimiento relacionado de los espermatozoides que se han extraído del epidídimo, se puede señalar que el **PS** no resulta de vital importancia para la capacidad fecundante de los espermatozoides epididimarios *in vitro*. Sin embargo, el **PS** tiene funciones de regulación de procesos a nivel espermático, del tracto genital femenino y en la fecundación. Esta función se refiere principalmente a la nutrición, protección, regulación de la **Mot** y capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos.

Para que el **PS** realice su actividad debe permanecer lo más constante posible. Para ello, cada estructura anatómica que participa en la generación de este líquido deberá aportar en tiempo y forma su producto. Por ejemplo, las vesículas seminales aportan entre el 15 al 25% del volumen del **PS**, a través de la mezcla de fructosa, inositol, ácido cítrico, ergotionina, glicerifosforilcolina y varios aminoácidos (taurina, hipotaurina, ácido glutámico, carnitina).

La próstata por su parte produce alrededor del 55 al 70% del volumen plasmático y sus secreciones son alcalinas en donde están inmersos los

prostosomas (**Piehl et al., 2006**), gránulos que tienen como principal característica el almacenamiento de **Ca**, lípidos (colesterol, esfingomielina y fosfatidilcolina), pequeñas moléculas de guanidín difosfato (**GDP**), adenosín difosfato (**ADP**) y adenosín trifosfato (**ATP**), y una gran cantidad de iones de **Ca** y **Zn**, enzimas como fosfolipasa A, ATPasa, y peptidasa, de un tamaño entre 21 y 100 nm. Durante la eyaculación los prostosomas se mezclan con los espermatozoides y liberan el **Ca** al citosol del espermatozoide (**Saavedra, 2009**).

Se ha encontrado una relación entre los prostosomas con procesos de estabilización de membranas, previniendo la capacitación y reacción acrosómica espontánea (**Caballero, 2007**). Por su parte, el **Zn** muestra sus propiedades estabilizadoras de macromoléculas y su actividad antibacteriana (**Strzezek et al., 1987**). Sin embargo, cuando los verracos son sobreutilizados, y la temperatura ambiental aumenta como es el caso del verano, el contenido de **Zn** varía. Los verracos sobreutilizados (3 a 4 montas por semana) muestran niveles variables de **Zn** en el **PS**, dependiendo de la época: Verano, 1.72 mg 100 mL⁻¹ y en invierno 2.59 mg 100 mL⁻¹ (**Strzezek et al., 2000**). En el caso de las glándulas bulbo-uretrales, producen la fracción gelatinosa característica de los verracos y participa en el volumen del **PS** con el 2 al 5%. Por su parte el epidídimo aporta prostaglandinas, factores descapacitantes como el colesterol (**Cross, 1996a, b; Bernal, 2006**), proteínas de la familia de las espermadhesinas como **AQN1** (Alanina-glutamina-asparagina), **AWN1** (alanina-triptófano-asparagina) y **PSP** (proteína del **PS** porcino). Todo ello permite encontrar un **PS** con un **pH** cercano a 7 (**Caballero, 2007; Sansegundo, 2008**). Otras sustancias del **PS** son las enzimas (proteasas, acrosina, nucleasas, fosfatasa ácida y alcalina, **SOD**), las cuales actúan en la licuefacción del semen, la digestión de células espermáticas muertas y dañadas, así como en dar protección contra los **ROS** (**Strzezek, 2002; Bernal, 2006**).

Entre otros aspectos relacionados con la composición del **PS** esta su efecto en la **Mot**, observándose que la adición de **PS** heterólogo puede afectar positiva o negativamente la **Mot**, dependiendo de cuál sea la fuente de **PS** (**Kneuppel et al., 2000; citado por Caballero, 2007**). También suele existir una variación entre las diferentes fracciones del **PS**, ya que se ha observado que la correspondiente a la fracción rica (**FR**) del eyaculado, muestra un apoyo mayor para la obtención de mejores tasas de penetración al realizar **FIV**. Todas estas variaciones pueden ser

aumentadas si la actividad de extracción seminal se aplica continuamente, provocando disfunciones epididimarias y desequilibrios en la secreción de las glándulas sexuales accesorias, afectando la composición de sus fluidos, y el desarrollo normal de la célula espermática (**Strzezek et al., 1995**).

2.13. Calidad seminal y pruebas de valoración

La evaluación del eyaculado se realiza con el objetivo de disminuir el efecto de la calidad seminal sobre los resultados de fertilidad y prolificidad. La calidad está relacionada con factores inherentes al macho (raza, edad, genética, salud), sistema de obtención y almacenaje del eyaculado (**Ardón, 2005; Pérez-Llano et al., 2006**). Asimismo, las características seminales suelen estar relacionadas entre ellas, y pueden cambiar según las condiciones del eyaculado, el tiempo que ha transcurrido desde su obtención, evaluación y utilización. El almacenamiento del eyaculado es el inicio del cambio de calidad, en indicadores como el **pH**, **Mot**, grado de contaminación, aglutinación, viabilidad. También suceden cambios en el metabolismo energético e **IAC** y de **ADN** espermático. Estos cambios se agudizan cuando el estado biogenético está alterado, debido a que la calidad inicial es fundamental para la conservación de las células, así como por el tipo de conservación del eyaculado (refrigerado o congelado). La calidad inicial tiene que ver con características genéticas (mutaciones de genes) y con características congénitas (**ADN** roto, fragmentado, descondensado, alteraciones en acrosoma y cola) (**Liu y Baker, 1992; Ardón, 2005; Rodríguez, 2008; Boe-Hansen et al., 2008; López-Fernandez et al., 2008**).

De manera general y de forma comercial las pruebas que son utilizadas para valorar la producción y calidad seminal son las que a continuación se describen:

2.13.1. Volumen de eyaculado

Durante la eyaculación el **PS** y el contenido del epidídimo pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan. La recogida del eyaculado según la técnica de **Martín-Rillo (1986)** debe realizarse de forma fraccionada, para evitar el efecto del **PS** en la actividad metabólica de los espermatozoides. De esta manera se obtiene el volumen del eyaculado (**Vol**), el

cual está formado por tres fracciones: preespermática, Fracción Rica (**FR**) o espermática y Fracción Pobre (**FP**), o postespermática.

2.13.2. Motilidad

Esta característica se relaciona con la capacidad de los espermatozoides de llegar al lugar de la fecundación, atravesando el tracto reproductivo femenino. Pero también es fundamental en los procesos de **FIV (Ardón, 2005)**. La valoración de la **Mot** es la primera característica que se observa al microscopio, presentando limitaciones en función del método utilizado. En la mayoría de los casos la valoración es subjetiva y variable. Aunque en los últimos años se han mejorado los protocolos utilizando sistemas automatizados de análisis espermático (CASA), arrojando información tan precisa como la velocidad individual, morfología de los espermatozoides, amplitud del movimiento, tipo de movimiento. Sin embargo, este sistema tiene un elevado coste y requiere de estandarización debido a los diferentes sistemas ópticos y software, limitando la extrapolación de los resultados de un laboratorio a otro (**Malo, 2009**). La **Mot** es un indicador de calidad seminal, que se desarrolla durante la estancia de los espermatozoides en el epidídimo, en donde los cambios conformacionales de las células permiten adquirir al principio, un movimiento débil, circular no progresivo, apoyado por el aporte de excreciones epididimarias y cantidades de andrógenos que ayudan a este proceso. Al llegar a la cola del mismo, el espermatozoide muestra una cola rígida y recta con la que pueda moverse rápidamente y dirige linealmente el movimiento. Este movimiento se le denomina “motilidad progresiva”. Por ello, es necesario que las propiedades mecánicas de las **ODF** se desarrollen a través de la incorporación de gran cantidad de **Zn (Hidiroglou y Knipfel, 1984; Henkel et al., 2003)**.

La característica de **Mot**, está relacionada con otros indicadores de calidad, capacidad fecundante y de desarrollo embrionario (**Sansegundo, 2008**). **Ardón (2005)** analizó la relación de la **Mot** y la cromatina inestable, pero no encontró ninguna. Mientras que la integridad de las membranas parece estar estrechamente relacionada con una disminución de la **Mot**, debido al incremento de los **ROS** durante el movimiento, los cuales lipoperoxidan dichas membranas incluidas las mitocondriales, produciendo un agotamiento del **ATP**, que conduce a

una fosforilación insuficiente del axonema, provocando además que el **ADN** también se dañe (**Sansegundo, 2008; López-Fernández et al., 2008**).

2.13.3. Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática es parte del análisis básico necesario para la valoración de un eyaculado. La **OMS (1999)** determinó que esta característica era necesaria y que la mejor metodología era la que se realizaba con la cámara de Neubauer. Sin embargo, existen otras metodologías entre las que se encuentran las que utilizan la cámara de Makler, o Bürker. Otros métodos son los que utilizan el NucleoCounter SP-100 y el Spermax, los cuales no requieren la observación directa en el microscopio, ni el conteo de las células, pero sí una mayor inversión en equipo (**Hansen et al., 2006**). Aunque los resultados de conteo directo con cámara suelen ser precisos, requieren mayor tiempo, siendo además necesarios en la mayoría de los casos para estandarizar las técnicas implementadas en los laboratorios de inseminación artificial, en donde se emplean fotocolorímetros, o sistemas de conteo automatizados (**Malo, 2009**).

2.13.4. Morfoanomalías

Un eyaculado con un aumento de las morfoanomalías (**MA**) espermáticas es indicativo de una fertilidad disminuida. Por ello, la necesidad de incrementar el nivel tecnológico para obtener espermigramas objetivos de excelente calidad, ha derivado en la creación de sofisticados programas computarizados. El análisis automatizado de la morfología espermática (Automated Sperm Morphology Analysis -ASMA-) determina el tamaño y la forma del espermatozoide de una manera objetiva y reproducible, siendo utilizada desde hace algún tiempo de manera experimental para determinar las dimensiones individuales de los espermatozoides de cerdos, además de hacer posible la separación de los espermatozoides de una muestra seminal en subpoblaciones (**Quintero-Moreno et al., 2009**). Sin embargo, la técnica de evaluación más utilizada es la extensión de semen teñido sobre portaobjetos y examinándolas por microscopía de campo claro.

Existe una variedad importante de **MA** relacionadas con daño en cabeza (microcabezas, cabezas en forma irregular, cabezas gigantes), y con la cola, en donde las gotas citoplásmicas distales (**GD**) y proximales (**GP**) son las más estudiadas, junto con las colas enrolladas o también llamadas colas en látigo (**CL**).

La evaluación de las **MA** indican valores normales que van de 7.3 a 8.8%. Sin embargo, estas anormalidades pueden variar, y estar relacionadas a otros daños celulares como cromatina inestable. **Ardón (2005)** en su estudio encontró una relación estrecha ($r = 0.85$) entre las **MA** y la fragmentación del **ADN**.

2.13.4.1. Gotas citoplásmicas

La **GC** es un indicador de la madurez espermática. Por lo tanto, su presencia indica que la capacidad fecundante de los espermatozoides puede estar disminuida. Las **GC** deben ser diferenciadas, y de manera práctica se clasifican en **GP** y **GD**. Esta clasificación identifica a las células en las que el citoplasma residual almacenado en la gota se encuentra más próximo a la pieza de conexión y anillo de Jensen (**Bedford, 1975, citado por Sansegundo, 2008**).

En particular, las **GP** son consideradas como las de mayor importancia para los resultados de fertilidad y prolificidad. **Mozo (2006)** recomienda que no exceda del 10%.

López-Fernández et al. (2008) identificaron que la morfoanomalía **GP** se relacionaban con el índice de fragmentación de **ADN (IF)** y con el estado de maduración de las células. También, con el daño de las membranas de los espermatozoides, por la mayor cantidad de **ROS** producidos en el epidídimo, o por el estrés oxidativo del mismo espermatozoide al tratar de moverse ya que la **GC** suele disminuir la capacidad de movimiento.

Por su parte **Ardón (2005)** evaluó espermatozoides de cerdo y observó que la relación entre **GC** y cromatina inestable estaban relacionadas ($r = 0.7$). Aunque en su trabajo no hizo diferenciación del tipo de **GC**, los resultados mostraron que las **GC** se presentaban de un 12 a un 25% de espermatozoides, y que de ellos el 2.5 al 10.2% contenían cromatina inestable. Por ello, señaló que un eyaculado con más de 15% de **GC**, reduce la fertilidad en los verracos, y

seguramente otros espermatozoides del mismo eyaculado presentaran daño en la cromatina.

2.13.4.2. Colas dañadas

La cola espermática formada durante la espermiogénesis, requiere la eliminación del **Zn** para formar las **ODF**, obteniendo la fortaleza y longitudinalidad necesaria para su movimiento. Sin embargo, problemas en la maduración epididimaria pueden ser motivo para encontrar colas con poca fortaleza en su movimiento, o colas flexionadas, por ello se clasifican como daños secundarios.

Una vez que son eyaculados, el choque térmico o soluciones hipotónicas, pueden inducir la aparición de espermatozoides con **CL** o en ovillo, falseando los resultados de una actividad de maduración inadecuada, por lo que a estas se les puede considerar como daños terciarios.

Las técnicas más utilizadas para la evaluación son la tinción de las células a través de un frotis. La ventaja es el gran número de espermatozoides que pueden verse y la facilidad con la que se realiza mediante un microscopio de campo claro. El valor máximo recomendado en un eyaculado es de 10% (**Mozo, 2006**).

2.13.4.3. Membranas espermáticas

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (**Hammerstedt et al., 1990**). Durante la maduración en el epidídimo, existen cambios en la membrana a través de la modificación del patrón constituyente de proteínas, es decir, se adicionan proteínas epididimales, se pierden o se redistribuyen las ya existentes, y se adiciona colesterol a la membrana (**Sansegundo, 2008**). Estas membranas deben ser capaces de proteger a la célula, siendo su integridad indispensable. Además, la integridad del citoplasma no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y por lo tanto, para la fertilidad del macho (**Yanagimachi, 1994**).

De forma práctica se realiza un análisis de la reacción acrosomal (**AR**), daño acrosomal (**AD**), y daño en la membrana mitocondrial (**DMM**). El daño más frecuentemente encontrado en dichas membranas es a través de los **ROS** los cuales, participan en reacciones de sustracción de **H⁺**, rotura de uniones, y adición de radicales. Los **ROS**, son capaces de oxidar lípidos de las membranas celulares, proteínas y carbohidratos, dañar el **ADN** y afectar al ácido hialurónico produciendo apoptosis celular. A pesar de la susceptibilidad que tienen los espermatozoides a los **ROS**, la actividad de la **GPx** y **SOD**, suele ser efectiva. Para ello, es necesario contar con suficiente cantidad de **Zn** (Iyer *et al.*, 1988). El daño a las membranas de los espermatozoides pueden estar relacionadas con la subfertilidad que muestran algunos machos, y se ha demostrado que contienen un **ADN** dañado, provocando infertilidad (De Ambrogi *et al.*, 2006). Además, el tiempo de conservación suele afectar la integridad de las membranas y este es común encontrarlo acompañado con un **ADN** fragmentado (Boe-Hansen *et al.*, 2005). O'Dell (2000) señala que las membranas celulares cuando tienen una disminución de **Zn**, los grupos **-SH** se oxidan y se forman grupos **S-S**, inactivando los canales de transporte no sólo de **Zn**, sino de **Ca**. Estos grupos **S-S** pueden unirse con una molécula proteínica asociativa (**GPx**), que en estado normal no lo realiza. De ahí que su función esté relacionada con procesos antioxidantes.

Ardón (2005) evaluó la inestabilidad de la cromatina y su relación con la integridad de la membrana acrosomal, encontrando que al estar dañada la membrana, suele también estarlo la cromatina. Por su parte, Evenson *et al.* (1999) analizaron semen de humano e identificaron en los espermatozoides lesiones poco perceptibles en la cabeza del espermatozoide “puntas de un iceberg”, y observaron que aún cuando un número bajo de espermatozoides presentaban estas, un porcentaje alto de células tenía alteraciones en los cromosomas, relacionados con muerte embrionaria. Por lo tanto, un eyaculado con evidencias de daño morfológico, es adecuado considerarlo como candidato a ser analizado de forma más exhaustiva (Ardón, 2005).

La evaluación de la integridad de la membrana constituye una importante información en la evaluación de la fertilidad potencial del macho. La incorporación de técnicas de valoración espermática como la prueba hiposmótica (**HOST** «hyposmotic swelling test») permitirían complementar el espermiograma

convencional. La integridad de membrana se evalúa como porcentaje de espermatozoides que responden a cambios de presión osmótica. El **HOST (Jeyendran et al., 1984)**, permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas (incremento de tamaño y flagelos curvos o en ovillo). Se ha observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extra e intracelular, situación que el espermatozoide trata de equilibrar difundiendo agua al compartimento intracelular y, como consecuencia la célula aumenta su volumen (**Bredderman y Foote, 1969**).

La morfología del acrosoma puede ser estudiada por distintas técnicas. **Pursel et al. (1972)**, determinaron una clasificación del estado del acrosoma con ayuda de un microscopio de contraste de fases observando el borde apical del acrosoma. Asimismo, el marcaje del acrosoma realizado a través del uso de lectinas unidas a fluorocromos está siendo utilizado con mayor frecuencia. Las lectinas más utilizadas son la **PSA (Pisum sativum agglutinin)** y **Con A** (Concavalina A) combinada con el fluorocromo **FITC** (isotiocinato de fluoresceína), o la lectina **SBTI** (Trypsin inhibitor from Soybean) combinada con biotina. Todas estas lectinas se unen a la enzima acrosina, siendo la intensidad de marcaje elevada en los acrosomas intactos (**Pinart et al., 2006**).

2.13.5. Fragmentación del ADN espermático

La determinación del estado en el que se encuentra el **ADN**, no es una técnica que se utilice de manera rutinaria en el control de la calidad seminal en los centros de **IA** porcina. La evaluación del estado del **ADN** puede facilitar el diagnóstico de posibles fallos reproductivos relacionados con el verraco (**Liu y Baker, 1992; Ardón, 2005; López-Fernández et al., 2008**).

Es frecuente que los verracos presenten cierto grado de fragmentación de **ADN** espermático, el cual está considerado como normal en función de la capacidad que tiene la célula de restablecer aquellos pedazos de **ADN** que se desprenden durante la síntesis del mismo. En un análisis es común encontrar eyaculados con 5% de espermatozoides que presentan **ADN** fragmentado

(López-Fernández *et al.*, 2008; Boe-Hansen *et al.*, 2008). Sin embargo, estados patológicos, o febriles, golpes de calor y el aumento en la edad, están considerados como factores de incremento de esta fragmentación (Ardón, 2005; López-Fernández *et al.*, 2008). Con base en esta información Waberski *et al.* (2002), Rybar *et al.* (2004), Enciso *et al.* (2006), De Ambrogi *et al.* (2006) López-Fernández *et al.* (2008) señalan que el eyaculado fresco de verraco muestra valores frecuentes de **IF** de 10%, normales 5%, óptimos 3.3%. Estos valores no se relacionan con algún efecto significativo de la capacidad reproductiva del verraco, pero un 15% de **IF**, no debe ser descartado para su uso en procesos de producción de dosis seminales para la **IA**. Aquellos animales que muestran **IF** entre el 15 y 20% son individuos relacionados con claros problemas de fertilidad (Boe-Hansen *et al.*, 2008).

Waberski *et al.* (2002) y López-Fernández *et al.* (2008) determinaron la frecuencia con la que los verracos presentan este **IF**, la cual es del 64 al 87.6% de lo verracos, y de estos verracos el 75% no llegan al 3% de **IF**. Sin embargo, Vorger (2004, citado por Ardón, 2005) mostró una frecuencia menor (14.5%) en la población de verracos que evaluó con daño en **ADN**, pero los valores de **IF** fueron mayores (9.2%). No obstante esto, existen individuos que pueden llegar a presentar en semen recién eyaculado valores de **IF** del 17% (Waberski *et al.*, 2002) a los cuales es conveniente analizar de forma rutinaria.

Ardón (2005) por su parte recomienda que verracos con un aumento significativo en la fragmentación de **ADN** o que el daño persista al evaluar los eyaculados, debe ser analizada la conveniencia de mantenerlos en programas de reproducción asistida, ya que suelen recaer con mayor frecuencia y con valores de **IF** más altos. La incidencia de daño en **ADN** de animales que recaen suele ser del 50% de la población y el **IF** puede estar entre el 6.8 y 22% (Volker, 2004, citado por Ardón 2005).

Para evitar una inadecuada interpretación del estado que guarda el **ADN** en los espermatozoides, se deben analizar de inmediato o en su defecto almacenarlos con algún medio de conservación. Pérez-Llano *et al.* (2006) demostraron que al mezclar con diluyente para conservar y nutrir a los espermatozoides a una temperatura de entre 15°C y 17°C, la fragmentación del **ADN** se retrasaba. Sin embargo, la dilución del eyaculado no evita la evolución de

daño en el **ADN**, si los espermatozoides ya lo tienen, como tampoco se evitará la generación en otros espermatozoides cuando el tiempo, calidad y tipo de medio de conservación no sea el adecuado, la temperatura de conservación, y/o el estado sanitario de la muestra sean inapropiados (**Boe-Hansen et al., 2008**). Asimismo, no debe ser olvidada que la raza del macho (64%) y las diferencias entre los eyaculados (26.1%) ofrecen variación en los resultados que se encuentran en el **IF**.

Al evaluar espermatozoides obtenidos de epidídimo se observó que la fragmentación del **ADN** era menor, atribuyendo esto a que la compactación del **ADN** era insuficiente, y que el daño al **ADN** ocurre probablemente en la última fase de maduración epididimal, y durante la eyaculación. **De Ambroggi et al. (2006)**, también relacionaron el **IF** con las células inmaduras encontradas en el eyaculado y observo que el **IF** producía una pérdida de la viabilidad espermática ($r = 0.85$).

2.13.6. Capacidad fecundante de los espermatozoides

La capacidad fecundante (**CF**) de los espermatozoides se ha definido como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (**Yanagimachi, 1994**). El método más preciso y que mayor información arroja para predecir la **CF** es el que utiliza la penetración de ovocitos en sistemas *in vitro* (**Yanagimachi et al., 1976; Gil et al., 2006**). Aunque esta prueba no valora fases fundamentales del proceso de penetración del ovocito como son el reconocimiento, la unión y la penetración de la zona pelúcida. La **CF** está relacionada con los parámetros de calidad espermática que incluyen la **Mot**, la integridad morfológica de cada una de las partes de la célula (acrosomas, **ADN** y cola), contaminación microbiana del eyaculado y con la cantidad de células espermáticas en el medio (**Johnson et al., 2000**). La valoración con la prueba *in vitro* de los verracos, ofrece algunas limitantes como son inconsistencia de los resultados por la evaluación de un reducido número de células, la variabilidad por la subjetividad del observador y la correspondiente a las muestras seminales, ya que la raza, edad, el nivel nutricional y el tipo de almacenamiento y transporte suelen afectar al eyaculado (**Graham et al., 1980; Saacke, 1984; Evenson y Thompson, 1994; Saacke et al., 1994**). A pesar de todo ello **Martínez et al. (1996)** señalan que existe una elevada correlación entre

las tasas de penetración *in vitro* y la **FIV** de los verracos. La **FIV** puede además inducir la producción de embriones *in vitro* aumentando la difusión genética en ganado porcino. Sin embargo, siguen existiendo problemas como la polispermia y desarrollo embrionario que requieren mayor estudio (**Gil et al., 2010**).



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño de la investigación

La presente tesis se inició en septiembre de 2007, en la granja porcina “La Jabonera”, localizada en el pueblo de Sanchonuño, provincia de Segovia, comunidad Castilla y León. Fueron planificados en esta investigación cinco experimentos, que permitieron cumplir con los objetivos planteados (**Esquema 1**).

3.1.1. Material biológico

Para el primer experimento se utilizaron 35 verracos F1 (Landrace x York), con una edad de 8.5 meses y peso inicial (**PI**) de 145.68 ± 2.99 Kg (media \pm **EEM**), **CC** grado 3.

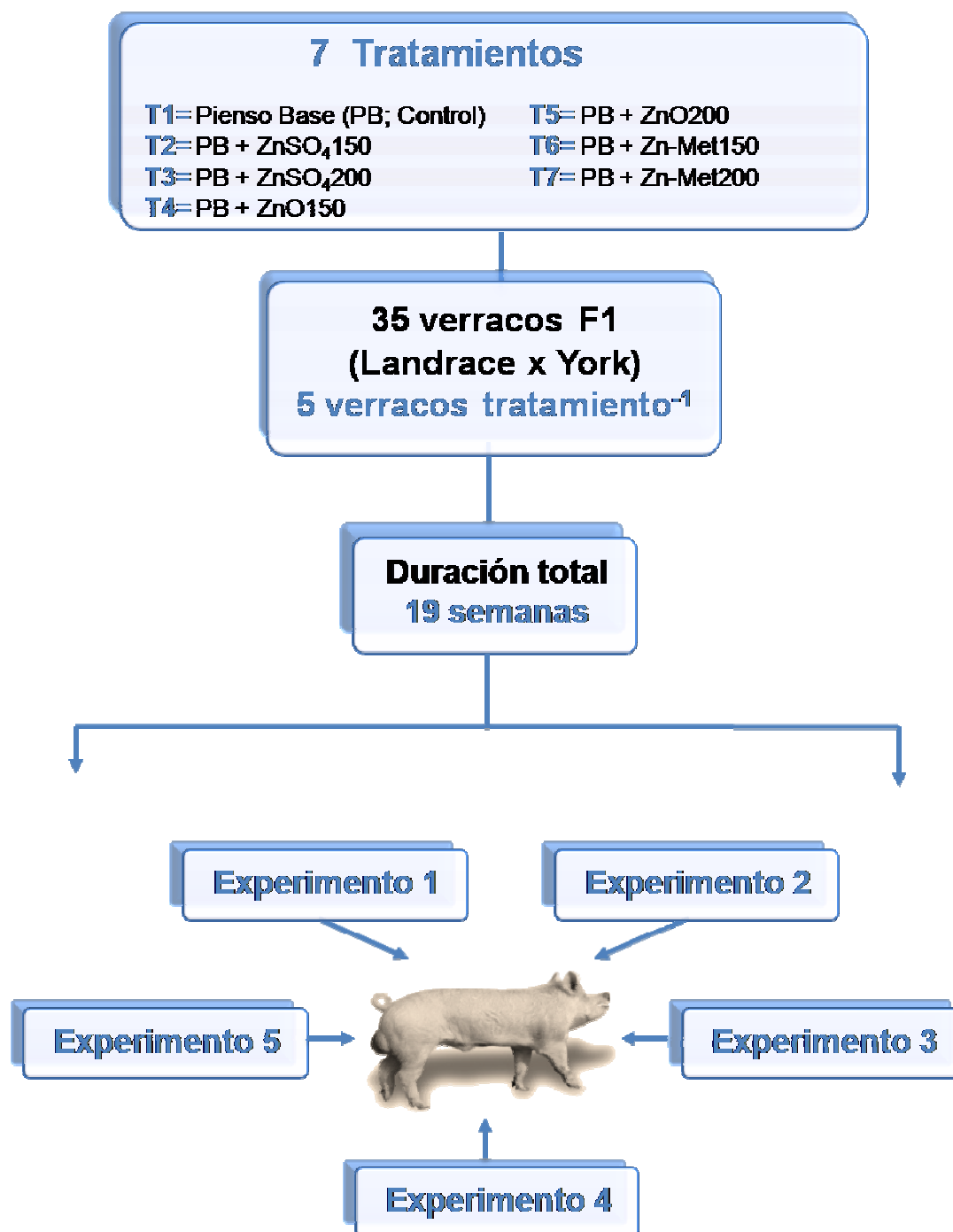
En el Experimento 2, se utilizó la **FR** del eyaculado colectada semanalmente.

Para la determinación del **IF**, Experimento 3, se utilizó una muestra de la **FR** (2 mL) obtenida de cada verraco. Inmediatamente después de la extracción fue congelada a -20°C y llevada al laboratorio para su análisis.

El Experimento 4, consistió en realizar pruebas de fecundación *in vitro* (**FIV**), utilizando ovocitos procedentes de ovarios de cerdas prepuberales F1 (Landrace x Large White), con un peso medio de 90 a 100 Kg, sacrificadas en un matadero industrial y transportados al laboratorio en un intervalo de tiempo que no superó una hora. Los ovarios fueron almacenados en un recipiente isotérmico a 38°C con solución salina, y seleccionados con base a la presencia de folículos antrales de 2 a 6 mm de diámetro. Con el fin de partir de muestras homogéneas se desecharon todos aquellos que presentaban cuerpos lúteos o algún tipo de morfoanomalía macroscópica. Las dosis seminales utilizadas para inseminar a los ovocitos correspondieron a los tres mejores verracos de cada tratamiento.

Durante el Experimento 5, se realizaron los análisis de espectrofotometría de absorción atómica (**AEAA**). Una vez que fue terminado el periodo de extracción seminal, los verracos fueron enviados a matadero, obteniendo los testículos y epidídimos, siendo procesados para su análisis. Las muestras de **PS**

y SE fueron extraídas de la FP y de la FR respectivamente, obtenidas en el segundo experimento.



Esquema 1. Diseño general de la investigación

3.1.2. Piensos experimentales

Los ingredientes para la elaboración del pienso fueron aportados por Grupo SETNA Nutrición, S.A., el cual formuló y elaboró la premezcla mineral y vitamínica. El **PB** fue fabricado en la planta de piensos NUTECAL localizada en Benavente, Comunidad de Castilla León.

La fórmula del **PB** se muestra en la **Tabla 3**. Los requerimientos nutricionales utilizados para su formulación fueron los recomendados por el **NRC (1998)** para verracos en producción. En la premezcla mineral no fue incluida ninguna fuente de **Zn**.

Del **PB** fue tomada una muestra para realizar un **AEEA**, determinando en ella la concentración de **Zn**.

Tabla 3. Ingredientes y valor nutritivo del pienso base (**PB**) para verracos en producción¹.

Ingredientes	Inclusión (Kg)	Valor nutricional	Composición
Cebada	47.253	Peso (Kg)	100.000
Maíz	12.562	Humedad (%)	10.465
Trigo	10.659	Proteína bruta (%)	17.000
Cuartas 9/20	5.000	Grasa bruta (%)	4.974
Melaza	2.000	Ac. Linoleico (%)	1.205
Soja (44.0% PC)	20.230	Fibra bruta (%)	4.396
Fosfato bicálcico	1.06	Calcio (%)	0.75
Sal	0.5	Sodio (%)	0.177
DL- Metionina (99%)	0.086	Fósforo total (%)	0.579
L-Lisina (78%)	0.1	Fósforo Dig. (%)	0.250
L-Treonina	0.050	E.M. Kcal Kg ⁻¹	3400
Premezcla Vit+Min ²	0.500	Prot.Dig. (%)	14.325
TOTAL	100.000	Lis.Dig. (%)	0.850
		Met.Dig. (%)	0.301
		Met+Cis Dig. (%)	0.553
		Treo.Dig. (%)	0.538

¹ Contenido de **Zn** en el **PB**: 25 ppm Kg⁻¹ de pienso. ²Incluye (Kg dieta⁻¹): Vitamina A (trans-acetato de retinol), 10.000 UI; Vitamina D₃ (colecalfiferol), 2.000 UI; Vitamina E (acetato de tocoferol), 25 mg; Tiamina (mononitrato de tiamina), 0.16 mg; Riboflavina, 0.781 mg; Piridoxina (HCl-piridoxina), 0.375 mg; Vitamina B₁₂ (cianocobalamina), 4.0 mg; Vitamina K (bisulfato de menadiona), 0.62 mg; Ácido Nicotínico, 4.0 mg; Ácido Pantoténico (D-pantotenato de calcio), 1.9 mg; Colina (cloruro de colina, 60%), 21 mg; Ácido Fólico (50%), 1.25 mg; Biotina 2%, 1.6 mg; MnO, 14.0 mg; FeSO₄·7H₂O, 24.0 mg; CuSO₄·5H₂O, 5 mg; KI, 0.33 mg; CoCO₃, 0.36 mg; Na₂SeO₃, 2.5 mg; CaCO₃, 0.32 mg.

Las fuentes de **Zn** utilizadas en los tratamientos se muestran en la **Tabla 4**. La concentración de **Zn**, con valor alimenticio fue para las fuentes de: 36% en ZnSO₄·H₂O, 72% para el ZnO y, 15% en Metionato de **Zn** (Zn-Met).

Tabla 4. Tratamientos según fuente y nivel de Zn.

Tratamiento	Fuente ²	Nivel de Zn ³ ppm	Fórmula ³
Control	-----	25 ¹	PB
ZnSO ₄ 150	ZnSO ₄ ·H ₂ O	150	PB+ ZnSO ₄ ·H ₂ O
ZnSO ₄ 200		200	
ZnO150	ZnO	150	PB +ZnO
ZnO200		200	
Zn-Met150	Metionato de	150	PB + Metionato de Zn
Zn-Met200	Zn	200	

¹ Contenido de Zn en el pienso base (PB): Análisis de espectrofotometría de absorción atómica del (AOAC, 2000). ²Todas las fuentes fueron grado alimentario con un contenido comercial de Zn de: 36%, ZnSO₄·H₂O; 72% ZnO; 15% Metionato de Zn. ³Se agregó la fuente de Zn al PB para obtener los niveles (ppm) mostrados en los tratamientos.

3.1.3. Material de laboratorio

En las **Tablas 5 y 6** se realiza una descripción del material fungible y de laboratorio que fueron utilizados en los experimentos realizados.

Tabla 5. Material fungible.

Material	Marca comercial	Material	Marca comercial
Aceite de inmersión	Olimpus	Guantes de látex natural	
Agujas 22G, 21 G	Teruno	Papel indicador pH 4-10	Merk
Bolsas con cierre de seguridad con bandas blancas		Parafilm M 100 mm ancho	POBEL
Bandejas de aluminio para 1, 2, 3 Kg		Placas de Petri 35 x 10 mm; 90 x 14 mm	Cellstar
Cubreobjetos 18 x 18 mm; 15 x 15 mm	VWR Int.	Portaobjetos	VWR Int.
Eppendorf 0.25, 0.5, 1, 2.5 mL	Eppendorf	Puntas desechables plásticas 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µL	Gilson
Filtros Albet 150 mm	Filter-Lab	Puntas desechables plásticas 0.5, 1, 5 mL	Gilson
Guantes desechables de vinilo		Rotuladores cristalográficos 0.4, 1 mm	
		Vasos desechables de plástico	

Tabla 6. Material de laboratorio.

Material	Marca comercial	Material	Marca comercial
Agitador de tubos	POBEL	Gradillas para eppendorf 100 unidades.	POBEL
Agitador magnético con temperatura	Dialyzers	Gradillas para tubos de ensayo 70 x 155 x 155	POBEL
Báscula electrónica portátil	Ohaus ± 5 mg	Gradillas para tubos de ensayo	POBEL
Balanza triple barra 2600 mg	Ohaus	Guantes anticalóricos	POBEL
Baño de arena	Selecta	Imanes	POBEL
Baño maría	Selecta	Maniquí portátil	POBEL
Balanza analítica	Mettler AE 200	Maquina selladora, 300 mm	POBEL
Báscula de jaula	Pre-material	Matraz Erlenmeyer 100, 250, 500, 1000 mL	POBEL
Bureta digital 25, 50 mL	POBEL	Matraz volumétrico 100, 250, 500	POBEL
Cajas de poliespán		Micropipetas 5,10,20,100,1000 μ L	POBEL
Cámara de Neubauer	Brand	Microscopio de contraste de fases	
Campana de flujo laminar		Microscopio estereoscópico	SMZ-2T Nikon
Campana de extracción		Microscopio de fluorescencia	Leica Microsystems Controller B170 Nabertherm
Centrífuga Sorvall RC2-B Super Speed	Pierce Biotechnology	Leitz DMLB	
Bandejas plásticas 70x40; 30x20 cm		Mufla	
Cinta métrica		Nevera 5°C	
Contador manual de células	Clay Adams	Nevera a -20°C	
Crisoles de porcelana 5 cm diámetro		Pera de goma	POBEL
Dosificador Labmax 10, 100 mL	Witeg	Pinzas para vasos 30 cm	POBEL
Desecador de cristal, 40 cm	POBEL	Pinzas para crisoles 30 cm long.	POBEL
Embudos para análisis 12, 15 cm		Pipetas de cristal 1, 2, 5, 10 mL	POBEL
Espátulas vibratoria acanalada 19 cm longitud	POBEL	Probeta 50, 100, 250, 500 mL	POBEL
Espátulas doble 7 ancho mm; 200 mm longitud	POBEL	Reloj avisador digital	POBEL
Espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA	Varian, Springvalley	Termo	
Estufa 1-200 °C	Selecta	Termómetro	POBEL
Estuches de disección		Termoplatina	Selecta
Frasco lavador tapón de rosca	POBEL	Aspirador de goma	POBEL
Goma antideslizante	POBEL	Vaso de precipitado 100, 250, 500, 1000	POBEL
		Vernier	Stainless Hardened

3.1.4. Productos químicos

En la **Tabla 7**, se describen los reactivos utilizados para la evaluación de la calidad seminal y en los experimentos de **IF** y **FIV**.

3.1.5. Soluciones y medios para el análisis y cultivo celular

Los medios utilizados para la realización de las diferentes pruebas de laboratorio se describen en orden, con base a la realización de los experimentos.

Tabla 7. Reactivos para la realización de pruebas de laboratorio.

Prueba	Casa comercial	Prueba	Casa comercial
Determinación de Fragmentación de ADN		Medios de fecundación <i>in vitro</i>	
Agua destilada		Agua bidestilada	Sigma
Etanol	Panreac	BSA (bovine serum albumin)	
Kit Sperm-Sus-Halomax	ChromaCell,SL. Madrid	BTS	
Yoduro de propidio Antifaiding	Invitrogen, Carlsbad	Cafeína	Sigma
		Cl ₂ Ca-2H ₂ O	Sigma
		KCl	
		NaCl	
Determinación de Zn en tejidos, PS y SE*		Cl ₂ Mg-6H ₂ O	
Agua desionizada	SETNA	CO ₃ Hna	Sigma
HCl 37%	PANRREAC	D-L Ácido láctico	Sigma
Solución patrón 1000 ppm de Zn	PANRREAC		
Evaluación seminal		Glucosa	Sigma
Agua destilada		Hipotaurina	Sigma
Agua desionizada		Hoescht-33342	Sigma
Agua Milli-Q	Millipore	Kanamicina	
Citrato de sodio		KH ₂ PO ₄	Sigma
Formol		Lacmoid	Sigma
Glucosa		L-Glutamina	Sigma
Isocintao de Fluoreceina	Sigma	Na ₂ HPO ₄	Sigma
KCl	Sigma	NaCl	Sigma
Lectina PSA		DABCO	Sigma
NaHCO ₃	Sigma	Penicilina G potásica	Sigma
Na-EDTA-2H ₂ O	Sigma	Piruvato de sodio	Sigma
Rosa de bengala		PO ₄ H ₂ K	Sigma
		SO ₄ Mg-7H ₂ O	Sigma
		Sulfato de Estreptomina	Sigma
		Taurina	Sigma
		Tris	Sigma
		Vectashield	Vector
			Laboratories, Inc

*AOAC, 2000.

3.1.5.1. Diluyente BTS

El medio BTS fue realizado en el laboratorio de Reproducción del Departamento de Fisiología Animal de la Universidad Complutense de Madrid (Tabla 8). El BTS fue utilizado para la dilución de la FR, conservación y transporte de las muestras para las pruebas de IF y FIV.

Tabla 8. Diluyente **BTS** para semen de verraco.

Ingredientes	Concentración (mM)
Glucosa	0,0002
Na·EDTA·2H ₂ O	3,36
NaHCO ₃	20
KCl	5

BTS = Belville Thawing Solution. Fuente: **Pursel y Johnson, 1975.**

3.1.5.2. Solución salina formolada

Se disolvieron 9 gr de Cloruro sódico en 1000 mL de agua destilada y 3 mL Formaldehído. Hasta su utilización, esta solución fue almacenada a temperatura ambiente.

3.1.5.3. Solución PSA-FICT

La lectina *Pisum sativum* (**PSA**) fue diluida en agua ultrapura Milli-Q en una relación 1:20 con Fluoresceína-5-Isotiocinato (**FITC**).

3.1.5.4. Solución DABCO

Un gramo de 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2] Octano (**DABCO**): Triethylenediamina, fue mezclado en una solución de glicerol con agua destilada en una relación 1/9.

3.1.5.5. Medio para la recolección y lavado de ovarios

El medio utilizado para la recolección de ovarios desde el matadero hasta el laboratorio, fue realizado con solución salina (0.9% **NaCl**) adicionado con 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Kanamicina y atemperado a 38°C.

La solución salina fue utilizada para lavar los ovarios dos veces, hasta seleccionar los folículos adecuados para su punción con una aguja de 18G, conectada a una jeringuilla de 10 mL.

3.1.5.6. Medio para lavado de ovocitos

Los ovocitos fueron lavados con una solución **PBSDm** (Solución fosfatada tamponada de Dulbecco modificada) (**Tabla 9**) suplementada con **BSA** (albúmina de suero bovino) en el momento de su utilización.

Tabla 9. Composición de la solución **PBS***.

Reactivo	Concentración (mM)
NaCl	136.89
KCl	2.68
Na₂HPO₄	10.14
KH₂PO₄	1.76

***PBS**= Solución fosfatada tamponada.

3.1.5.7. Medio para lavado de espermatozoides

Los espermatozoides fueron lavados y manipulados con la solución **PBSDm** adicionada con 2 mg mL^{-1} de **BSA**. La solución fue filtrada posteriormente.

3.1.5.8. Medio de fecundación

La composición del **MF** utilizado para la fecundación *in vitro* se observa en la **Tabla 10**. Previo a su utilización, se agregaba cafeína (2 mM) y 0.2% de **BSA**, a continuación, se incubaba 40 h ajustando el **pH** a 7.4. Una vez transcurrido este periodo de equilibrio, el medio fue filtrado para su utilización.

Tabla 10. Medio de fecundación (MF).

Reactivo	Concentración (mM)
NaCl	113.1
KCl	3.0
Cl ₂ Ca·2H ₂ O	7.5
Tris	20
Glucosa	11
Piruvato de sodio	5

3.1.5.9. Solución de Lacmoid

Se disolvió 1 g de Lacmoid en 45 mL de agua bidestilada. Se calentó hasta el punto de ebullición. Una vez que alcanzó la temperatura ambiente, se fue añadiendo ácido acético glacial, hasta una cantidad de 45 mL. Se almacenó en un lugar fresco y oscuro.

Antes de su utilización, se filtraba la cantidad necesaria para la evaluación de los ovocitos fecundados.

3.1.5.10. Fluorocromo

Se mezcla en una relación 1:1 (v/v) el Yoduro de propidio y antifading.

3.1.5.11. Solución de ácido clorhídrico (HCl18.5%)

En la campana de extracción se mezcló 500 mL de agua desionizada, con 500 mL de HCl al 37%. Se dejó reposar y se almacenó a temperatura ambiente.

3.2. Instalaciones

Para cumplir con los objetivos planteados en esta investigación, se utilizó una nave cerrada, con ventilación automática para la época de calor. Las jaulas para los verracos fueron individuales, con bebedero de chupete, comedero de canaleta y sistema automático para el suministro del pienso. Suelo enrejillado dispuesto encima de la fosa de deyecciones.

El área de trabajo para la extracción seminal fue acondicionada dentro de la misma nave, en una superficie de 2.5 x 2.5 m. Se dispuso de un maniquí para la monta, y una alfombra antideslizante, para facilitar la actividad de los verracos.

En la misma granja se acondicionó un laboratorio para realizar los análisis de contrastación seminal, y elaboración de las muestras necesarias para los experimento 2, 3 y 4.

El Experimento 2 y parte del Experimento 5 se desarrolló en el laboratorio de la Unidad Docente de Zoología (**UDZ**), Dpto. de Fisiología, de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. El Experimento 3, fue realizado en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Madrid. El Experimento 4, fue llevado a cabo en el laboratorio de Reproducción del Hospital de Enseñanza Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Para la realización del Experimento 5, los verracos fueron sacrificados en el matadero frigorífico ESFOSA, Vic, en Barcelona, recuperando los testículos y epidídimos. Los análisis de **MS**, humedad (**H**) y cenizas (**C**), de dichos órganos se realizaron en el laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Todas las muestras del experimento 5 fueron llevadas al laboratorio de Análisis y Control de Calidad de Materias Primas y Piensos del Grupo SETNA Nutrición, S.A. en Madrid.

3.3. Asignación de tratamientos

Los verracos (repeticiones) fueron aleatoriamente distribuidos en las jaulas individuales, donde permanecieron durante todo el periodo experimental. Posteriormente y de forma aleatoria a cada cinco verracos, les fue asignado uno de los siete tratamientos mostrados en la **Tabla 6**.

3.3.1. Periodo de adaptación

Las primeras cuatro semanas fueron utilizadas para la adaptación de los verracos tanto a las instalaciones, como a los tratamientos. En este periodo se entrenaron los verracos a saltar sobre el potro de recogida. Se utilizó la técnica de la mano enguantada descrita por **Hancock y Hovell (1959)**. Los verracos fueron considerados aptos para ingresar al periodo experimental cuando mostraron buena líbido y regularidad en los saltos (**García et al., 1999**).

3.3.2. Periodo experimental

El periodo experimental se prolongo por espacio de 16 semanas. Durante dicho periodo, los verracos tuvieron un ritmo de recogidas de un salto semanal. Los dos primeros experimentos abarcaron las 16 semanas. El Experimento 3 duró 14 semanas. El Experimento 4 se desarrollo durante las dos últimas semanas. El Experimento 5, se realizó una vez sacrificados los animales. En la **Tabla 11**, se muestra la distribución de los experimentos.

Tabla 11. Periodo de experimentación.

Actividad	Experimento	Tiempo (Semanas)	Animales
Adaptación		4	35
	1	16	35
Experimental	2	16	35
	3	14	35
	4	2	21
	5	-----	35

3.4. Metodología

3.4.1. Sistema de suministro de los tratamientos

El pienso fue suministrado diariamente, utilizando un sistema restringido, ofreciendo 1.8 a 2.5 Kg día⁻¹ verraco⁻¹, y agua *ad libitum*.

El pienso para cada verraco era pesado diariamente, y la cantidad ajustada semanalmente, según fuera el caso. Para ello se consideraba el **PV** (Kg), y la evaluación física de los verracos determinando la **CC**.

3.4.2. Evaluación del comportamiento productivo del verraco

Para evaluar el comportamiento productivo del verraco se utilizaron las siguientes variables:

Las variables **PV**, **GPS** (ganancia de peso semana⁻¹), **PF** (peso final) de cada verraco fueron obtenidas semanalmente, una vez terminada su eyaculación, y pesando cada animal de forma individual con una báscula con jaula.

La **GPS** se obtuvo por diferencia entre el **PV** final y el **PV** inicial de la semana. El **PF** se registró en la semana 16.

Variable **CC**: Evaluada según la escala de valores recomendada por **Neary y Yager (2002)** y **Chikwanha et al. (2007)** se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Condición corporal (**CC**) en verracos.

Grado	CC
1	Emaciado
2	Delgado
3	Bueno
4	Graso
5	Obeso

Variables morfométricas de testículos: Semicircunferencia testicular derecha (**SCTD**); semicircunferencia testicular izquierda (**SCTI**); semicircunferencia testicular total (**SCTT**); longitud testicular derecha (**LTD**); longitud testicular izquierda (**LTI**). En todas las medidas se incluyó el escroto y en el caso de la longitud se incluyó el espacio ocupado por el epidídimo. Las medidas morfométricas de los testículos fueron realizadas según la técnica descrita por **Fuentes et al. (1989, 1995)**. Para ello se utilizó una cinta métrica, colocada de forma horizontal, comprendiendo los dos extremos en donde el escroto se une a la piel en la región perineal como se observa en la **Ilustración 1**.

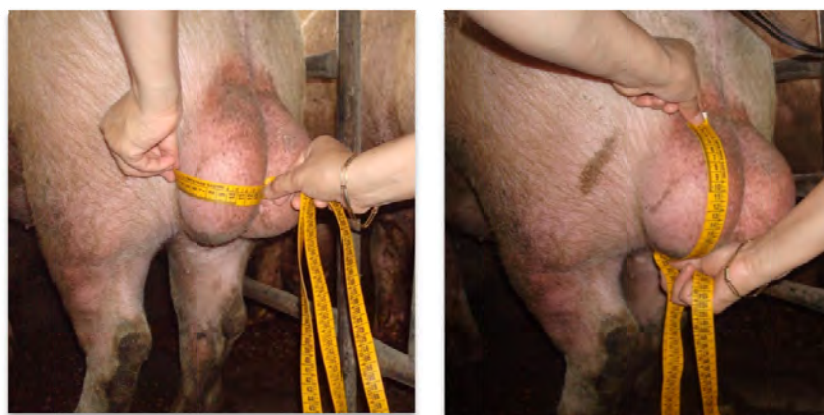


Ilustración 1. Mediciones morfométricas de la región escrotal en verracos.

3.4.2.1. Ritmo de recogida del verraco (IE)

El **IE** fue semanal y se utilizó la técnica de la mano enguantada, dando continuidad al sistema establecido durante el periodo de adaptación.

3.4.2.2. Medidas testiculares y de epidídimos

Los testículos y epidídimos fueron obtenidos por disección. Los testículos fueron separados de las glándulas y del epidídimo, retirándose las membranas que los cubrían.

Los testículos y epidídimos fueron pesados de forma individual con una balanza electrónica, obteniéndose las variables **PTD** y **PTI**. Posteriormente, fueron identificados y colocados en una caja térmica de poliestirén a 4°C.

Para la determinación de la circunferencia (**CTD y CTI**) y ancho (**ATD y ATI**), se utilizó una cinta métrica. La longitud (**LTD y LTI**) fue medida con un vernier electrónico (**Ilustración 2**).



Ilustración 2. Mediciones de testículos y epidídimos de verracos.

Los epidídimos fueron pesados en la balanza electrónica, obteniendo las variables **PED** (peso epidídimo derecho), y **PEI** (peso epidídimo izquierdo).

3.4.2.3. Índice gonadosomático (IG)

El **IG** es un indicador de la relación existente entre el crecimiento testicular y el crecimiento corporal (**PV**) en los verracos. Para obtener el valor de **IG** se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{IG (\%)} = \text{peso testicular (g)} / \text{PV (Kg)}$$

3.4.3. Recogida de semen

El semen se recogió en dos termos que contenían un vaso desechable, cubierto con un filtro. Uno de los termos además era calentado a 37°C para recoger con la **FR**. El otro, se mantuvo a temperatura ambiente para recoger la **FP**.

Inmediatamente después de recoger ambas fracciones, se procedió a la evaluación del semen.

3.4.3.1. Evaluación básica del semen

La evaluación de la producción y calidad seminal se realizó a través de las siguientes variables:

Volumen de eyaculado. Los mL de **FR** y **FP** fueron medidos a través de una probeta graduada. El volumen total (**VT**) fue obtenido sumando el volumen de las dos fracciones.

Motilidad. El porcentaje de motilidad espermática (**Mot, %**), se realizó depositando una gota de semen en un portaobjetos, cubriéndolo con un cubre objetos atemperado a 37°C. Posteriormente se observó la preparación en un microscopio de campo claro a 200x. El porcentaje de espermatozoides con movimiento se valoró en una escala de 0 a 100% (**Lleó, 2000**).

Calidad de Movimiento (CM): Se calificó utilizando una escala de 0 a 5 según la técnica descrita por **Martín-Rillo et al. (1996)** y **Lleó (2000)**. Para esta valoración se colocó en un portaobjetos atemperado a 37°C una gota de **FR**,

seguido de un cubreobjetos, también debidamente atemperado. Se observó en un microscopio de campo claro con el objetivo de 20x. La escala de valores se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Calidad de movimiento (**CM**) de los espermatozoides.

Calidad de movimiento	Valor
Movimiento progresivo vigoroso muy rápido	5
Movimiento rápido y progresivo	4
Movimiento progresivo lento y sinuoso	3
Movimiento anormal, algunos progresivos	2
Pocos espermatozoides móviles, con movimiento progresivo, o girando sobre sí mismos	1
Movimiento inexistentes, espermatozoides inmóviles (necrospermia)	0

Concentración espermática: El conteo de células espermáticas se realizó utilizando la cámara de Neubauer. Para ello, se mezcló una muestra de **FR** con solución salina formolada, en una relación 1:200, utilizando una pipeta de Thomas. Posteriormente se agitó por un periodo de 3 min y se tiraron las tres primeras gotas. Una gota fue colocada sobre cada una de las plataformas de la cámara e inmediatamente observadas en un microscopio de campo claro, con un objetivo de 20x. Los cuadros fueron contados siguiendo la técnica descrita por **González et al. (2008)** y **Hansen et al. (2006)**.

La concentración fue expresada como número de espermatozoides contenidos en un mL de **FR (Spz mL⁻¹)**.

Para la concentración espermática total (**Spz eyaculado⁻¹**), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Spz eyaculado}^{-1} = \text{Spz mL}^{-1} \times (\text{FR} + \text{FP})$$

pH: Se utilizaron tira reactivas con un intervalo de medición de 5 a 10, colocando una gota de 10 µL de **FR** sobre la tira. Unos segundos después se observaba el cambio de coloración de la tira y se comparaba con la escala patrón de colores que presentaban estas tiras reactivas.

Morfoanomalías (MA): Una muestra de 20 μL de **FR** fue colocada en un porta objetos, posteriormente se añadieron 30 μL de tinción rosa de Bengala. Ambas fueron extendidas de forma horizontal y homogéneamente sobre el cubreobjetos, dejándola secar a temperatura ambiente.

Se valoró el tipo de **MA** en donde se incluyeron las **CL**, **GP**, y **GD**. Se contaron 200 espermatozoides con un microscopio de campo claro y objetivo de 20x. Se obtuvo la proporción de cada tipo de **MA** y se consideró el total de ellas.

Evaluación de acrosomas: Para la evaluación de los acrosomas se utilizó una muestra diluida de la **FR** en **BTS** (3:7 v/v), con una concentración de 5×10^6 **Spz mL⁻¹**. Se colocó una muestra de 15 μl en un portaobjetos para realizar un frotis, dejando secar, y posteriormente sumergir en etanol puro durante 30 min, pasado este tiempo se dejó secar a temperatura ambiente (**Risopatrón et al., 2001; Jiménez et al., 2003**).

De la lectina **PSA-FICT** fueron tomados 25 μl colocándolos sobre el frotis, almacenándolos inmediatamente en una cámara oscura durante 10 min. Para retirar el sobrante de **PSA-FICT**, se aplicó agua destilada directamente en el frotis y se procedió al secado a temperatura ambiente. Finalmente se colocó una gota de **DABCO** cubriéndose seguidamente con un cubre objetos, retirando el sobrante por absorción con papel de filtro (**Sukardi et al., 1997; Cox et al., 1998, Risopatrón et al., 2001; Jiménez et al., 2003**).

Las muestras fueron analizadas en un microscopio con un filtro de 480 nm con el objetivo de 100x de inmersión. Se contaron 200 células por muestra, evaluando las características acrosomales según la clasificación de **Nicolaeva et al. (1998); Jiménez et al. (2003); Chenoweth (2005)**:

Integridad Acrosomal (IAC): Todos los espermatozoides que mantuvieron la tinción **PSA-FICT**, y mostraban una membrana uniforme y completa.

Acrosoma dañado (AD): Aquellos espermatozoides que mostraron deformidad de la membrana manteniendo la tinción **PSA-FICT**.

Acrosoma reaccionado (AR): Todos aquellos espermatozoides que perdieron la tinción de **PSA-FICT**.

3.4.4. Índice de fragmentación de ADN espermático (IF)

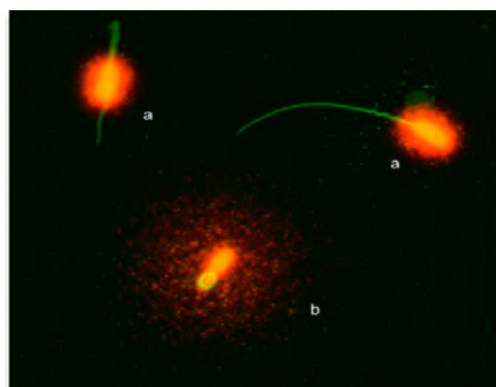
El análisis de **IF** fue realizado de acuerdo a la técnica descrita por **López-Fernández et al. (2007, 2008)**. Para ello, se utilizó el Kit Sperm-Sus-Halomax[®] (ChromaCell SL, Madrid, Spain). Se tomaron 25 μl de una muestra de **FR** diluida con **PBS** a una concentración de $2 \times 10^6 \text{ Spz mL}^{-1}$, introduciéndola en un tubo eppendorf con agarosa líquida de bajo punto de fusión atemperada a 37°C .

Los portaobjetos recubiertos de una película de agarosa fueron colocados en una bandeja metálica, a continuación se añadieron 20 μl de suspensión espermatozoides-agarosa. Se cubrieron rápidamente con un cubreobjetos, para formar un microgel dejando solidificar a 4°C durante 5 min. Se retiró el cubreobjetos cuidadosamente, evitando hacer presión o rasgaduras en el microgel. Los portaobjetos se colocaron horizontalmente en una bandeja que contenía 10 mL de solución de lisis, transcurridos 10 min se lavaron con agua destilada por espacio de 5 min, transfiriéndolos de forma secuenciada a bandejas que contenían etanol al 70, 90 y 100% durante 2 min en cada una. A continuación los portaobjetos se colocaron horizontalmente y se dejaron a temperatura ambiente.

Para la lectura se tiñeron con una gota de fluorocromo (sección **3.1.5.10**) y se observaron en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x.

En la interpretación de la lectura de **IF** se consideró a un espermatozoide con **ADN** fragmentado (**SpzF**) cuando se observó un halo grande y disperso de cromatina alrededor de su cabeza. Si por el contrario, el halo era pequeño y con cromatina compacta, este fue considerado como un espermatozoide no fragmentado (**Ilustración 3**).

Ilustración 3. Espermatozoides teñidos con fluorocromo para determinar fragmentación de **ADN**. a Espermatozoides con **ADN** no fragmentado; b. Espermatozoide con **ADN** fragmentado (**SpzF**).



Para obtener el **IF** se contaron 300 espermatozoides por portaobjetos y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{IF} = \text{SpzF} * 100 / \text{No. Espermatozoides contados}$$

3.4.5. Fecundación *in vitro* (FIV)

3.4.5.1. Muestras seminales

Cada dosis seminal consistió en una mezcla de 3 mL de **FR** (1 mL verraco⁻¹) y 17 mL de medio de **BTS**.

Las dosis fueron mantenidas a 17°C durante un tiempo no mayor a 10 h. Posteriormente fueron contrastadas para valorar la **Mot** y concentración espermática. Inmediatamente después, los tubos fueron centrifugados a 1900 x g durante 3 min. El **SE** fue resuspendido tres veces en 10 mL de medio **PBSDm** (**Ilustración 4**).

Tras los lavados el sedimento resultante fue resuspendido en **MF** para poder calcular la concentración y preparar con ello las dosis seminales que contenían 1×10^6 **Spz mL⁻¹** (**Gil et al., 2006**). De cada dosis se tomaron 50 µl para inseminar a los ovocitos.

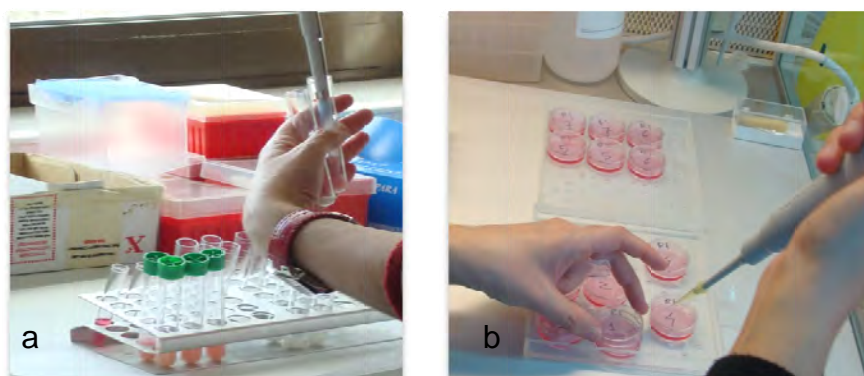


Ilustración 4. Mezclas seminales (a) y dilución de las mismas (b), para la inseminación *in vitro* de ovocitos.

3.4.5.2. Ovocitos inmaduros para inseminación *in vitro*

La prueba **FIV** se realizó siguiendo la técnica de **Gil et al. (2006)** y **Almiñana (2008)**. Los ovarios fueron mantenidos a 37°C y llevados al laboratorio en un tiempo no mayor a 60 min posterior a su colección (**Ilustración 5**).

Los ovocitos fueron obtenidos por aspiración y colocados en un tubo Falcón de 15 mL para sedimentación durante 3 min. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante compuesto de ovocitos y células foliculares se resuspendió en medio de lavado de los ovocitos **PBSDm** a 37°C.

El contenido del tubo fue colocado en una placa de Petri (90 x 14 mm) cuadrículada. Esta placa fue colocada bajo un microscopio estereoscópico a 60x, para realizar la selección de los ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo y estaban rodeados de al menos dos capas de células de cúmulus, con ooplasma uniforme.

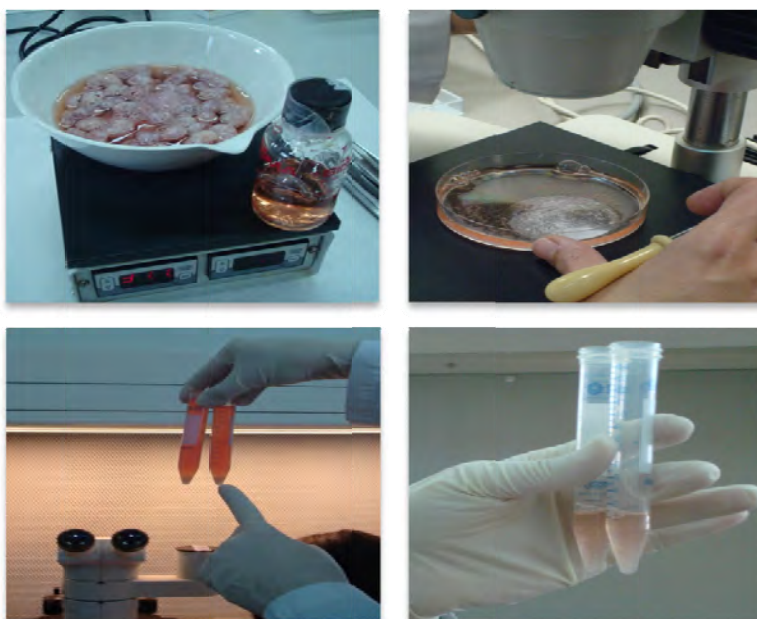


Ilustración 5. Ovarios de cerdas prepúberes para la obtención y evaluación de ovocitos para su utilización en la **FIV**.

Una vez seleccionados los ovocitos se lavaron tres veces en medio **PBSDm** y se transfirieron a placas de Petri (35 x 10 mm) con 2 mL de **MF** previamente atemperado a 39°C y estabilizado en una estufa con **CO₂**.

3.4.5.3. Fecundación y cocultivo de gametos

Se tomaron 50 µL de dilución espermática 1×10^6 **Spz mL⁻¹**, agregándolos a la placa de Petri que contenía una media de 20 a 22 ovocitos.

Los gametos fueron coincubados bajo una atmósfera de 5% de **CO₂** en aire a 39°C, con una humedad del 95 al 100%, durante un periodo de 16 a 18 h. Tras la coincubación los ovocitos fueron retirados del **MF** y se lavaron tres veces en medio **PBSDm**, pipeteando repetidas veces para eliminar los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida.

3.4.5.4. Tinción y valoración microscópica de la FIV

Con el fin de evaluar los indicadores de fecundación, los ovocitos desnudos se colocaron en portaobjetos a modo de microgotas, con líneas de vaselina laterales y sobre éste un cubreobjetos que era presionado cuidadosamente para evitar la ruptura de los mismos. Se fijaron en una solución de ácido acético glacial y etanol puro en una relación 1:3 (v/v) a temperatura ambiente durante 72 h. Posteriormente, los ovocitos fueron teñidos con Lacmoid al 1% y se examinaron con un microscopio de contraste de fase a 20x y 40x.

Los indicadores de **FIV** se evaluaron a las 15 h post-inseminación. Los ovocitos degenerados, inmaduros y ovocitos con el oolema roto o con una apariencia anormal del citoplasma fueron excluidos de la prueba. Las características de cada indicador evaluado se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Variables evaluadas en el análisis de fecundación *in vitro* (FIV).

Variable	Medida	Identificación	Ecuación	Observaciones
Ovocitos inseminados	Número	OI		Total de ovocitos coincubados
Ovocitos penetrados	%	OP	$OP * 100 / \text{total de OI}$	Ovocito con presencia de espermatozoides o cabezas con su respectivo flagelo
Ovocitos monospermicos	%	OM	$OM * 100 / OP$	Ovocitos conteniendo sólo una cabeza de espermatozoide o un pronúcleo masculino y los dos cuerpos polares
Espermatozoides por ovocito	Número	EO		Número de espermatozoides en cualquier estadio de descondensación por OP
Eficiencia de fecundación	%	EF	$\% OM * 100 / OI$	
Desarrollo de pronúcleos	%	DPn		Presencia de un pronúcleo masculino, estando presente su correspondiente flagelo y los dos cuerpos polares

Fuente: Gil *et al.*, 2006.

3.4.6. Determinación de Zn

3.4.6.1. Obtención de muestras para AEAA

Las muestras utilizadas para la determinación de **Zn**, fueron obtenidas de los testículos y epidídimos, una vez que los verracos fueron sacrificados. En tanto que el **PS** y el **SE** se obtuvieron de los eyaculados de los verracos utilizados en esta investigación.

3.4.6.1.1. Muestras de testículos y epidídimos

La técnica utilizada para la determinación de **MS**, **H** y **C**, fue la reportada por la **AOAC (2000)**.

Se tomaron 200 g de tejido testicular para su análisis, mientras que del epidídimo se tomó el órgano completo. Posteriormente las muestras se colocaron en crisoles de porcelana y sometidas a desecación por 24 h, a temperatura constante de 98 a 100°C. Transcurrido ese tiempo, los crisoles se transfirieron a un desecador hasta que su temperatura fue constante.

Una vez pesados en la balanza analítica, el porcentaje de **MS** y/o **H** se obtuvo por diferencia.

Las muestras secas fueron molidas finamente y homogeneizadas. Posteriormente se tomo una muestra de 6 g, que fue colocada en crisoles de porcelana pesados previamente.

Los crisoles se colocaron dentro de una mufla programada. Los primeros 120°C se alcanzaban en 30 min. En el mismo tiempo se llegaba a 250°C y a partir de los 60 min la temperatura se llevó a 550°C (**Ilustración 6**).



Ilustración 6. Obtención de cenizas (**C**).

El tiempo de incineración fue de 12 h, consiguiéndose un material inorgánico homogéneamente blanco o ligeramente gris y suave. Los crisoles se dejaron enfriar dentro de la mufla hasta alcanzar una temperatura de 90 a 100°C, se colocaron en un desecador de cristal, en donde se mantuvieron hasta llegar a una temperatura constante y sin humedad.

Los crisoles que contenían la materia incinerada, fueron pesados en una balanza analítica y por diferencia se obtuvo el porcentaje de **C**.

3.4.6.1.2. Muestras de plasma seminal (PS)

La **FP** contenida en un tubo con capacidad de 10 mL, fue pesada y centrifugada a 3000 x g durante 10 min (**Ilustración 7**). El sobrenadante (**PS**) fue retirado y colocado en otro tubo con la misma capacidad, repitiéndose el procedimiento anterior. El **PS** fue depositado en un tubo tapado herméticamente y refrigerado hasta su análisis por **AEAA**.



Ilustración 7. Obtención de plasma seminal (**PS**).

3.4.6.1.3. Muestras de sedimento espermático (**SE**)

Una muestra de **FR** de 10 mL fue colocada en un tubo plástico con tapón, previamente pesado en una balanza analítica. Una vez que le fue colocada la muestra de **FR** al tubo, se pesó nuevamente.

Para obtener el **SE**, las muestras se centrifugaron a 3000 x g por 10 min, retirándose el sobrenadante. El **SE** fue resuspendido en 10 mL de agua desionizada, mezclándola suavemente para disolver el **SE**, y así obtener el lavado de los espermatozoides. El **SE** fue centrifugado dos veces más, retirando el sobrenadante.

El tubo fue colocado de forma vertical, para escurrir totalmente el líquido pegado en las paredes del mismo. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 24h y posteriormente se colocó por 30 min en una estufa a 98°C (**Ilustración 8**). Se pesaron y por diferencia se obtuvo el peso del **SE**.



Ilustración 8. Obtención de sedimento espermático (**SE**) y almacenamiento.

3.4.6.2. Análisis de espectrofotometría de absorción atómica (AEAA)

3.4.6.2.1. Digestión y dilución de muestras para AEAA

3.4.6.2.1.1. Muestras de testículo

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, fue depositada una muestra de un gramo de **C** de testículo. Dentro de una campana de extracción se adicionó al matraz 100 mL de solución **HCl18.5%**.

Para la digestión de la muestra se utilizó un baño de arena, colocado también dentro de la campana de extracción. El matraz fue introducido en el baño de arena, el cual se fue calentando lentamente hasta alcanzar una temperatura de 350°C. El contenido de **HCl18.5%** se fue reduciendo por evaporación hasta un volumen de 50 mL.

Una vez finalizada la digestión, se retiraron los matraces del baño de arena y se dejaron dentro de la campana de extracción, hasta enfriara y cesara la eliminación de vapores ácidos. La solución digerida fue filtrada en un matraz volumétrico, utilizando un embudo con un filtro Albet y aforándola a 500 mL con agua desionizada (**Ilustración 9**).

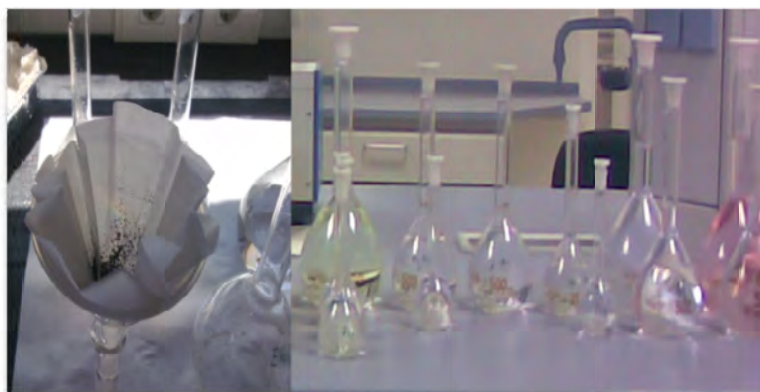


Ilustración 9. Filtrado de las muestras digeridas y matraces con dilución de las muestras para su lectura con el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

3.4.6.2.1.2. Muestras de epidídimo

La muestra de **C** del epidídimo fue pesada en cantidades de 0.5 g. El procedimiento para la digestión de las muestras fue el mismo que el descrito para el testículo. Sin embargo, en este caso el filtrado fue en un matraz volumétrico aforado a 100 mL.

3.4.6.2.1.3. Muestras de sedimento espermático (SE)

El **SE** seco fue pesado en una balanza analítica y posteriormente colocado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.

La digestión del **SE** fue realizada con la misma metodología descrita para las **C** de testículo y epidídimo (**Ilustración 10**).

La solución restante de la digestión fue filtrada en un matraz volumétrico aforado a 100 mL, siguiendo la metodología descrita para el resto de las muestras.

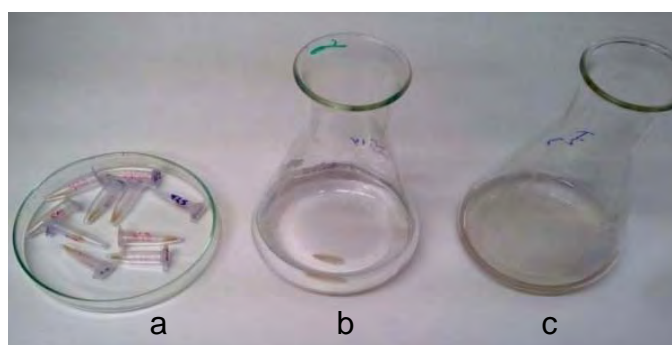


Ilustración 10. Digestión de sedimento espermático (**SE**). a. Muestras de **SE** almacenadas en eppendorf. b. **SE** en **HCl 18.5%**. c. Solución digerida de **SE**.

3.4.6.2.1.4. Muestras de plasma seminal (PS)

Con una micropipeta se tomó 1 mL de **PS** depositado en un matraz volumétrico aforado a 100 mL, previamente tarado. El matraz con el **PS** fue pesado una vez más en una balanza analítica (**Ilustración 11**).

Se agregó agua desionizada al matraz hasta aforarlo a 100 mL, diluyendo el **PS** agitándolo vigorosamente para obtener un solución homogénea.



Ilustración 11. Dilución de muestras de plasma seminal (**PS**).

3.4.6.2.2. Lectura de espectrofotometría de absorción atómica

El **AEAA** es una técnica de alta selectividad, sensibilidad y rápida realización. Por ello, en esta investigación se utilizó un espectrofotómetro calibrado según las instrucciones de operación descritas en la **Tabla 15**.

Tabla15. Condiciones de operación del espectrofotómetro para determinar **Zn**.

Variable	Valor
Longitud de onda Zn (nM)	213.9
Anchura de rendija (nM)	1.0
Limite menor de detección (ppm)	>0.01
Corriente de lámpara (mA)	5.0
Integración (S)	5.0
Flujo de aire (L/min)	13.5
Flujo de acetileno (L/min)	2.00

La lectura de las muestras diluidas se realizó una a una, colocando el capilar dentro del matraz (**Ilustración 12**).

La concentración de **Zn** fue mostrada automáticamente en el ordenador, los valores de **Zn** contenidos en las **C**, estaban reportados en ppm. Estos valores fueron transformados a ppm de **Zn** en **MS** para los tejidos testicular y epididimario. En el caso del **SE** las ppm de **Zn** (**ZnSE**) eran calculadas directamente en base a **MS**. Por su parte la lectura de **Zn** en **PS** (**ZnPS**) se obtuvo en ppm de **Zn mL⁻¹**.

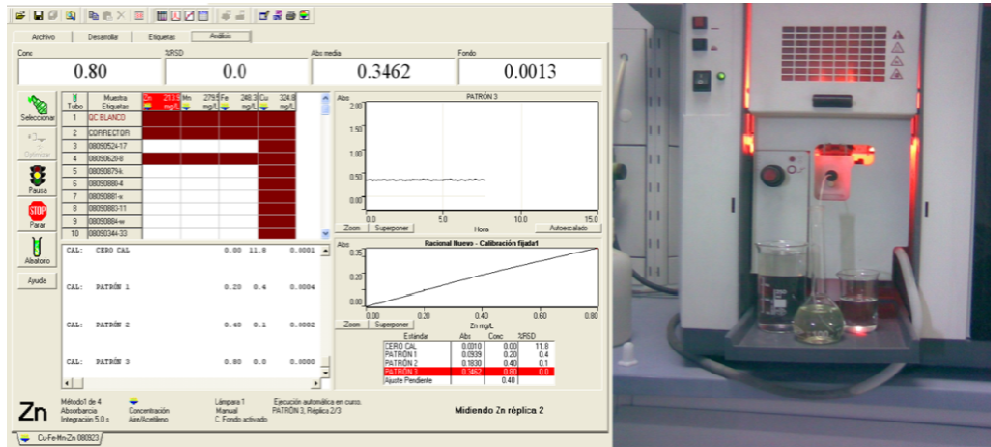


Ilustración 12. Espectrofotómetro de absorción atómica

3.5. Desarrollo de los experimentos

La investigación fue planificada para desarrollar cinco experimentos los cuales se describen a continuación.

3.5.1. Experimento 1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos

Se realizó en las instalaciones de la Granja Porcina la Jabonera, localizada en Sanchonuño, Provincia de Segovia. En este experimento se evaluó el efecto de los tratamientos en las características productivas de 35 verracos F1 (York-Landrace).

El **PI** de cada verraco se obtuvo al inicio del experimento. Inmediatamente después fueron alojados en las jaulas individuales y les fue asignado uno de los tratamientos de manera aleatoria.

Los verracos recibían el pienso una vez al día, en cantidad previamente ajustada según el **PV**, la **GPS** y la **CC** semanal.

El **CPD** se registró diariamente, obteniendo la dinámica de consumo por verraco.

El ritmo de recogida propuesto para este experimento fue de una vez por semana, obteniéndose con ello el **IE** para cada tratamiento.

Durante las 16 semanas que duró el experimento se obtuvo el **PV** y la **GPS**. La dinámica de crecimiento por semana de cada verraco, se obtuvo a través de la información de todo el periodo experimental. El **PV** tomado en la semana 16, se considero como el **PF** de este experimento.

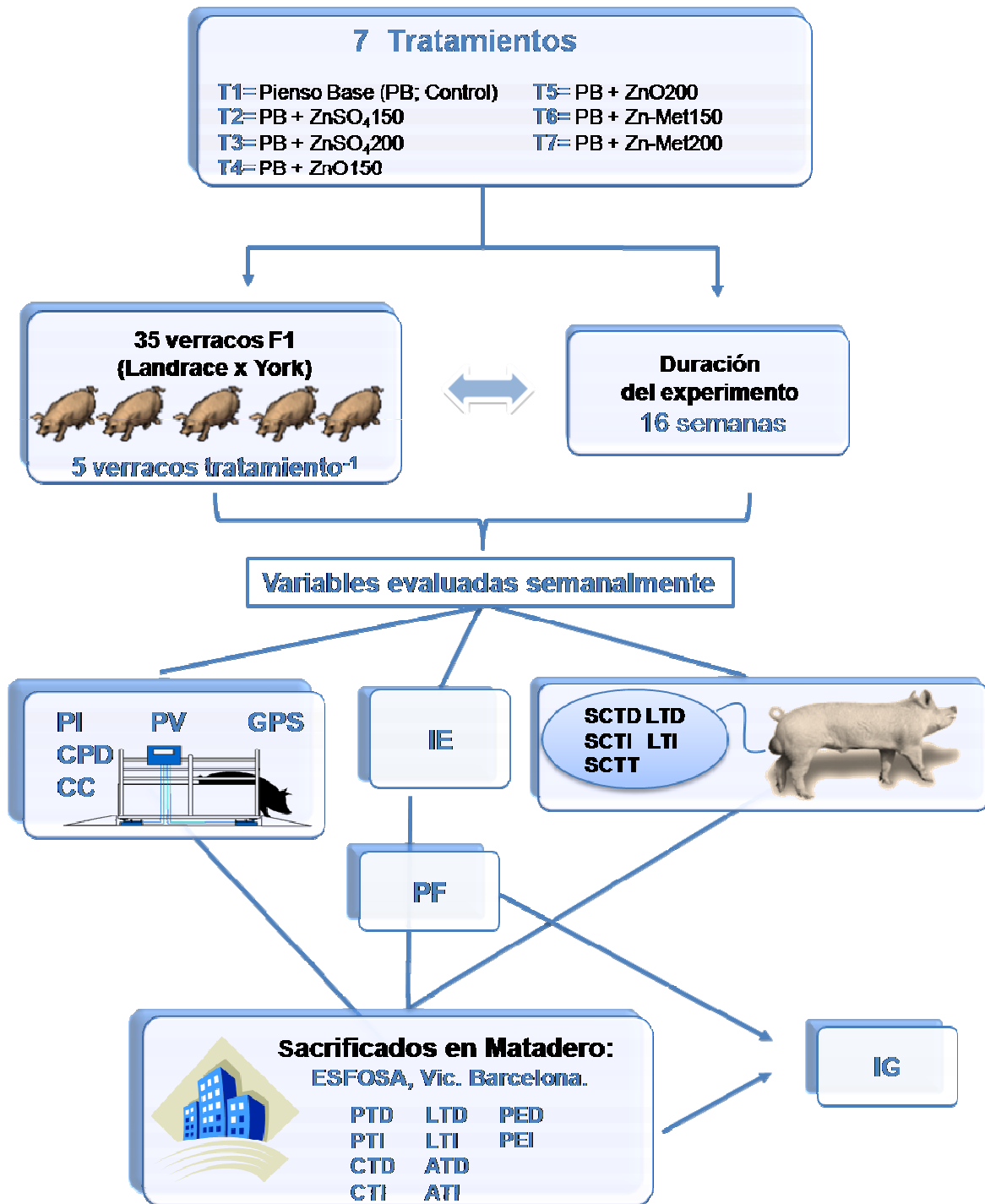
Tras la eyaculación, los verracos eran examinados físicamente para evaluar la **CC**. Los verracos fueron calificados con base al aspecto físico utilizando los valores que se muestran en la **Tabla 12**. En ningún caso se permitió que la **CC** superara valores de 4 y ni se presentaran verracos con **CC** menor a 2.

También fue evaluado el crecimiento morfométrico de ambos testículos, siguiendo la metodología descrita anteriormente (sección **3.4.2**) y evaluando las variables: **SCTD**, **SCTI**, **SCTT**, **LTD**, **LTI**. Con esta información se obtuvo la dinámica de crecimiento testicular por semana.

Una vez sacrificados los verracos, se procedió a la disección de los órganos sexuales. Fueron identificados los 70 testículos y 70 epidídimo, colocados en cajas térmicas de poliestireno, para ser transportados al laboratorio de Producción Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Las variables medidas en estos órganos se describen en la sección **3.4.2.2**.

El número de observaciones (**n**) obtenidas durante las 16 semanas evaluadas, fueron 560 para las variables **CPD**, **PV** e **IE**, y 529 de **CC**.

El **IG** se obtuvo utilizando el **PF** del verraco y el peso testicular diseccionado. Se utilizó la ecuación que se describe en la sección **3.4.2.3**.



Esquema 2. Representación del Experimento 1

3.5.2. Experimento 2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermograma básico del eyaculado, y de la evaluación de la integridad acrosomal

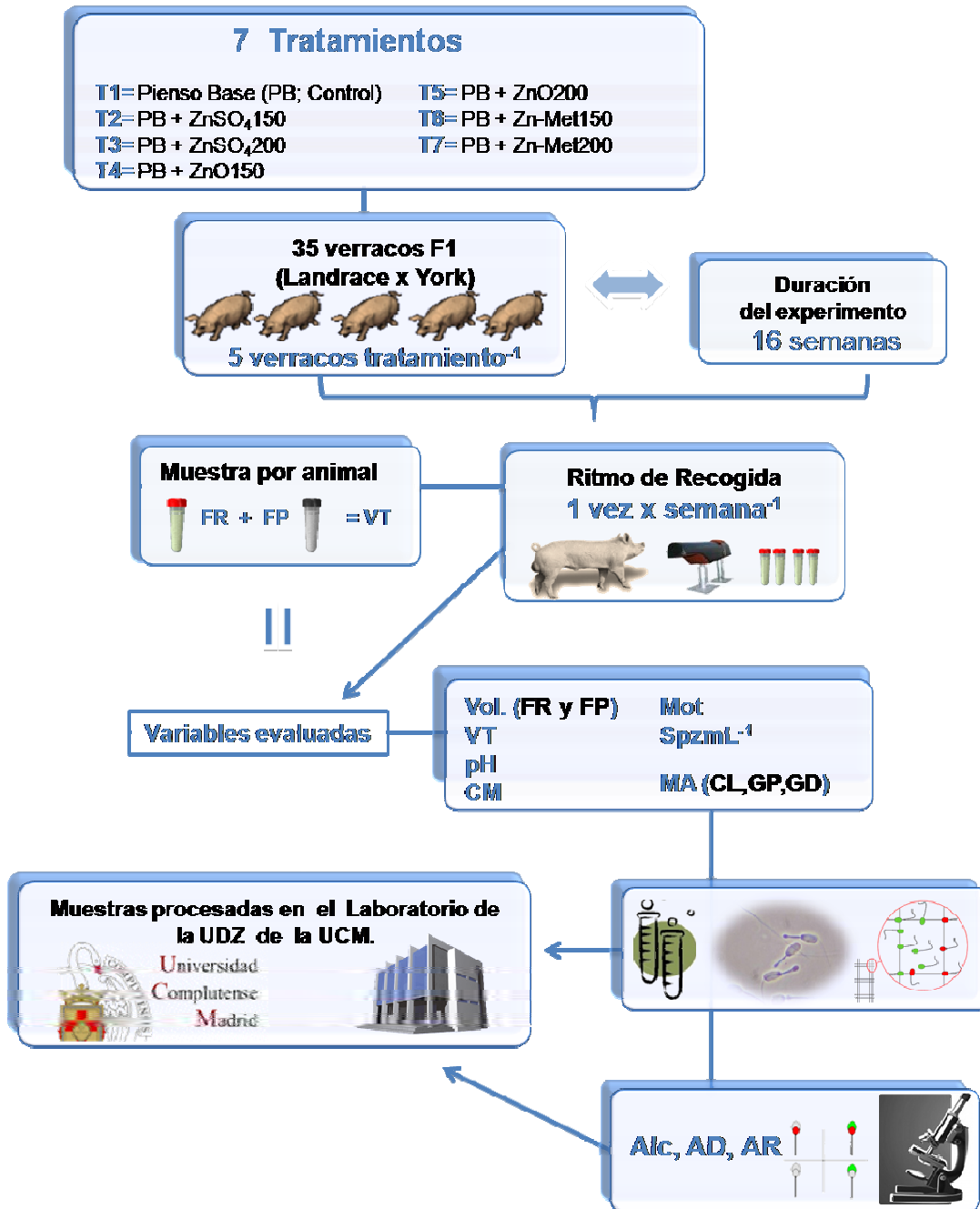
El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de los tratamientos que contenían diferente fuente y niveles de **Zn**, en la producción y calidad del eyaculado de verracos. Para ello, se utilizaron las instalaciones de la Granja la Jabonera, durante un periodo de 16 semanas, tiempo durante el cual fueron recogidos semanalmente los eyaculados de los animales. Cada verraco recibía el pienso en un solo suministro.

Un total de 577 eyaculados fueron evaluados. Las variables se analizaron siguiendo la sección **3.4.3**. En el laboratorio dispuesto en la granja, se preparaba el material para el eyaculado y los medios de conservación para las submuestras seminales que posteriormente eran trasladadas al laboratorio de la **UDZ**.

El eyaculado de los verracos era almacenado en termos independientes para la **FR** y **FP**. Ambas fracciones eran medidas con una probeta y se obtenía el volumen (mL). La suma de los valores de **FR** y **FP**, fue considerada como el **VT**. De la **FR** se obtuvieron los valores de **Mot**, **CM**, **pH**, **Spz mL⁻¹**, **MA**, **CL**, **GP**, **GD** y siguiendo las técnicas descritas anteriormente para cada una de estas variables.

En la séptima semana de experimentación fue iniciado el análisis para identificar el estado de los acrosomas. Se utilizó una submuestra que se obtenía a través de la mezcla de 3 mL de **FR** con 7 mL de **BTS**. Esta submuestra era colocada en un tubo de plástico tapado herméticamente, y depositada en una caja de poliestirén con refrigerantes, para conservarla a 17°C, así era llevada al laboratorio **UDZ**, en un periodo no mayor a 4 h. Se procedía a realizar el análisis del estado acrosomal preparando las muestras según la metodología descrita en la sección **3.4.3.1**. Se obtuvieron los porcentajes de **IAC**, **AD**, y **AR** de cada muestra.

Con los valores de cada una de las variables se analizó la dinámica que presentó durante las 16 semanas que duró este experimento.



Esquema 3. Representación del Experimento 2.

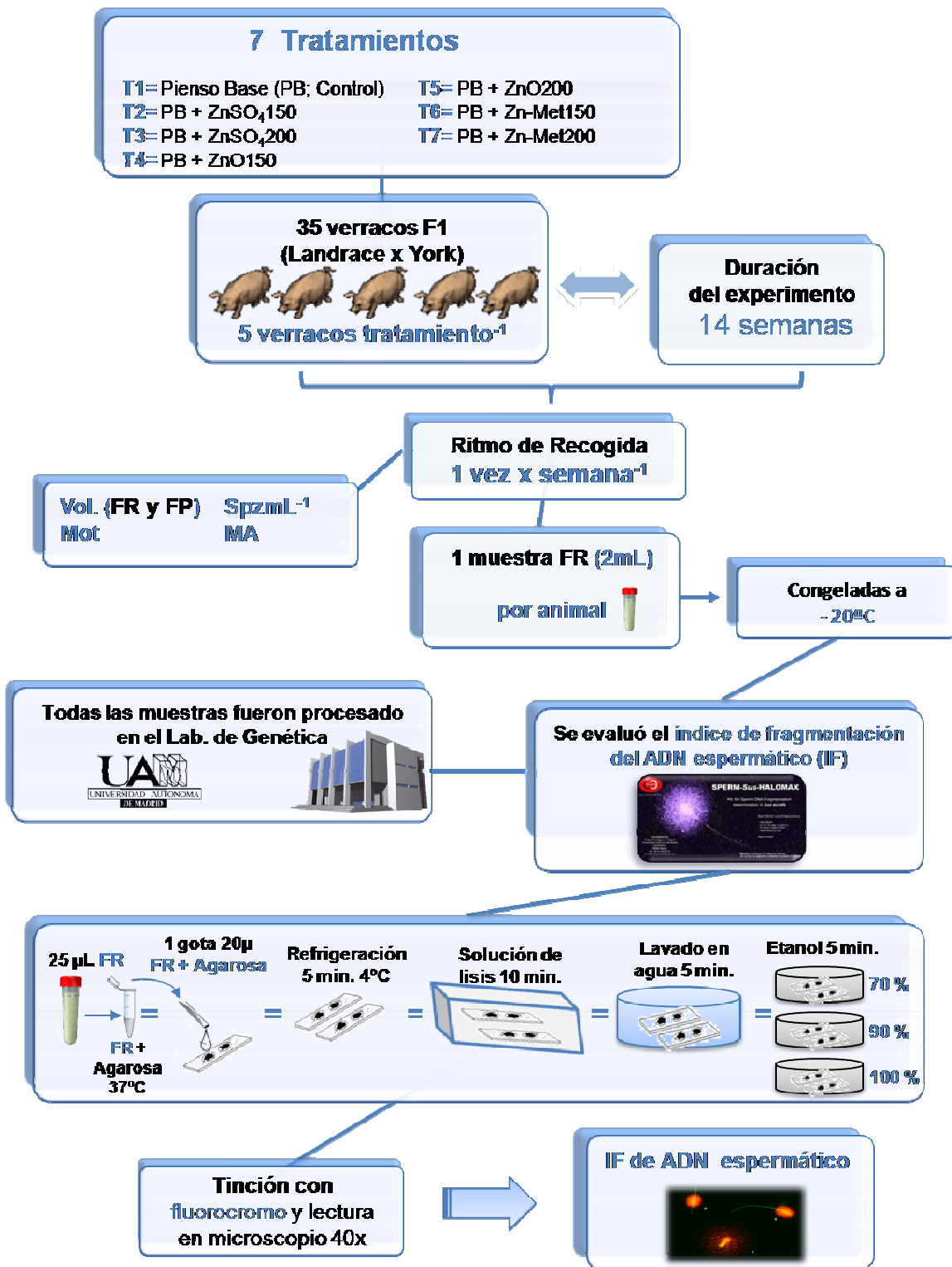
3.5.3. Experimento 3. Evaluación del estado del ADN nuclear espermático

El objetivo del Experimento 3 fue evaluar el efecto de la fuente y nivel de **Zn** en el estado que guardaba el **ADN** espermático. Se utilizaron un total de 416 muestras de **FR**.

Para ello, fueron utilizadas a partir de la semana 6 y durante 14 semanas, submuestras de la **FR** del eyaculado de los 35 verracos del Experimento 2. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Madrid.

La técnica utilizada para cumplir con este objetivo fue la descrita por **López-Fernández et al. (2007, 2008)**, la cual incluye el uso del Kit Sperm-Sus-Halomax[®] (ChromaCell SL, Madrid, Spain). Con esta técnica se obtuvieron los índices de fragmentación del **ADN** espermático (**IF**) por semana y tratamiento.

Para ello se tomaban 25 µl de una muestra de **FR** la cual era diluida con **PBS**, hasta llegar a una concentración de 2×10^6 **Spz mL⁻¹**, y posteriormente se procedía a realizar la metodología descrita en la sección **3.4.4**.



Esquema 4. Representación del Experimento 3.

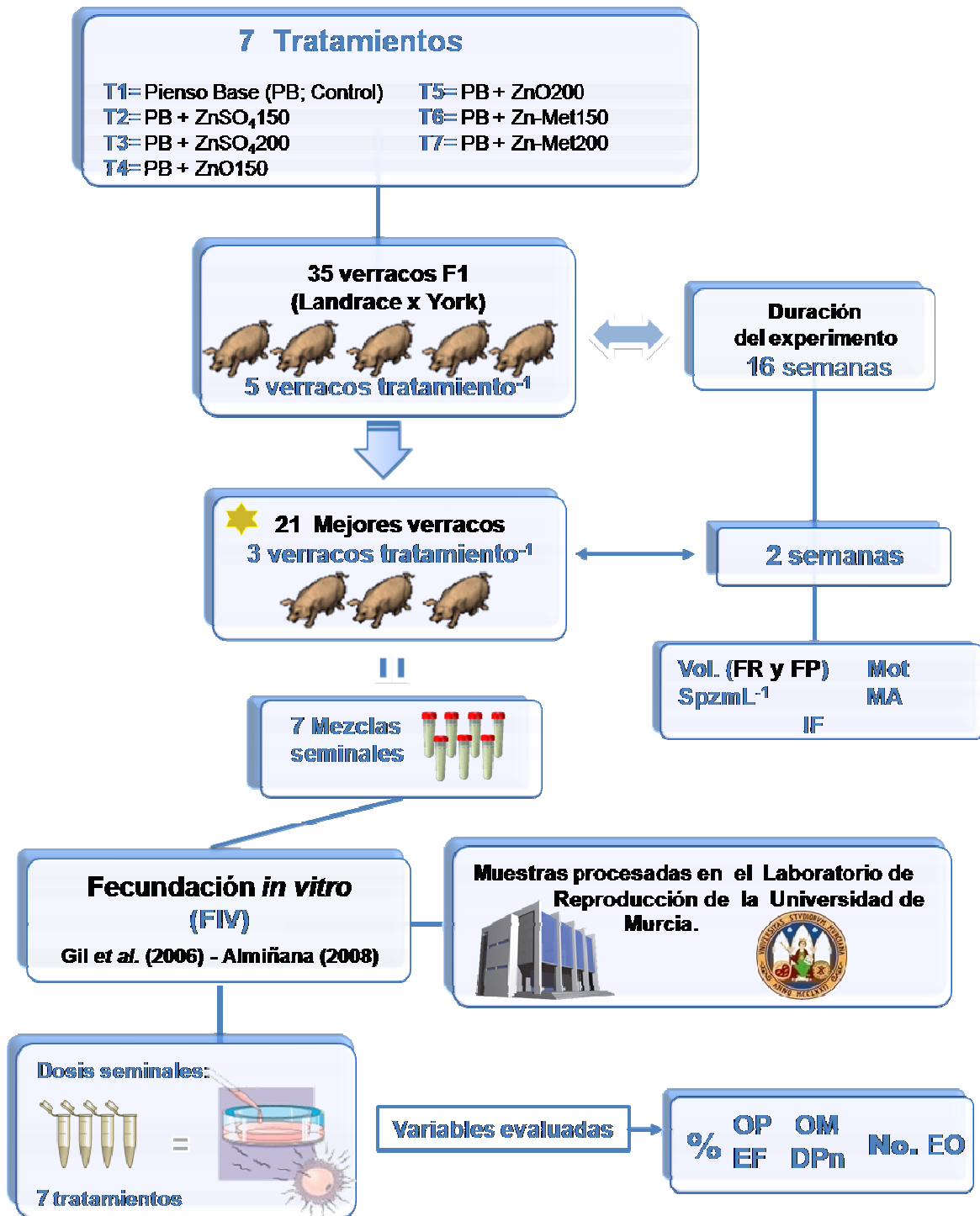
3.5.4. Experimento 4. Evaluación de la capacidad fecundante *in vitro* (FIV) de espermatozoides de verracos tratados con diferente fuente y nivel de Zn

Para estudiar el efecto de la fuente y nivel de **Zn** incluido en el pienso de los verracos en la capacidad fecundante de los espermatozoides, se realizó un experimento con ovocitos de cerda prepúberes en el laboratorio de Reproducción del Hospital de Enseñanza Veterinaria de la Universidad de Murcia. Se utilizaron 14 dosis seminales (2 por tratamiento) y un total de 1160 ovocitos.

La técnica utilizada fue la descrita por **Gil *et al.* (2006)** y modificada por **Almiñana (2008)** la cual esta mencionada en este Capítulo en la sección **3.4.5**. Este experimento se realizó durante la semana 15 y 16 de eyaculación de los 35 verracos utilizados en el Experimento 2. Utilizando la información previa (14 semanas) de la calidad seminal que producían dichos verracos se procedió a seleccionar a los tres mejores de cada tratamiento. Lo que permitió elegir 21 animales, eliminando el efecto individual del verraco, buscando con ello que los resultados mostraran la capacidad de penetración de los espermatozoides que les debió conferir el tratamiento.

Un mL de cada **FR** fue tomado con una micropipeta, y colocado en el tubo plástico estéril con tapa de 20 mL de capacidad, el cual contenía 17 mL de medio de conservación **BTS**. De esta manera se obtuvieron 7 mezclas de **FR** por semana, las cuales correspondieron a una por tratamiento y con ellas se produjo cada una de las dosis seminales que fueron utilizadas en un tiempo no mayor a 10 h en la técnica de **FIV**. En este experimento fue utilizada una dosis de mezcla seminal de cada tratamiento por semana.

La producción de las dosis seminales fue realizada como se explicó en la sección **3.4.5.1**. Con ellas se inseminaron los ovocitos seleccionados para este experimento. En cada semana se incluyó una media de 88 ovocitos por tratamiento, distribuyéndolos aleatoriamente en cuatro cajas de Petri y colocando 22 ovocitos en cada una de ellas. Fueron evaluadas las variables de **FIV** que se muestran en la **Tabla 14**.



Esquema 5. Representación del Experimento 4.

3.5.5. Experimento 5. Evaluación de la concentración de Zn en tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (PS) y sedimento espermático (SE)

En la semana decimo novena se llevaron los verracos al matadero frigorífico ESFOSA, Vic, en Barcelona. Se obtuvieron por disección el paquete de órganos sexuales de los 35 verracos. Los testículos fueron separados de los epidídimos y limpiados de los restos de membranas y tejidos adheridos.

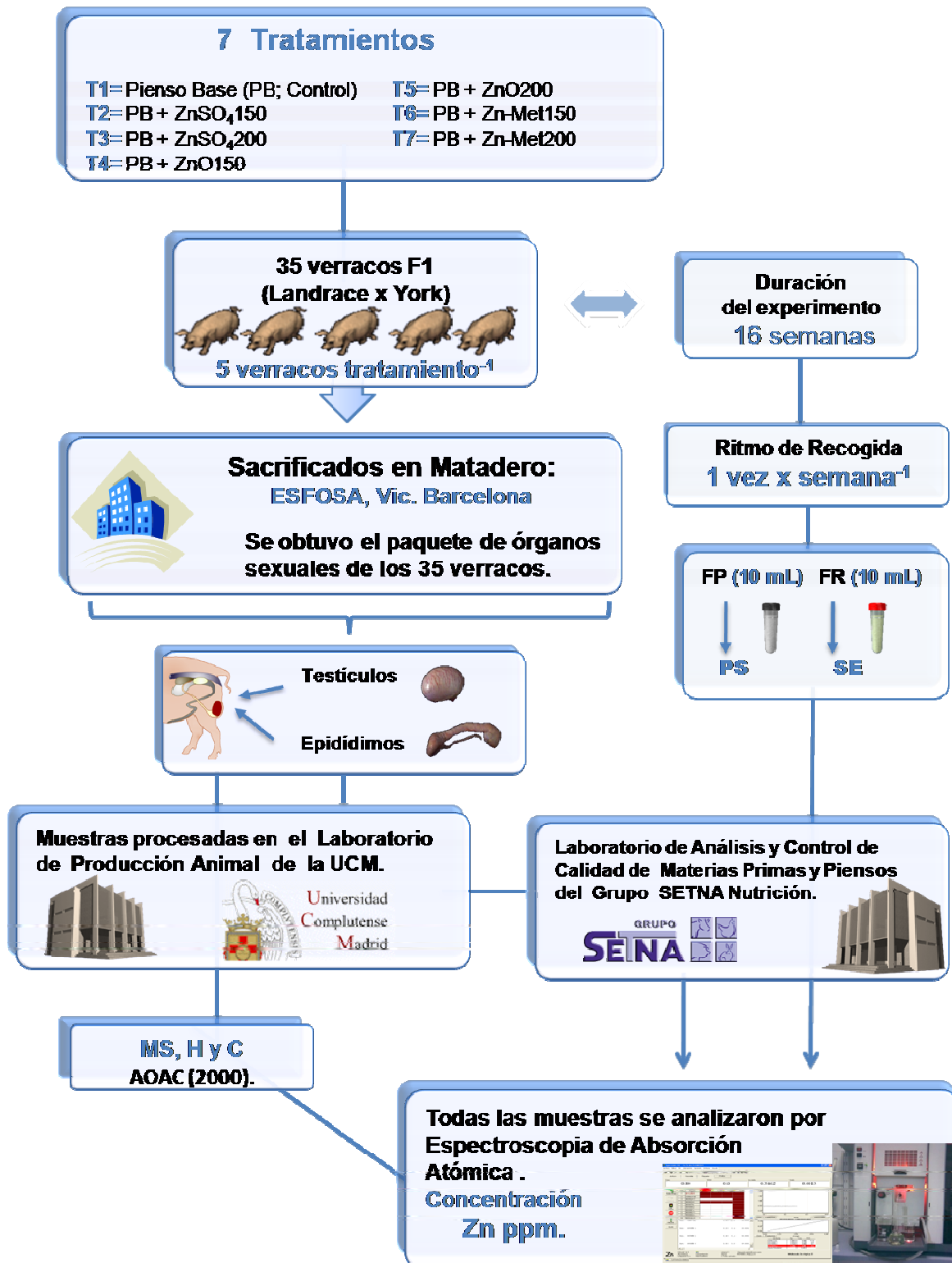
Para la realización de este experimento se procedió a utilizar la técnica oficial de la **AOAC (2000)**. De cada testículo fue tomada una muestra como se describió en la sección **3.4.6.1**, obteniéndose el porcentaje de **MS**, **H** y **C** que contenían cada uno de los 70 testículos y 70 epidídimos de acuerdo con la metodología antes descrita (sección **3.4.6.1.1**).

Una vez obtenidas las **C**, se realizaron las diluciones según la metodología señalada en la sección **3.4.6.2.1.1** y **3.4.6.2.1.2**.

Para la obtención de las muestras de **PS** y **SE**, se siguió la metodología descrita en la sección **3.4.6.1.2** y **3.4.6.1.3** respectivamente. Un total de 490 muestras de **PS**, y 157 de **SE** se digirieron con base en la metodología que se anota en la sección **3.4.6.2.1.3**, para el **SE** y en la sección **3.4.6.2.1.4** para el **PS**.

La lectura de espectrofotometría fue realizada con la metodología descrita en la sección **3.4.6.2.2**.

Los **AEAA** permitieron determinar la dinámica que tuvo la concentración de **Zn** en el **SE (ZnSE)** durante cinco semanas (semana 12 a 16) y de 16 semanas para el **ZnPS**.



Esquema 6. Representación del Experimento 5.

3.6. Análisis estadísticos de los resultados

Para realizar los análisis de resultados se utilizó el paquete estadístico **SAS** (Statistical Analysis Systems 2003, SAS/ STAT User's Guide, Release 9.0, Inst. Inc, Cary NC, USA).

El objetivo general de la investigación fue determinar el efecto de la fuente y nivel de **Zn** en la eficiencia reproductiva de verracos. Para ello se probaron durante un total de 19 semanas, siete tratamientos los cuales se pueden observar en la **Tabla 6**. Durante estas semanas se desarrollaron cinco experimentos.

Se utilizaron 35 verracos, considerándolos como unidades experimentales, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en las jaulas que se utilizaron para alojarlos, posteriormente se asignaron de la misma manera los tratamientos a cinco verracos que constituyeron las repeticiones de cada tratamiento.

Antes de realizar el análisis de la varianza para un modelo de efectos mixtos con los modelos propuestos en cada experimento, se probaron las estructuras de covarianza de los datos de cada variable: Componentes de varianza (**VC**), Simetría Compuesta (**CS**), Autoregresiva (**AR1**) y No estructurada (**UN**), y se seleccionó la mejor de acuerdo a los criterios de información de Akaike (**AIC**) y el criterio Bayesiano de Swarz (**BIC**) según el valor mínimo obtenido.

Para probar los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza del modelo, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett respectivamente. Las variables que no cumplieron estos supuestos fueron transformadas a arco seno de $\sqrt{Y+1}$ y logaritmo natural de Y según se distribuyeran los datos como una binomial o como un función exponencial, buscando cumplir con las suposiciones del modelo mencionadas.

En el caso de las variables expresadas en escalas débiles o que no cumplieran las suposiciones de distribución normal de las observaciones se recurrió a la estadística no paramétrica, aplicando la prueba de U-Mann-Withney, cuando se compararon únicamente dos medias y la prueba de Kruskal-Wallis cuando se tenían más de dos medias independientes.

En el análisis de comparaciones múltiples de medias, utilizando variables continuas, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples denominada Diferencia Honesta Significativa, también conocida como Prueba de Tukey. Así mismo, se usó la prueba ajustada de Tukey (Adjusted Tukey, **SAS**) cuando se compararon medias de Mínimos Cuadrados (**LSMEANS**). Para la comparación de medias en variables expresadas como rangos se utilizó una modificación de la prueba de Tukey denominada Prueba de Nemenyi.

Antes de realizar el experimento se establecieron dos niveles de confianza (α), considerando como significativa una diferencia entre un par de medias cuando el nivel de probabilidad fue de $P < 0.05$ y altamente significativa si fuera $P < 0.01$.

De acuerdo con lo anterior, se procedió a analizar la información obtenida en cada uno de los experimentos realizados.

Los valores de cada variable fueron analizados con un Diseño Completamente al Azar (**DCA**) con medidas repetidas en tiempo, utilizando el **PROC MIXED de SAS**, en el cual el modelo incluyó los efectos fijos del tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento*tiempo, así como los efectos aleatorios de animal y error, con este procedimiento se analizaron las diferencias entre verracos a lo largo del periodo de estudio (19 semanas) y entre verracos dentro de periodo. También fue incluido el análisis del efecto del nivel y fuente y la interacción de los mismos.

En particular las variables **CC**, **CL**, **GP**, **GD**, e **IF** fueron analizadas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, debido a la escala empleada para su valoración.

Para analizar los resultados de **FIV** se utilizó un análisis de comparaciones preplaneadas entre grupos de tratamientos [Comparaciones ortogonales de tratamientos o Contrastes ortogonales (**C1**, **C2**, **C3**...**C6**)]. Para ello, se consideró la estructura factorial de tratamientos 3 x 2 (fuentes x niveles) + un testigo, estableciendo seis contrastes (**C1**: Control vs Fuentes de Zinc; **C2**: Fuentes inorgánicas vs Fuente orgánica; **C3**: $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ vs ZnO ; **C4**: $\text{ZnSO}_4 150$ vs $\text{ZnSO}_4 200$; **C5**: $\text{ZnO} 150$ vs $\text{ZnO} 200$; **C6**: Zn-Met150 vs Zn-Met200).

También se probó el grado de asociación entre las variables morfométricas testiculares, y las variables **PT**, **PE**, **PV**, así como entre las variables **PT**, **Spz mL⁻¹** y **VT**, y el **PE**, **FP** y **VT**, estimando el coeficiente de correlación (**r**).

Para establecer relaciones causa-efecto se utilizó un modelo de regresión lineal múltiple, con el **PROC GLM** (modelo lineal general) de **SAS**, estimando los coeficientes (β 's) para las variables **IF**, **ZnSE**, **SpzO**, **FIV**, **OM**, **DPn**, **Mot**, **MA** e **IAC**.

En la selección de las variables para ser incluidas en el modelo de regresión se utilizó el procedimiento de regresión por pasos (**PROC STEPWISE**) del programa **SAS**.



4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos

Los verracos utilizados para obtención de dosis seminales, deben ser cuidadosamente mantenidos durante su estancia en centros de inseminación. En una evaluación semanal se considera pertinente analizar el peso corporal inicial (**PI**), ganancia de peso semanal (**GPS**), o al menos la condición corporal (**CC**), con objeto de detectar la existencia de posibles problemas en los verracos que puedan alterar la calidad seminal. Para ello, es necesario considerar el consumo de alimento suministrado (**CPD**) y el ritmo de trabajo (**IE**) al que son sometidos. Los resultados obtenidos de esta evaluación productiva se presentan en la **Tabla 16**.

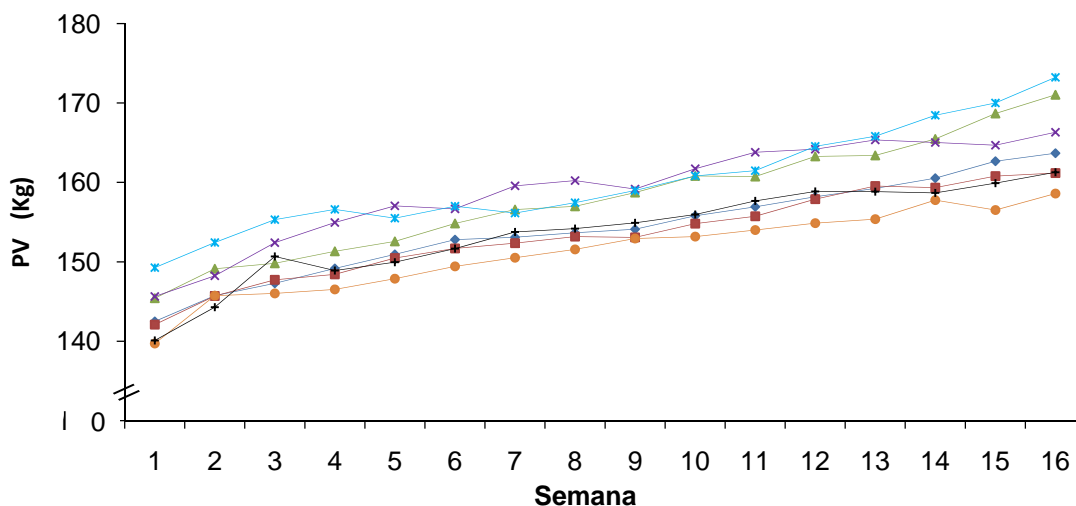
Tabla 16. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de variables relacionadas con el comportamiento productivo de verracos alimentados con piensos que contenían diferentes fuentes y niveles de **Zn**.*

Tratamiento	Variables					
	PI	PF	GPS**	CPD**	CC*	IE
	Kg	Kg	g	Kg	Grado	Día
Control	142.48	166.87	1.410	2.016 ^a	2.69 ^c	6.36 ^b
ZnSO ₄ 150	142.48	162.63	1.260	1.943 ^{ab}	2.83 ^{bc}	7.38 ^a
ZnSO ₄ 200	145.40	168.38	1.680	1.870 ^b	3.09 ^b	6.87 ^{ab}
ZnO150	145.64	166.77	1.610	1.850 ^b	3.45 ^a	7.09 ^{ab}
ZnO200	149.25	170.86	1.690	1.903 ^b	3.05 ^b	6.76 ^{ab}
Zn-Met150	139.70	162.81	1.320	1.910 ^b	2.83 ^{bc}	6.43 ^{ab}
Zn-Met200	140.80	166.71	1.480	1.923 ^b	2.89 ^b	6.25 ^b
EEM	2.99	3.24	0.260	0.02	0.04	0.22
Probabilidad (P = F)	0.33	0.63	0.91	0.0001	0.0001	0.001

*Comportamiento productivo de verracos (n=35): Peso inicial (**PI**); peso final (**PF**); ganancia de peso semana⁻¹ (**GPS**); consumo de pienso día⁻¹ (**CPD**); condición corporal (**CC**); intervalo entre eyaculados (**IE**). Periodo de evaluación: 16 semanas. Error estándar (**EEM**). **Las variables **GPS** y **CPD** fueron analizadas utilizando como covariable el **IE** y para **PF** se utilizó como covariable el **PI**. ^{a,b} Medias con distinto superíndice en columna son diferentes (P = F).

La edad media de los verracos al inicio de la prueba biológica fue de 8.5 meses. El **PI** no mostró diferencias ($P = 0.33$) entre tratamientos. Sin embargo, para incrementar la precisión en la evaluación de tratamientos, el **PI** fue incluido como covariable en el modelo estadístico. Las medias de mínimos cuadrados de **PF** no mostraron diferencias entre tratamientos ($P = 0.63$). El tratamiento ZnSO_4150 mostró el **PF** más bajo con 162.63 Kg, siendo $\text{ZnO}200$ el que produjo mayor peso (170.68 Kg) en los verracos al finalizar la prueba.

La **GPS** no mostró diferencias ($P = 0.91$) entre tratamientos (**Tabla 16**), aunque se puede observar un mayor valor en los tratamientos que contenían como fuente ZnO y en el tratamiento ZnSO_4200 . El aumento osciló entre 180 a 400 g de **GPS**. Por su parte, la evaluación de la interacción Tratamiento*Tiempo, no arrojó diferencias dentro de tratamientos ($P = 0.23$) durante las 16 semanas del experimento pero, identifica al ZnSO_4150 y al $\text{Zn-Met}150$ como los tratamientos con **GPS** más bajos, siendo el $\text{ZnO}200$ el de mayor ganancia media durante 8 semanas (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Peso vivo (**PV**) por tratamiento durante el periodo evaluado. Las líneas representan medias semana⁻¹: Control ◆; ZnSO_4150 ■; ZnSO_4200 ▲; $\text{ZnO}150$ ×; $\text{ZnO}200$ *; $\text{Zn-Met}150$ ●; $\text{Zn-Met}200$ +. Error estándar de la media (**EEM**): **PV** (**EEM**, 3.54, $n=551$); **CC** (**EEM**, 0.23, $n= 551$). Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS**. ($P = 0.23$).

El **CPD** en los verracos del tratamiento Control fue mayor ($P = 0.0001$), con respecto al resto de los tratamientos, a excepción del $ZnSO_4150$. Estos dos tratamientos fueron los de mayor consumo durante la prueba, al menos 87.5 ± 26.5 g más por día (media \pm **DE**), mientras que el $ZnO150$ (1.850 Kg día⁻¹) fue el menos consumido, siendo notoria la diferencia (≈ 166 g día⁻¹) con respecto al Control (2.016 Kg día⁻¹) (**Tabla 16**).

Los tratamientos que incluyeron alguna fuente y nivel de **Zn** fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$), pero numéricamente diferentes entre ellos en el **CPD**, al menos 93 g de pienso día⁻¹.

Los verracos tuvieron **CPD** diferentes durante el periodo evaluado, que oscilaron entre 285 a 628 g día⁻¹ ($P = 0.0001$). El consumo de los verracos de los tratamientos Control y $ZnO150$ durante el periodo evaluado, se mantuvo por encima de todos los tratamientos y no mostró diferencias ($P > 0.05$).

La **CC** observada en los verracos con el sistema de alimentación utilizado en este experimento, generó diferencias entre tratamientos ($P = 0.0001$) (**Tabla 16**). Los verracos del tratamiento Control tuvieron una **CC** media de 2.69 , siendo este valor más bajo que los demás tratamientos ($ZnSO_4200$, $ZnO150$, $ZnO200$ y $Zn-Met200$). Mientras que el tratamiento $ZnO150$, mostró el grado de **CC** (3.45) más alto.

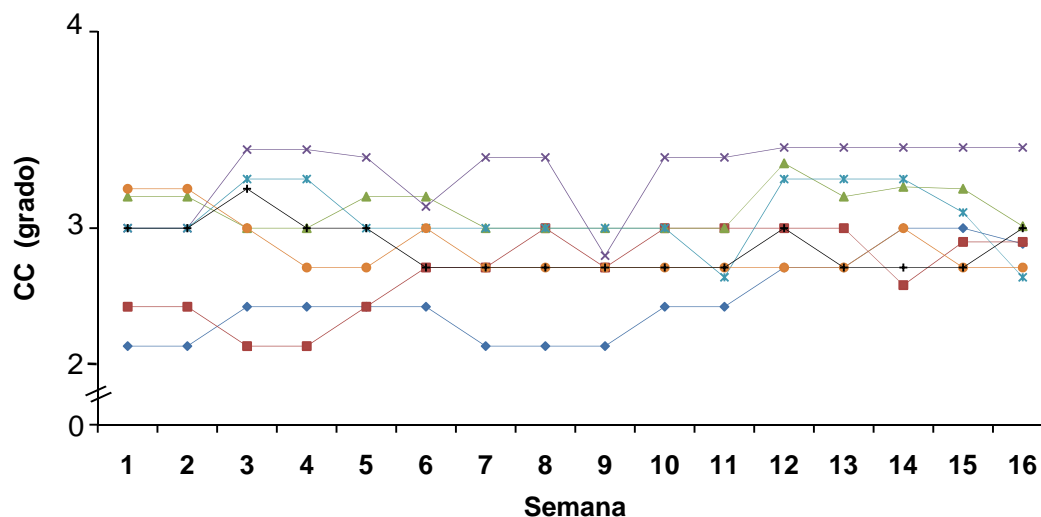
En la **Tabla 17**, se observa que ningún tratamiento tuvo animales con **CC** 1 o/y 5. Además, destaca el hecho que de 529 evaluaciones realizadas de **CC** durante esta etapa, el tratamiento Control con una frecuencia del 6.24% , el $ZnSO_4150$ con un 3.02% y el $Zn-Met150$ con un 3.02% tuvieron mayor número de animales con **CC** 2. El $Zn-Met200$ registró la mayor frecuencia de animales con grado 3 y el tratamiento $ZnO150$ presentó verracos con grado 4, con una frecuencia de 5.1% . Mientras que en el tratamiento $ZnSO_4150$ no se presentó ningún animal con grado 4.

Tabla 17. Efecto de la fuente y nivel de **Zn** en la condición corporal (**CC**) y la frecuencia de presentación (%) en verracos.

Tratamiento	Frecuencia de presentación del grado de CC tratamiento ^{-1**}			
	2	3	4	n
Control	6.24	7.94	0.76	79
ZnSO ₄ 150	3.02	11.15	0.0	75
ZnSO ₄ 200	0.38	14.56	2.08	90
ZnO150	0.57	6.24	5.1	63
ZnO200	0.76	9.64	1.32	62
Zn-Mer150	3.02	10.78	1.32	80
Zn-Met200	2.08	12.48	0.57	80
EEM	1.55	1.48	1.56	
%	16.07	72.78	11.15	100
n	85	385	59	529

*Medias de mínimos cuadrados ± error estándar (**EEM**). Período de evaluación: 16 semanas. Las medias fueron obtenidas utilizando como covariable el **IE**. **No existieron valores para la condición corporal (**CC**) con grado 1 y 5. **n** = Valores de evaluaciones de **CC** por tratamiento ($n = \sum \text{tratamiento}^{-1} \text{ grado de CC}^{-1}$). **n** = Observaciones por grado de **CC**⁻¹.

En la **Gráfica 2**, se observa que la mayor variación entre tratamientos en relación a la **CC** ocurrió en las primeras nueve semanas, en las cuales el Control y Zn-Met150 tuvieron **CC** inferiores al grado 3. Caso contrario ocurrió con ZnO150 ya que, durante 12 semanas se mantuvo con una **CC** mayor al grado 3.



Gráfica 2. Evaluación de la condición corporal (**CC**) por tratamiento durante el período evaluado. Las líneas representan medias semana⁻¹: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 X; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Error estándar de la media (**EEM**) = 0.23; **n** = 551. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS** (P = 0.94).

El coeficiente de correlación estimado entre las variables **GPS** y **CC**, fue bajo ($r = 0.40$; $P = 0.0001$), indicando que al incrementarse la **GPS** aumenta la **CC** y que la asociación entre **CPD** y **CC** es negativa, pero este coeficiente es bajo ($r = -0.29$).

Con respecto al **IE** en la **Tabla 16**, se muestran las diferencias entre tratamientos ($P = 0.001$), en donde el tratamiento con mayor **IE** correspondió al $ZnSO_4$ 150 con 7.38 días, siendo diferente al tratamiento Control (6.36 días) y al Zn-Met200 (6.25 días). En el resto de tratamientos no se apreciaron diferencias ($P > 0.001$).

Los resultados de la medición de la región escrotal para obtener el **SCTD** y **SCTI**, no registraron diferencias significativas entre tratamientos ($P = 0.09$ y $P = 0.22$ respectivamente) (**Tabla 18**). La **SCTT** siguió el mismo comportamiento de crecimiento testicular que de forma individual ($P = 0.06$). Bilateralmente, los testículos mostraron mayor desarrollo (≈ 1.26 a 2.35 cm) con la fuente $ZnSO_4 \cdot H_2O$ que al utilizar Zn-Met con ambos niveles de **Zn**.

Al evaluar los tratamientos en un mismo punto del tiempo para **SCTD** y **SCTI**, se apreciaron diferencias ($P = 0.0001$) (**Tabla 18**). Sin embargo, la interacción Tratamiento * Tiempo sólo mostró diferencias ($P = 0.02$) para el **SCTI** (**Gráfica 3b**). Por otra parte, el crecimiento que muestra la **SCTD** y **SCTI** en todos los tratamientos es similar, a excepción del Zn-Met200. Los testículos de los verracos del Zn-Met200 crecieron por debajo de la media general (**Gráfica 3a, b**).

El **LTD** no reflejó diferencias entre tratamientos ($P = 0.12$). Las diferencias entre el tamaño más grande de **LTD** ($ZnSO_4$ 200, 24.28 cm) y el más pequeño (Zn-Met200, 22.07 cm) fue de 2.21 cm. Es destacable que el **LTI** de ambos tratamientos sí fueron diferentes ($P = 0.05$) (**Tabla 18**). El resto de tratamientos no mostraron diferencias en ambas características ($P > 0.05$). Por su parte, el efecto tiempo favoreció significativamente el crecimiento longitudinal de la región escrotal (**LTD, LTI**) ($P = 0.0001$) pero este fue homogéneo durante toda la prueba (interacción Tratamiento*Tiempo) por lo que no reveló diferencias en ambas variables (**LTD**, $P = 0.21$; **LTI**, $P = 0.32$) (**Gráfica 4**).

Tabla 18. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto de pienso con diferente fuente y nivel de **Zn** en el tamaño de la región escrotal (testículo + epidídimo) de verracos.*

Tratamiento	Variables					
	SCTD	SCTI	SCTT	LTD	LTI	PV
	cm	cm	cm	cm	cm	Kg
Control	12.52	12.52	23.33	23.06	23.04 ^{ab}	154.14
ZnSO ₄ 150	12.34	12.33	23.41	22.93	23.46 ^{ab}	153.37
ZnSO ₄ 200	13.07	12.92	24.82	24.28	24.45 ^a	158.04
ZnO150	12.70	12.27	23.55	23.90	23.92 ^{ab}	159.06
ZnO200	12.18	12.06	23.12	22.46	22.56 ^{ab}	160.18
Zn-Met150	11.77	11.69	21.90	22.94	23.00 ^{ab}	151.28
Zn-Met200	10.47	10.8	20.08	22.07	22.44 ^b	153.72
EEM	0.60	0.58	1.02	0.57	0.47	3.12
	Probabilidad (P = F)					
Tratamiento	0.09	0.22	0.06	0.12	0.05	0.37
Tiempo	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Tratamiento*Tiempo	0.38	0.02	0.67	0.21	0.32	0.45

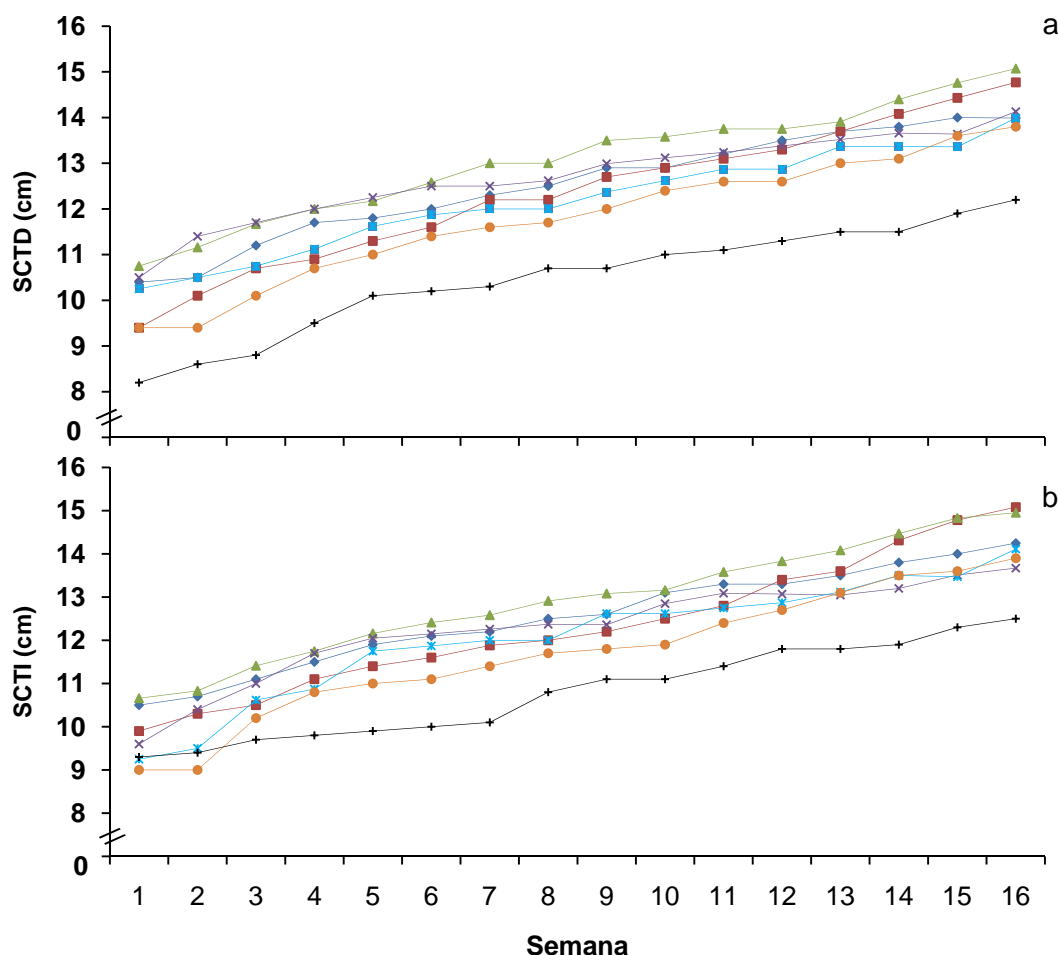
*Valores tomados de la región escrotal *in vivo* (incluye epidídimo y testículo). Verracos evaluados 35 (**n**). Periodo de evaluación: 16 semanas. Evaluaciones variable⁻¹ = 529. Semicircunferencia testicular derecha (**SCTD**); semicircunferencia testicular izquierda (**SCTI**); semicircunferencia testicular total (**SCTT**); longitud testicular derecha (**LTD**); longitud testicular izquierda (**LTI**); peso vivo del verraco (**PV**). ^{a,b} Medias con distinto superíndice en columna son diferentes (P < 0.05).

En las **Gráficas 4a** y **4b**, se refleja la longitud de la región escrotal (**LTD**, **LTI**), medida semanalmente en los tratamientos, observando que el comportamiento de ZnSO₄200 y Zn-Met200, fue distinto ya que el primero a partir de la quinta semana superó a todos los tratamientos, en tanto que el segundo se mantuvo por debajo de la media general, durante toda la prueba.

Las correlaciones realizadas entre las características **SCTD** y **SCTI** con el **PV**, muestran que en todos los tratamientos están correlacionadas significativamente (P = 0.0001), excepto con el ZnSO₄150 y Zn-Met200 (P > 0.05) (**Tabla 19**).

Los valores de correlación estuvieron en un intervalo de **r** = 0.32 a **r** = 0.79, siendo los tratamientos con ZnO los que presentaron mayor correlación.

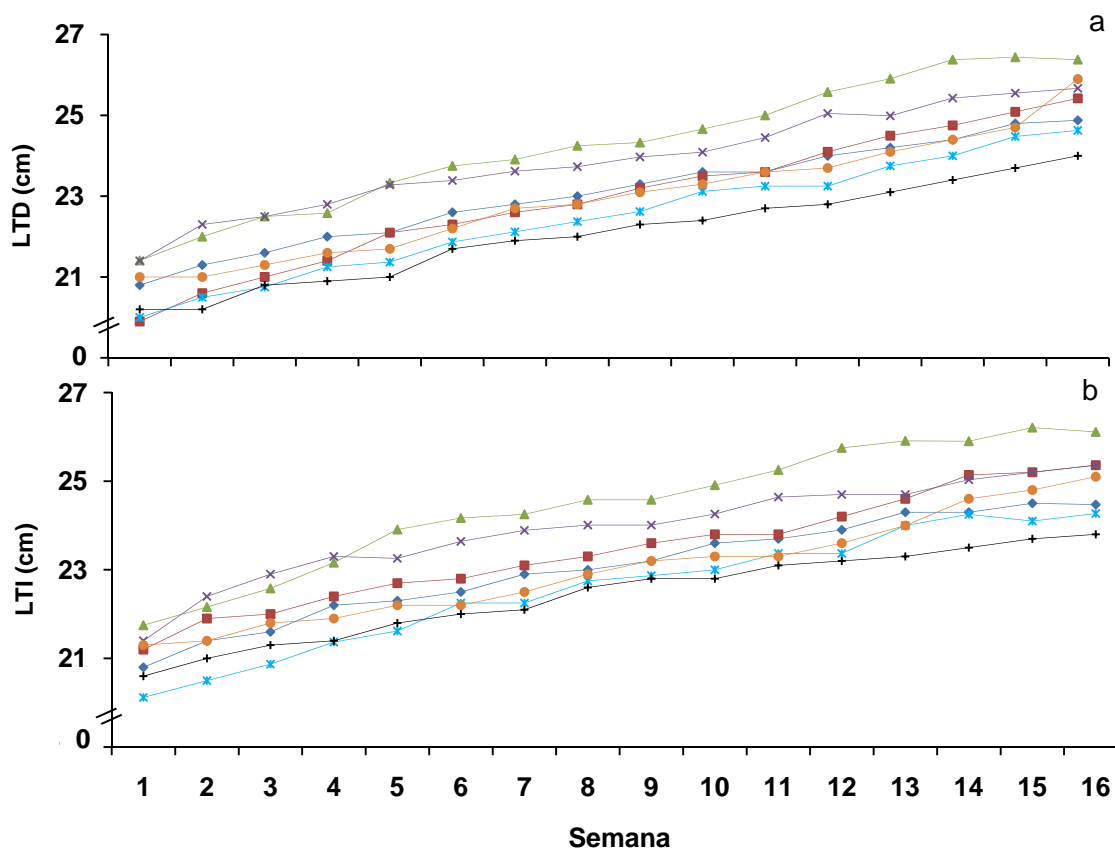
En el caso de la correlación de **SCTT** con **PV**, esta fue significativa para todos los tratamientos, y los valores de r tuvieron un intervalo de $r = 0.25$ a $r = 0.76$. El ZnSO_4150 y Zn-Met200 fueron los tratamientos en donde la correlación resultó más baja y con menor probabilidad ($r = 0.35$ y $r = 0.25$; $P < 0.05$).



Gráfica 3. Crecimiento de la semicircunferencia (**SC**) testicular por tratamiento durante el periodo evaluado. **a.** Semicircunferencia testicular derecha (**SCTD**); **b.** Semicircunferencia testicular izquierda (**SCTI**); Las líneas representan las medias semana⁻¹: Control ◆; ZnSO_4150 ■; ZnSO_4200 ▲; ZnO150 ×; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Error estándar de la media (**EEM**): **SCTD** = 0.65, $n = 529$; **SCTI** = 0.63, $n = 529$. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS**: **SCTD** ($P = 0.38$); **SCTI** ($P = 0.02$).

La longitud de ambos testículos (**LTD** y **LTI**) está correlacionada con el **PV** ($P = 0.0001$) (**Tabla 19**) pero, los valores de r mostrados por los tratamientos fueron variables ($r = 0.28$ a $r = 0.73$) para cada tratamiento.

Las medidas morfométricas de testículos y epidídimo se muestran en la **Tabla 20**. En ninguna de las características evaluadas en ambos órganos se observaron diferencias ($P > 0.05$).



Gráfica 4. Crecimiento longitudinal (LT) testicular de verracos durante el periodo evaluado: **a.** Longitud testicular derecha (LTD); **b.** Longitud testicular izquierda (LTI). Las líneas representan medias semana⁻¹: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 X; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Error estándar de la media (EEM): LTD = 0.64, n = 529; LTI = 0.53, n = 529. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS**: LTD (P = 0.21); LTI (P = 0.33).

Los valores de **PTD** fueron en promedio inferiores a los de **PTI**. Los tratamientos que registraron el peso más bajo fueron el ZnSO₄150 y Zn-Met200. Las diferencias de peso entre los tratamientos fueron de ≈50 y 68 g en el testículo derecho e izquierdo respectivamente. La longitud testicular (**LT**) de ambos lados no mostró ser distinta estadísticamente ($P = 0.93$, **LTD**; $P = 0.29$, **LTI**), pero los valores numéricos permitieron observar que entre tratamientos había al menos 0.21 cm en **LTD** y 1.22 cm en **LTI** de diferencia. El ancho testicular (**AT**) ($P = 0.23$, **ATD**; $P = 0.19$, **ATI**) y la circunferencia testicular (**CT**) ($P = 0.81$, **CTD**; $P = 0.92$, **CTI**) tampoco fueron afectadas de manera distinta por los tratamientos. La diferencia más amplia entre los valores de **ATD** y **ATI** (≈0.74 cm y 0.69 cm

respectivamente) correspondieron al ZnSO₄200 y Zn-Met200. En cuanto a la **CT**, los valores registraron una diferencia de 0.4 a 1.0 cm, siendo la **CT** más pequeña para el Zn-Met200 con 19.8 cm en la **CTD** y 20.0 cm en la **CTI**.

Tabla 19. Valores de correlación entre variables morfométricas testiculares en verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso.

Tratamiento		Variables					
		SCTD*	SCTI*	SCTT*	LTD*	LTI*	PV
Control	SCTD	1.00	0.78	0.89	0.92	0.87	0.47
	SCTI		1.00	0.79	0.84	0.84	0.55
	SCTT			1.00	0.88	0.87	0.48
	LTD				1.00	0.94	0.41
	LTI					1.00	0.28 **
	PV						1.00
ZnSO ₄ 150	SCTD	1.00	0.87	0.92	0.69	0.83	0.51
	SCTI		1.00	0.92	0.57	0.79	0.21 ^{NS}
	SCTT			1.00	0.58	0.81	0.35 **
	LTD				1.00	0.87	0.65
	LTI					1.00	0.57
	PV						1.00
ZnSO ₄ 200	SCTD	1.00	0.80	0.91	0.81	0.75	0.54
	SCTI		1.00	0.91	0.72	0.83	0.47
	SCTT			1.00	0.79	0.90	0.63
	LTD				1.00	0.90	0.63
	LTI					1.00	0.65
	PV						1.00
ZnO150	SCTD	1.00	0.91	0.90	0.87	0.84	0.58
	SCTI		1.00	0.89	0.85	0.89	0.75
	SCTT			1.00	0.86	0.85	0.62
	LTD				1.00	0.85	0.66
	LTI					1.00	0.73
	PV						1.00
ZnO200	SCTD	1.00	0.91	0.96	0.86	0.87	0.79
	SCTI		1.00	0.92	0.89	0.82	0.79
	SCTT			1.00	0.90	0.89	0.76
	LTD				1.00	0.93	0.69
	LTI					1.00	0.63
	PV						1.00
Zn-Met150	SCTD	1.00	0.77	0.91	0.90	0.82	0.34**
	SCTI		1.00	0.86	0.80	0.83	0.41
	SCTT			1.00	0.90	0.89	0.41**
	LTD				1.00	0.93	0.29**
	LTI					1.00	0.27**
	PV						1.00
Zn-Met200	SCTD	1.00	0.89	0.96	0.83	0.91	0.32**
	SCTI		1.00	0.91	0.70	0.84	0.11 ^{NS}
	SCTT			1.00	0.80	0.90	0.25*
	LTD				1.00	0.93	0.51
	LTI					1.00	0.39
	PV						1.00

Variables: Semicircunferencia testicular derecha (**SCTD**); semicircunferencia testicular izquierdo (**SCTI**); semicircunferencia testicular total (**SCTT**); longitud testicular derecho (**LTD**); longitud testicular izquierda (**LTI**); peso vivo del verraco (**PV**). *Las correlaciones entre las variables **SCTD**, **SCTI**, **SCTT**, **LTD**, **LTI** dentro de tratamientos mostraron diferencias altamente significativa ($P < 0.0001$). ** Correlación con probabilidad ($P = 0.05$). **NS** ($P > 0.05$).

Tabla 20. Medias de mínimos cuadrados \pm errores estándar de medidas morfométricas testiculares y epididimales de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de **Zn**.*

Tratamiento	Medidas morfométricas en órganos										
	Testículo									Epidídimo	
	PTD	LTD	ATD	CTD	PTI	LTI	ATI	CTI	IG	PED	PEI
	g	cm	cm	cm	g	cm	cm	cm	%	g	g
Control	311.3	11.2	7.19	20.7	317.4	11.4	7.3	20.8	0.19	81.6	86.0
ZnSO ₄ 150	274.8	11.3	7.36	20.3	305.0	11.6	7.4	20.5	0.17	84.6	84.5
ZnSO ₄ 200	303.3	11.5	7.58	20.8	336.0	12.4	7.8	20.8	0.19	89.5	91.8
ZnO150	311.3	11.5	7.29	20.7	316.0	12.0	7.6	20.8	0.19	81.2	80.6
ZnO200	321.5	11.2	7.05	20.2	328.2	11.3	7.3	20.4	0.18	82.0	83.2
Zn-Met150	325.0	11.7	7.08	20.8	342.8	11.9	7.4	20.8	0.20	86.6	88.6
Zn-Met200	276.0	11.3	6.84	19.8	314.8	11.7	7.3	20.0	0.18	70.0	74.2
EEM	18.68	0.29	0.19	0.56	22.95	0.36	0.21	0.52	0.014	5.2	5.5
Probabilidad (P = F)**	0.80	0.93	0.23	0.81	0.49	0.29	0.19	0.92	0.68	0.23	0.39

*Medidas morfométricas obtenidas de testículos y epidídimo de verracos recién sacrificados ($n = 70$). Peso testicular derecho (**PTD**); longitud testicular derecho (**LTD**); ancho testicular derecho (**ATD**); circunferencia testicular derecha (**CTD**); peso testicular izquierdo (**PTI**); longitud testicular izquierdo (**LTI**); ancho testicular izquierdo (**ATI**); circunferencia testicular izquierda (**CTI**); índice gonadosómico, peso testicular / peso vivo * 100 (**IG**); peso epididimario derecho (**PED**); peso epididimario izquierdo (**PEI**).**Probabilidad **NS** ($P > 0.05$).

Con relación al **IG** no hubo diferencias ($P = 0.68$) (**Tabla 20**) entre tratamientos, y los valores medios de los tratamientos fueron cercanos. Sin embargo, los tratamientos que sobresalieron con valores extremos en **IG** fueron el ZnSO₄150 (0.17%) y el Zn-Met150 (0.20%). El primero por haber alcanzado el valor menor, y el segundo por obtener el **IG** más alto en este experimento.

En cuanto al peso de los epidídimos (**Tabla 20**), no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos en ambos lados ($P = 0.23$, **PED**; $P = 0.39$, **PEI**). Sin embargo, las diferencias numéricas indican que estas oscilan entre 19.5 g y 17.63 g para **PED** y **PEI** respectivamente. Es interesante señalar el efecto que ejerció el tratamiento Zn-Met200 sobre el menor peso epididimario, mientras que el ZnSO₄200 favoreció un mayor peso.

Con respecto a las correlaciones encontradas entre los pesos de los testículos y epidídimos, los tratamientos se comportaron de forma distinta (**Tabla 21**). Los pesos testiculares (**PTD** y **PTI**) de los tratamientos ZnSO₄200 y ZnO150 tuvieron una correlación menor a $r = 0.5$, mientras que Zn-Met200 refleja correlaciones significativamente altas ($r = 0.73$ a $r = 0.88$) para **PTD** y **PTI**

respectivamente. El comportamiento ejercido al correlacionar los epidídimos (**PED** y **PEI**) y testículos, demuestra que tuvieron distinta correlación dependiendo del tratamiento y no todos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$). El **PED** y **PEI** está relacionado ($P < 0.05$) con el peso de los testículos sólo en los tratamientos $ZnSO_4200$, $ZnO150$ y Zn -Met en ambos niveles.

El análisis entre el peso del testículo (**PT**) y epidídimo (**PE**) con el **PF** determinó que no existe relación significativa ($P > 0.05$) entre dichas variables (**Tabla 22**).

Tabla 21. Coeficientes de correlaciones (**r**) entre las variables morfométricas testiculares y epididimarias de verracos alimentados con diferente fuente y nivel de **Zn**.

TRATAMIENTO		VARIABLES*						
		PTD	PTI	(P = F)	PED	(P = F)	PEI	(P = F)
Control	PTD	1.00	0.95	(0.01)	0.36	(0.55)	0.38	(0.53)
	PTI		1.00		0.31	(0.61)	0.40	(0.50)
	PED				1.00		0.43	(0.52)
	PEI						1.00	
$ZnSO_4150$	PTD	1.00	0.90	(0.04)	0.60	(0.29)	0.10	(0.87)
	PTI		1.00		0.54	(0.34)	0.44	(0.45)
	PED				1.00		0.47	(0.43)
	PEI						1.00	
$ZnSO_4200$	PTD	1.00	0.27	(0.09)	0.39	(0.04)	0.56	(0.06)
	PTI		1.00		0.47	(0.05)	0.75	(0.05)
	PED				1.00		0.97	(0.001)
	PEI						1.00	
$ZnO150$	PTD	1.00	0.68	(0.06)	0.48	(0.04)	0.89	(0.04)
	PTI		1.00		0.39	(0.06)	0.66	(0.05)
	PED				1.00		0.91	(0.03)
	PEI						1.00	
$ZnO200$	PTD	1.00	0.45	(0.95)	0.85	(0.15)	0.83	(0.17)
	PTI		1.00		0.25	(0.74)	0.02	(0.98)
	PED				1.00		0.95	(0.05)
	PEI						1.00	
Zn -Met150	PTD	1.00	0.98	(0.003)	0.79	(0.11)	0.86	(0.05)
	PTI		1.00		0.79	(0.11)	0.87	(0.05)
	PED				1.00		0.99	(0.001)
	PEI						1.00	
Zn -Met200	PTD	1.00	0.93	(0.02)	0.88	(0.04)	0.86	(0.05)
	PTI		1.00		0.73	(0.05)	0.91	(0.03)
	PED				1.00		0.82	(0.05)
	PEI						1.00	

*Variables: Peso testicular derecho (**PTD**); peso testicular izquierdo (**PTI**); peso epididimario derecho (**PED**); peso epididimario izquierdo (**PEI**). **Entre paréntesis ($P = F$) se muestran los valores α (Probabilidad de rechazar H_0).

Tabla 22. Coeficientes de correlaciones entre el peso vivo final (Kg) de los verracos y el peso testicular y epididimario.

Tratamiento		Variables*		
		PT	PE (P = F)	PF** (P = F)
Control	PT	1.00	0.31 (0.36)	0.13 (0.72)
	PE		1.00	0.16 (0.70)
	PV			1.00
ZnSO ₄ 150	PT	1.00	0.50 (0.14)	0.40 (0.25)
	PE		1.00	0.46 (0.17)
	PV			1.00
ZnSO ₄ 200	PT	1.00	0.53 (0.07)	0.19 (0.55)
	PE		1.00	0.14 (0.96)
	PV			1.00
ZnO150	PT	1.00	0.80 (0.005)	0.61 (0.11)
	PE		1.00	0.08 (0.84)
	PV			1.00
ZnO200	PT	1.00	0.42 (0.49)	0.38 (0.34)
	PE		1.00	0.45 (0.20)
	PV			1.00
Zn-Met150	PT	1.00	0.84 (0.002)	0.20 (0.58)
	PE		1.00	0.50 (0.13)
	PV			1.00
Zn-Met200	PT	1.00	0.90 (0.0005)	0.06 (0.87)
	PE		1.00	0.41 (0.23)
	PV			1.00

*Variables: Peso testicular (PT); peso epididimario (PE), peso final (PF). Entre paréntesis (P = F) se muestran los valores α (Probabilidad de rechazar Ho).

4.2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermiograma básico del eyaculado y de la evaluación de la integridad acrosomal

La producción y calidad del eyaculado se muestra en la **Tabla 23**. En ella se registran sus valores medios por tratamiento, la diferencia de los efectos principales y su interacción. Las variables **FR**, **FP**, **VT**, **Mot**, **CM**, **pH** y **MA** no fueron diferentes ($P > 0.05$), pero la **Spz mL⁻¹** si mostró efecto de los tratamientos aplicados ($P = 0.02$).

Tabla 23. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las variables de producción y calidad básica del eyaculado de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de **Zn**.

Tratamiento	Variables de producción y calidad seminal ¹								
	n	FR mL	FP mL	VT mL	Mot %	CM grado	pH	Spz mL ⁻¹ x 10 ⁶	MA %
Control	91	64.05	103.54	167.40	83.95	3.21	8.24	907.30 ^{ab}	3.69
ZnSO₄150	78	67.27	112.62	180.50	83.84	3.15	8.20	1114.83 ^a	3.33
ZnSO₄200	92	75.01	132.63	207.32	80.43	3.00	8.10	1006.51 ^{ab}	7.48
ZnO150	69	59.24	68.85	130.58	82.31	3.04	8.22	1073.29 ^{ab}	7.81
ZnO200	67	63.40	121.82	183.40	84.32	3.20	8.14	1081.57 ^{ab}	4.88
Zn-Met150	91	71.05	102.6	172.3	84.50	3.42	8.18	971.38 ^{ab}	3.42
Zn-Met200	89	64.59	94.76	157.91	78.98	2.95	8.26	855.07 ^b	12.28
EEM		8.15	19.71	26.93	1.80	0.14	0.04	72.12	3.34
Probabilidad (P = F)									
Tratamiento		0.85	0.38	0.55	0.15	0.21	0.13	0.02	0.56
Tiempo		0.0001	0.0002	0.0003	0.00	0.000	0.0001	0.0001	0.000
Tratamiento*					2	1			3
Tiempo		0.63	0.16	0.11	0.01	0.05	0.0002	0.0001	0.11

¹Fracción rica (**FR**); fracción pobre (**FP**); volumen total (**VT**); motilidad (**Mot**); calidad de movimiento (**CM**); concentración espermática mL⁻¹ (**Spz mL⁻¹**); morfoanomalías (**MA**). ^{a,b} Medias con distinto superíndice en columna son diferentes ($P = F$).

A pesar de no existir diferencias estadísticas en la **FR**, los tratamientos ZnSO₄200 y Zn-Met150 mostraron mayor **Vol**. Además, la utilización de **FI** (ZnSO₄·H₂O y ZnO) aumentan la producción de dicha fracción, al incrementar el

nivel de **Zn** (200 ppm). Sin embargo, la utilización de la **FO** Zn-Met a una concentración similar, manifestó un efecto inverso, disminuyendo la **FR**. Por otra parte, el tratamiento Control reflejó una media de **FR** de 64.05 mL, ligeramente superior a los tratamientos con ZnO.

En cuanto a la producción de **FP**, no existió diferencia entre el Control y los distintos tratamientos. Los resultados más bajos correspondieron al ZnO150 con 68.85 mL, seguido del Zn-Met200 con 94.76 mL y el tratamiento Control con 103.54 mL.

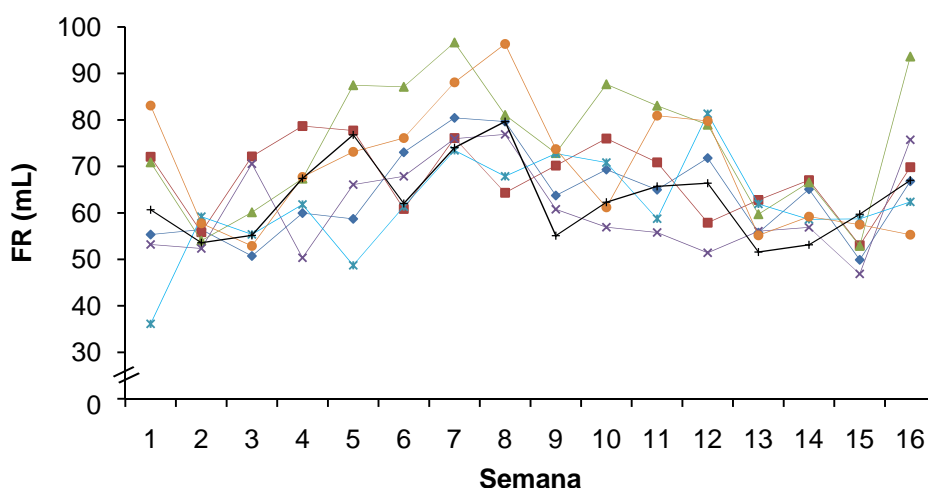
Al analizar el comportamiento de los tratamientos según la fuente y nivel de **Zn** se observa que, las **FI** con 200 ppm de **Zn**, aumentan el volumen de **FP**. Sin embargo, dicha concentración tiene un efecto negativo, reduciéndose el **Vol** cuando se utiliza la **FO**. Los resultados más altos correspondieron al tratamiento ZnSO₄200 con 132.63 mL.

En la variable **VT** no fueron significativas las diferencias entre los tratamientos ($P = 0.55$). Los valores estuvieron en el orden de 130.58 mL (ZnO150) y 207.32 mL (ZnSO₄200). Hay en los tratamientos que contenían **FI** una evidencia de aumento en el **VT** al suministrar 200 ppm de **Zn**, pero este efecto no se observó con la **FO**, ya que Zn-Met200 disminuyó el **VT**, con respecto a Zn-Met150 (172.39 vs 157.91 mL respectivamente).

Por otra parte, los tratamientos modificaron los valores de las distintas variables evaluadas durante el Tiempo que duró el experimento (**Tabla 23**) siendo significativos en todas las variables de producción y calidad seminal analizadas ($P < 0.002$). También, se muestra efecto en la interacción Tratamiento*Tiempo de las variables **Mot**, ($P = 0.01$), **CM** ($P = 0.05$), **pH** (0.0002) y **Spz mL⁻¹** ($P = 0.0001$).

Las variables **FR** ($P = 0.63$), **FP** ($P = 0.16$) y **VT** ($P = 0.11$) no fueron diferentes. La dinámica del comportamiento de estas variables durante las semanas evaluadas, se observan en las **Gráficas 5, 6 y 7**.

El patrón de comportamiento de cada tratamiento resultó distinto. Aunque se identifica a los tratamientos ZnSO₄200 y Zn-Met150 como los de mayor producción de **FR** (**Gráfica 5**). El resto de tratamientos, se mantuvieron con menor producción (<80 mL) durante las 16 semanas de evaluación.



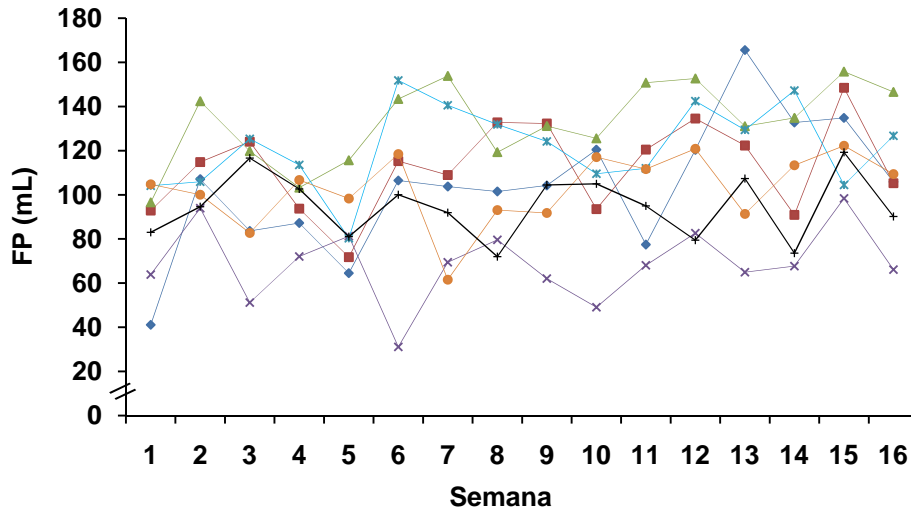
Grafica 5. Producción de la fracción rica del eyaculado (**FR**) según tratamiento: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 X; ZnO200 * ; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Las líneas representan la media tratamiento⁻¹ semana⁻¹. Error estándar de la media (**EEM**) = 11.65; n = 529. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS** (P = 0.63).

En el caso de la producción de **FP** del ZnO150 se mantuvo por debajo de los valores medios del resto de tratamientos (**Gráfica 6**), mientras que el ZnSO₄200 fue el de mayor producción de **FP** durante al menos 10 semanas de evaluación.

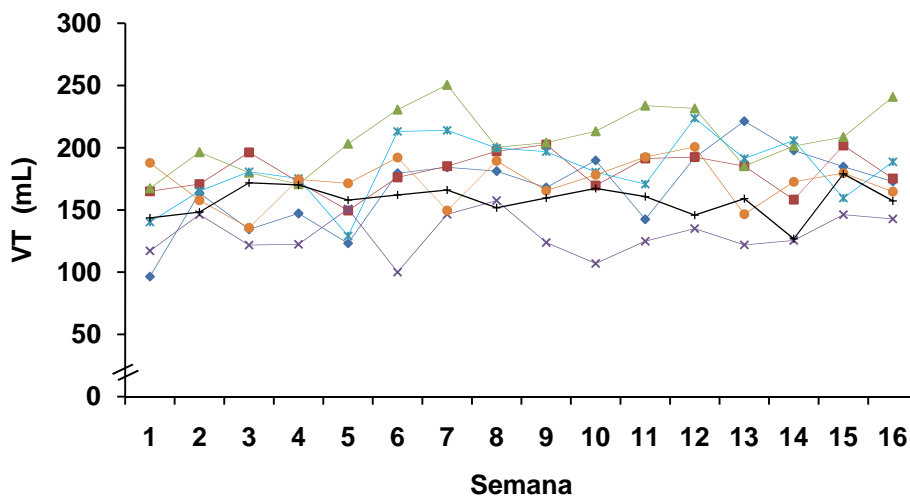
Por su parte el **VT** (**Gráfica 7**), muestra una dinámica de producción más cercana a la que muestra la **FP**, ya que esta contribuye más al **VT** que la **FR**.

Al evaluar las correlaciones entre las diferentes fracciones del eyaculado se encontraron correlaciones significativas en algunos tratamientos.

En la **Tabla 24** se describen las correlaciones entre **PT**, **Spz mL⁻¹** y **VT**. La correlación entre **Spz mL⁻¹** mostró una fuerte asociación con **PT** en ZnSO₄150 ($r = 0.77$; $P = 0.009$); mientras que la **Spz mL⁻¹** tiene una alta correlación con el **VT**, en los tratamientos Control ($r = 0.99$; $P = 0.001$) y el Zn-Met150 ($r = 0.70$; $P = 0.02$). En este último tratamiento también existió correlación entre **VT** y **PT** ($r = 0.64$; $P = 0.05$).



Gráfica 6. Producción de la fracción pobre del eyaculado (**FP**) según tratamiento: Control \blacklozenge ; ZnSO_4 150 \blacksquare ; ZnSO_4 200 \blacktriangle ; ZnO 150 \times ; ZnO 200 $*$; Zn-Met 150 \bullet ; Zn-Met 200 $+$. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹. Error estándar de la media (**EEM**) = 25.38; $n = 529$. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS** ($P = 0.16$).



Gráfica 7. Volumen total del eyaculado (**VT**) según tratamiento: Control \blacklozenge ; ZnSO_4 150 \blacksquare ; ZnSO_4 200 \blacktriangle ; ZnO 150 \times ; ZnO 200 $*$; Zn-Met 150 \bullet ; Zn-Met 200 $+$. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹. Error estándar de la media (**EEM**) = 32.30; $n = 529$. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo **NS** ($P = 0.11$).

Tabla 24. Coeficientes de correlación entre peso testicular (**PT**), concentración espermática (**Spz mL⁻¹**) y volumen total de eyaculado (**VT**) de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de **Zn**.

Tratamiento	Variable	Variable		
		PT r	Spz mL ⁻¹ r (P = F)	VT r (P = F)
Control	PT	1.00	-0.42 (0.22)	-0.37 (0.29)
	Spz mL ⁻¹		1.00	0.99(0.001)*
	VT			1.00
ZnSO ₄ 150	PT	1.00	0.77 (0.009)*	-0.43 (0.21)
	Spz mL ⁻¹		1.00	-0.47 (0.17)
	VT			1.00
ZnSO ₄ 200	PT	1.00	0.19 (0.55)	-0.28 (0.37)
	Spz mL ⁻¹		1.00	-0.38 (0.22)
	VT			1.00
ZnO150	PT	1.00	-0.04(0.90)	0.16 (0.66)
	Spz mL ⁻¹		1.00	-0.08 (0.83)
	VT			1.00
ZnO200	PT	1.00	-0.16 (0.70)	0.09 (0.83)
	Spz mL ⁻¹		1.00	-0.50(0.21)
	VT			1.00
Zn-Met150	PT	1.00	-0.14 (0.70)	0.64 (0.05)*
	Spz mL ⁻¹		1.00	0.70 (0.02)*
	VT			1.00
Zn-Met200	PT	1.00	-0.35 (0.33)	0.41 (0.23)
	Spz mL ⁻¹		1.00	-0.40(0.25)
	VT			1.00

*Entre paréntesis (P = F) se muestran los valores α (Probabilidad de rechazar H_0).

La producción seminal evaluada a través de las variables **FP** y **VT** tuvo una fuerte correlación con el **PE** (Tabla 25). En los tratamientos ZnO150 la correlación fue de $r = 0.73$ ($P = 0.015$) y $r = 0.70$ ($P = 0.025$) respectivamente. El Zn-Met mostró una correlación más estrecha entre las mismas variables ($r = 0.91$: $P = 0.0002$; y $r = 0.92$: $P = 0.0002$ en el mismo orden). Mientras que en el Zn-Met200 sólo se registró correlación entre **PE** y **VT** ($r = 0.60$; $P = 0.06$).

Por otra parte se muestra en la Tabla 25, una alta correlación (intervalo de $r = 0.7$ a $r = 0.99$; $P < 0.001$) entre **FP** y **VT** en todos los tratamientos evaluados.

Con relación a la **Mot** no hubo diferencias entre tratamientos ($P = 0.15$). El Zn-Met200 presentó los porcentajes más bajos con un 78.98%. Los resultados más altos correspondieron al Zn-Met150 y ZnO200 con un 84.50% y 84.32% respectivamente.

La **CM**, mostró la misma tendencia que la variable **Mot**, donde el Zn-Met200 registró el valor más bajo 2.95, y con 150 ppm de Zn junto con el tratamiento Control, tuvieron los registros más altos con un 3.42 y 3.21 respectivamente.

Tabla 25. Coeficientes de correlación entre peso epididimario (**PE**), volumen de la fracción pobre (**FP**) y total de eyaculado (**VT**) de verracos alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de **Zn**.

TRATAMIENTO		VARIABLE		
		PE	FP	VT
		r	r (P = F)	r (P = F)
Control	PE	1.00	0.40 (0.26)	0.40 (0.26)
	FP		1.00	0.99(0.001)
	VT			1.00
ZnSO ₄ 150	PE	1.00	0.14 (0.70)	0.30 (0.40)
	FP		1.00	0.97 (0.0001)
	VT			1.00
ZnSO ₄ 200	PE	1.00	-0.11 (0.72)	-0.09 (0.78)
	FP		1.00	0.99 (0.0001)
	VT			1.00
ZnO150	PE	1.00	0.73 (0.015)*	0.70 (0.025)*
	FP		1.00	0.97 (0.0001)
	VT			1.00
ZnO200	PE	1.00	0.081 (0.85)	0.10 (0.81)
	FP		1.00	0.98 (0.0001)
	VT			1.00
Zn-Met150	PE	1.00	0.91 (0.0002)*	0.92 (0.0002)*
	FP		1.00	0.99(0.0001)
	VT			1.00
Zn-Met200	PE	1.00	0.59 (0.70)	0.61 (0.06)*
	FP		1.00	0.98 (0.0001)
	VT			1.00

*Entre paréntesis (P = F) se muestran los valores α (Probabilidad de rechazar Ho).

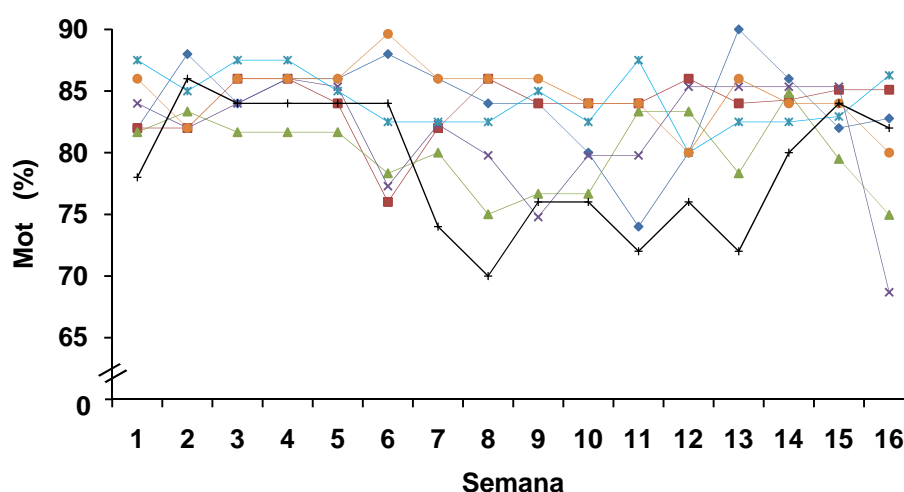
La interacción Tratamiento*Tiempo fue altamente significativa para las variables **Mot** (P = 0.01), **CM** (P = 0.05), y **pH** (P = 0.0002). Las diferencias mostradas durante las distintas semanas se observan en las **Gráficas 8 y 9**.

En las primeras cinco semanas la **Mot** se comportó de forma similar en todos los tratamientos. Sin embargo, a partir de la sexta semana los tratamientos ZnSO₄200, ZnO150, y Zn-Met200 disminuyeron la **Mot** por debajo del 80%. Además, el tratamiento Zn-Met200 no superó los valores de **Mot** mostrados durante las primeras cinco semanas, conservando porcentajes del 70% la mitad del periodo evaluado. Por su parte, el tratamiento Control, ZnSO₄150 y

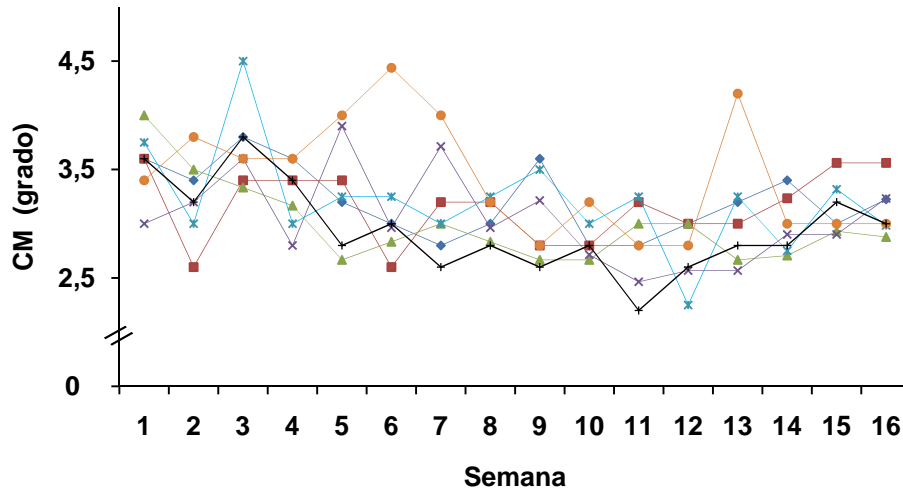
Zn-Met150, se mantuvieron constantes y los valores de **Mot** nunca fueron inferiores a 80%.

En el caso de la **CM**, el comportamiento indicó que los tratamientos variaron durante el periodo evaluado ($P = 0.05$). Se observa en la **Gráfica 9**, que existe una disminución en el grado de **CM** conforme avanzó el periodo de evaluación, lo que produjo que los tratamientos presentaran **CM** entre 2 y 3. Siendo el Zn-Met200 el que estuvo durante mayor número de semanas con una **CM** menor a grado 3.

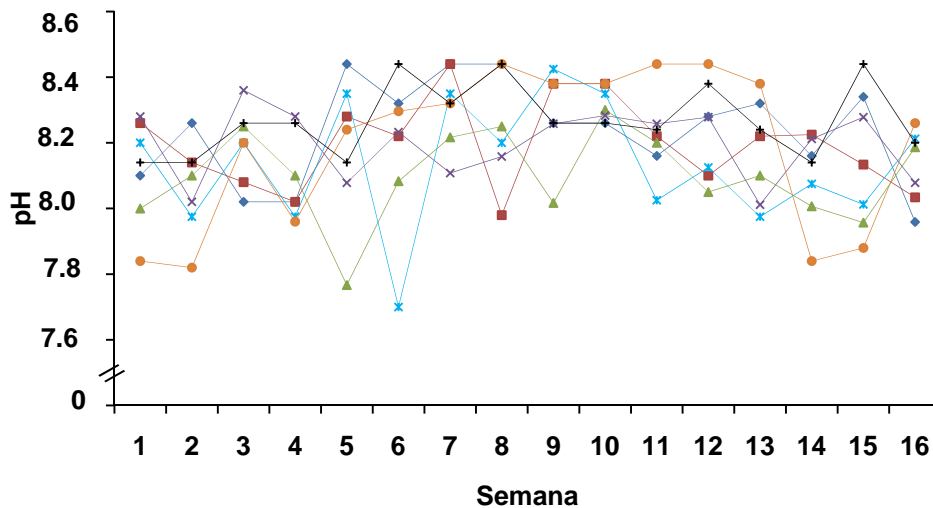
No existió diferencias entre tratamientos al analizar el **pH** ($P = 0.13$). Los valores oscilaron entre 8.10 y 8.26. Sin embargo, el **pH** mostró cambios durante el tiempo evaluado ($P = 0.0001$) y registró una interacción significativa con el tratamiento ($P = 0.0002$). En la **Gráfica 10**, se observan cambios más drásticos en los tratamientos ZnSO₄200, ZnO200, los cuales muestran cierta ciclicidad cada 5 y 6 semanas. Los valores menores fueron para estos dos tratamientos, reduciéndose hasta **pH** de 7.7. Aunque el comportamiento del tratamiento Zn-Met150 mostró valores constantes de **pH** durante 10 semanas este, ocasionó cambios drásticos del **pH** por debajo de 7.9, al inicio y final del periodo de evaluación.



Gráfica 8. Motilidad (**Mot**) según tratamiento: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 ×; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹; Error estándar de la media (**EEM**) = 3.34; **n** = 527. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo ($P = 0.01$).



Gráfica 9. Calidad de motilidad espermática (**CM**) según tratamiento: Control \blacklozenge ; ZnSO₄150 \blacksquare ; ZnSO₄200 \blacktriangle ; ZnO150 \times ; ZnO200 \ast ; Zn-Met150 \bullet ; Zn-Met200 \blackplus . Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹: Error estándar de la media (**EEM**) = 0.33; n = 527. Probabilidad de la Interacción Tratamiento*Tiempo (P = 0.05).



Gráfica 10. Valores del **pH** del eyaculado: Control \blacklozenge ; ZnSO₄150 \blacksquare ; ZnSO₄200 \blacktriangle ; ZnO150 \times ; ZnO200 \ast ; Zn-Met150 \bullet ; Zn-Met200 \blackplus . Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹: Errores estándar de la media (**EEM**) = 0.12; n = 523. Probabilidad de la Tratamiento*Tiempo (P = 0.0002).

En relación con **Spz mL⁻¹** (P = 0.02), el tratamiento ZnSO₄150 produjo la concentración más alta. Aunque el tratamiento Control no mostró diferencias con el resto de los tratamientos (P > 0.05), se aprecia una reducción de los **Spz mL⁻¹** de 17.8% cuando se compara con los tratamientos que contenían **FI**, mientras que la diferencia con el tratamientos con 150 de Zn-Met fue menor (6.62%). La **Spz mL⁻¹** se vio afectada durante el periodo de evaluación (P = 0.0001) existiendo además una interacción entre el Tratamiento*Tiempo (P = 0.0001), como se

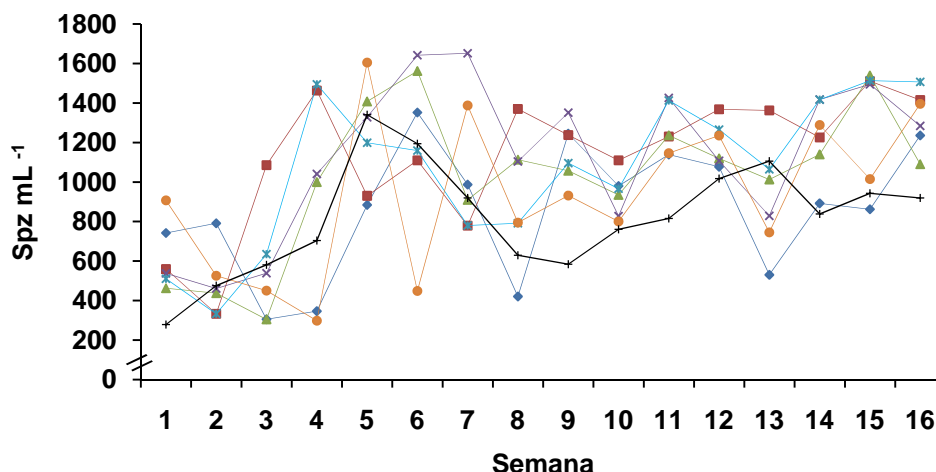
observa en la **Tabla 23** y **Gráfica 11**. De manera general, todos los tratamientos tuvieron una producción media entre 850 a 1200 x 10⁶ **Spz mL⁻¹**, exceptuando el tratamiento Zn-Met200, el cual a la mitad del periodo evaluado tuvo una producción inferior a la mostrada por el resto de los tratamientos (**Gráfica 11**), pero con una tendencia a incrementarse al final de la investigación. En el caso del tratamiento Control, la concentración fue oscilante, mostrándose durante varias semanas por debajo de la producción del resto de los tratamientos que fueron adicionados con alguna fuente de **Zn**.

En cuanto a las **MA** no se encontraron diferencias ($P = 0.56$) entre los distintos tratamientos, ni en la interacción Tratamiento*Tiempo ($P = 0.11$). Aunque durante el tiempo en que fue evaluada la variable **MA** se produjeron cambios ($P = 0.0003$).

En la **Tabla 26**, se observa el tipo de **MA (CL, GP, GD)** que se presentaron, siendo significativas las diferencias en **CL** y **GD** ($P = 0.0001$). Las **CL** producto del tratamiento ZnSO₄200 (5.79%) fueron similares ($P = 0.0001$) al Zn-Met200 (4.67%), y mayores al resto de los tratamientos. En el caso de las **GP** no existió diferencia entre los tratamientos ($P = 0.097$), y los valores no superaron el 5%.

En el caso de las **GD**, seis tratamientos mostraron valores de medias iguales ($P > 0.05$), pero el tratamiento Zn-Met200 mostró ser diferente ($P = 0.0001$) a todos ellos, ya que la producción de **GD** fue al menos duplicada con el uso de este tratamiento.

En la **Tabla 27**, se observan los resultados de los análisis de acrosomas, apreciando que los tratamientos no produjeron diferencias en **IAC** ($P = 0.43$), **AD** ($P = 0.28$), y **AR** ($P = 0.25$). Tampoco se observó que existiera un cambio en el patrón de producción de **IAC** ($P = 0.42$), **AD** ($P = 0.29$) y **AR** ($P = 0.22$) durante el tiempo evaluado.



Gráfica 11. Concentración espermática ($\text{Spz mL}^{-1} \times 10^6$) según tratamiento: Control ◆; ZnSO_4150 ■; ZnSO_4200 ▲; ZnO150 ×; ZnO200 * ; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹. Errores estándar de la media (**EEM**) = 190.38; n = 527. Probabilidad de la interacción Tratamiento*Tiempo (P = 0.0001)

La interacción Tratamiento*Tiempo (**Tabla 27**) de las variables acrosomales, también fue analizada, observando que no existía interacción en **IAc** (P = 0.11) y **AD** (P = 0.34), presentándose una tendencia (P = 0.06) de interacción Tratamiento*Tiempo en los **AR**. La dinámica del comportamiento de estas variables se observan en las **Gráficas 12a, 12b, y 13**

En general los tratamientos se presentan dentro de un intervalo de 5 a 14%. Aunque existió una tendencia a mostrarse más incrementado el porcentaje de **AR** en el tratamiento Zn-Met150 y Zn-Met200 de hasta un 20.12% y 24.22% respectivamente. Caso contrario fue observado en los tratamientos Control y ZnO150 , con un aumento al final de la evaluación del 17.72% y 17.38% respectivamente.

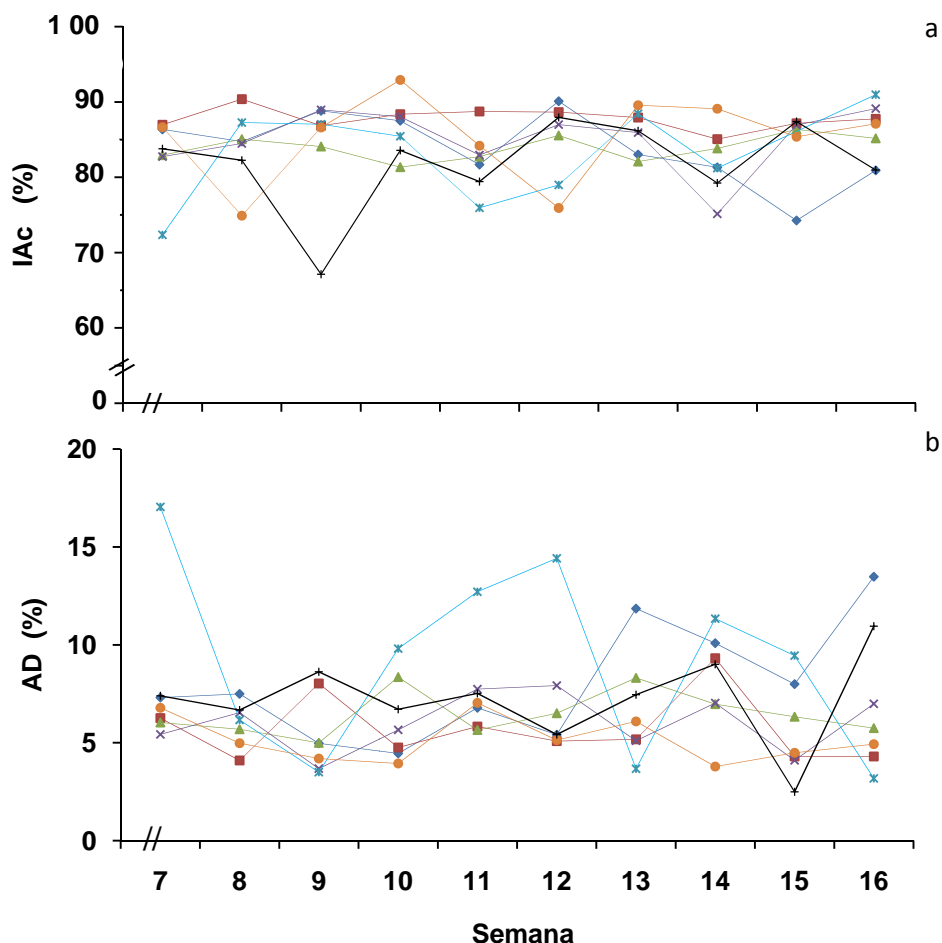
Tabla 26. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de tipo de morfoanomalías espermáticas de verracos según tratamiento.

Tratamiento	Tipo de morfoanomalía tratamiento ⁻¹		
	%		
	CL	GP	GD
Control	3.49 ^{bc}	2.21	2.29 ^b
ZnSO ₄ 150	2.82 ^{bc}	2.05	2.81 ^b
ZnSO ₄ 200	5.79 ^a	2.18	3.08 ^b
ZnO150	2.94 ^{bc}	4.10	3.90 ^b
ZnO200	3.03 ^{bc}	2.15	3.67 ^b
Zn-Met150	2.58 ^c	2.70	2.61 ^b
Zn-Met200	4.67 ^{ab}	3.56	7.48 ^a
EEM	0.50	0.41	0.46
Probabilidad (P = F)	0.0001	0.097	0.0001

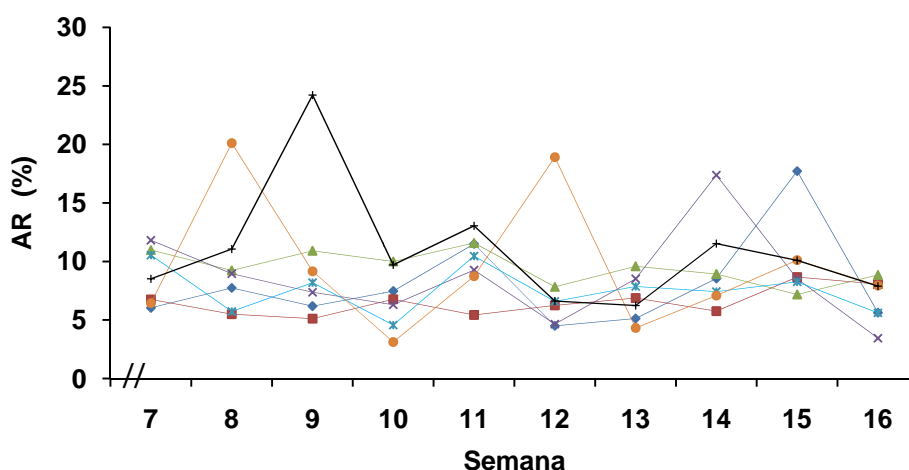
*Medias expresadas en valores originales. χ^2 , Kruskal-Wallis. Colas látigo (**CL**); gotas citoplásmicas proximales (**GP**); gotas citoplásmicas distales (**GD**).^{a,b,c} Medias con distinta literal en columna, son diferentes (P = F).

Tabla 27. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de acrosomas íntegros (**IAC**), dañados (**AD**) y reaccionados (**AR**), de espermatozoides de verraco alimentados con pienso con diferente fuente y nivel de **Zn**.

Tratamiento	Variables (%)		
	IAC	AD	AR
Control	84.82	7.34	7.75
ZnSO ₄ 150	86.89	5.77	6.94
ZnSO ₄ 200	84.10	6.27	9.44
ZnO150	86.62	5.25	8.10
ZnO200	83.01	9.47	7.24
Zn-Met150	86.19	4.93	8.85
Zn-Met200	82.89	7.12	9.88
EEM	1.90	1.17	1.24
		Probabilidad (P = F)	
Tratamiento	0.43	0.28	0.25
Tiempo	0.42	0.29	0.22
Tratamiento*Tiempo	0.11	0.34	0.06



Gráfica 12. Estado del acrosoma espermático según tratamiento: tratamiento: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 ×; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹: Integridad acrosomal (IAc) y acrosoma dañado (AD). Errores estándar de la media (EEM): IAc = 4.42; n = 321; AD = 2.55; n = 321. Probabilidad de la interacción Tratamiento *Tiempo NS: IAc (P = 0.11); AD (P = 0.34).

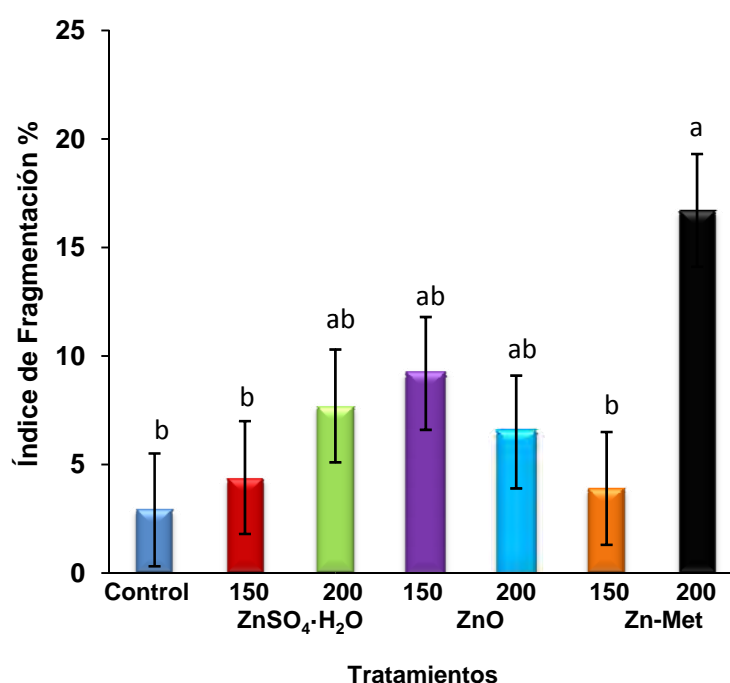


Gráfica 13. Acrosomas reaccionados (AR) según tratamiento: Control ◆; ZnSO₄150 ■; ZnSO₄200 ▲; ZnO150 ×; ZnO200 *; Zn-Met150 ●; Zn-Met200 +. Las líneas representan las medias tratamiento⁻¹ semana⁻¹. Errores estándar de la media (EEM) = 3.31; n = 321. Probabilidad de la interacción Tratamiento *Tiempo (P = 0.06).

4.3. Evaluación del estado del ADN nuclear espermático

Los tratamientos utilizados en este estudio registraron valores que no superaron el 10% de **IF**, a excepción del Zn-Met200 (**Gráfica 14**).

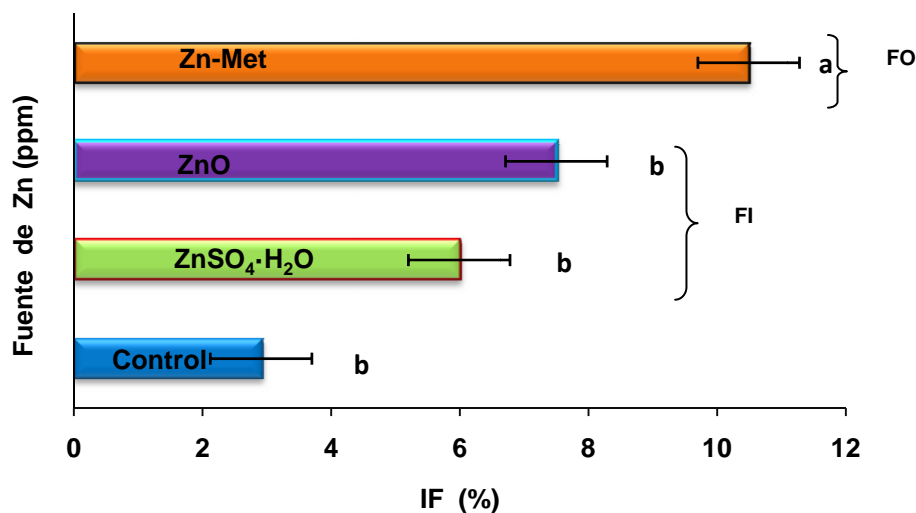
El **IF** del Zn-Met200 ($16.71 \pm 2.64\%$), fue mayor que los demás tratamientos probados, evidenciando esta superioridad ($P < 0.05$) con respecto al tratamiento Control ($2.91 \pm 2.6\%$), $\text{ZnSO}_4\text{150}$ ($4.4 \pm 2.63\%$) y Zn-Met150 ($3.9 \pm 2.61\%$), sin mostrar diferencias ($P > 0.05$) con $\text{ZnSO}_4\text{200}$ ($7.7 \pm 2.41\%$), ZnO150 ($9.2 \pm 2.92\%$), y ZnO200 ($6.5 \pm 2.93\%$). Las diferencias de Zn-Met200 con algunos tratamientos variaron del 53 al 77.6% de **IF**.



Gráfica 14. Efecto de la fuente y nivel de **Zn** en el índice de fragmentación de **ADN** espermático (**IF**) de verracos. Las barras representan medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (**EEM**). ^{a,b}Medias con distinto superíndice en las barras, son diferentes ($P = 0.02$).

Al analizar el efecto de la fuente de **Zn** (**Gráfica 15**), se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre las **FI** y la **FO**, esta última además fue diferente al Control (**Gráfica 14**). El Zn-Met aumentó 72.3% el **IF** con respecto al Control ($P < 0.0001$), un 43.89% en relación al $\text{ZnSO}_4\text{·H}_2\text{O}$ ($P = 0.002$), y 28.5% con respecto a ZnO ($P = 0.05$).

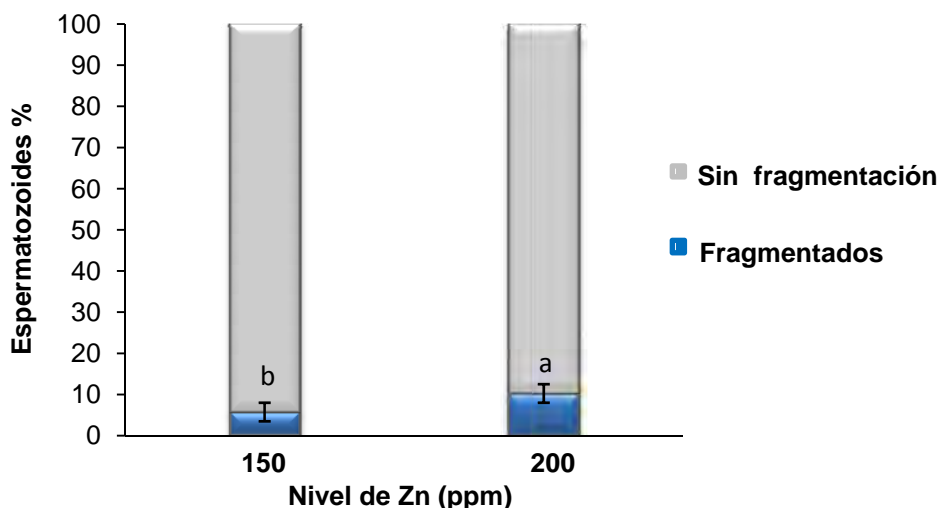
Entre las **FI** no se encontraron diferencias ($P = 0.52$), pero el ZnO reflejó un incremento en torno al 20% de **IF** en relación al $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, y 40% sobre el Control. La incorporación de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ incrementó 48.6% la presencia de espermatozoides fragmentados, pero no fue distinta al Control ($P = 0.65$) (**Gráfica 15**), manteniéndose con valores por debajo del 5% de **IF**.



Gráfica 15. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del Índice de fragmentación de ADN espermático (**IF**), en verracos alimentados con diferentes fuentes de **Zn**. Fuentes inorgánicas (**FI**); Fuentes orgánicas (**FO**).
^{a,b}Medias con distinto superíndice en las barras, son diferentes ($P < 0.05$).

El análisis de los niveles de **Zn** evaluados de forma independiente al tipo de fuente de **Zn**, mostró diferencias ($P < 0.0001$), ya que el uso de 200 ppm aumentó un 56% el **IF**, con respecto a 150 ppm (**Gráfica 16**).

Por otra parte, si se compara el efecto de los dos niveles de **Zn** (150 vs 200 ppm) con relación al tratamiento Control (25 ppm), ambos niveles produjeron una tasa de **IF** superior ($5.73 \pm 2.72\%$ y $10.23 \pm 2.66\%$ vs $2.91 \pm 2.6\%$; 150 y 200 ppm vs Control, respectivamente). Estos resultados indican un aumento notable en el **IF**, del 50% y 72%, cuando se utilizan niveles de 150 y 200 ppm de **Zn**.

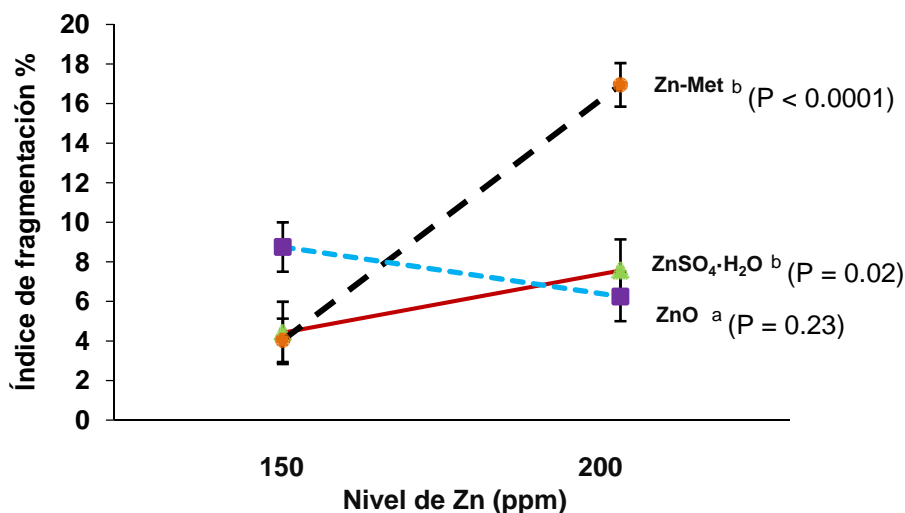


Gráfica 16. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar del efecto del nivel de **Zn** en el índice de fragmentación de **ADN** espermático (**IF**) de verracos. ^{a,b}Medias con distinto superíndice entre barras, son diferentes ($P < 0.0001$).

En la **Gráfica 17**, se muestra el comportamiento del **IF** el cual se modifica al incrementarse el nivel de **Zn**, aunque este cambio depende de la fuente mineral adicionada en el pienso.

Al comparar el incremento de **Zn** en las fuentes $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Zn-Met se observa un **IF** superior ($P = 0.02$) en la primera fuente, equivalente a un $\approx 57\%$ ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 150 ppm, $4.36 \pm 2.63\%$ vs 200 ppm, $7.71 \pm 2.41\%$). Mientras que el Zn-Met indujo un cambio ($P < 0.0001$) en el **IF**, que generó un aumento de hasta 76.7% (150 ppm, $3.89 \pm 2.57\%$ vs 200 ppm, $16.7 \pm 2.59\%$). Caso contrario ocurre con el ZnO , ya que no mostró cambios significativos ($P = 0.23$) con el incremento de nivel, pero produjo un descenso del **IF** del 30% (150 ppm, $9.27 \pm 2.92\%$ vs 200 ppm, $6.49 \pm 2.93\%$).

El **IF** producto de las **FI** en los niveles de 200 ppm ($7.7 \pm 2.41\%$ vs $6.5 \pm 2.93\%$; $\text{ZnSO}_4 200$, $\text{ZnO} 200$ respectivamente) ($P = 0.21$) no muestra diferencias entre ellas, pero si en 150 ppm ($\text{ZnSO}_4 150$, $4.4 \pm 2.63\%$ vs $\text{ZnO} 150$, $9.2 \pm 2.92\%$) ($P = 0.03$).



Gráfica 17. Interacción de la fuente y nivel de **Zn** utilizado en piensos de verraco, y su efecto en el índice de fragmentación del **ADN** de espermatozoides (**IF**). Los valores fueron transformados utilizando Arco Seno \sqrt{Y} . Las líneas representan medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (**EEM**) tratamiento⁻¹, utilizando los valores originales. ^{a,b} Medias con distinto superíndice, son diferentes ($P < 0.0001$).

En la **Gráfica 17**, se observa que el Zn-Met150 tuvo valores cercanos al ZnSO₄150 ($P = 0.40$) ($3.89 \pm 2.57\%$ vs $4.36 \pm 2.58\%$) y al ZnO200 ($3.89 \pm 2.57\%$ vs $6.49 \pm 2.93\%$) ($P = 0.07$). Por otra parte, la interacción de Zn-Met150 con ZnSO₄200 ($3.89 \pm 2.57\%$ vs $7.71 \pm 2.41\%$) ($P = 0.002$) y ZnO150 ($3.89 \pm 2.57\%$ vs $9.27 \pm 2.92\%$) ($P = 0.003$) fueron distintas.

El nivel de 150 ppm de **Zn**, con el uso de las fuentes ZnSO₄·H₂O y Zn-Met, no superó la producción de 5% del **IF**.

La frecuencia con la que los eyaculados presentaban **IF** en cada tratamiento se muestra en la **Tabla 29**. Los resultados mostraron que el 6.49% de las muestras analizadas no presentaron espermatozoides fragmentados y la mayoría (52.16%) estuvo dentro del intervalo de 1 a 5% de **IF**. Existió un 12.98% de las muestras que presentó valores mayores al 15%, de las cuales 6.27% tuvieron **IF** alrededor de 20%.

El tratamiento que presentó con mayor frecuencia **IF** y que tuvo los valores más altos fue el Zn-Met200 (intervalo 6 a 15 y >15%). Este tratamiento en particular tuvo dos verracos que llegaron a producir valores de **IF** de 60%.

Tabla 29. Frecuencia de presentación de índice de fragmentación de ADN espermático (**IF**) según intervalo y tratamiento.

Tratamiento	n	Frecuencia de IF (%) por intervalos			
		0	1-5	6-15	>15
Control	67	1.44	12.26	2.16	0.24
ZnSO ₄ 150	59	0.24	9.13	4.81	0.0
ZnSO ₄ 200	64	0.24	6.73	6.01	2.40
ZnO150	51	0.96	5.78	2.64	2.89
ZnO200	49	1.20	5.77	3.61	1.20
Zn-Met150	63	2.16	9.13	3.37	0.48
Zn-Met200	63	0.24	3.37	5.77	5.77
EEM		1.01	1.78	1.82	1.83
%	100	6.48	52.17	28.37	12.98
n	416	27	217	118	54

*Frecuencia intervalo⁻¹ = \sum Frecuencia de **IF** (%) tratamiento⁻¹. Intervalos obtenidos con prueba de Kruskal-Wallis.

Por otra parte, interesaba conocer si la fragmentación se presentaba de forma constante en los eyaculados por ello, se analizó el efecto del Tiempo (semana) dentro de los intervalos de **IF** (**Tabla 30**). Aunque el **IF** no cambió significativamente durante el tiempo evaluado ($P = 0.37$), se observa que los eyaculados con **IF** cero dejaron de presentarse a partir de la semana 16, lo que produjo un incremento de eyaculados con presencia de células fragmentadas en los intervalos <15%.

Al analizar la interacción Tratamiento*Tiempo en la tasa de **IF** (**Tabla 31**) no se encontraron diferencias ($P = 0.35$) observándose que el tratamiento Control mantuvo un patrón de comportamiento similar durante las 14 semanas evaluados (0.24 a 6.39%). Mientras que el resto de tratamientos presentaron mayor variabilidad. Los tratamientos que utilizaron alguna de las fuentes de **Zn**, no presentaron **IF** menores a 1.24% y llegaron a producir 29.3% de células con fragmentación, como el caso del Zn-Met200.

La comparación entre **FI** y **FO** permitió observar que las primeras llegaron a producir un **IF** de 14.23% (semana 11), mientras que la **FO** duplicó el valor de **IF** (29.3%, semana 14). Aunque el ZnO150, mantuvo en promedio mayor número de semanas con **IF** altos.

Tabla 30. Frecuencia de presentación de índice de fragmentación de ADN espermático (**IF**) durante un periodo de evaluación de 14 semanas con base a intervalos.

Tiempo**	n	Frecuencia de IF* por intervalos				%
		0	1-5	6-15	>15	
6	22	0.48	3.37	0.48	0.96	5.29
7	26	0.48	3.37	1.68	0.72	6.25
8	31	0.48	4.33	1.92	0.72	7.45
9	30	0.72	4.33	1.44	0.72	7.21
10	28	0.24	3.85	1.44	1.20	6.73
11	32	0.48	1.68	3.61	1.92	7.69
12	33	0.72	3.85	1.92	1.44	7.93
13	32	0.97	3.61	2.16	0.96	7.69
14	32	1.44	3.13	2.16	0.96	7.69
15	28	0.48	4.09	1.44	0.72	6.73
16	32	0.0	4.57	1.92	1.20	7.69
17	31	0.0	3.85	2.88	0.72	7.45
18	30	0.0	3.13	3.61	0.48	7.21
19	29	0.0	5.05	1.68	0.24	6.97
EEM		1.84	1.80	1.82	1.84	
n	416	27	217	118	54	
%		6.49	52.21	28.34	12.96	100

*Los intervalos fueron establecidos según la mayor frecuencia analizada en la prueba biológica.

** Periodo evaluado: 14 semanas. Los valores fueron sometidos a una prueba de Kruskal-Wallis.

Además se observó que con 150 ppm de **Zn**, el **IF** máximo fue de 13.70% (semana 11), en cambio para el nivel de 200 ppm, el valor máximo fue 29.3%.

De esta manera, el incremento del **IF** (semana 11, 12 y 17, 18), se realizó a intervalos de 6 y 7 semanas, para luego disminuir a porcentajes tan bajos como los que le precedieron.

En la **Gráfica 18**, se observa la dinámica de **IF** que los tratamientos mostraron durante las 14 semanas evaluadas. Los tratamientos que desde el inicio tuvieron una tasa de **IF** alta, mantuvieron ese índice durante todo el periodo de evaluación.

Los tratamientos durante las semanas evaluadas llegaron a presentar incrementos notables. El tratamiento Control durante las semanas 6 y 12 registró un incremento de alrededor del 92 y 56 % respectivamente, y en siete semanas mostró valores inferiores a la media del periodo evaluado ($2.91 \pm 2.6\%$).

Tabla 31. Medias de mínimos cuadrados \pm errores estándar del índice de fragmentación de ADN espermático (**IF**) de verracos durante el periodo de evaluación, con diferentes fuentes y niveles de **Zn**.

Tiempo*	Índice de fragmentación (IF) Tratamiento ⁻¹							EEM
	Control	ZnSO ₄ 150	ZnSO ₄ 200	ZnO150	ZnO200	Zn-Met150	Zn-Met200	
6	0.24	5.78	7.11	5.48	8.66	2.92	10.91	4.45
7	2.12	2.54	8.14	6.90	10.08	3.50	14.47	4.42
8	1.34	4.36	9.92	5.70	3.50	2.70	12.41	3.95
9	3.96	4.82	8.70	12.21	1.40	1.24	16.68	3.99
10	3.32	1.94	7.91	9.78	12.00	2.2	12.96	4.14
11	6.39	8.80	13.40	13.70	14.23	2.60	20.80	3.89
12	1.32	3.12	4.00	10.20	1.65	11.42	24.55	3.83
13	4.80	6.21	7.53	12.18	1.20	1.96	13.44	3.92
14	4.24	3.32	6.62	12.65	5.43	1.14	29.30	3.89
15	1.24	1.24	8.46	6.90	3.62	3.84	13.13	4.15
16	1.80	4.56	10.75	8.4	6.23	2.80	11.82	3.92
17	4.68	3.51	4.84	13.50	8.50	4.54	15.09	3.93
18	3.36	8.74	6.28	7.74	7.93	11.24	20.70	4.01
19	1.96	2.40	3.90	3.50	6.60	3.40	18.70	4.18
EEM	3.80	4.02	3.52	4.33	4.44	3.74	4.03	

n= 416.No existió diferencia significativa entre las semanas tratamiento⁻¹ (P = 0.35).

En los tratamientos ZnSO₄150 y ZnSO₄200, se observa que el **IF** fue menor a 10%, siempre con valores más bajos para el nivel de 150 ppm. Sin embargo, en ambos casos, existió aumento del **IF** a intervalos regulares de 6 y 7 semanas (semana 11 y 16) implicando un incremento del **IF** entre el 62 y 100%.

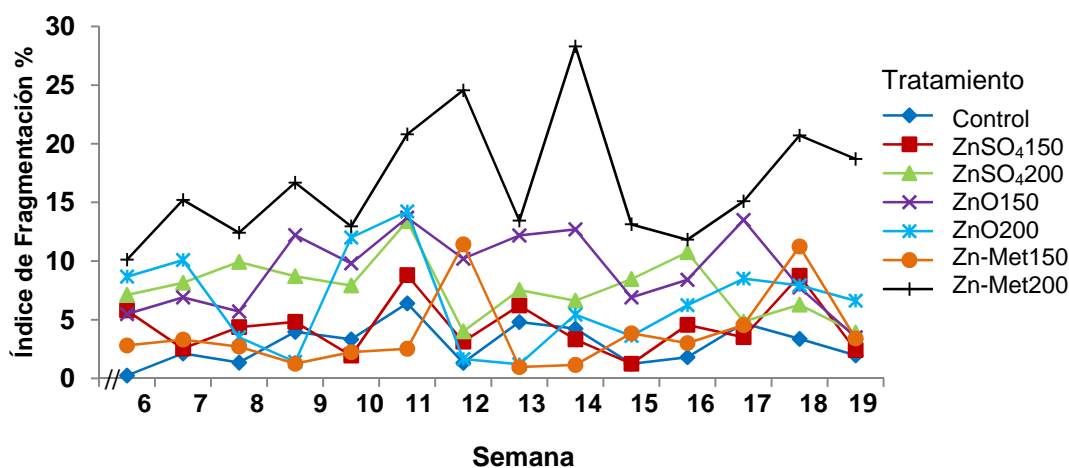
La fuente ZnO, mostró que 150 ppm produce mayor porcentaje de **IF** que el ZnO200. A pesar de los incrementos obtenidos de forma cíclica con ambos tratamientos, no hubo cambios (P > 0.05) durante el tiempo evaluado. Ambos niveles de ZnO mostraron valores durante la mitad de la prueba por debajo de la media del **IF** (6.5 \pm 2.93%), aunque en la semana 11 se observó el mayor incremento de **IF** (14.23 \pm 4.4%, ZnO150; 8.50 \pm 4.4%, ZnO200).

El **IF** correspondiente a la **FO** registró amplios cambios durante la evaluación llegando a alcanzar diferencias del 90%. Los valores del Zn-Met200 siempre fueron superiores a los de Zn-Met150. Este tratamiento, se mantuvo por debajo de su valor medio de **IF** (3.9 \pm 2.61%) durante 11 semanas, mientras que

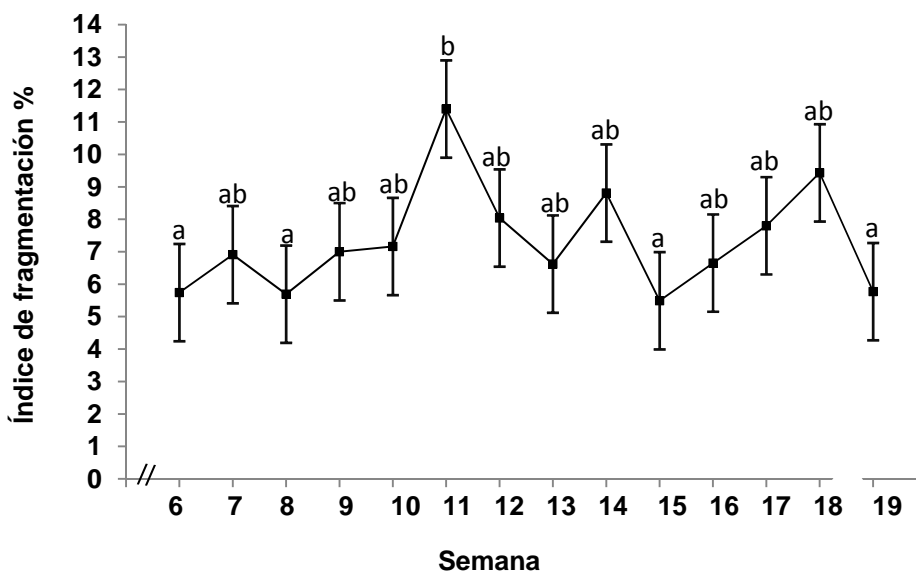
el Zn-Met200 presentó un comportamiento variable llegando a mostrar un $29.30 \pm 4.0\%$ de fragmentación en la semana 9.

Al analizar la **Gráfica 19**, se aprecia que independientemente de los tratamientos, existieron diferencias entre semanas ($P = 0.02$).

Por último, se realizó un análisis de correlación entre la concentración de **Zn** en el sedimento espermático (**ZnSE**) de los diferentes tratamientos y el **IF** (%). Dicha correlación ($r < 0.13$) no mostró diferencias ($P > 0.05$).



Gráfica 18. Dinámica del índice de fragmentación de **ADN** en espermatozoides (**IF**) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**. Probabilidad de la Interacción Tratamiento*tiempo **NS** ($P > 0.05$).



Gráfica 19. Fragmentación de **ADN** espermático (**IF**) presente en eyaculados de verracos durante un periodo continuo de evaluación. ^{a,b}Distinto superíndice entre semanas, son diferentes ($P = 0.02$). Los valores utilizados son las Medias \pm error estándar (**EEM**) de los siete tratamientos.

4.4. Evaluación de la capacidad fecundante *in vitro* (FIV) de espermatozoides de verracos tratados con diferente fuente y nivel de Zn

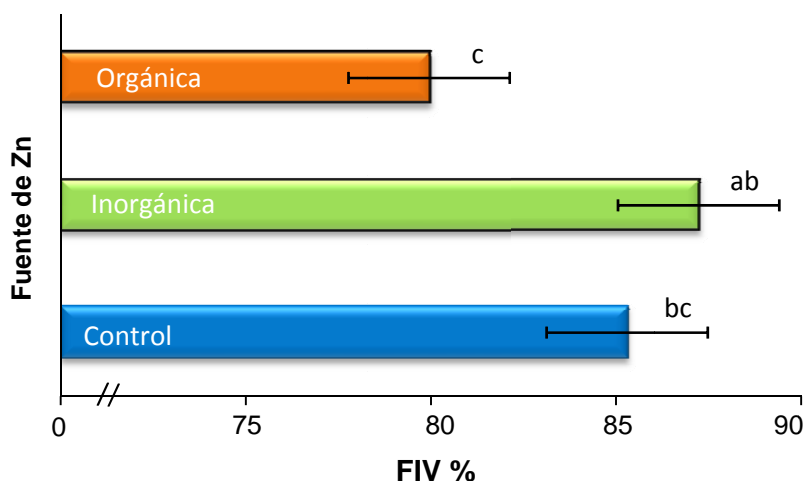
En la **Tabla 32**, se muestran los resultados de las variables relacionadas con la capacidad de penetración de los espermatozoides de verracos tratados con distintas fuentes y niveles de **Zn** en el pienso, utilizando ovocitos inmaduros (**FIV**). También se incluye el número de espermatozoides que penetran cada ovocito (**EO**) y la proporción de ovocitos que tuvieron sólo un espermatozoide (**OM**). Estas dos últimas variables se reflejan en la eficacia de fecundación del tratamiento (**EF**).

Tabla 32. Medias de mínimos cuadrados y errores estándar (**EEM**) de ovocitos fecundados *in vitro* (**FIV**), espermatozoides ovocito⁻¹ (**EO**), ovocito monospermico (**OM**) y eficiencia de fertilización (**EF**) en verracos, según fuentes y niveles de **Zn**.

Tratamiento*	Fuente	Nivel	Variable ¹					
			FIV %	EO No.	OM %	EF %		
			n					
Control	-----	25	152	85.3	6.9	8.0	6.6	
ZnSO ₄ 150	ZnSO ₄ .H ₂ O	150	144	87.4	8.7	9.1	7.7	
ZnSO ₄ 200		200	155	87.8	8.7	4.8	4.1	
ZnO150	ZnO	150	157	87.8	8.3	4.1	3.8	
ZnO200		200	154	85.9	7.1	4.4	3.9	
Zn-Met150	Zn-Met	150	142	87.4	8.7	2.3	1.9	
Zn-Met200		200	147	72.5	6.5	8.9	6.8	
Total 1051				EEM	3.42	0.54	2.46	2.1
Comparaciones ortogonales de tratamientos								
Contrastes			Probabilidad (P = F)**					
C ₁ = Control vs resto de Tratamientos*			0.98	0.06	0.22	0.24		
C ₂ = Fuentes Inorgánicas (ZnSO ₄ .H ₂ O; ZnO) vs Fuente Orgánica (Zn-Met)			0.01	0.33	0.51	0.41		
C ₃ = ZnSO ₄ .H ₂ O vs ZnO			0.64	0.06	0.31	0.35		
C ₄ = ZnSO ₄ 150 vs ZnSO ₄ 200			0.67	0.99	0.09	0.09		
C ₅ = ZnO150 vs ZnO200			0.61	0.22	0.94	0.94		
C ₆ = Zn-Met150 vs Zn-Met200			0.02	0.03	0.13	0.17		

¹EF = número de ovocitos monospermicos ovocito⁻¹ inseminados. n = número de ovocitos inseminados tratamiento⁻¹. **Se consideraron significativos los valores (P < 0.05).

El valor **FIV** del tratamiento Control no fue diferente al efecto medio del grupo restante de tratamientos (**C₁**; $P = 0.98$). Sin embargo, al comparar la media de las **FI** con las **FO** (**C₂**) se observan diferencias significativas (**FI**, 87.23 ± 2.82 vs **FO** 79.95 ± 3.0 , $P = 0.01$) (**Gráfica 20**) aunque, esta diferencia dependió del nivel (ppm) de **Zn** utilizado en el **PB** (**Gráfica 21**).



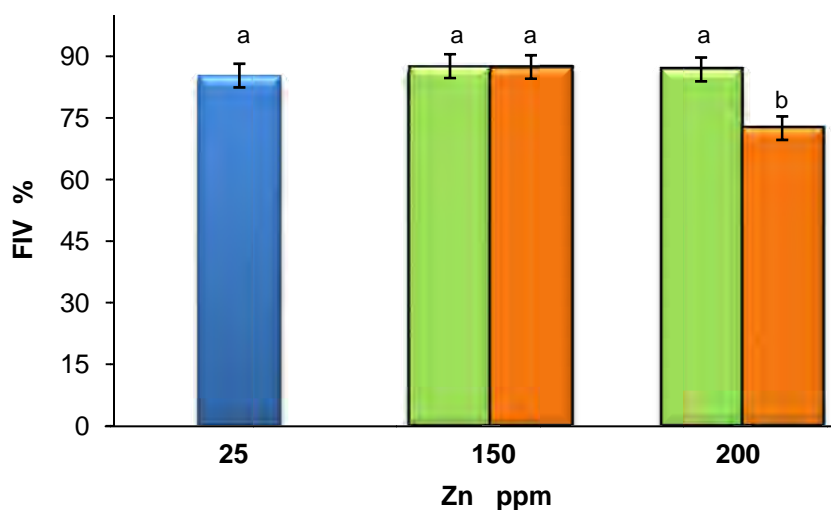
Gráfica 20. Efecto de la fuente de **Zn**, en la proporción de ovocitos penetrados (**FIV**), obtenidos con semen de verraco. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (**EEM**). ^{a,b,c} Distinto superíndice en las barras, son diferentes ($P < 0.05$).

Para identificar el comportamiento entre las **FI** se realizó una comparación (**C₃**) entre $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ vs ZnO , encontrándose porcentajes similares **FIV** ($P = 0.64$) (**Tabla 32**). Los valores obtenidos de **FIV** para ambas fuentes tuvieron proporciones cercanas al 87%.

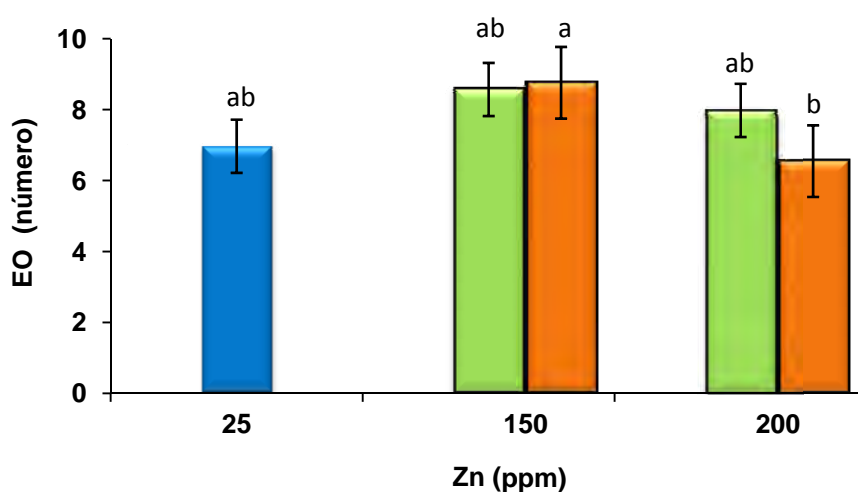
A través del contraste **C₄**, **C₅** y **C₆** se analizó el comportamiento de los niveles de **Zn** dentro de las fuentes. Las **FI** no mostraron diferencias entre niveles (**C₄**: $P = 0.67$; **C₅**: $P = 0.61$). Pero la **FO** ($\text{Zn-Met} = \text{C}_6$) mostró disminución de la **FIV** al utilizar 200 ppm ($P = 0.02$) (**Tabla 32**, **Gráfica 21**).

En relación al número de **EO**, el contraste **C₁** mostró una tendencia ($P = 0.06$) del tratamiento Control (6.9 ± 0.54) a un menor número de **EO** con respecto al promedio de los tratamientos con alguna de las fuentes de **Zn**. Los **EO** registrados por las **FI** (8.26 ± 0.55) fueron iguales ($P = 0.33$) a la **FO** (7.65 ± 0.58)

(C₂). Pero al comparar las FI (C₃) se observó una tendencia (P = 0.06) a disminuir cuando se utiliza el ZnO (Tabla 32).



Gráfica 21. Efecto del nivel de Zn (ppm), en la proporción de ovocitos penetrados (FIV), utilizando semen de verraco. Control ■; Fuente inorgánica (FI) ■; Fuente orgánica (FO) ■. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (EEM). ^{a,b} Distinto superíndice en las barras, son diferentes (P < 0.05).



Gráfica 22. Efecto del nivel de Zn en el número de espermatozoides ovocito⁻¹ (EO), con semen de verraco. Control ■; Fuente inorgánica (FI) ■; Fuente orgánica (FO) ■. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (EEM). ^{a,b} Distintos superíndices entre barras, son diferentes (P < 0.05).

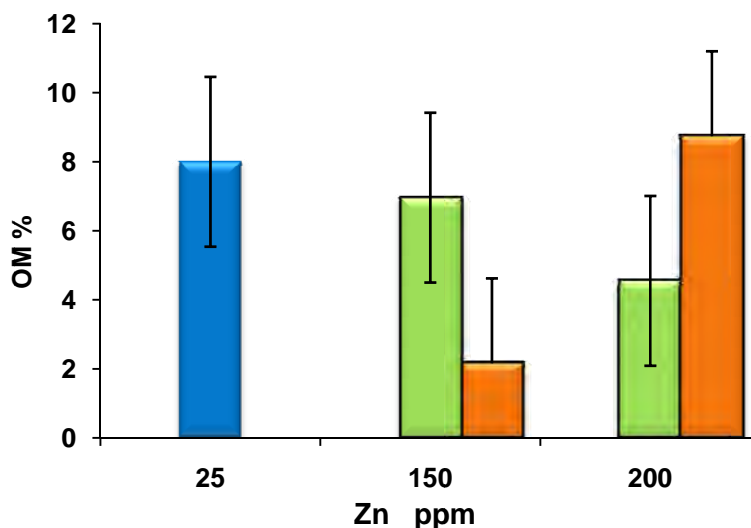
No se apreció ningún cambio en los EO (Gráfica 22) cuando se aumentó el nivel de Zn (150 a 200 ppm) dentro de la misma FI (C₄; P = 0.99; C₅; P = 0.22). Sin embargo, al comparar el comportamiento del Zn-Met150 vs Zn-Met200 (C₆)

existió una disminución de **EO** (8.7 vs 8.5) al incrementar el nivel de **Zn** ($P = 0.03$).

En general, ningún tratamiento registró diferencias ($P > 0.05$) en relación a **OM**, a pesar de la amplia diferencia entre los valores medios que se observan en la **Tabla 32**, lo cual ocurrió debido a la gran variabilidad que presenta esta característica (**EEM** = 2.46).

El tratamiento Control mostró una proporción amplia de **OM** (8.0%) (**C**₁: $P = 0.22$), con respecto al resto de los tratamientos, superada únicamente por el ZnSO₄150 (9.1%) y Zn-Met200 (8.9%). Por su parte, la **FO** (5.45%), no mejoró el comportamiento de las **FI** (5.5%) (**C**₂). Dentro de las **FI** (**C**₃: $P = 0.31$) no hubo diferencias entre ZnSO₄·H₂O y el ZnO.

Puesto que la **EF** está calculada con base a la proporción de **OM** y **OI**, las probabilidades obtenidas para esta variable fueron similares a los **OM**. El tratamiento más eficaz que permitió obtener mayor número de ovocitos fecundados por un solo espermatozoide fue el ZnSO₄150 (7.7%) ($P = 0.09$), mientras que el tratamiento con los resultados más bajos correspondió al Zn-Met150 (1.9%).



Gráfica 23. Efecto del nivel de **Zn**, en la presencia de ovocitos monospermáticos (**OM**), con semen de verraco. Control ■; Fuente inorgánica (**FI**) ■; Fuente orgánica (**FO**) ■. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados ± error estándar (**EEM**). Probabilidad **NS** ($P > 0.05$).

El **DPn** en ovocitos maduros de cerda se muestra en la **Tabla 33**. Los resultados indican que no existieron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos. El tratamiento Control reflejó valores mayores de **DPn** (58.9 ± 6.5 y $53.9 \pm 4.8\%$), existiendo una tendencia ($P = 0.08$) a disminuir el porcentaje de **DPn** en los tratamientos que utilizaron ZnO (ZnO150, 34.5 ± 1.9 ; ZnO200, $36.5 \pm 2.8\%$) y ZnSO₄150 ($38.1 \pm 3.8\%$).

En cuanto al comportamiento entre los tratamientos con Zn-Met, se observó que a pesar de no ser diferentes estadísticamente, el Zn-Met200 ($53.9 \pm 4.8\%$) presentó mayor porcentaje de **DPn** que el Zn-Met150 ($43.2 \pm 5.4\%$).

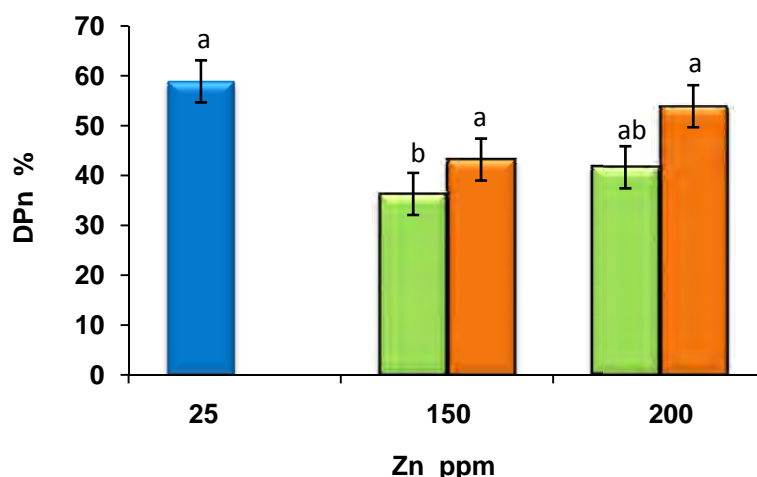
La comparación realizada a través del nivel de **Zn** arrojó un incremento en la proporción de **DPn** cuando se emplearon 200 ppm. El incremento se presentó en las tres fuentes, ZnSO₄200 **vs** ZnSO₄150 de 8.7%, ZnO200 **vs** ZnO150 2%, y Zn-Met200 **vs** Zn-Met150 10.7%.

Al analizar el efecto de fuente y nivel de **Zn** en las **FI** se observó una disminución del **DPn**. La diferencia fue significativa al utilizar 150 ppm, con respecto al Control y al Zn-Met200 (**Gráfica 24**).

Tabla 33. Proporción de desarrollo de pronúcleos (**DPn**), cabezas espermáticas (**CE**) y espermatozoides intactos (**SpzO⁻¹**) en ovocitos de cerda, cultivados con espermatozoides de verraco tratados con diferentes fuentes y niveles de **Zn**.

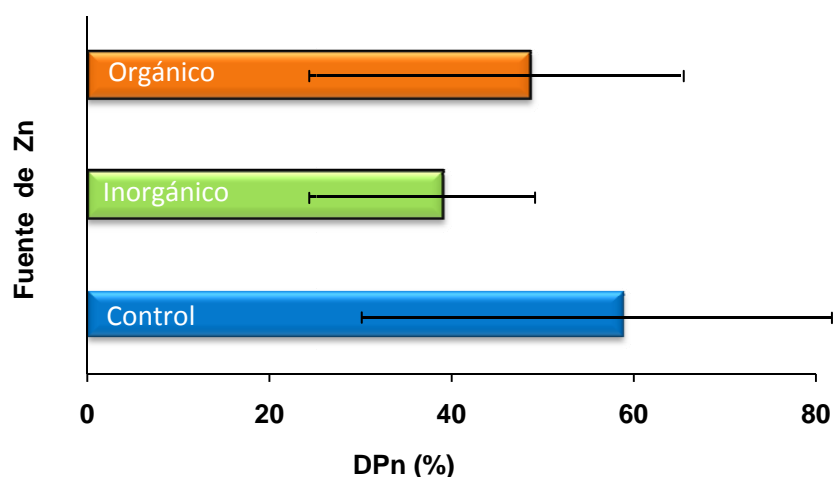
Tratamiento	Variables		
	DPn %	CE %	SpzO* %
Control	$58,9 \pm 6,5$	$35,6 \pm 7,1$	$5,5 \pm 3,3$ ^{ab}
ZnSO ₄ 150	$38,1 \pm 3,8$	$61,9 \pm 3,8$	0.0 ^b
ZnSO ₄ 200	$46,8 \pm 4,4$	$49,2 \pm 6,9$	$4,0 \pm 4,0$ ^{ab}
ZnO150	$34,5 \pm 1,9$	$50,5 \pm 4,5$	$14,9 \pm 4,9$ ^a
ZnO200	$36,5 \pm 2,8$	$56,1 \pm 3,8$	$7,5 \pm 2,7$ ^{ab}
Zn-Met150	$43,2 \pm 5,4$	$51,9 \pm 5,5$	$4,9 \pm 2,6$ ^{ab}
Zn-Met200	$53,9 \pm 4,8$	$42,2 \pm 6,0$	$4,2 \pm 2,9$ ^{ab}
Probabilidad (P = F)	0,08	0,34	0,006

Los valores representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (**EEM**). ^{a,b}Distintos superíndices en columna, son diferentes ($P = 0.006$).



Gráfica 24. Efecto del nivel de Zn, en el desarrollo de pronúcleos (DPn), con semen de verraco. Control ■; Fuente inorgánica (FI) ■; Fuente orgánica (FO) ■. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la media. ^{a,b}Distinto superíndice en columna son diferentes ($P < 0.05$).

En la **Gráfica 25**, se puede observar que el Control alcanzó el mayor porcentaje de DPn ($58.9 \pm 6.5\%$), con respecto a los tratamientos con fuentes de Zn (FO: $48.5 \pm 5.21\%$; y las FI: $38.98 \pm 5.40\%$), sin presentar entre ellas diferencias estadísticas ($P > 0.05$).



Gráfica 25. Efecto de la fuente de Zn, en el desarrollo de pronúcleos (DPn), utilizando espermatozoides de verracos. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (EEM). Probabilidad **NS** ($P > 0.05$).

La proporción de **CE** fue similar entre tratamientos ($P = 0.34$), registrándose una amplia diferencia entre las medias de tratamiento y gran variabilidad en su

comportamiento. EL tratamiento Control llegó a tener un número de **CE** hasta del 16.4% menor con respecto a los tratamientos en los que se aplicó alguna fuente de **Zn (Tabla 33)**.

Tanto el nivel como la fuente de **Zn** produjeron efectos distintos en la presencia de **CE**. Por ejemplo el $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y Zn-Met disminuyen en 12.7% y 9.7% respectivamente las **CE**, pero el **ZnO** aumentó dicho índice hasta un 5.56%.

Por su parte, la presencia de **SpzO⁻¹** mostró una tendencia a diferir entre los tratamientos ($P = 0.006$). Esta diferencia se ve reflejada claramente al comparar el ZnO150 ($14.9 \pm 4.9\%$) con el ZnSO_4 150. Este último no presentó **SpzO⁻¹**. Los resultados indican que el ZnO aumenta la presencia de **SpzO⁻¹**, implicando un descenso en la tasa de **DPn** y **CE**.

Para determinar la existencia de relación entre las características de calidad seminal, capacidad fecundante de los espermatozoides y **DPn**, se realizó un análisis de regresión lineal seleccionando los modelos mediante el procedimiento “stepwise”, el cual arrojó efectos significativos ($P < 0.05$) al establecer una relación negativa ($R^2 = -0.54$) entre **MA**, con el **FIV** y **DPn** en los tratamientos ZnO150 y Zn-Met200 ($P = 0.02$). Así como, la relación ($R^2 = -0.47$) negativa entre **IAc** y los **OM** en el tratamiento Zn-Met200 (**Tabla 34**). En el resto de tratamientos no existieron relaciones causa efecto significativas con ninguna de las variables.

El análisis muestra que el 54% de la variación en la capacidad de penetración espermática de los espermatozoides puede ser explicada por las **MA** del tratamiento ZnO150. Mientras que los **IAc** (47%) y el **DPn** (54%) explican el comportamiento que mostró el tratamiento Zn-Met200 con los **OM** y **DPn** respectivamente.

Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre el **FIV**, **EO**, **OM**, **EF**, **DPn**, **CE** y **SpzO⁻¹**, con el **IF** y **ZnSE** obteniéndose sólo correlaciones significativas entre los tratamientos ZnSO_4 200 y Zn-Met150 (**Tabla 35**).

El porcentaje de **FIV** del tratamiento ZnSO_4 200 se correlacionó positivamente ($P = 0.05$) con el **IF** ($r = 0.49$), y con **ZnSE** ($r = 0.53$). En el caso del Zn-Met150 los porcentajes de **FIV** sólo mostraron una tendencia ($P = 0.08$) de asociación entre el **IF** y **ZnSE** ($r = -0.52$ y $r = -0.49$ respectivamente).

Tabla 34. Modelos de regresión lineal relacionando morfoanomalías (**MA**), integridad acrosomal (**IAC**) con ovocitos penetrados *in vitro* (**FIV**), ovocitos monospermicos (**OM**) y desarrollo de pronúcleos (**DPn**) según tratamientos con Zn.

Tratamiento	Variable*	Modelo	R ²	P = F
ZnO150	FIV	$\hat{y}_i = 90.3 - 0.182MA$	-0.54	0.02
Zn-Met 200	OM	$\hat{y}_i = 0.87 - 0.009IAC$	-0.47	0.03
	DPn	$\hat{y}_i = 55.2 - 1.68MA$	-0.54	0.02

* \hat{y}_i = Variable dependiente: **FIV**=Ovocitos fecundados *in vitro*; **OM**=Ovocitos monospermicos; **DPn**=Desarrollo de pronúcleos. Modelo general $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \xi_i$. Los modelos fueron seleccionados (PROCStepwise) cuando P < 0.05.

Las correlaciones estudiadas entre **SpzO⁻¹**, **IF** y **ZnSE** fueron positivas para el tratamiento Zn-Met150 (P = 0.05) en ambos casos, mientras que en el tratamientos ZnSO₄200 sólo se observó una tendencia (P = 0.06) (**Tabla 35**).

Tabla 35. Correlaciones (r) entre ovocitos penetrados *in vitro* (**FIV**), índice de fragmentación de **ADN** espermático (**IF**), concentración de **Zn** en sedimento espermático (**ZnSE**) espermatozoides por ovocitos maduro (**SpzO⁻¹**).

Tratamiento	Variables						
		IF	(P = F)	ZnSE	(P = F)	SpzO ⁻¹	(P = F)
ZnSO ₄ 200	FIV	0.49	(0.05)	0.53	(0.05)	-----	
	IF	-----		-----		0.49	(0.06)
	ZnSE	-----		-----		0.50	(0.06)
Zn-Met150	FIV	0.52	(0.08)	0.49	(0.08)	-----	
	IF	-----		-----		0.47	(0.05)
	ZnSE	-----		-----		0.53	(0.05)

Se consideró significativo cuando la P < 0.05. Coeficientes de correlación muestral.

4.5. Evaluación de la concentración de Zn de tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (ZnPS) y sedimento espermático (ZnSE)

En la **Tabla 36**, se muestra la composición química de los testículos, observándose que ninguna de las variables evaluadas en ambos testículos, presentó diferencia ($P > 0.05$). Es evidente que en el tratamiento Control con un nivel de **Zn** de 25 ppm, no disminuyó la concentración de **MS**, **C** y concentración de **Zn**, ni el nivel más alto (200 ppm) alteró dichas variables. Sin embargo, fue observado un ligero incremento del contenido de **Zn** testicular (**ZnTes**) utilizando Zn-Met200, aproximadamente entre 14 a 17 ppm de **Zn**, mientras que en las **FI** la concentración disminuyó al aumentar el aporte del mineral presentando mayor efecto con ZnO. La evaluación de ambos epidídimos (**ED**, **EI**) (**Tabla 37**), indica que no hubo diferencia entre tratamientos tanto en la composición de **H** (**ED**, $P = 0.85$; **EI**, $P = 0.76$) y de **MS** (**ED**, $P = 0.87$; **EI**, $P = 0.77$).

Las **C**, no mostraron diferencias en ambos epidídimos (**ED**, $P = 0.08$; **EI**, $P = 0.06$) pero, los tratamientos con mayor nivel de **Zn** (200 ppm) registraron una reducción en el contenido de ellas, siendo los tratamientos con azufre, los que mostraron mayor cambio.

Analizando la concentración de **Zn** (ppm) en epidídimo (**ZnEp**), se observa una tendencia (**ED**, $P = 0.09$; **EI**, $P = 0.07$) a aumentarlo en ambos epidídimos. Este incremento se situó entre 4 y 32 ppm de **Zn** dependiendo de la fuente de **Zn** utilizada en el **PB**. A pesar de todo, el tratamiento Control no fue el que tuvo los valores más bajos **ZnEp** (**ED**, 67.82 ± 9.20 ; **EI**, 67.81 ± 8.73 ppm; media \pm **EEM**).

En el caso de la concentración de **Zn** (ppm) en el **ZnSE**, no existió efecto significativo del tratamiento ($P = 0.39$). Ningún tratamiento registró valores por debajo de 900 ppm de **ZnSE**. El tratamiento Control (920.34 ± 136.21 ppm) no mostró diferencias con el resto de tratamientos. En la **Gráfica 26** se puede observar que el tratamiento Zn-Met200 presentó una concentración mayor de **Zn** ≈ 300 ppm, en comparación al resto de tratamientos.

Tabla 36. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la composición química de testículos de verracos alimentados con fuentes y niveles distintos de **Zn** contenidos en el pienso.

Tratamiento	Testículo*									
	Derecho (TD)					Izquierdo (TI)				
	H %	MS%	C%	Zn ppm ¹	H %	MS%	C%	Zn ppm ¹	H %	Zn ppm ¹
Control	83.44	16.58	6.54	83.88	83.31	16.67	6.14	79.80		
ZnSO ₄ 150	83.80	16.17	5.92	85.52	83.44	16.55	6.35	82.49		
ZnSO ₄ 200	83.90	16.09	6.47	82.95	83.38	16.60	6.33	82.12		
ZnO150	83.70	16.28	6.86	87.56	83.68	16.30	6.54	84.32		
ZnO200	83.00	16.99	5.88	76.25	83.10	16.88	6.05	78.12		
Zn-Met150	83.76	16.36	6.62	85.05	83.91	16.08	6.19	85.44		
Zn-Met200	83.05	16.93	6.38	93.42	82.85	17.03	6.17	92.46		
EEM	0.37	0.38	0.24	4.27	0.38	0.38	0.26	5.23		
Probabilidad (P = F)	0.44	0.51	0.07	0.20	0.56	0.56	0.88	0.59		

*Humedad, H; materia seca, MS; cenizas, C. n = 70 testículos. No existieron diferencias significativas (P = F). En base seca

Tabla 37. Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de la composición química de epidídimos de verracos alimentados con fuentes y niveles distintos de **Zn** contenidos en el pienso.

Tratamiento	Epidídimo							
	Derecho (ED)				Izquierdo (EI)			
	H %	MS%	C%	Zn ppm ¹	H %	MS%	C%	Zn ppm ¹
Control	78.48	21.51	6.32	67.82	78.13	21.86	7.81	67.81
ZnSO₄150	78.47	21.52	9.94	50.73	78.61	21.38	7.81	54.63
ZnSO₄200	78.86	21.13	5.35	54.64	78.61	21.37	5.55	58.72
ZnO150	79.07	20.91	8.01	61.77	79.06	20.92	8.55	61.54
ZnO200	80.39	19.59	6.68	71.95	79.28	20.70	6.82	85.44
Zn-Met150	79.26	20.73	7.82	52.35	79.61	20.38	6.59	59.49
Zn-Met200	78.79	20.66	5.01	85.17	78.94	21.04	6.02	85.53
EEM	1.00	1.02	2.98	9.20	0.65	0.66	2.29	8.73
Probabilidad								
(P = F)	0.85	0.87	0.08	0.09	0.76	0.77	0.06	0.07

*Humedad, **H**; materia seca, **MS**; cenizas, **C**. **n**= 70 testículos. No existieron diferencias significativas (**P = F**).¹ En base seca

Además, es evidente que la mayor diferencia entre tratamientos se registra en la **FO**. El Zn-Met150 tuvo 906.63 ± 134.6 ppm, mientras que el Zn-Met200 presentó una media de 1294 ± 134.60 ppm de **Zn**.

También se observa un ligero incremento en el tratamiento ZnO200 (1088.59 ± 151.52 ppm). Esto indica que sólo la fuente oxidada y la quelatada con metionina, producen un almacenamiento de **Zn** por encima de 1000 ppm.

La fuente con mayor homogeneidad en la concentración de **ZnSE** fue la azufrada (ZnSO₄150, 931.02 ± 136.21 ; ZnSO₄200, 920.41 ± 138.87 ppm).

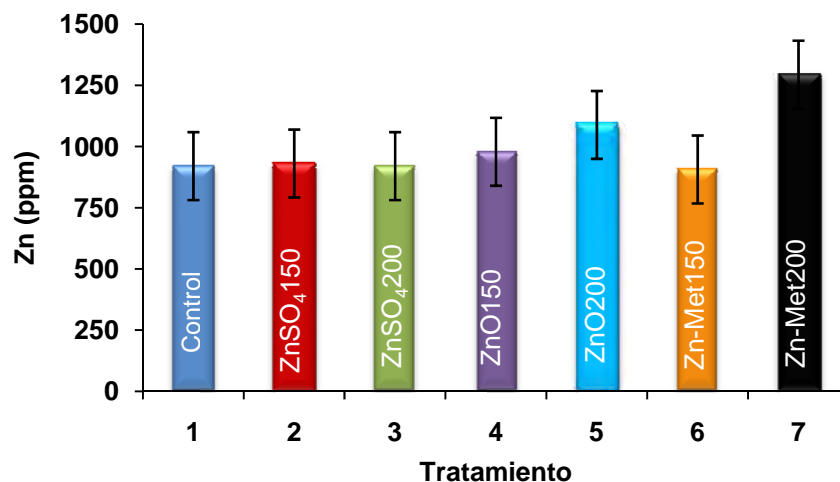
Por otra parte, al analizar la dinámica de concentración del **ZnSE**, durante cinco semanas (**Gráfica 27**), se comprobó que no existía interacción Tratamiento*Tiempo ($P = 0.40$). La concentración de **Zn** aumentaba o disminuía por semanas pero estas diferencias no fueron suficientes para determinar diferencias estadísticas.

El tratamiento Zn-Met200 nunca tuvo valores de **ZnSE** por debajo de 1000 ppm (1090.87 a 1626.23 ± 181.41 ; media \pm **EEM**). Excepcionalmente, el tratamiento Control y ZnSO₄150 mostraron valores superiores a 1000 ppm en el **ZnSE**, pero sólo el Control produjo valores tan bajos como 686.19 ± 181.41 ppm.

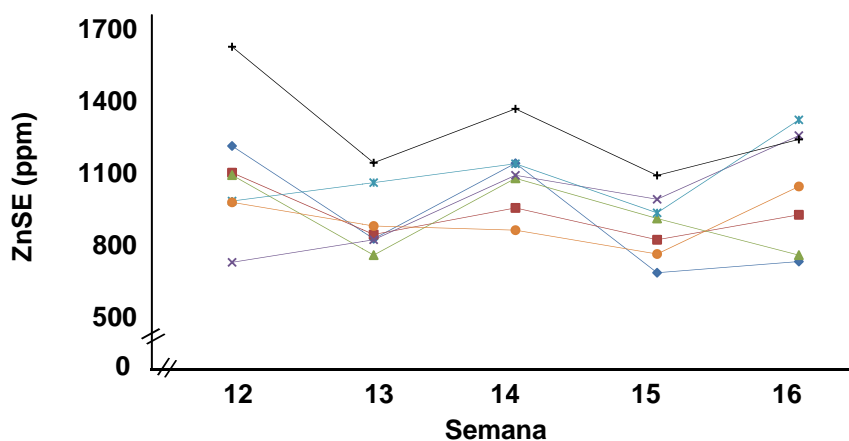
En el caso de la concentración de **Zn** en el **PS (ZnPS) (Gráfica 28)**, no existió efecto del tratamiento ($P = 0.33$). Con el Zn-Met se obtuvieron las concentraciones más bajas de **ZnPS** (Zn-Met150, 13.53 ± 3.0 ; Zn-Met200, 16.38 ± 3.0 ppm) al compararla con las **FI**. Por su parte, los tratamientos con fuente azufrada (ZnSO₄150, 17.96 ± 3.05 ; ZnSO₄200, 21.02 ± 2.76 ppm) muestran un comportamiento similar al tratamiento Control (17.12 ± 3.0 ppm).

Por otra parte, se observa que el nivel de Zn de 200 ppm incrementó la **ZnPS** (ZnSO₄200, 21.02 ± 2.76 ; ZnO200, 22.75 ± 3.38 ; Zn-Met200, 16.37 ± 3.0 ppm). La **ZnPS** evidencia que la cantidad de **Zn** en la **FO** fue menor que en las **FI**.

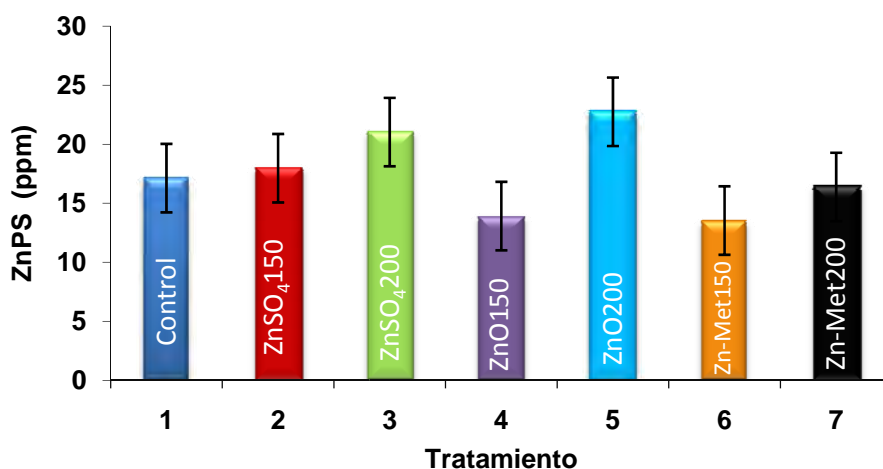
Al analizar la interacción Tratamiento*Tiempo (**Gráfica 29**), fueron identificadas diferencias ($P = 0.009$) sólo en el tratamiento ZnSO₄200, que fue causada por la concentración inicial de **Zn** (semana 2 = 9.31 ppm). En el resto de tratamientos, no se observaron diferencias durante el periodo evaluado.



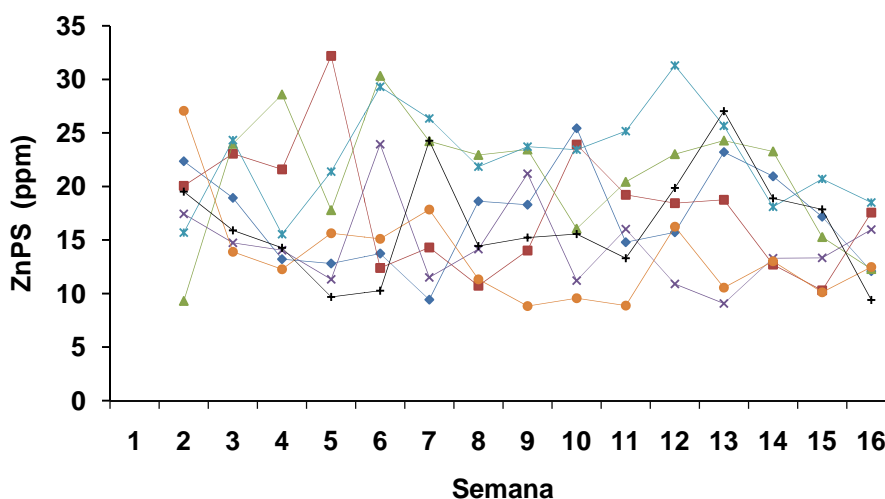
Gráfica 26. Concentración de Zn (ppm) en el sedimento espermático (**ZnSE**) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados. Errores estándar (**EEM**): Control (136.21); ZnSO₄150 (136.21); ZnSO₄200 (138.87); ZnO150, (138.87); ZnO200 (151.52); Zn-Met150 (134.60); Zn-Met200 (134.50). n = 157. Probabilidad **NS** (P = 0.39).



Gráfica 27. Concentración de Zn (ppm) en sedimento espermático (**ZnSE**) de verraco por semana. Las líneas representan las medias de mínimos cuadrados. Error estándar de la media (**EEM**): Control (186.85) ◆; ZnSO₄150 (186.85) ■; ZnSO₄200 (195.17) ▲; ZnO150 (202.22) ×; ZnO200 (181.41) * ; Zn-Met150 (181.41) ●; Zn-Met200 (181.41) +. Probabilidad de la Interacción Tratamiento * Tiempo **NS** (P = 0.40).



Gráfica 28. Concentración de Zn (ppm) en plasma seminal (**ZnPS**) de verracos, tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn en el pienso. Las barras representan las medias de mínimos cuadrados. Errores estándar (**EEM**). Control (3.00); ZnSO₄150 (3.05); ZnSO₄200 (2.76); ZnO150, (3.11); ZnO200 (3.38); Zn-Met150 (3.00); Zn-Met200 (3.00). n = 490. Probabilidad **NS** (P = 0.33).



Gráfica 29. Concentración de Zn (ppm) en plasma seminal (**ZnPS**) de verraco por semana. Las líneas representan las medias de mínimos cuadrados. Error estándar (**EEM**). Control (4.99) ◆; ZnSO₄150 (5.30) ■; ZnSO₄200 (4.69) ▲; ZnO150 (5.46) ×; ZnO200 (5.75) *; Zn-Met150 (4.96) ●; Zn-Met200 (4.96) +. Probabilidad de la Interacción Tratamiento * Tiempo (P = 0.009).



DISCUSIÓN

Zinc del Aleman Blender ,engañar.

5. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación del comportamiento productivo de los verracos

Uno de los problemas más habituales en un centro de inseminación artificial es mantener a los verracos con una **GPS**, **CC** y **PV** adecuados. Estos parámetros están relacionados con la edad, época del año, actividad sexual, raza o línea genética del animal. Además, hay que evitar la aparición de problemas de sobre peso y lesiones de aplomos que puedan afectar la libido y la calidad seminal (**Louis et al., 1994a, b; Wilson et al., 2004**).

El **PF** registrado no mostró diferencias significativas ($P = 0.63$) entre tratamientos. Estos resultados ponen de manifiesto que los verracos durante las 16 semanas de investigación, ganaron peso de manera uniforme coincidiendo con los resultados publicados por **Kemp (1989)** y **Wilson et al. (2004)**.

La evaluación de la **CC** y la obtención de la **GPS** según **Neary y Yager (2002)**, **PIC (2008)** y **Tokach (2009)** permiten realizar cambios oportunos en el suministro de pienso, ayudando a salvaguardar la condición física, salud y producción de los verracos, estando recomendada su estimación al menos, una vez por semana. En este experimento fue adoptada esta metodología. Por tanto la estimación semanal de la **CC** y la **GPS**, permitió tomar decisiones oportunas a la hora de introducir cambios en la administración de pienso según indica el **NRC (1998)** para verracos en producción. El suministro mínimo de **PB** fue $1.8 \text{ Kg día}^{-1} \text{ verraco}^{-1}$ y el máximo de $2.5 \text{ Kg día}^{-1} \text{ verraco}^{-1}$.

En relación con la **GPS** no se encontraron diferencias ($P = 0.91$) entre tratamientos. Los valores medios de **GPS** oscilaron entre 1.260 a 1.690 Kg semana⁻¹ (ZnSO_4150 y $\text{ZnO}200$ respectivamente) siendo superiores a los publicados por **Louis et al. (1994b)** quienes suministraron 1.8 a 2.0 Kg de pienso día⁻¹ verraco⁻¹ obteniendo una ganancia de $1.180 \text{ Kg semana}^{-1} \text{ verraco}^{-1}$. **Kemp et al., (1989)** recomiendan para verracos jóvenes (<12 meses) una ganancia de peso diaria de 400 g día^{-1} ($2.800 \text{ Kg de ganancia semana}^{-1}$). Una vez alcanzado el año de edad, aconsejan una ganancia diaria de 200 g ($1.400 \text{ Kg semana}^{-1}$). Esta última recomendación sólo fue alcanzada por los tratamientos

ZnSO₄200 (1.670 Kg), y ZnO200 (1.720 Kg) aunque no reflejaron diferencias con el resto de tratamientos.

Los resultados del presente estudio coinciden con **Wedekind et al. (1994)**, quienes no encontraron una mayor ganancia de peso al utilizar diferentes fuentes y niveles de **Zn** en cerdos en fase de finalización. El mismo comportamiento fue observado por **van Heugten et al. (2003)** en cerdos destetados, quienes compararon ZnSO₄ con dos fuentes orgánicas, Zn-Met y Zn-Lis a un nivel de 80 y 160 ppm de **Zn**, no encontrando diferencias entre fuentes y niveles. En esta misma línea se encuentra el estudio de **Buff et al. (2005)** realizado en cerdos destetados utilizando 150 ppm de **Zn** con dos fuentes distintas, Zn-Polisacárido y ZnO.

En **1970 Liptrap et al.**, sugirieron incrementar a 50 y 80 ppm de **Zn** un **PB** que contenían 22 y 35 ppm respectivamente, ya que mejoraron la ganancia de peso en cerdos en fase de finalización. Sin embargo, estos datos fueron obtenidos con una **PB** que no utilizaba fitasas en su formulación. Estos mismos autores realizaron un estudio con machos no castrados en fase de crecimiento, observando que estos requieren de un suministro de **Zn** en el **PB** a una concentración mayor que los machos castrados. **Creech et al. (2004)**, coinciden y señalan, que las fuentes de proteínatos de **Zn**, aumentan la eficiencia de crecimiento de los cerdos comparada con ZnSO₄, y recomienda que el 50% del requerimiento de **Zn** sea a través de una **FO**.

Sin embargo, en esta investigación el tratamiento Control tuvo un comportamiento similar al resto de tratamientos. Una razón puede ser el incremento en el **CPD** y la mayor biodisponibilidad del **Zn** contenido en el **PB**, debido a la inclusión de fitasas. No existe suficiente evidencia científica sobre el efecto que tiene el consumo de fuentes y niveles de **Zn** en verracos en producción incluso, los datos llegan a ser contradictorios.

Teniendo en cuenta la **GPS** y la **CC**, se realizaron los cambios de suministro (Kg) de pienso de forma individual. Aquellos animales que mostraban **GPS** positivas pero por debajo de 160 g día⁻¹ y/o **CC** grado <3, les fue adicionado entre 100 a 200 g más de piensos día⁻¹, hasta conseguir que el verraco mejorara ambas características lo cual, fue más fácil conforme transcurrieron las semanas de estudio debido a que al aumentar la edad, los requerimientos nutricionales de

los verracos disminuyen y la **GPS** y **CC** son más fáciles de mantener con el sistema de alimentación establecido (**Kemp et al., 1989; Colembrander y Kemp, 1990; Mateos et al., 1997**).

Por lo descrito anteriormente, el **CPD** y la **CC** registraron diferencias entre tratamientos. Los verracos del tratamiento Control y ZnSO₄150, mostraron problemas para mantener el grado 3 de **CC** durante el periodo evaluado (grado 2.69 y 2.83 respectivamente). Debido a ello, se les suministró una mayor cantidad de pienso (2.016 y 1.943 g día⁻¹, respectivamente) lo que permitió que entre ambos tratamientos no existieran diferencias. Este incremento de **CPD** aumentó el consumo de todos los nutrientes contenidos en el **PB**, evitando los efectos adversos de una posible deficiencia de **Zn** para el caso del Control.

Según **Miller y Kornegay (1983)** y **Martin et al. (1994)**, el pienso con 50 ppm o menos, puede ocasionar paraqueratosis, lesiones en patas o disminución del crecimiento, todos ellos, signos patognomónicos externos de una deficiencia de **Zn**. También, puede existir daño en esófago y en otras partes del tracto digestivo sin presencia de signos externos, como muestra el trabajo de **Liptrap et al. (1970)**. Los autores antes mencionados, demostraron que es más frecuente y grave las lesiones en verracos que en hembras o machos castrados cuando disminuye el nivel de **Zn**. Estos signos suelen aumentar cuando existe una concentración mayor de otros minerales (**Ca, Fe, Cu, Mn**) con respecto al **Zn**, o el pienso contiene un alto nivel de fitatos (**Creech et al., 2004; Williams et al., 2005**). En esta investigación, es posible que hayan sido suficientes las 25 ppm contenidas en el **PB** (Control), tanto para no presentar lesiones macroscópicas de paraqueratosis o lesiones en patas, como para producir de forma similar a los verracos que consumieron tratamientos con alguna de las fuentes y niveles de **Zn**.

En el ZnSO₄150 el aumento de **CPD** (285 a 628 g día⁻¹) no provocó mejora en la **GPS**, ni en la **CC**. Es probable que los resultados estén asociados a la presencia de un problema neumónico en dos verracos pertenecientes a este tratamiento. Por tal motivo, el suministro de pienso se aumentó para reducir el riesgo de disminución del crecimiento o muerte.

Por otra parte, la reducción del **CPD** en ZnO150, no fue suficiente para disminuir la incidencia de cerdos con tendencia a mostrar una **CC** de grado 4 durante todo el experimento. En este caso, el problema fue la presencia de

verracos con baja libido, rehusando a saltar sobre el maniquí, de acuerdo al ritmo de recogidas propuesto. **Kemp (1991), Close y Roberts (1991), NRC (1998)**, señalan que la demanda de energía para la monta es muy pequeña (5% del total energético necesario, lo equivalente a 103 Kcal de **ED** eyaculación⁻¹), pero esta no cambia cuando los verracos tienen un buen estado físico, y/o en un medio con pocas variaciones climáticas.

Las diferencias en el **CPD** no fueron significativas entre tratamientos con fuente y nivel adicional de **Zn (Tabla 16)**, pero mostraron diferencias durante el periodo evaluado, debido a los cambios en la administración de pienso aplicado para mantener la **GPS** y la **CC**.

Los cambios en la **CC** durante el periodo de evaluación estuvieron sujetos al **CPD**, pero también al **IE** y al ambiente al que fueron sometidos los verracos. Ningún tratamiento mostró una **CC** grado 1 o 5. Los resultados de la dinámica semanal de **CC**, demuestran que el manejo alimenticio redujo la frecuencia con la que los verracos presentaban **CC** menor o mayor al grado 3. Asimismo, lo más difícil fue conseguir que los verracos no disminuyeran el grado de **CC** a 2, ya que existieron factores ambientales (frío, calor) que afectaron el comportamiento de los sementales. El experimento se realizó en los meses de octubre a febrero. Las temperaturas de la nave durante dicho periodo oscilaron entre -5 a 31°C. Por tanto, la dinámica que presentaron los tratamientos en la **CC** durante las semanas de evaluación se debe a la suma de condiciones ambientales, que llevaron a esta variable a cambios erráticos (patrón de subir y bajar) coincidiendo con **Tokach (2009)**. Por esta razón, este autor recomienda pesar los cerdos, lo cual no siempre es factible de realizar. Sin embargo, en el presente estudio sí se llevó a cabo dicha práctica. La correlación que mostraron las variables **GPS** y **CC** fue de $r = 0.40$.

Louis et al. (1994b) admiten que el cuidado alimenticio al que están sometidos los verracos es estricto y con un margen estrecho, puesto que cambios pequeños en el suministro de pienso ($\approx 10\%$ del consumo día⁻¹) pueden generar rápidas y drásticas diferencias en la **CC**, libido, producción seminal, calidad espermática, y capacidad fecundante de los espermatozoides (**Close y Roberts, 1991; Close, 1993a; Wilson et al., 2004**).

El ritmo de recogidas establecido en esta investigación fue de un salto a la semana. El ZnSO₄150 (7.38 días) mostró diferencias con el Control (6.36 días) y Zn-Met200 (6.25 días). Los resultados demuestran que el incremento en el **IE** fue de 1.02 a 1.13 días con respecto a los tratamientos señalados. Estudios realizados al respecto manifiestan que el **IE** puede estar afectado por factores de salud, temperatura ambiental, líbido o por la calidad y cantidad de pienso consumido (**Kemp, 1989; Kemp et al., 1989; Louis et al., 1994a,b; Mateos et al., 1997; Wilson et al., 2004; Hoy, 2007**).

En este estudio el mayor **IE** del ZnSO₄150, se debió probablemente a un problema de salud que presentaron dos de los verracos. Sin embargo, el resultado del Control fue posiblemente mejorado por el aumento en el **CPD** y su efecto en el epitelio testicular. **Kemp (1989)** y **Wilson et al. (2004)** coinciden en que el aumento de 0.25 a 0.32 Kg de pienso día⁻¹ verraco⁻¹, ayuda a mantenerlos en niveles productivos adecuados, además de evitar el efecto ambiental (al menos 1°C por debajo de su línea de termoneutralidad, 20°C). No obstante, **Liptrap et al. (1970)** encontraron que verracos que consumían pienso con 22 a 29 ppm de **Zn** redujeron el tamaño testicular relacionando esto hecho con la disminución de la líbido que presentaron.

Los verracos del Zn-Met200 se comportaron con mayor líbido y calidad de monta durante todo el experimento, destacando el hecho que ningún verraco dejó de saltar. Esto, puede estar relacionado con el efecto que la fuente y nivel de **Zn** ejercen sobre el desarrollo de las células de Leydig y los receptores **LH** los cuales, inducen la excreción de enzimas esteroideogénicas, aumentan la producción de esteroides testiculares incluida la androsterona y la actividad de esteroideogénesis. En este sentido, se hace necesario la realización de análisis para determinar la concentración de andrógenos así como un análisis histológico de testículo para establecer dicha relación (**Lunstra et al., 2003; Wilson et al., 2004; Zamaratskaia, 2004; França et al., 2005; Johnson et al., 2008**). El resto de los tratamientos mostraron un **IE** significativamente igual.

Al analizar el nivel de **Zn** se observa que los tratamientos con mayor concentración (200 ppm) tuvieron una reducción del **IE** aunque entre ellos, no existieron diferencias significativas. A pesar de las diferencias el **IE** puede considerarse como una variable constante. Además, el comportamiento general

de los animales frente al maniquí fue bueno. Por lo tanto, las diferencias no se observan relacionadas con consumo de pienso en los tratamientos que contenían adicionalmente alguna fuente de **Zn**, pero sí con la manera en que metabólicamente funcionan las fuentes y niveles de **Zn** en el tejido testicular.

Existen evidencias científicas suficientes (**Evenson et al., 1993; Bedwal y Bahuguna, 1994; Mahan et al., 2002; Lunstra et al., 2003; Hostetler et al., 2003; França et al., 2005; Ugwu et al., 2009**), para mostrar la estrecha relación que existe entre el **Zn** y el crecimiento tisular incluido el peso y tamaño de testículos, debido al mayor desarrollo y densidad de los túbulos seminíferos. Por ello, se esperaba encontrar algún efecto en el tamaño de la región escrotal (**SCTD, SCTI, LTD y LTI**). Sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos.

Schell y Kornegay (1996) y **Edwards y Baker (1999)** mencionan que las fuentes de **Zn** producen crecimiento somático de forma distinta, ya que al comparar las **FO** (Zn-Met y Zn-Lis), con las **FI**, la ganancia de peso es mayor en las primeras. Sin embargo, **Cheng et al. (1998)**, no encontraron dicha diferencia señalando que las **FO** se comportan igual que el $ZnSO_4 \cdot H_2O$ pero, diferente al **ZnO** coincidiendo esto último con **Rojas et al. (1995)** y **Ward et al. (1996)**. Mientras que, **Creech et al. (2004)** señalan que el nivel de **Zn** utilizado con dichas fuentes varía la respuesta en el crecimiento tisular.

El análisis de la **SCTT** revela una tendencia de aumento de tamaño testicular en los tratamientos con $ZnSO_4 \cdot H_2O$. La diferencia en **SCTT** mostró ≈ 3 cm más de tamaño en comparación con el Zn-Met, y en cuanto a la **LT** las diferencias entre ambos tratamientos fue de ≈ 1.16 cm. Estos resultados se ajustan a los presentados por **Martin et al. (1994)** quienes señalan que esta fuente tiene un efecto positivo y mayor a los que muestran las **FO** y otras **FI**.

Las medidas escrotales de verracos con 12 meses de edad publicadas por **Trudeau y Sanford (1986)**, (ancho, 7.5 a 8.5 cm; longitud, 14.5 a 16.0 cm) fueron inferiores a las registradas en esta investigación, 10.47 a 13.07 cm de ancho (**SCT**) y 22.07 a 24.45 cm de **LT**.

Valorando el crecimiento del área escrotal se aprecia un aumento significativo y lineal, coincidiendo con lo publicado por **Allrich et al. (1983)** y **Lee et al. (1987)**. El efecto de los tratamientos en las variables medidas, demuestran

que cada tratamiento produjo de forma particular una dinámica de crecimiento que fue constante y homogénea durante el periodo evaluado.

Analizando las posibles correlaciones entre **PV** y medidas del área escrotal (**SCTD, SCTI, SCTT, LTD y LTI**), se observó que la correlación fue distinta entre tratamientos. Los valores significativos estuvieron en el orden de $r = 0.25$ y $r = 0.79$. Estos valores se aproximan a los descritos por **Almeida et al. (2006)**, quienes encontraron una $r = 0.87$. Cada tratamiento tuvo correlaciones distintas, siendo el Zn-Met quien mostró una menor correlación entre el **PV** con las medidas del área escrotal ($r = 0.21$ a $r = 0.55$). En cambio, en el ZnO la correlación encontrada fue significativamente alta ($r = 0.47$ a $r = 0.75$). Es importante comprender que estas mediciones deben tomarse con reserva, ya que no son un indicador adecuado del crecimiento testicular, coincidiendo con lo expresado por **Allrich et al. (1983)**.

La medición del **PT** y **PE** se realizó en los animales sacrificados en matadero. Los tratamientos no mostraron efecto significativo para ambos tejidos. Sin embargo, se observa que existe un aumento en el **PT** en verracos que fueron tratados con Zn-Met150. Las diferencias llegaron a ser del orden de ≈ 22 a 50 g con respecto a los valores más bajos. A pesar de ello, los resultados obtenidos en este estudio fueron inferiores a los datos de **PT** en animales entre 8 y 12 meses de edad publicados por **Allrich et al. (1983)** y **Lee et al. (1987)** quienes obtuvieron valores de 510 a 638.5 ± 43.9 g (media \pm EEM) y **Okwun et al. (1996)** con valores de 497.78 ± 34.74 g. **Huang y Johnson (1996)** realizaron un estudio en diez generaciones de verracos seleccionando por **PT**. Estos machos tuvieron un **PT** de 318.0 ± 10.1 g mientras que los verracos que no habían sido seleccionados sólo alcanzaron 255.1 ± 12.3 g. Teniendo en consideración estos resultados, y la heredabilidad de la característica de tamaño testicular ($h^2 = 0.35$), se considera fundamental utilizar la nutrición como un potenciador del desarrollo y crecimiento del parénquima testicular. El tamaño y **PT** puede representar de forma significativa la producción de 3.2 a 6.1×10^9 Spz g^{-1} de testículo (**Trudeau y Sanford, 1986; Allrich et al., 1983; Johnson et al., 1994; Rathje et al., 1995; Harder et al., 1995; Huang y Johnson, 1996**).

Con respecto al resultado obtenido por el tratamiento Control no es fácil explicar por qué un nivel de 25 ppm de **Zn**, pudo producir similares pesos testiculares que el resto de tratamientos. Tal vez la explicación esté relacionada

con lo expuesto por estudios donde se observó que bajo condiciones basales de **Zn**, la **MTF1** del citoplasma suele apoyar de forma positiva al **Zn** en la producción de **MT** y **ZnT1**, permitiendo almacenar mayor cantidad de **Zn** en los zincosomas transfiriendo cantidades suficientes al núcleo (**McMahon y Cousins, 1998; Cousins et al., 2006; Hernández, 2006; Murakami e Hirano, 2008; Jackson et al., 2008**).

Los resultados indican que al aplicar mayor nivel de **Zn** o cambiar la fuente no se mejoró el **PT**. Esto está en concordancia con lo expuesto por **Carlson et al. (2007)** y **Hernández, (2006)**, quienes identificaron que es más evidente el efecto del nivel de **Zn** que el cambio en la fuente de dicho elemento. Por ello, la pregunta sería si vale la pena utilizar la concentración (165 ppm) que el **NSNG (2010)** ha publicado recientemente, cuando la evidencia científica es incipiente, y no argumenta el efecto negativo que puede sufrir el crecimiento testicular de testículo o la reducción de la producción y calidad espermática en verracos cuando se utiliza un nivel superior a 150 ppm y se incluyen fuentes orgánicas.

En cuanto al **IG**, se puede señalar que no existieron diferencias entre tratamientos pero, los valores fueron inferiores a los encontrados por **Okwun et al. (1996)** y **Almeida et al. (2006)**. Estos autores muestran **IG** de 0.4, el doble del obtenido en los tratamientos probados. Por tanto, los valores indican un menor crecimiento testicular con respecto al **PV** de los machos. Es probable que la restricción alimenticia haya afectado el desarrollo de los testículos, y no se encontraron diferencias debido a que todos los verracos fueron sometidos al mismo sistema.

Ya en **1961**, **Stevermer et al.** determinaron que los cambios nutricionales en verracos suelen afectar de manera más rápida y con mayor magnitud los órganos accesorios que a los testículos. En el caso de los epidídimos (**PED, PEI**), se puede señalar que el peso no evidenció diferencias entre tratamientos. Los resultados de este estudio (70.0 a 91.8 ± 5.5 g; media \pm **EEM**) son cercanos a los publicados por **Harder et al. (1995)** (62 a 87 g), superiores a los de **Huang y Johnson (1996)** (60.8 ± 2.5 g a 79.2 ± 2.1 g) y más bajos que los de **Allrich et al. (1983)** (147.2 ± 5.6 g). A pesar de las diferencias encontradas con otras investigaciones, el desarrollo de los epidídimos está en relación con edad y peso de los verracos analizados.

Sin embargo, los valores demuestran la existencia de diferencias en el **PE** del orden de 17.63 g a 19.5 g, ya que el ZnSO₄200 (**PED**, 89.5 g; **PEI**, 91.8 g) registró epidídimos más pesados que el resto de tratamientos siendo el Zn-Met200 el que menor peso produjo (**PED**, 70.0 g; **PEI**, 74.2 g).

La concentración de **Zn** existente en el epidídimo está estrechamente relacionada con el **Zn** liberado por los espermatozoides durante su maduración (**Henkel et al., 2003; França et al., 2005**). A la vista de los resultados obtenidos se considera que existió un efecto negativo del **Zn** en aquellos verracos que consumieron la fuente orgánica con 200 ppm, provocando un efecto citotóxico en el epitelio epididimario que se ve reflejado tanto en el peso como en los resultados de calidad seminal que serán presentados en el siguiente capítulo.

5.2. Análisis de la dinámica de producción y calidad seminal que presentan los verracos, a través del espermiograma básico del eyaculado y de la evaluación de la integridad acrosomal

El volumen de eyaculado en las variables **FR**, **FP** y **VT**, no mostró diferencias entre el tratamiento Control y el resto de los tratamientos.

Los valores de **FR** obtenidos en este experimento, fueron menores a los reportados por **Gadea (1997)** describiendo valores entre 101.68 a 120.87 mL. **Martínez (2002)**, **Roca et al. (2006)** y **Ugwu et al. (2009)** reportaron intervalos de valores de **FR** de 46 a 185 mL. Estos investigadores utilizaron verracos de 6 a 48 meses, sometidos a un **IE** similar al utilizado en este estudio (7.78 días). **Knox (2000)** establece que un buen método de extracción permite obtener un volumen de **FR** entre 80 y 100 mL. **Louis et al. (1994a, b)** y **Huang y Johnson (1996)** mostraron que la edad no tienen un efecto lineal con el volumen del eyaculado en verracos mayores de 9 meses, mientras que el **IE** si lo afecta. **Ugwu et al. (2009)** determinaron que puede existir diferencias entre razas al comparar el **Vol** de **FR**. También demuestran que el tamaño testicular y el peso corporal afectan a esta variable debido a su alta correlación ($r = 0.79$).

Es probable que el tamaño testicular obtenido en este estudio y que se refleja en el valor de **IG** <2, sea una de las causas para explicar el menor **Vol** en la **FR**.

Hacker et al. (1994) mostraron que el sistema de alimentación afecta el **Vol** de eyaculado en verracos menores de 180 días, observando que la restricción del pienso redujo el **Vol** de 117 a 83 mL. Estos valores son similares a los de este estudio (63.40 a 75.01 ± 8.15 mL: media ± **EEM**); además la cantidad de pienso suministrada estaba basada en el peso corporal del verraco, similar al sistema de alimentación de esta investigación. **Brown (1994)** menciona que el sistema de alimentación en verracos maduros no afecta el **Vol** del eyaculado, ni la concentración espermática, pero en verracos jóvenes (<180 días) puede reducir el tamaño testicular y la concentración espermática. En este experimento se inició la restricción de pienso a los 6.5 meses, con un **PI** de 110 Kg, suministrando 3.5 Kg de pienso, por ello no se considera la causa para obtener menor **FR**. Al inicio de la recolección de eyaculados, se redujo la cantidad de pienso (1.8 a 2.5 Kg), lo cual probablemente no fue suficiente para permitir un crecimiento testicular mayor y por lo tanto un aumento en el **Vol** de la **FR** (**Harden et al., 1995; Huang y Johnson, 1996; Lunstra et al., 2003**).

Es importante hacer notar que el tratamiento Control tuvo un nivel de **Zn** de 25 ppm, al menos cinco veces menos que el resto de los tratamientos, y que alcanzó niveles de **FR** similares, lo cual probablemente se deba a que el **CPD** favoreció al tratamiento Control. **Kemp (1989)** y **Brown (1994)** afirman que los animales primero satisfacen sus necesidades nutricionales de mantenimiento y desarrollo, y el resto lo derivan a la reproducción, esto explica que el consumo de 50.4 mg día⁻¹ de **Zn** de los verracos del tratamiento Control, fuera suficiente para producir la misma cantidad de **FR** que los verracos asignados al resto de tratamientos, los cuales consumían al menos 285 mg día⁻¹ del mineral. Esto significa que los niveles de **Zn** recomendados (**NRC, 1998; FEDNA, 2006; NSNG, 2010**) pudieran estar sobreestimados. **Creech et al. (2004)** demostraron que un pienso base con 23 a 27 ppm, adicionado con 50 a 500 ppm no mejoró el desarrollo de cerdos en crecimiento y finalización.

En cuanto a los tratamientos que contenían alguna de las fuentes, se observa que las **FI** aumentaron la **FR**, al incrementar el nivel de **Zn**, lo cual no fue observado en el Zn-Met, indicando que esta **FO** a un nivel de 200 ppm no mejora el **Vol** de la **FR**, y por el contrario tiende a perjudicarlo (**Turgut et al., 2003**). **Wilson et al. (2004)** mencionan que un aumento de 75 a 150 ppm de **Zn** en el

pienso, no mejoró la producción y calidad seminal, pero ayudó a mejorar los problemas locomotores de los verracos.

Hunt et al. (1992), **Martin et al. (1994)** y **Knox (2000)** señalan que una concentración reducida de **Zn** en el pienso puede apoyar al crecimiento tisular, incluido el de células de Leydig, pero no desarrollar la capacidad total de los receptores a **LH** y por tanto, disminuir la concentración de testosterona, provocando una menor producción de espermatozoides y de secreciones de las glándulas accesorias, ocasionando una reducción en la libido. Según **Hunt et al. (1992)** en humanos, la contribución de la secreciones de las glándulas accesorias (**FP**) al **VT**, es del 60% al 80 % y en el cerdo es de 80% a 90% (**Knox, 2000**).

Los resultados en esta investigación no mostraron que entre tratamientos existieran diferencias en la producción de **FP**. Los datos corresponden a valores de eyaculados normales, exceptuando el ZnO150 (68.85 mL). **Knox (2000)** señala que la **FP** suele estar entre 70 a 400 mL. Sin embargo, el tratamiento ZnO150 redujo entre 27 a 52% la producción de **FP**, con respecto al resto de los tratamientos. Este tratamiento, tuvo verracos que mostraron menor libido, y el **IE** aumentó. Por ello existe la posibilidad de que estos animales tuvieran un comportamiento distinto debido al nivel de **Zn** y no tanto por la fuente, ya que los resultados evidenciaron que los tratados con 200 ppm de ZnO, se comportaron de forma más cercana al resto de los tratamientos.

Louis et al. (1994a) y **Brown (1994)** mencionan que un inadecuado consumo de nutrientes afecta de forma rápida a las glándulas accesorias y se ve reflejado en la producción de **FP**, además describen que la **FP** está relacionada con el tamaño del epidídimo, por lo que es probable que el menor tamaño mostrado por los tratamientos ZnO150 y Zn-Met200 haya sido consecuencia de la menor cantidad observada con respecto al resto de los tratamientos. El coeficiente de correlación (**Tabla 25**) entre las variables **FP** y **PE**, en ZnO150 ($r = 0.73$) y Zn-Met150 ($r = 0.91$), mostró una fuerte asociación que indica que si el tamaño del epidídimo disminuye, el **Vol** de **FP** será afectado de la misma manera. Utilizando este hecho se puede mencionar que es probable que las glándulas accesorias y en particular la próstata hayan sido afectadas al igual que el epidídimo

No hay que pasar por alto que al menos en las **FI**, el aumento de nivel de **Zn** (150 a 200 ppm) produjo un incremento en el **Vol** de **FP**. Pero al igual que en la **FR**, se observa que el aumento de la concentración del mineral en el Zn-Met perjudicó la producción de **FP**.

El **VT** reportado por **Louis et al. (1994a,b)**, **Marin-Guzman et al. (1997)**, **Estienne y Harper (2004)**, **Rodríguez (2008)**, **Sulabo et al. (2008)** muestra un valor medio alto (155 mL a 276 mL) al que fue obtenido en esta investigación (130.58-207.32 ± 26.93 mL: media ± **EEM**). Sin embargo, los valores cercanos a los reportados por los autores antes señalados, fueron los producidos por **FI** a nivel de 200 ppm (ZnSO₄200, 207.32 mL; ZnO200, 183.4 mL; **EEM**=26.93). El **Vol** de estos tratamientos muestra un incremento que representó en la fuente ZnSO₄·H₂O un 15%, y en ZnO el 43%. Mientras que la **FO** al utilizar el nivel de 200 ppm produjo un ligero decremento (7.7%) en el **VT**.

Es evidente que el tratamiento Control a pesar de la menor cantidad de **Zn**, tuvo mayor **VT** que el ZnO150 (36.82 mL = 22%) y que el Zn-Met200 (9.5 mL = 5.7%), ya que en estos dos últimos tratamientos la menor **FP** contribuyó a que se redujera el **VT**. Esto muestra el efecto negativo del menor tamaño que tienen los epidídimos y las glándulas accesorias en ambos tratamientos.

Al analizar el efecto del tiempo en las variables **FR**, **FP** y **VT**, se encontraron diferencias que indican que conforme aumentó la edad, **PV**, **TT** y **TE**, se incremento la producción (mL), lo que coincide con **Huang y Johnson (1996)**, **Ford et al. (1997)** y **Lunstra et al. (2003)**. Sin embargo, el efecto del tratamiento durante el periodo de 16 semanas evaluadas, no mostro diferencia. Lo que indica que los tratamientos no modificaron su efecto durante el periodo probado.

La **Mot** encontrada en este experimento no mostró diferencias entre tratamientos, y los valores se ubicaron dentro de lo considerado como adecuado para esta característica seminal (>70%) (**Shipley, 1999; Knox, 2000; Audet et al., 2004; Roca et al., 2006; Fraser y Strzezeck, 2007; Jacyno et al., 2007**). **Gadea (1997)** publicó que la **Mot** de eyaculados clasificados por la prolificidad demostrada (>10 lechones camada⁻¹) fue de 65 a 80%. **Roca et al. (2006)** describieron que cuando un eyaculado muestra porcentajes de **Mot** de 83% suele producir tasa de fertilidad altas, mientras que valores de 80% generan

tasas pobres. Por su parte **Huang y Johnson (1996)** mostró que el incremento de eyaculados por semana disminuye la **Mot** de 85 a 73%.

Desde el punto de vista nutricional, **Louis et al. (1994a)** señalan que la **Mot** no es afectada por el nivel de proteína, y los valores suelen variar entre un 80% a 84%. **Sulabo et al. (2008)** probaron dos sistemas de alimentación (restringida y *ad libitum*), los cuales no modificaron la **Mot** (86 a 90%). Para el caso de esta evaluación, se puede señalar que los resultados fueron ligeramente inferiores a los valores señalados, considerándolos como eyaculados que probablemente no producirán problemas de fertilidad, excepto el tratamiento Zn-Met200.

A pesar de no existir diferencias entre tratamientos, en el Zn-Met200 se observó una disminución de 1 a 6% de la **Mot**. **Hunt et al. (1992)** describió que el **Zn** mejora la **Mot**, pero cuando existe un consumo excesivo, la **Mot** se deprime significativamente; por su parte **Turgut et al. (2003)** señalan que la sobredosis de **Zn** reduce la motilidad.

En el 2000, **Althouse et al.**, encontraron que la **Mot** no se ve afectada por el tipo de fuente de **Zn**, ya que compararon fuentes quelatadas con ZnSO₄ y ZnO. Por ello es probable que la reducción de la tasa de **Mot** se deba al nivel de **Zn** incluido en el pienso.

Estudios sobre la concentración de **Zn** en el espermatozoide y **PS** indican que no está relacionada con la **Mot** (**Behne et al., 1988; Hunt et al., 1992**). En este estudio, no se encontró una relación lineal entre la concentración de **Zn** con el sedimento espermático (**SE**) y la **Mot**, en todos los tratamientos, excepto el Zn-Met200. Los valores del coeficientes de determinación muestran que la **Mot** en el tratamiento Zn-Met200 disminuye cuando se incrementa el **Zn** en el **SE** ($R^2 = 0.71$, $P = 0.0001$) (**Tabla 28**).

Tabla 28. Valores de regresión de la concentración de **Zn** (ppm) en sedimento espermático (**ZnSE**) y motilidad (**Mot**).

Tratamiento	Intercepto	$\beta_1\chi_i$	Probabilidad P = F	R ²
Control	80.69	0.004	0.17	0.08
ZnSO ₄ 150	82.51	0.002	0.62	0.01
ZnSO ₄ 200	76.14	0.005	0.18	0.08
ZnO150	84.66	-0.005	0.27	0.06
ZnO200	81.77	0.002	0.54	0.02
Zn-Met150	86.74	-0.004	0.13	0.09
Zn-Met200	110.72	-0.028	0.0001	0.71

Ecuación de regresión: $\gamma_i = \beta_0 + \beta_1\chi_i + \varepsilon_i$. R^2 =Coeficiente de determinación.

Es evidente que el comportamiento de las fuentes de **Zn** es distinto, como lo señala **Rojas et al. (1995)**, pero en este estudio se hace patente, que el nivel también lo es y puede afectar adversamente. Tal es el caso del Zn-Met, que a 150 ppm produce una **Mot** de $84.5 \pm 0.15\%$ y con 200 ppm, la reduce a $78.98 \pm 0.15\%$.

Martin et al. (1994) señalan que el **Zn** interviene en el control de la síntesis de esteroides, en la integridad del retículo endoplasmico liso de las células de Leydig, así como en la sensibilidad de los receptores a **LH** y los mecanismos de liberación de testosterona en el testículo, lo que confiere alguna razón para pensar que cualquier cambio en la concentración de **Zn** en el pienso puede alterar las variables antes descritas, contribuyendo de forma directa con el **Vol** de eyaculado en sus distintas fracciones. Pero con la **Mot** es más aceptado el hecho que una deficiencia ligera de **Zn** puede no estar relacionada, ya que las reservas corporales de **Zn** que se generan en los zincosomas celulares, pudieron ayudar en el testículo para que las células espermáticas no se vieran afectadas. Sin embargo, una restricción ligera pero por un tiempo prolongado puede lograr afectar a las células espermáticas, observando una disminución de la **Mot** (**Hunt et al., 1992**), así como otros daños en **ADN** nuclear (**López-Fernández et al., 2006**).

Henkel et al. (2003) señalan que los espermatozoides deben deshacerse del **Zn** (60%), para la formación de las **ODF** del flagelo, durante su proceso de maduración en el epidídimo. El **Zn** excretado por el espermatozoide, es entonces transportado a través del epitelio de la cabeza del epidídimo, para su reutilización. Sin embargo, en evaluaciones de células epiteliales intestinales se ha demostrado que cuando existe un exceso de **Zn** en el medio, existen mecanismos que impiden la absorción de ese **Zn** en epitelio y es dependiente de la presentación. Utilizando esta información, se puede sugerir que la concentración excesiva de **Zn** en la cabeza del epidídimo en tratamientos con mayor nivel, pudo inhibir la importación del mineral al interior de las células epididimales. Lo que redujo la excreción del **Zn** espermático e induciendo a una menor capacidad de **Mot** en el tratamiento Zn-Met200, lo que coincide con las investigaciones realizadas por **Bedwal y Behuguna (1994)**, que además señalan que la **CM** es menor.

Por otra parte es probable que el menor tiempo que permanecieron los espermatozoides en el epidídimo, contribuyeran a reducir la excreción de citoplasma y con ello el **Zn**, generando mayor porcentaje de **MA** en el eyaculado de los verracos tratados con Zn-Met200, las cuales fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos (**Tabla 23 y 26**), siendo las **GP** y **GD** una de las causas.

La **Mot** cambio durante el tiempo analizado, y esto estuvo relacionado con el tratamiento evaluado. Esto es normal ya que hay factores ambientales que pueden llegar a producir cambio en la **Mot**. Pero al restablecer estos cambios, la **Mot** normalmente suele regresar a los niveles previos, ese fue el caso de los tratamientos ZnSO₄200 y ZnO150, pero no del Zn-Met200. Este último mostró durante 11 semanas una media de **Mot** de 70%, lo que puede ser debido a un efecto permanente del tratamiento.

En cuanto a la **CM**, no existieron diferencias entre los tratamientos. Los valores que se obtuvieron indican que el tratamiento Zn-Met200 también produjo una **CM** ligeramente inferior (2.95) al resto de los tratamientos (3 a 3.42). **Rueda et al. (2009)** obtuvo una **CM** de 4.1, con una frecuencia del 75%, mientras que **Gadea (1997)** reportó que la **CM** más alta (3.17) fue mostrada por verracos que eran clasificados como de alta fertilidad (>80%), mientras que aquellos que tuvieron fertilidad entre 40% a 60% la **CM** fue de 2.38. De forma general **Rueda et al. (2009)** señala que es idóneo un eyaculado con **CM** de 3 y **Mot** de al menos 75%. También se observó cambios durante las evaluaciones realizadas, en donde algunos tratamientos tendieron a mostrar un descenso, como fue el tratamiento ZnSO₄150, que se recuperó y mejoró durante las últimas semanas. Sin embargo, el tratamiento Zn-Met200 no restableció la **CM** mostrada durante las primeras semanas, coincidiendo con el comportamiento que tuvo de **Mot**. Es evidente que en la medida que los verracos fueron sometidos a un proceso de eyaculación sistemático el tratamiento produjo un efecto constante, que para el caso de Zn-Met200 resultó negativo.

En el caso del **pH**, se observa que los valores tampoco mostraron diferencias entre los tratamientos, pero son mayores en ≈ 0.8 unidades de **pH** a los reportados por **Foley et al. (1964)**, **King y Macpherson (1966)**, **Trudeau y Sanford (1986)**, **Gadea (2003)**, y **Rueda et al. (2009)** quienes encontraron **pH** de

7.3 a 7.69. También fue observada la existencia de una pequeña población de verracos que presentan valores de hasta 8.55. En esta investigación el mayor pH (8.26) fue producido en el tratamiento Zn-Met200.

Los valores de pH suelen incrementar con el tiempo pos-eyaculación, y los valores observados en este estudio son similares a los reportados por **Nevo et al. (1970)**, al tener 20 minutos de haber sido eyaculados. Es probable que los valores de pH de este estudio, estén relacionados con la disminución de secreción de FP que refleja la funcionalidad de la glándula accesoria y en particular la prostática (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Ali et al., 2007**). El pH del eyaculado suele ser ácido debido a la cantidad de ácido cítrico, Zn y ácido fosfórico, pero cuando existe un daño en la próstata el pH suele incrementarse (**Ali et al., 2007**). Lamentablemente en este estudio no fue analizada la glándula prostática.

El comportamiento de pH varió en el tiempo de la prueba, y este mostró estar relacionado con el tratamiento. En el pH se observaron valores mayores a 8 durante la mayoría de las semanas evaluadas. Pero los tratamientos ZnSO₄200, ZnO200 y Zn-Met200, produjeron valores tan cercanos a los descritos por **Foley et al. (1964)**, **King y Macpherson (1966)**, **Trudeau y Sanford (1986)**, **Gadea (2003)**, **Rueda et al. (2009)**, al menos durante 4 a 5 semanas de evaluación, para luego recuperar el pH por encima de 8. Lo cual indica que el nivel de Zn es probablemente el que controla el pH. Lo cual puede ser explicado por el efecto del mineral en la producción de PS y su efecto reductor en esta característica.

La variable Spz mL⁻¹ mostró diferencias significativas entre los tratamientos, obteniendo concentraciones al menos el doble de los reportados por **Trudeau y Sanford (1986)**, **Louis et al. (1994b)**, **Jacyno et al. (2007)**, **Rueda et al. (2009)**, los cuales estaban entre 118 a 680 x 10⁶ Spz mL⁻¹. Sin embargo, **Fraser y Strzezek (2007)** obtuvieron concentraciones de hasta 856 x 10⁶ Spz mL⁻¹. Existe el reconocimiento sobre el efecto positivo que tiene el Zn en el crecimiento testicular, producción hormonal y espermatogénesis (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Rathje et al., 1995**). Aunque es evidente que el comportamiento productivo del tratamiento Control no difirió con el resto de tratamientos, la explicación pudiera estar relacionada con el mayor consumo de pienso del tratamiento Control. Por otra parte los estudios sobre necesidades de Zn en verraco, que fueron realizados en los años '70 y '80, y que aún sirven de referencia, dada la incipiente investigación que se realiza en esta área, no

utilizaban la enzima fitasa, por lo que aparentemente un pienso base era incapaz de cubrir las necesidades nutricionales de los verracos, provocando alteraciones en la piel principalmente. Sin embargo, hoy día el uso de la enzima fitasa puede colaborar para que la concentración de **Zn** del **PB** sea más biodisponible, aumentando su aprovechamiento (**Williams et al., 2005**), lo que evidenciaría un requerimiento menor de **Zn** por parte de los verracos y tal vez la gran tolerancia que tienen a efectos citotóxicos dependiendo de la fuente de **Zn** y de no rebasar niveles de 150 ppm, como muestra este estudio.

La mayor concentración espermática la produjo el ZnSO₄150, que fue de 1114.83×10^6 **Spz mL⁻¹**, la cual es mayor que lo publicado por **Williams et al. (2005)**, mientras que la concentración espermática de Zn-Met200 (855.7×10^6 **Spz mL⁻¹**) fue igual a lo reportado por **Fraser y Strzezek (2007)**. Las diferencias encontradas entre ZnSO₄150 y Zn-Met200 resultaron significativas. Pero estos a su vez fueron iguales al resto de los tratamientos (907.30 a $1081.57 \pm 72.12 \times 10^6$ **Spz mL⁻¹**: media \pm **EEM**). Como se ha descrito, el tamaño testicular está relacionado con la producción de espermatozoides, sin embargo, al realizar la correlación entre el **PT** y la **Spz mL⁻¹**, no todos los tratamientos mostraron evidencias significativas de estar relacionadas, pero si se observó en ZnSO₄150.

Wedekins et al. (1992), **Rojas et al. (1995)** y **Case y Carlson (2002)** demostraron que las necesidades de **Zn** pueden ser cubiertas por una cantidad distinta de este mineral, dependiendo de la fuente utilizada y la combinación de ingredientes del **PB**. Esto explica probablemente las diferencias en la concentración espermática presentada en este experimento, sean debidas al efecto por una fuente pero con diferente nivel utilizado (**Rojas et al., 1995**). Por su parte **Althouse et al. (2000)** y **Baker et al. (1998)** señalan que el uso de **FI** y **FO** no producen diferencias en la concentración espermática, cuando se comparan entre ellas. Mientras que **Fakler et al. (2002)** demostraron que al utilizar el **Zn** quelatado con algún aminoácido, incrementa la concentración espermática.

Con respecto a los resultados obtenidos de producción espermática, durante el periodo evaluado, estos demuestran que esta variable se comporta de forma distinta durante el tiempo y es afectada por el tratamiento (interacción Tratamiento*Tiempo). Se mostró en algunas semanas una disminución en la producción espermática, pero esta fue recuperada en todos los tratamientos, excepto en el Zn-Met200. A partir de la quinta semana, la concentración

espermática mostrada por el Zn-Met200 fue inferior al resto de los tratamientos. Asimismo, se identifica el efecto que tiene el crecimiento de los verracos, ya que se observó un aumento del tamaño testicular y un incremento de la producción espermática como lo refieren **Lunstra et al. (2003)** y **Ugwu et al. (2009)**.

En cuanto a la presencia de **MA** no existieron diferencias entre los tratamientos probados. Aunque, Zn-Met200 produjo al menos 36% más **MA** que el resto de los tratamientos. En general, las **MA** de este estudio, fueron similares a los reportados por **Louis et al. (1994b)**, **Huang y Johnson (1996)**, **Shipley (1999)**, **Audet et al. (2004)**, **Roca et al. (2006)** y **Sulabo et al. (2008)** que corresponden a valores entre 5.9 a 14.4%. **Roca et al. (2006)**, coinciden con **Gadea (1997)**, **Estienne y Harper (2004)** y **Ugwu et al. (2009)** quienes mostraron que del 16.5 al 21% de **MA** puede ser frecuente en verracos con buena fertilidad (>80%). El **Zn** tiene un efecto directo sobre los espermatoцитos primarios, por lo que puede verse alterado el porcentaje de **MA**. **Chesters (1978)** y **Martin et al. (1994)**, señalan que el **Zn** es necesario para la expresión de genes entre la **G₁** y **S**, **S** y **G₂**, y la **G₂** y la fase **M** del ciclo celular, así como, en la formación de los receptores de unión “dedos de **Zn**” de **ADN**, por lo que cabría la posibilidad de encontrar daños morfológicos a nivel de cabeza, o también sería posible que las células estuvieran formadas anómalamente (desarrollo incompleto) debido a una disminución de hormonas, producción de testosterona por daño en células de Leydig (**Bedwal y Bahuguna, 1994**). Pero lo anterior no coincide con los resultados encontrados con el tratamiento Control, ya que la tasa de **MA** es menor al resto de tratamientos, por lo que es probable que los verracos no sufrieran daño en testículo, ni en vesículas seminales. Lo anterior concuerda con lo descrito con **Ali et al. (2007)** quien tampoco encontró relación entre la concentración de **Zn** y la presencia de **MA**. **Hunt et al. (1992)** encontraron que espermatoцитos de humano tratados con diferentes niveles de **Zn** (subóptimos y óptimos) no tuvieron diferencias significativas en la presencia de **MA**. Por su parte **Althouse et al. (2000)** utilizaron fuentes quelatadas de **Zn** y no encontraron diferencias en las tasas de **MA**, lo que coincidió con **Baker et al. (1998)** al utilizar ZnO y ZnSO₄.

En este caso la concentración de **Zn** en el tratamiento Control, no produjo efectos adversos sobre esta característica, pero si la concentración de 200 ppm con Zn-Met. Esto último sugiere que un elevado consumo de **Zn** puede producir

daños tanto en la morfología externa, como en la morfología de **ADN**, como se mostrará posteriormente.

El valor de **MA** observado en los tratamientos, esta dado por una proporción distinta de tipos de **MA (CL, GP, y GD)**. Al menos las **CL** y **GD** fueron diferentes entre tratamientos. **Gadea (1997)** señala que no todas las **MA** son de origen testicular, ya que su tránsito en el epidídimo puede ser factor importante para que se presente una mayor proporción de ella.

En esta investigación los valores de **CL** no superaron el porcentaje de 5.8%. Por lo tanto los valores de **CL** fueron tan bajos, como los reportados por **Gadea (1997)**, quien obtuvo 4% de **CL** el cual se considera un porcentaje normal para no tener problemas de fertilidad, así mismo, **Rodríguez (2008)** mostró en verracos sin problemas genéticos (cariotipos normales) 8.6% de **CL**, mientras que **Shiple (1999)** encontró un 5% de **CL**, recomendando que este valor no se exceda, para evitar problemas de fertilidad en el verraco. Los datos de este experimento indican que las **CL** aumentan cuando se incrementa el nivel de **Zn**, de forma indistinta a la fuente utilizada.

En esta investigación ningún tratamiento produjo porcentajes de **GP** considerados como elevados (>6%) (**Gadea, 1997**), aunque **Rodríguez (2008)** señala que valores de 2.52% son fácilmente observados cuando no existe problemas genéticos en los verracos. **Shiple (1999)** señala que las **GP** no deben exceder del 20%. El mayor valor obtenido en este experimento fue de 4.10%, y estadísticamente fue igual al resto de los tratamientos. No existió evidencia que el nivel o fuente de **Zn**, contribuyeran a aumentar el porcentaje de **GP**.

En el caso de las **GD**, se observa un incremento en el porcentaje de células dañadas, encontrándose diferencias entre los tratamientos, ya que el Zn-Met200 incrementó este tipo de **MA** en al menos 48%. Los valores a pesar de todo, no son mayores a los reportados por **Rodríguez (2008)**, quien encontró hasta 18%, sin embargo **Shiple (1999)** recomienda que no se exceda de 15% esta característica, para evitar problemas de baja prolificidad y fertilidad.

Las **GC** son productos de una deficiente eliminación del citoplasma durante la maduración del espermatozoide (**Gadea, 1997; Sansegundo, 2008**). Es probable que los tratamientos utilizados en este estudio no hayan afectado la integridad testicular, provocando que los espermatozoides tuvieran una formación

adecuada (presencia de complejos tiol-**Zn**). Pero habría que considerar la posibilidad de que el espermatozoide este afectado por el **IE**, ya que precisamente el que menos tiempo de **IE** mostró, fue el que mayor porcentaje de **GP** y **GD** produjo (Zn-Met200).

La célula espermática al remover su citoplasma en el epidídimo, elimina el 60% de **Zn** contenido en ella, esta eliminación probablemente no fue tan eficientemente realizarla debido a un posible efecto quelante del mineral tanto en la cola como en el núcleo, y tal vez al control homeostático de **Zn**, que está presente en el epidídimo como lo señalan los trabajos de **Chesters (1978)**, **Cousins (1985)**, **Hunt et al. (1992)**, **Krebs (2000)**, **Henkel et al. (2003)**, **Iguchi et al. (2004)**, y **Ohana et al. (2009)**. Dicho control está relacionado con los genes transportadores de **Zn (ZnT, Zip, MT)** que pueden limitar la expulsión de **Zn** del espermatozoide o la entrada de este mineral a través del epitelio epididimario, debido a un efecto negativo de la concentración de **Zn** en el lumen epididimario, sobre las células.

No hay evidencia científica que aclare por que una fuente puede causar mayor o menor **MA**, incluidas en estas los tipos de ellas. Pero podría pensarse que el incremento de **Zn** con una fuente orgánica, esté relacionado con su biodisponibilidad, su capacidad de rápida absorción y su mayor tiempo y concentración dentro de las células (**Rojas et al., 1995**).

Por su parte el comportamiento mostrado de las **MA** cambió durante el periodo de estudio y existió un comportamiento distinto entre los tratamientos evaluados. Se observó que en la mayoría de las semanas los tratamientos difirieron en los valores de **MA**, las cuales fueron mayores en el tratamiento Zn-Met200 y ZnO150. El primer tratamiento produjo durante 5 semanas valores mayores al 12%, alcanzando tasas del 35% de **MA**. Similar situación fue presentada por ZnO150 debido al incremento de **GP** mostrado a partir de la quinta semana.

Múltiples estudios han demostrado el efecto positivo que tiene el **Zn** en la integridad de membranas, debido a su actividad de eliminación de las **ROS**, protección de grupos **SH** para evitar la oxidación prematura de **ODF (Stohs y Bagchis, 1995; Henkel et al., 2003; Ali et al., 2007)** y acrosomas (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Ali et al., 2007**). Debido a que no se encontró diferencias entre

los tratamientos probados en **IAC**, **AD** y **AR**, no hay razón para señalar que el **Zn** suministrado a través de alguna de las fuentes haya sido el promotor de un mejor comportamiento en estas variables.

Con base a los resultados, es lógico pensar que consumos de 50.4 ppm día⁻¹ puedan ser suficientes para ejercer un efecto positivo en la conservación de los acrosomas, pero esto no corresponde al efecto que describen las algunas investigaciones. Los valores de **IAC** observados en este estudio muestran un nivel similar (82.89 a 86.62 ± 1.90%: media ± **EEM**) a los reportados por **Gadea (1997)** y **Roca et al. (2006)**. Estos autores señalan que en la medida que estos valores aumentan la fertilización y prolificidad pueden ser mejoradas, por ello **Gadea (1997)** y **Rodríguez (2008)**, indican que eyaculados con 91.2% de **IAC** producen una fertilidad superior a 80% y aumento de lechones nacidos vivos >12.

La evaluación de la **IAC** mostró que durante el tiempo analizado se mantuvieron sin diferencias, y en un intervalo de valores de 75 a 90%. Por su parte los **AD** no cambiaron significativamente durante el tiempo evaluado, aunque se puede identificar que el tratamiento ZnO200 tuvo un comportamiento más irregular, llegando a valores superiores del 10%. En el caso de los **AR**.

5.3. Evaluación del estado del ADN nuclear espermático

Los resultados mostraron que el **IF** fue diferente entre los tratamientos, los cuales fueron menores a 10%, excepto el Zn-Met200. Este último tratamiento produjo al menos 53% más de **IF**, con respecto al resto de los tratamientos.

Con base a los **IF** los tratamientos se pueden agrupar de la manera siguiente: Grupo 1 **IF** < 5%, que incluyen al Control, ZnSO₄150 y Zn-Met150; grupo 2 **IF** = 5 a 10%, ZnSO₄200, ZnO150 y ZnO200; y grupo 3 **IF** >15%, Zn-Met200. Esta agrupación permite comparar la información obtenida con los resultados que **Pérez-Llano et al. (2006)** y **López-Fernández et al. (2008)** han encontrado con frecuencia en semen fresco sin diluir.

Waberski et al. (2002), **Enciso et al. (2006)**, **Pérez-Llano et al. (2006)**, y **López-Fernández et al. (2008)** reconocen que valores menores al 15% de **IF**, no están relacionados con verracos que hayan mostrado fallo reproductivo y coinciden que el 64 a 83% de las muestras presentan valores menores al 5% de

IF. Por su parte **Rybar et al. (2004)** y **López-Fernández et al. (2008)** identificaron que valores mayores al 15% pueden provocar problemas reproductivos en el verraco. En humanos la metodología de valoración seminal considera normal 15% de **IF**, a partir de este valor las muestras hasta 29% son calificadas de mala calidad, y cuando presentan 30% o más son considerados con severos problemas de calidad espermática y con una alta probabilidad de fallo reproductivo. En verracos esta clasificación esta aun en estudio, ya que el **IF** puede modificarse por la edad del animal y por efectos ambientales y sanitarios (**López-Fernández et al., 2008;**).

En este experimento la frecuencia con la que se presenta fragmentación del **ADN** en los espermatozoides varió con el tratamiento y fue cambiando con el tiempo. Pero de forma general el 52.16% de las muestras seminales se mantuvieron por debajo del 5% de **IF**. Mientras que el 12.98% de las muestras mostró valores de fragmentación mayores al 15%.

Está claro que el tratamiento Control produjo el nivel medio más bajo de **IF** ($2.91 \pm 2.6\%$), haciéndose evidente que al ingresar alguna fuente de **Zn** al **PB** se aumentó el daño en los espermatozoides, obteniendo al menos 25%. Los valores de **IF** en el tratamiento Control se mantuvieron constantes (<5%) durante todo el periodo evaluado, a excepción de la semana 11 en la que el **IF** presentó un valor de 6.39%. Este incremento, coincide con el mostrado por el resto de los tratamientos en esa semana, por lo que es posible que se deba a un efecto independiente al tratamiento. Todos los tratamientos volvieron a presentar un incremento del **IF**, cinco semanas después. Los valores observados en estas semanas, estuvieron en relación al comportamiento que presentaron los tratamientos, por ello el Zn-Met200 (24.55%, semana 11; 20.70%, semana 18) produjo valores superiores a todos los tratamientos. Este tipo de comportamiento (cíclico) fue también identificado por **Ardón (2005)**.

Al comparar las **FI** con la **FO** se presentaron diferencias de comportamiento entre ellas. Mientras que las **FI** ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y ZnO) produjeron similares **IF** ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.03%; ZnO , 7.88%).

La **FO** superó el **IF** del $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en un 43.89% y al ZnO con 28.5%. Lo anterior podría estar relacionado con las diferencias en biodisponibilidad de las fuentes, las cuales han sido estudiadas por **Wedekind y Baker, (1990)**,

Wedekind et al. (1994), Sandoval et al. (1997), Rojas et al. (1995), Edwards y Baker, (1999). En estudios realizados con ovinos, pollos y cerdos, las **FO** (Zn-Met y Zn-Lis) han sido más biodisponibles, mostrando mayor concentración de **Zn**, en menos tiempo en el plasma sanguíneo, hígado, páncreas, riñón y hueso (**Rojas et al., 1995**).

Rojas et al. (1995), sin embargo, demostró que el Zn-Met se comporta de forma similar al $ZnSO_4$, pero diferente al ZnO. Según el autor las fuentes de **Zn** tienen distinta capacidad de estimular la producción de **MT**, siendo el **Zn** oxidado el que menos actividad estimulante produce, demostrando con ello su pobre valor biológico (**Rojas et al., 1995; Krebs, 2000**).

Sin embargo, los estudios antes referidos no coinciden con esta investigación, ya que el ZnO mostró una concentración de **Zn** (ppm) ligeramente superior al $ZnSO_4 \cdot H_2O$, tanto en testículo, epidídimo, y **PS**, como en espermatozoides. Lo que al menos indica que el ZnO se absorbe y almacena de forma similar al $ZnSO_4 \cdot H_2O$. Pero el ZnO produce un efecto diferente en el espermatozoide, ya que indujo un 20% más de **IF**, que el $ZnSO_4 \cdot H_2O$. **Rojas et al. (1995)** describen que el ZnO tiene un efecto limitado en la producción de **MT**, lo que podría estar relacionado con el hecho de que la **MT** es necesaria para transferir el **Zn** al núcleo espermático y este a su vez es requerido para la integridad y estabilidad del **ADN** (**Evenson et al., 1993**).

Existe una gran controversia sobre el efecto de las **FO** y las diferencias con las **FI** (**Wedekind y Baker, 1990; Wedekind et al., 1994; Rojas et al., 1995; Sandoval et al., 1997; Edwards y Baker, 1999**), pero de forma general se acepta que al menos el $ZnSO_4 \cdot H_2O$, se comporta de forma similar a las **FO**. Sin embargo, todos los estudios han sido encaminados a identificar el efecto de estas fuentes en el crecimiento celular somático de cerdos.

En este caso, al comparar la **FO** Zn-Met con las **FI**, se observó que la primera supera a las dos **FI** probadas en este estudio, ya que produjo 43.89% y 28.5% más **IF**, con respecto a $ZnSO_4 \cdot H_2O$ y ZnO respectivamente. Además, la fuente Zn-Met, produjo valores mayores al 10% de **IF**.

Spears (1996) demostró que el $ZnSO_4 \cdot H_2O$ y el Zn-Met ofrecen mayor retención y utilización de **Zn**, que el ZnO. En este estudio la fuente azufrada

produjo una disminución en la concentración de **Zn** en testículos, epidídimo, y espermatozoide, con respecto a la mostrada por la **FO** y ZnO. Es lógico pensar que el estímulo que ejerce el ZnSO₄·H₂O en la producción de **MT** y la expresión de los genes **ZnT**, mejoran la distribución de este mineral en la célula (**Edwards y Baker, 1999**), incluido el ingreso de este mineral al núcleo espermático. Es probable que el **S** contenido en la fuente ayudara a la integridad del **ADN** espermático, lo que se ve reflejado en los valores de **IF** (6.03%).

Con respecto a la fuente Zn-Met, los estudios señalan que ofrece una mejor absorción y producción de **MT**, debido a un efecto estimulador de los transportadores de **Zn** (**Zip** y **ZnT**), e incrementa su almacenamiento en los zincosomas, ayudando con ello a mantener la homeostasis del **Zn** en el citoplasma para evitar un estado toxico (**Rojas et al., 1995; McMahon y Cousins, 1998; Krebs, 2000**). Sin embargo, estos estudios han sido realizados en células somáticas, pero desde el punto de vista reproductivo, en la célula espermática no existe evidencia alguna. En este estudio el Zn-Met mostró tener una elevada concentración de **Zn** en los espermatozoides, lo que hace pensar que la biodisponibilidad de la fuente y su comportamiento metabólico distinto a las **FI**, favoreció ese acumulo de **Zn**. Sin embargo, esta gran cantidad de **Zn**, no favoreció la integridad de **ADN** espermático.

De manera general se puede señalar que el uso de fuentes de **Zn**, incrementan el **IF** (Control, 2.91±2.6%; ZnSO₄·H₂O, 6.03%; ZnO, 7.88%; Zn-Met, 10.49%), el cual afortunadamente no es superior en ninguno de los casos a 15%.

Sin embargo, los estudios realizados por **Hernández (2006)** señalan que la concentración de **Zn** almacenado en las células, está más relacionado con el nivel de **Zn** consumido, que con la fuente utilizada, y por tanto el efecto de la fuente queda superado por el efecto del nivel. Esto ha quedado demostrado con este estudio, en donde el incremento de 25 ppm a 150 y 200 ppm en el **PB** mostró un efecto negativo, aumentando la fragmentación de **ADN** espermático (Control, 2.91 ± 2.6% ; 150 ppm, 5.73 ± 2.72%; 200 ppm; 10.49 ± 2.66%).

Es evidente el hecho que dependiendo del nivel que se aplique de **Zn**, es el comportamiento que tiene la fuente. En este estudio se produjo mayor porcentaje de **IF** en las fuentes ZnSO₄·H₂O (150 ppm, 4.36 ± 2.63% vs 200 ppm, 7.71 ± 2.41%) y Zn-Met (150 ppm, 3.89 ± 2.57% vs 200 ppm, 16.7 ± 2.59%),

cuando se incrementó de 150 a 200 ppm el nivel de **Zn** en el **PB**. Pero en el caso de la fuente de ZnO el incremento del nivel de **Zn**, no tuvo efecto significativo, aunque 200 ppm redujo en un 30% el **IF**. Esto probablemente se debe a la baja capacidad estimulante que tienen las fuentes oxidadas sobre la producción de **MT**, por lo tanto el **Zn** citoplásmico es expulsado de la célula a través de los **ZnT**, disminuyendo el ingreso de **Zn** al núcleo, que en este caso podría haber sido perjudicial por el nivel tan alto de **Zn** (200 ppm) que ha demostrado un efecto tóxico en la célula espermática (**Hortin et al., 1993; Rojas et al., 1995; Spears, 1996; Smith et al., 1997; Yamasaki et al., 2007; Fukada et al., 2008**).

Evenson et al. (1993) y **Smith et al. (1997)**, demostraron que un exceso de **Zn** en el pienso puede desestabilizar las uniones de **S-S** y los complejos de **Zn** dentro y entre las protaminas, llevando a la desnaturalización de la estructura cuaternaria de la cromatina y mayor desestabilización del **ADN in situ**.

Por ello tal vez se puede asegurar que el **Zn** por encima de 150 ppm utilizando fuentes con alta biodisponibilidad como son las **FO** y sulfatadas, pueden originar un perjuicio en la estructura del **ADN**.

Los resultados demostraron que los tratamientos se comportan de forma independiente al tiempo, revelando que aquellos que logran producir bajos porcentajes de **IF**, lo harán siempre, y aquellos como el Zn-Met200 que producen gran daño en la célula, estará presente siempre, esto coincide con los estudios de **Pérez-Llano et al. (2006)**. Lo anterior también está relacionado al verraco, ya que aquellos que producían altos índices de fragmentación desde el inicio de la prueba, se mantuvieron en ese comportamiento. Esto ya había sido reportado por **Ardón, (2005)**, **De Ambrogi et al. (2006)**, **Enciso et al., (2006)**, **López-Fernández et al. (2008)**. **Volker en 2004 (citado por Ardón, 2005)** también señala que aquellos que son crónicos, muestran valores que pueden llegar a ser tan altos como 22%, en este caso los verracos crónicos llegaron a producir valores de hasta 60% de **IF**.

5.4. Evaluación de la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides de verracos tratados con diferentes fuentes y niveles de Zn

La utilización del **PB** con un contenido de 25 ppm de **Zn** ha mostrado ser suficiente para producir valores iguales de **FIV** que los tratamientos adicionados con distintas fuentes de **Zn**. Sin embargo, entre **FI** y **FO** hubo diferencias en el porcentaje de **FIV**, debido a que el Zn-Met registró una reducción de $\approx 15\%$.

Los valores de **FIV** encontrados en este estudio muestran similitud a los publicados por **Gil et al. (2006)**, aunque un 10% por debajo de los obtenidos por **Caballero (2007)**.

Aunque las características seminales han sido relacionadas con la capacidad de penetración de los espermatozoides tanto *in vivo* como *in vitro* (**Blazak y Overstreet, 1982; Ng et al., 1986; Liu y Baker, 1992; Gil, 2001; Braundmeier et al., 2004; Caballero, 2007**) otros autores señalan que no todas las características seminales (**Mot, MA, Spz mL⁻¹, IAc**) se relacionan con los resultados de **FIV** (**Gadea, 1997; Ardón, 2005**). En este estudio no se encontró correlación entre las características de calidad seminal y el porcentaje de **FIV**, excepto en el ZnO150, en donde la correlación indicó que las **MA** inciden negativamente en el **FIV** en el tratamiento ($r = -0.54$).

En el año **2005 Ardón** mostró que la inestabilidad del **ADN** disminuye la tasa de penetración *in vitro*. En este estudio, el ZnSO₄200 fue el único tratamiento que mostró correlación entre la **FIV**, **IF** y la concentración de **Zn** en el sedimento espermático (**ZnSE**), siendo estas correlaciones $r = 0.49$ y $r = 0.53$ respectivamente. El Zn-Met150 sólo registró una tendencia en dichas variables: $r = 0.52$ entre **FIV** e **IF**; y $r = 0.49$ con la **ZnSE**. Estos resultados indican la estrecha relación entre el poder de fecundación y el estado del **ADN**, lo que concuerda con **Bedwal y Bahuguna (1994)** quienes mencionan que cualquier alteración en el **IF** puede producir cambios en el porcentaje de **FIV**.

Aonuma et al. (1978) señalan que una alta concentración de **Zn** inhibe la reacción acrosómica, disminuyendo la capacidad fecundante de los espermatozoides. Además, el **Zn** compite por los canales de transporte de membrana multivalentes, desencadenando una reducción de **Ca**, necesario para dicho proceso de capacitación espermática (**Cousins et al., 2006; Hernández,**

2006). Con base en los resultados obtenidos, se puede considerar que un aumento de la concentración de **Zn** en los espermatozoides de los tratamientos ZnSO₄200 y Zn-Met150, pudiera reducir el **FIV**, como ya se obtuvo con el Zn-Met200. Por lo tanto, la posibilidad de que una concentración máxima de 1000 ppm de **Zn** en el **ZnSE** sea suficiente para obtener porcentajes de **FIV** (>80%) similares a los reportados por **Gil (2001)** sería oportuno tenerlos en cuenta.

En relación al tipo de fuente utilizada en este experimento, las **FI** tuvieron un porcentaje mayor de **FIV** que las **FO**. El uso de 200 ppm con una **FO** afectó negativamente el porcentaje de **FIV**. Sin embargo, dicha concentración no tuvo efecto en la capacidad de penetración del espermatozoide al utilizar fuentes azufradas u oxidadas.

Es lógico pensar que el comportamiento de las fuentes es debido a la biodisponibilidad de las mismas (**Wedekin et al., 1992 y 1994; Rojas et al., 1995; Spears, 1996; Krebs, 2000, Hernández, 2006**). Las **FO** almacenan mayor concentración de **Zn** en las células de hígado, páncreas, intestino, testículo y próstata (**Evenson et al., 1993**). Esto, coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que con el Zn-Met200 la **ZnSE** registrada fue al menos de 250 ppm, un 26% más grande que en el resto de tratamientos. Este aumento se corresponde con las 50 ppm (25%) que fueron añadidas en el **PB** al utilizar 200 ppm de **Zn** en esta **FO**.

En todos los tratamientos se observó que el **SE** es capaz de almacenar al menos tres veces más de **Zn** (>900 ppm) del consumido por los verracos a través del **PB**. Los tratamientos con una **ZnSE** por debajo de 1000 ppm, mostraron un mayor porcentaje de **FIV** (Control, 920.34 ± 136.21; ZnSO₄150, 931.02 ± 136.21; ZnSO₄200, 920.41 ± 138.87; Zn-Met150, 906.63 ± 134.6 ppm). Pero la **ZnSE** del Zn-Met200 fue de 1294 ± 138.7 ppm, lo que redujo el **FIV** (72.5%). **Bedwal y Bahuguna (1994)** demostraron que en espermatozoides con una mayor concentración de **Zn** se disminuye la motilidad, así como la capacidad de penetración de la célula espermática debido al bloqueo de la reacción acrosómica.

Diversos estudios han relacionado la calidad seminal con la capacidad fecundante del espermatozoide y por tanto, con el número de **EO** (**Liu y Baker, 1992**). Por otra parte, dependiendo del tipo de conservación de la dosis seminal

puede variar el número de **EO**. Con semen congelado **Romar et al. (2001)** y **Gil et al. (2003, 2006)** indican que los valores de **EO** se sitúan entre un 1.5 a 2.5 más en comparación con semen fresco, diluido o refrigerado. En la presente investigación se utilizó semen fresco, y se obtuvo 6.5 a 8.7 **EO**, coincidiendo con los resultados publicados por **Caballero, (2004)** y **Gil et al. (2007)**.

El comportamiento reflejado por los distintos tratamientos indica que el nivel de **Zn** puede afectar el número de **EO**. Dentro de la **FO**, el aumento del nivel de **Zn** manifestó un efecto negativo sobre los **EO**. El tratamiento Control (6.9) mostró una tendencia a disminuir los **EO** con respecto al resto de tratamientos. El Zn-Met150 presentó 8.7 **EO**, reduciéndose significativamente hasta 6.9 en el Zn-Met200. Situación similar se presenta cuando se utiliza la fuente oxidada aunque la diferencia no fue significativa (ZnO150; 8.3 vs ZnO200; 7.1). Sin embargo, el ZnSO₄200 no se comportó de igual manera que la fuente oxidada y el Zn-Met. Es clara la reducción de **EO** cuando se utilizan niveles bajos (25 ppm) o altos de **Zn** (200 ppm). Por lo tanto se puede concluir que los **EO** dependen del nivel y fuente de **Zn** administrada en el **PB**.

El aumento en el número de **EO** mostrado por la fuente ZnSO₄·H₂O aún con 200 ppm puede ser explicado por los distintos mecanismos en los que se encuentra implicado el **S** como son: la formación de sulfolípidos y sulfoglicolípidos (**Huacuja et al., 1990**) que apoyan la actividad de movimiento de los espermatozoides por la formación de **ODF** (**Henkel et al., 2003**), así como la integridad del **ADN** debido a la estabilidad de los puentes disulfuro (**Evenson et al., 1993; Ardón, 2005**).

En cambio, el ZnO200 muestra una tendencia a disminuir los **EO**. Esto puede relacionarse con los mecanismos que tiene la célula para controlar el almacenamiento y excreción del **Zn** descritos por **Iguchi et al. (2004)** y **Cousins et al. (2006)**. El pobre estímulo que tiene el ZnO sobre los genes transportadores de **Zn** (**ZnT**) y en la **MT** aumentaron la concentración del mineral.

Con el nivel de 200 ppm, la fuente azufrada de **Zn** tuvo menor concentración del mineral en los espermatozoides, que los producidos por la fuente oxidada y el Zn-Met, lo que indica el efecto beneficioso que ejerce esta fuente sobre la expresión de los mecanismos de ingreso, almacenamiento y expulsión de **Zn**.

El **Zn** expulsado del espermatozoide durante la meiosis fortalece las **ODF**, pero en el espermatozoide se queda una concentración relativamente pequeña de **Zn** que junto con el **S**, protegen los grupos sulfhídricos evitando la oxidación, favoreciendo la motilidad celular y la integridad de membranas aumentando la tasa de fecundación (**Bedwal y Bahuguna, 1994; Stohs y Bagchi, 1995; Henkel et al., 2003**).

Cuando una célula espermática contiene niveles altos de **Zn**, **Aonuma et al. (1978)** señalan que puede producirse una disminución de la reacción acrosómica y por tanto, el proceso de fecundación puede verse comprometido. Los valores de **Zn** en los espermatozoides de los distintos tratamientos, muestran que no está siendo expulsada la misma cantidad en las fuentes utilizadas, aun en el mismo nivel de **Zn**. Las fuentes ZnO y Zn-Met expulsan menos **Zn** que la fuente azufrada, pudiendo estar relacionado con los mecanismos de activación de los genes de expulsión **ZnT (McMahon y Cousins, 1998)**.

Por su parte los **OM** demostraron que los tratamientos producen un efecto significativamente igual, registrándose una gran variabilidad entre los valores (**EEM, 2.46**).

Los **OM** más altos correspondieron al tratamiento Control (8.0%), ZnSO₄150 (9.1%) y Zn-Met200 (8.9%). No obstante, es importante señalar que los valores de **OM** de este estudio son inferiores a los publicados por **Romar et al. (2001), Gil et al. (2003; 2006), Popwell y Flowers (2004)**, cuyas proporciones estimadas van del 18 al 67%, mientras que en esta investigación oscilaron de 2.3 al 9.1%. **Caballero (2007)** y **Macedo et al. (2010)** han publicado valores entre un 4.7 y 10.6%, para semen diluido y conservado a 17°C, coincidiendo con los resultados de esta investigación.

El análisis de correlación entre las características del semen y los **OM**, no mostró ninguna asociación, excepto en el ZnSO₄200 ($r = 0.47$), en donde se observó que en la medida que se pierden la **IAC**, se aumenta el porcentaje de **OM**.

Diversos estudios determinan que eyaculados con menor porcentaje de **Mot**, **CM**, y altos porcentajes de **MA** y acrosomas dañados, producen un incremento de los **OM (Katz et al., 1982; Ng et al., 1986; Chan et al., 1989; Liu y**

Baker, 1992; Kendall et al., 2000). Además, **Bhattacharya y Kanjilal (2003)** encuentran una relación entre espermatozoides con núcleo inmaduro o **ADN** fragmentado y **OM**, debido al proceso de selección del propio ovocito, evitando la penetración de espermatozoides dañados. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró correlación significativa entre **IF** y **OM**.

Caballero (2007) y **Gil et al. (2006)** señalan que la polispermia está relacionada con una tasa de **FIV** alta y por tanto, inversa a la tasa de **EF** (**Gil et al., 2007**). La **EF** con semen congelado publicada por **Gil et al. (2003; 2007)** indica porcentajes cercanos al 48 %, valores superiores a los encontrados en esta investigación (1.9 a 7.7%) los cuales, no mostraron diferencias entre tratamientos.

En cuanto a la tasa de **DPn** masculinos, los valores oscilaron entre el 34.5 al 58.9%, no existiendo diferencias entre tratamientos. Sin embargo, los tratamientos $ZnSO_4$ 150, ZnO150 y ZnO200, disminuyeron el porcentaje de **DPn** al menos un 20% con respecto al tratamiento Control, que fue además, el de mayor porcentaje de **DPn**. En general, los resultados demuestran que los tratamientos aplicados en este estudio producen **DPn** inferiores a los obtenidos por **Romar et al. (2001)** quienes obtuvieron valores de 89.29 a 98.71% de **DPn** utilizando espermatozoides de epidídimo y congelados, considerando para su cálculo el valor de los ovocitos penetrados y no el de ovocitos inseminados como es el caso de este estudio. Por su parte, **Chan et al. (1989)** señalan que la capacidad de fecundación de los espermatozoides se establece cuando un ovocito presenta dos o más pronúcleos. En este experimento, existió una media de 3.87 **Pn** por ovocito, siendo los valores de las distintas fuentes de **Zn** los siguientes: Control 4.15%; $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 3.86%; ZnO, 3.45%; y Zn-Met, 3.85%.

Asimismo, los análisis de regresión indicaron que la tasa de **MA** se relaciona negativamente con la tasa de **DPn** en el tratamiento $ZnSO_4$ 200 ($r = -0.54$). El Control registró el valor más alto de **DPn** ($58.9 \pm 6.5\%$), probablemente debido al efecto positivo de un nivel bajo de **Zn** en el pienso, aun existiendo una gran variación en este tratamiento. No obstante, con 200 ppm se observa una tendencia a aumentar el **DPn**, no reflejándose dicho efecto en el resto de variables analizadas. Se considera que un espermatozoide que ha sido capaz de penetrar al ovocito, tiene las condiciones morfológicas y fisiológicas necesarias para desencadenar los mecanismos implicados en unión de

pronúcleos y desarrollo embrionario posterior. Por ello, a pesar de las diferencias mostradas por los espermatozoides en los distintos tratamientos es probable que el **DPn** no se vea afectado.

Entre tratamientos, se observan evidentes diferencias en el porcentaje de **CE** y **SpzO⁻¹**. Los resultados reflejan que aquellos tratamientos con alguna fuente de **Zn** se comportan de forma distinta al Control, ya que este último presentaba menos **CE** que el resto de los tratamientos. Los tratamientos con **FI** y **FO**, tuvieron más del 40% de espermatozoides penetrados (**CE** y **SpzO⁻¹**) que no formaron **Pn**, lo que puede estar relacionado con el efecto del **Zn**. Según **Bedwal y Bahuguna (1994)** la normal y completa descondensación de la cromatina depende del contenido de **Zn** en la cabeza del espermatozoide, y de la presencia de enzimas como la glutatión peroxidasa (**GSH**) la cual, está estrechamente relacionada con el **DPn** masculinos. La actividad de la **GSH** en la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas espermáticas generan la descondensación, pero cuando el **Zn** se incrementa, este inhibe la actividad enzimática (**Blazak y Overstreet, 1982; Fushida et al., 1993; Evenson et al., 1994; Popwell y Flowers, 2004; y Enciso et al., 2006. Evenson et al. (1993)** encontraron que un nivel bajo de **Zn** puede alterar la condensación de la cromatina, así como altas concentraciones producir un aumento en la formación de puentes **S-S** (quelatación) que incrementará la hipersensibilización de la cromatina, impidiendo que el **ADN** se descondense correctamente alterándose el proceso de fecundación. En esta investigación se observa claramente como un aumento de **Zn** produce efectos negativos sobre varias características del espermatozoide en los procesos de fecundación, haciéndose necesario un estudio más profundo de los mismos.

5.5. Evaluación de la concentración de Zn en tejidos (testículos y epidídimos), plasma seminal (PS) y sedimento espermático (SE)

La composición química de testículos y epidídimos no mostró diferencias en cuanto a **MS, H** y **C**.

El nivel de **Zn** en el **PB** no afectó significativamente la concentración de **ZnTes**, ni la utilización de alguna fuente de **Zn** aumentó el contenido del mismo. Esto, puede estar relacionado con los estudios desarrollados por **Shell y**

Kornegary (1996) quienes observaron que para encontrar diferencias en el contenido de **Zn** en tejidos como riñón, hueso (10^o costilla), y músculo era necesario utilizar cantidades superiores a 1000 ppm de **Zn** en el **PB**.

Si bien, los resultados demuestran que el contenido de **Zn** no puede considerarse diferente entre tratamientos, hay que tener en cuenta que los análisis de espectrofotometría indican que la fuente Zn-Met incrementa el contenido de **Zn** al menos entre 14 a 17 ppm cuando se utilizaron niveles de 200 ppm en el **PB**. A partir de esta concentración, sería necesario identificar si este aumento se mantiene cuando se incrementan las ppm de **Zn**, ya que un nivel elevado de **Zn** en testículo produciría un aumento del **Zn** espermático.

Bedwal y Bahuguna (1994) señalan que el tejido testicular tiene un crecimiento corporal muy rápido. Por ello, un consumo deficiente de **Zn** produce un decremento sustancial de este mineral en el testículo (**Hunt et al., 1992; Evenson et al., 1993; Oteiza et al., 1995**). La disminución en el contenido de **Zn** del testículo (al menos 11%) puede producir una cantidad inadecuada de enzimas de transcripción, necesarias en la cabeza de la célula espermática (**Bedwal y Bahuguna, 1994**), o una reducción de la unión del **Zn** con el grupo **SH** de la cisteína, para formar el grupo tiol que ayuda a las células espermáticas a no oxidarse prematuramente en el epidídimo (**Oteiza et al., 1995; Henkel et al., 2003**).

Los mecanismos por los que el contenido de **Zn** testicular cambia, han sido asociados por **Rojas et al. (1995)** al nivel de **Zn** aplicado en el **PB**, mientras que **Bedwal y Bahuguna (1994)** mencionan que en la medida que los machos maduran, el requerimiento nutricional se mantiene, pero el contenido de **Zn** en testículo aumenta. Esto puede soportar la hipótesis de que existe una estrecha relación entre necesidad de este mineral y el crecimiento de tejidos, ya que la velocidad con la que crecen los testículos después de la pubertad no es la misma con la que crecieron previamente.

En este experimento los resultados demuestran que en animales jóvenes (<12 meses) el nivel de **Zn** no produjo diferencias en el contenido testicular, manteniéndose en niveles de 76.25 a 93.42 ppm. Asimismo, el tratamiento Control no afectó el contenido del mineral en el parénquima, lo que hace suponer

que niveles de 25 ppm son suficientes para concentrar la misma cantidad de **Zn** que aquellos que recibieron alguna fuente de **Zn**.

La adición de fuentes de **Zn** no mejoró el contenido del mismo, aunque el Zn-Met200 registró un incremento del mineral en el tejido testicular, por lo que es probable que dependiendo de la fuente de **Zn**, existan diferentes mecanismos de estímulo en las células, que ayuden a aumentar la concentración de **Zn** como ya ha sido descrito en hígado, riñón, hueso y pancreas por **Schell y Kornegay (1996)**.

Las células testiculares eliminan **Zn** transfiriéndolo a los espermatozoides inmaduros, principalmente en la fase G₁ (síntesis de proteínas, expresión de genes, aumento de tamaño y desarrollo de orgánulos celulares) y S (replicación del **ADN**) del ciclo celular (**Hunt et al., 1992**), periodos donde se requiere mayor concentración de **Zn**. Por tanto, una intoxicación del testículo parece ser poco probable.

En el epidídimo la concentración de **Zn (ZnEp)** tampoco fue afectada de forma distinta por los tratamientos, lo que provocó que la concentración fuera similar, aún cuando una diferencia en la concentración de 30.9 a 34.4 ppm de **Zn** se registró al comparar el Zn-Met200 con el resto de los tratamientos. Pero este incremento no fue suficiente para obtener diferencias significativas entre los tratamientos.

La concentración de **ZnEp** tiende a ser constante en cerdos, y es similar a la encontrada en los testículos. La eficiente maduración espermática que se realiza en el epidídimo depende de las condiciones que guarda este órgano. Cuando existe un bajo consumo de **Zn** existe una reducción en la producción de proteínas para la maduración espermática y proteínas de transporte de **Zn (Bedwal y Bahuguna, 1994)**. Las proteínas son andrógeno-dependientes, por lo que una concentración de **Zn** en el **PB** menor a lo que requieren los animales, disminuyen la secreción de las hormonas, debido al efecto que este ión tiene en el desarrollo de las células de Leydig y Sertoli, y su relación con el nivel de hormonas secretadas por el hipotálamo (**Estienne y Harper, 2005**). Pero cuando se excede el consumo de **Zn**, el epidídimo que es sensible a pequeñas variaciones en el contenido del mineral, reduce la producción de proteínas transportadoras de **Zn**, cierra los canales de ingreso a su tejido impidiendo que se

expresen los genes (**Zip**), y con ello, el contenido epididimario se mantiene constante.

En el **SE** no existió efecto de los tratamientos en la concentración de **Zn** (**ZnSE**). A pesar de ello, vale la pena considerar que el Zn-Met200 aumentó aproximadamente 300 ppm de **Zn** en el **SE**. Un nivel superior a 150 ppm en el **PB** puede inducir a un elevado contenido del mineral en la célula espermática, provocando una disminución en la motilidad, aumento de morfoanomalías, un proceso mayor de fragmentación y alteraciones en la capacidad fecundante, lo cual, concuerda con lo descrito por **Bedwal y Bahuguna (1994)**. **Henkel et al. (2003)** quienes señalan que el 93% del **Zn** espermático se encuentra en el flagelo, especialmente en las **ODF**, y el 7% restante se encuentra en la cabeza. Este último, puede ser aumentado de 4 a 5 veces más, lo que provocaría su unión a la matriz nuclear, produciendo una desestabilización de las uniones de **S-S** y **Zn** dentro y entre la moléculas de protaminas induciendo la desestabilización de la estructura cuaternaria y haciendo más susceptible al **ADN** a la desnaturalización *in situ* (**Evenson et al., 1993; Henkel et al., 2003**).

En todos los tratamientos se observó una concentración media de **Zn** por encima de 900 ppm, correspondiendo a los espermatozoides del ZnO200 y Zn-Met200 niveles de **Zn** superiores a 1000 ppm.

Al analizar la **ZnSE**, se registró en al menos cinco semanas, una concentración mínima de **Zn** en los espermatozoides de 600 ppm, en tanto que la máxima concentración de **Zn** fue 1600 ppm. También se observó que dentro de cada tratamiento la **ZnSE** no fue constante, ya que presentó un patrón de comportamiento semejante a “picos de sierra”.

Los cambios en la concentración de **ZnSE**, reflejan que el contenido del mineral es al menos dos tercios más grande que el consumo máximo de **Zn** al que fueron sometidos los verracos. Y en los casos donde se utilizó Zn-Met200, tuvo al menos 1000 ppm más de **Zn** que lo que consumían a través del **PB**.

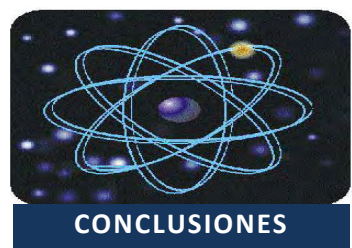
Los valores de **ZnSE** indican que cada fuente se comporta de forma distinta. A pesar de contener el mismo nivel de **Zn** en el **PB**, la concentración de **ZnSE** tendió a incrementarse en el ZnO200 (1088.59 ± 151.52 ppm) y Zn-Met200 (1294 ± 134.60 ppm), mientras que el almacenamiento fue menor en el tratamiento ZnSO₄200 (920.41 ± 138.87 ppm). Por tanto, sería conveniente

considerar, en el momento de utilizar fuentes con alta biodisponibilidad, la posibilidad de no suplementar el pienso con niveles de **Zn** superiores a 150 ppm.

Los resultados muestran como el **SE** de los tratamientos que contenía más ppm de **Zn**, tuvieron un efecto inverso en el **PS**, ya que fueron los que menor concentración **ZnPS** presentaron, coincidiendo con los tratamientos con **FO**.

El **PS** tiene un papel importante para mantener el nivel óptimo de iones de **Zn** (**Strzezek et al., 2004**), tanto en los espermatozoides como en el epidídimo. El **Zn** del **PS** proviene en su mayor parte de la próstata. En este estudio, se observó que ningún tratamiento desarrolló un efecto diferente, y mantuvo los valores de **Zn** dentro de un intervalo que osciló entre 13.53 ± 3.0 a 22.75 ± 3.38 ppm. Los valores de **ZnPS** son similares (19.53 a 26.68 ppm) a los que encontraron **Saiz et al. (1997)**, **Oteiza et al. (1995)** y **Gadea (1997)**.

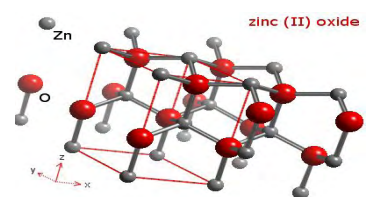
Gadea (1997) señala que aquellos animales con una fertilidad alta, presentaron valores mayores de **ZnPS**. Esto, pudiera explicar que los bajos valores obtenidos en este estudio con el Zn-Met200 estén implicados en la reducción de la capacidad de fecundación de los espermatozoides.



6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye lo siguiente:

1. Los verracos no mostraron diferencias en su desarrollo corporal, crecimiento testicular y epididimario durante el periodo evaluado con los diferentes tratamientos. Pero, se observó que cuando el tratamiento no contenía una fuente adicional de **Zn**, era requerida mayor cantidad de pienso para mantener una adecuada **CC** y ganancia de peso.
2. El tratamiento Zn-Met200 afectó significativamente algunas características de producción y calidad seminal, reduciendo la concentración espermática y la **Mot**. Asimismo, se aumentó el porcentaje de **CL** y **GD**.
3. Ninguno de los tratamientos produjo **IF** que indicaran que los machos tuvieran problemas de fertilidad. Pero se observa que el Zn-Met200 incrementa el porcentaje de **IF** un 50% con respecto a los demás tratamientos. El **IF** presentó un comportamiento cíclico que refleja la importancia de considerarlo como un indicador de calidad para determinar la utilidad de los eyaculados en los procesos de inseminación o fecundación artificial.
4. El Zn-Met200 produjo un efecto negativo sobre el **FIV** al compararlo con el resto de los tratamientos, indicando que el incremento del nivel de **Zn** con una **FO** reduce la capacidad de penetrabilidad de los espermatozoides. Con respecto al número de espermatozoides por ovocito penetrado el ZnO redujo este parámetro. Asimismo, las características de calidad seminal, **IF** y **ZnSE** no están relacionadas en todos los tratamientos con el **FIV**.
5. La concentración de **Zn** en testículos y epidídimos no se vio afectada por la utilización de alguna de las fuentes de **Zn** a los dos niveles incluidos. Por su parte, el **ZnSE** no mostró estar afectado por los tratamientos, ni tampoco varió durante el periodo evaluado. En el caso del **ZnPS** se observó que los valores medios no sufrieron efecto del tratamiento, pero si existió un comportamiento diferente de los tratamientos durante el tiempo evaluado.



RESUMEN

7. RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación se centró en evaluar diferentes fuentes (ZnSO_4 , ZnO y Zn-Met) y niveles (150 y 200 ppm) de **Zn** en la eficacia reproductiva de verracos. Para ello, se realizaron cinco experimentos utilizando 35 verracos F1 (Landrace x York), de 8.5 meses de edad y un peso inicial (**PI**) de 145.68 ± 2.99 Kg ($P = 0.33$) y se utilizó un pienso base (**PB**) formulado con una mezcla de cebada-maíz y soja, el cual contenía únicamente el **Zn** presente en los ingredientes (25 ppm). Los tratamientos realizados fueron: Control (**PB**); T2, **PB** + ZnSO_4 a 150 ppm de **Zn**; T3, **PB** + ZnSO_4 a 200 ppm; T4, **PB** + ZnO a 150 ppm; T5, **PB** + ZnO a 200 ppm; T6, **PB** + Zn-Met a 150 ppm y; T7, **PB** + Zn-Met a 200 ppm, y fueron asignados aleatoriamente a los verracos. El pienso fue suministrado diariamente, utilizando un sistema restringido, el cual consistió en 1.8 a 2.5 Kg día⁻¹ verraco⁻¹ y agua *ad libitum*. Los sementales se alojaron en jaulas individuales con bebedero de chupete, comedero de canaleta y sistema automático de suministro del pienso. Los resultados de cada variable fueron analizados con un Diseño Completamente al Azar (**DCA**), utilizando el programa SAS (2003).

Experimento 1. Durante un periodo de 16 semanas, los verracos fueron evaluados en su comportamiento productivo (peso vivo, **PV**; ganancia de peso por semana, **GPS**; consumo de pienso diario, **CPD**; peso final, **PF** y condición corporal, **CC**) y parámetros morfométricos de testículos (semicircunferencia testicular derecha, **SCTD**; semicircunferencia testicular izquierda, **SCTI**; semicircunferencia testicular total **SCTT**; longitud testicular derecha, **LTD** y longitud testicular izquierda, **LTI**). El pienso para cada verraco era pesado diariamente, y ajustada la cantidad semanalmente, según fuera el caso. Para ello se consideraba el **PV** y la **CC**. En este periodo se entrenaron los verracos a saltar en el potro de recogida. Durante el periodo experimental los verracos tuvieron un ritmo de recogidas de un salto semanal (**IE**). Los resultados mostraron que los tratamientos se comportaron diferente ($P = 0.0001$), al evaluar el **CPD**, los tratamientos T1 y T2 consumieron mayor cantidad de pienso, lo cual no se vio reflejado en la **CC** ($P = 0.0001$), ya que al menos el tratamiento T1 mostró valores de **CC** menores a la media del resto de tratamientos. El **IE** también mostró diferencias entre los tratamientos, ya que los verracos del T2 incrementaron el **IE**, mientras que el T7 indujo un comportamiento constante de salto en el potro. Los

valores medios de la región testicular no mostraron diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos, aunque la **SCTT** indica una tendencia ($P = 0.06$) a ser menor en T7. El **PV** reflejó una correlación ($P = 0.0001$) mayor a 0.4 con las medidas de la región escrotal. Los valores morfométricos testiculares y de epidídimo y el índice gonadosomático (**IG**) no fueron distintos entre los tratamientos ($P > 0.05$).

Experimento 2. A los animales se les hizo eyacular y se evaluó la dinámica de producción y calidad seminal mediante el análisis básico del eyaculado (volumen total, **VT**; fracción rica, **FR**; fracción pobre, **FP**; concentración espermática, **Spz mL⁻¹ x 10⁶**; motilidad, **Mot**; calidad de movimiento, **CM**, **pH** y; morfoanomalías, **MA**), incluyendo la valoración del estado del acrosoma, analizando la integridad acrosomal (**IAC**), acrosoma dañado (**AD**) y acrosoma reaccionado (**AR**). De las variables analizadas en este experimento, solamente la **Spz mL⁻¹ x 10⁶** mostró efecto de los tratamientos ($P = 0.02$), siendo el tratamiento T7 el que presentó un valor medio menor al resto de los tratamientos. Sin embargo, dentro del tipo de **MA** observadas, las cola en látigo (**CL**) y gota distal (**GD**) resultaron ser ($P = 0.0001$) diferentes, debido al tratamiento recibido. En el caso de las **CL**, los tratamientos T3 y T7 presentaron mayor porcentaje de **MA** y para **GD** fue el T7.

Experimento 3. En este experimento se determinó el índice de fragmentación del **ADN** espermático (**IF**), utilizando 416 muestras de la **FR** (2 mL) obtenidas de cada verraco. Los valores de **IF** de los tratamientos no superaron el 10%, exceptuando el T7 (16.71 + 2.64%) ($P < 0.05$). El 52.16% de las muestras seminales se mantuvieron por debajo del 5% de **IF**, mientras que el 12.98% mostró valores mayores al 15%. La adición de alguna fuente de **Zn** al **PB** aumenta 25 % la tasa de **IF**. Las **FI** se comportan de forma similar ($P > 0.05$), pero al compararlas con las **FO** se observó diferencias ($P < 0.001$). El uso de 200 ppm de **Zn** con una **FO** como el Zn-Met afecta negativamente el **ADN** de los espermatozoides.

Experimento 4, En este experimento se utilizó el semen de 21 verracos (los tres mejores de cada tratamiento) y se realizó la prueba de fecundación *in vitro* (**FIV**), para estudiar la capacidad fecundante de los espermatozoides, utilizando ovocitos de ovarios de cerdas prepuberales. Además, se evaluaron los espermatozoides que penetraban cada ovocito (**EO**) y la proporción de ovocitos que tuvieron un solo espermatozoide (**OM**). Al analizar los resultados con respecto al **FIV**, se observa que el T7 reduce la tasa de fecundación con respecto

al resto de los tratamientos. ($P = 0.02$), afectando así el comportamiento de las **FO**, ya que el valor de **FIV**, producido por las **FI** fue mayor que el de la **FO** ($P = 0.01$). También se redujo **EO** al utilizar T7 ($P = 0.03$) y en cuanto a **OM** y **EF**, se observó una tendencia de disminución con el uso de T3 ($P = 0.09$).

Experimento 5. Una vez terminado el periodo de extracción seminal, los verracos se sacrificaron, obteniendo los testículos y los epidídimos, procediéndose a analizar la concentración de **Zn** mediante espectrofotometría de absorción atómica (**AEAA**) en ambos tejidos y en las muestras de plasma seminal (**PS**) y sedimento espermático (**SE**). Aunque no se encontraron diferencias en la concentración de **Zn** debidas al tratamiento, en ninguno de los testículos, ni epidídimos analizados ($P = 0.07$), la mayor concentración del ión fue presentada por el T7. La concentración de **Zn** en **SE** y **PS** no presentó efecto del tratamiento ($P = 0.39$ y $P = 0.33$, respectivamente), pero el **SE** del tratamiento T7 presentó una mayor concentración. En tanto que el **ZnPS** se redujo en los tratamientos que utilizaron la **FO** Zn-Met. Aunque, los resultados fueron variables, se observó que la **FO** a mayor concentración, es la que presentó mayor efecto negativo sobre los parámetros estudiados, por lo que la biodisponibilidad, es un factor importante a tener en cuenta al momento de la utilización de las fuentes de **Zn**.



SUMMARY

8. SUMMARY

In order to evaluate inorganic and organic Zinc (**Zn**) sources on boar's reproductive efficiency, thirty-five F1 Landrace x York White boars, 8.5 months age and 145.68 ± 2.99 Kg initial body weight (**BWi**) were randomized housed to individual pen with automatic feeder and water systems. The basal diet (**BD**) was a barley-corn and soybean meal mixture with 25 ppm **Zn**. The data were analyzed as a completely randomized design with repeated measures using PROC MIXED of SAS (2003). The treatment were: T1, Control BD; T2, BD + ZnSO₄ to 150 ppm of **Zn**; T3, BD + ZnSO₄ to 200 ppm; T4, BD + ZnO to 150 ppm; T5, BD + ZnO to 200 ppm; T6, BD + Zn-Met to 150 ppm and; T7, BD + Zn-Met to 200 ppm where the experimental unit was individual boar.

Experiment 1. Productive performance of individual boars (body weight, **BW**; body gain by week, **BGw**; daily intake, **DI**; final body weight, **BWf** and body condition, **BC**) and morphometrics parameters of testis (semicircumference of right testicle, **SCRT**; semicircumference of left testicle, **SCLT**; total testicular semicircumference **TTSC**; length right testicle, **LRT** and length of left testicle, **LLT** were evaluated during 16 weeks. The diet was adjusted weekly, using **BW** and **BC** criteria. During the experimental period the boars jump once a week for semen collection (**SC**). The results showed that the treatments were different ($P = 0.0001$), for T1 and T2 in **DI** of **BD**, which did not reflected in the **BC** ($P = 0.0001$), because of the treatment T1 showed lower values of **BC** than the average of the others treatments. The **SC** also was different among treatments, since the boars of the treatment T2 increased the **SC**, whereas the T7 was constant throughout the experiment. The average values of testicular zone were not different ($P > 0.05$) among the treatments, though the **TTSC** indicates a trend ($P = 0.06$) to being a lower in T7. The **BW** showed a correlation ($P = 0.0001$) bigger than 0.4 with the measures of the scrotal area. The morphometric values of testis, epididymis and gonadosomatic index (**GI**) was not different between treatments ($P > 0.05$).

Experiment 2. The ejaculates were evaluated for dynamics of production and seminal quality by the basic analysis of the ejaculated (total volume, **TV**; rich fraction, **RF**; poor fraction, **PF**; spermatic concentration, **Spz ml⁻¹ x 10⁶**; motility, **Mot**; quality of movement, **QM**, **pH** and morphoanomaly, **MA**), including the evaluation of the acrosomal condition, analyzing the acrosomal integrity (**Acl**), damaged acrosomal (**DA**) and reacted acrosomal (**RA**). Variables analyzed in this experiment, only the **Spz ml⁻¹ x 10⁶** showed effect of treatments ($P = 0.02$), being the T7 with less average value than the rest of treatments. Nevertheless, inside the type of **MA** observed, the tail in whip (**TW**) and drop distal (**DD**) showed to be ($P = 0.0001$) different, due the treatment. In case of the **TW**, the treatments T3 and T7 presented more degree of **MA's** and for **DD** it was the T7.

Experiment 3. To determine the fragmentation index (**FI**) of the spermatic **DNA**, were utilized 416 samples of the **RF** (2 mL) obtained from each boar. The values of **FI** of treatments did not overcome 10%, except the T7 ($16.71 + 2.64 \%$) ($P < 0.05$). From the seminal samples 52.16% were below 5% in **FI**, whereas 12.98% showed values bigger than 15%. The addition of some source of **Zn** to the **BD** increases 25% **FI**. The inorganic sources (**IS**) were similar ($P > 0.05$), but when are compared with the organic sources (**OS**) differences were observed ($P < 0.001$). The use of 200 ppm of Zn with **OS** like the Zn-Met affects negatively the **DNA** of the sperms.

Experiment 4. In this experiment semen of 21 boars (the best three of every treatment) was used for test of *in vitro* fertilization (**IVF**), to study the fertilizing capacity of the sperms, using oocytes of ovaries from gilts. In addition, there were evaluated the sperms that were penetrating every oocyte (**SO**) and the proportion of oocytes that had only one sperm (**OM**) and efficiency of fertilization (**EF**). On having analyzed the results with regard to the **IVF**, is observed that the T7 reduces the rate of fertilization with regard to the rest of the treatments ($P = 0.02$), affecting this way the behavior of the **OS**, since **IVF's** value, produced by the **IS** was major that of the **OS** ($P = 0.01$). Also **SO** was reduced with T7 ($P = 0.03$) and the other hand, **OM** and **EF**, decreased by the use of T3 ($P = 0.09$) was observed.

Experiment 5. Once finished the period of seminal extraction, the boars were slaughtered, obtaining its testicles and epididymis, for analyze **Zn** concentration by atomic absorption spectrophotometry (**AAS**) in both and samples of seminal plasma (**SP**) and spermatic sediment (**SS**) too. Though don't find differences in the concentration of **Zn** due to treatment, in any of the testis, or epididymis ($P = 0.07$), the more concentration of the ion was in the T7. The concentration of **Zn** in **SS** and **SP** don't had effect of treatment ($P = 0.39$ and $P = 0.33$, respectively), but **SS** of the treatment T7 had higher concentration. On the other hand, the **ZnPS** decreased in the treatments with **OS** (Zn-Met). Though, the results varied, is observed that the highest concentration of **OS** presented high negative effect on the studied parameters, because of the biodisponibility, is an important factor to bearing in mind to the moment of the utilization of **Zn's** sources.



ABREVIATURAS

9. ABREVIATURAS

5'-ND	5'- nucleótidos
A	Espermatogonias tipo A
ACE	Enzima convertidora de angiotensina «Angiotensin converting enzyme»
AD	Acrosoma Dañado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AEAA	Análisis de espectrofotometría de absorción atómica
AIC	Criterios de información de Akaike
AMD	Degeneración ocular macular
AQN1	Alanina-glutamina-asparagina
AR	Acrosoma Reaccionado
AR1	Autoregresiva
As	Arsénico
AT	Ancho testicular
ATD	Ancho testicular derecho
ATI	Ancho testicular izquierdo
ATP	Adenosín trifosfato
AWN1	Alanina-triptófano-asparagina
BD	Biodisponibilidad
BIC	Criterios Bayesiano de Swarz
BSA	Albumina de suero bovino «Bovine serum albumin»
BTS	Beltville Thawing Solution
C	Cenizas
C1,C2, C3....C6	Contrastes ortogonales
Ca	Calcio
CC	Condición corporal
Cd	Cadmio
CF	Capacidad fecundante
CL	Cola látigo
CM	Calidad de movimiento
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
Con A	Concavalina A
COOH	Grupo carboxilo
CPD	Consumo de pienso día ⁻¹
CS	Simetría compuesta
CT	Circunferencia testicular
CTD	Circunferencia testicular derecha
CTI	Circunferencia testicular izquierda
Cu	Cobre
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]Octano
DCA	Diseño completamente al azar
DMM	Daño en membrana mitocondrial
DCT1	Transportador de cationes divalentes «Divalent Cation Transporter 1»

Dp	Diploteno
DPn	Desarrollo de Pronúcleos
EA	Espermátidas alargadas
EB	Espermatogonias tipo B
ED	Epidídimo derecho
EEM	Error estándar de la media
EF	Eficiencia de fecundación
EI	Epidídimo izquierdo
EIn	Espermatogonias intermedias
EM	Energía metabolizable
EO	Espermatozoides por ovocito
ER	Espermátidas redondas
ES	Espermatositos secundarios
FA	Fosfatasa alcalina
Fe	Hierro
FEDNA	Fundación Española para el desarrollo de la nutrición animal
FI	Fuente (s) inorgánica (s)
FITC	Fluoresceína-5-Isotiocinato
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FP	Fracción pobre
FO	Fuente(s) orgánica(s)
FR	Fracción rica
GC	Gota Citoplásmica
GD	Gota Citoplásmica Distal
GDP	Guanidina difosfato
GP	Gota Citoplásmica proximal
GPS	Ganancia de peso semana ⁻¹
GPx	Glutación peroxidasa
H	Humedad
H⁺	Hidrógeno
H₂CO₃	Ácido carbónico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Acido Hidroclorhídrico
HOST	Prueba hiposmótica «hyposmotic swelling test»
IA	Inseminación Artificial
IAC	Integridad Acrosomal
IE	Ritmo de recogida o trabajo
IF	Índice de Fragmentación del ADN espermático
IG	Índice gonadosomático
INRA	l'Institut national de la recherche agronomique
INOS	Síntesis de óxido nítrico
Kg	Kilogramos
L	Leptoteno
LDH-X	Lactado deshidrogenasa
LH	Hormona luteinizante
LSMEANS	Medias de mínimos cuadrados
LT	Longitud del testículo
LTD	Longitud testicular derecha

LTI	Longitud testicular izquierda
M	Molar
MA	Morfoanomalías
MF	Medio de fecundación
Mn	Manganeso
mg	Miligramos
Mot	Motilidad espermática
MS	Materia seca
MT	Metalotioneína
MTF1	Gen de regulación de los factores de transcripción, vinculante al factor de transcripción 1
n	Número de observaciones
Na	Sodio
Ni	Níquel
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NO	Óxido nítrico
Nramp2	Proteína asociada a la resistencia natural de los macrófagos
NRC	National Research Council
NS	No significativo / No existió diferencias
ODF	Fibras densas externas «outer dense fibres»
OI	Ovocitos inseminados
OM	Ovocitos monospermicos
OP	Ovocitos penetrados
OH	oxhidrilo
O₂	Oxígeno
P2	Protamina P2
P	Fosforo
Pb	Plomo
pH	Potencial hidrógeno
PB	Pienso base
PBS	Solución fosfatada tamponada
PBSDm	Solución fosfatada tamponada de Dulbecco modificada «Phosphate Buffered Saline»
PE	Peso epididimario
PED	Peso epidídimo derecho
PEI	Peso epidídimo izquierdo
PF	Peso final
PI	Peso inicial
PL	Espermatocitos en preleptoteno
ppm	Partes por millón
Pq	Paquiteno
PROC MIXED	Procedimiento de medidas repetidas
PROC STEPWISE	Regresión por pasos
PS	Plasma seminal
PSP	Proteína del PS porcino
PSA	<i>Pisum sativum agglutinin</i>
PT	Peso testicular
PTD	Peso testicular derecho
PTI	Peso testicular izquierdo

PV	Peso vivo
r	Correlación
R²	Coefficiente de determinación
ROS	Especies reactivas de oxígeno «reactive oxygen active»
S	Azufre
SAS	Statistical analysis systems
SBTI	Trypsin inhibitor from Soybean
SCTD	Semicircunferencia testicular derecha
SCTI	Semicircunferencia testicular izquierda
SCTT	Semicircunferencia testicular total
SE	Sedimento espermático
-SH	Grupo sulfhidrilo
Si	Silicio
SoDH	Sorbitol deshidrogenasa
SOD	Superóxido dismutasa
Spz mL⁻¹	Concentración espermática por mililitro
Spz eyaculado⁻¹	Concentración espermática total
SpzF	Espermatozoide fragmentado
SpzO⁻¹	Espermatozoides por ovocito fecundado
S-S	Puentes disulfuro
T	Tioneina
TT	Tamaño testicular
TE	Tamaño del epidídimo
Ub	Ubiquinización
UDZ	Laboratorio de la Unidad Docente de Zoología
UV	No estructurada
VC	Componentes de varianza
Vol	Volumen de eyaculado o de fracciones espermáticas
VT	Volumen total
Z	Zigoteno
Zn	Zinc
ZnEp	Concentración de Zn en epidídimo
Zn-Lis	Lisinato de Zn
Zn-Met	Metionato de Zn
ZnO	Óxido de Zn
Zip, Zip II, gufA, LZT, Zip1, Zip6, Zip7, Zip10	Gen transportador “importación” de Zn
ZnPS	Zn en plasma seminal
ZnSE	Zn en el sedimento espermático
ZnSO₄	Sulfato de Zn
Zn-SH	Grupos Zn-tiol
ZnT, ZnT-1, ZnT-2, ZnT-3, ZnT-4, ZnT-5, ZnT-8, ZnT-9, ZnT-10	Genes transportadores de Zn
ZnTes	Concentración de Zn en testículo



BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

AAFCO. 2002. Association of American Feed Control Officials, Inc. Georgia Department of Agriculture Plant Food, Feed, and Grain Division. Atlanta.

Acda S.P., Chae B.J. 2002. A review on the application of organic trace minerals in pig nutrition. *Pakistan Journal of Nutrition.* 1(1):25-30.

Ali H., Ahmed M., Baig M., Ali M. 2007. Relationship of zinc concentrations in blood and seminal plasma with various semen parameters in infertile subjects. *Pak. J. Med. Sci.* 23(1):111-114.

Allrich R.D., Christenson R.K., Ford J.J., Zimmerman D.R. 1983. Pubertal development of the boar: Age-related changes in testicular morphology and *in vitro* production of testosterone and Estradiol-17 β . *Biology of Reproduction.* 28:902-909.

Almeida F.L., Leal M.C., França L.R. 2006. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction.* 75:792-799.

Almiñana B.C. 2008. Optimización del sistema de fecundación *in vitro* en la especie porcina: Condiciones de maduración y de cocultivo de los gametos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Murcia. Pp.1-200.

Althouse B., Wilson M.E., Gall T., Moser R.L. 2000. Effects of supplemental dietary zinc on boar sperm production and testis size. 14^{on} International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, Swede. 1(10):8. Pp 264.

Ammerman C.B., Baker D.H., Lewis A.J. 1995. Bioavailability of nutrients for animals: aminoacids, minerals and vitamins. Academic Press, Inc. San Diego, C.A.

Ammerman C.B., Henry P.R., Miles R.D. 1998a. Supplemental organically-bound mineral compounds in livestock nutrition. In: *Recent Advances in Animal Nutrition.* P. C. Garnsworthy and J. Wiseman. (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 67-91.

Ammerman C.B., Henry P.R., Miles R.D. 1998b. Bioavailability of organic forms of the microminerals. *Proceedings of the 9th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium.* Gainesville, Florida p. 33-49.

Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. 2006. Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research.* 5(11):3173-3178.

Angelopoulou R., Plastira K., Msaouel P. 2007. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 5(36):1-15.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association Official Analytical Chemists, Arlington, VA. USA.

Aonuma S., Okabe M., Kawaguchi M. 1978. The effect of zinc ions on fertilization of mouse ova *in vitro*. *J. Reprod. Fertility*. 53:179-183.

Apgar G.A., Kornegay E.T., Lindemann M.D., Notter D.R. 1995. Evaluation of copper sulfate and a copper lysine complex as growth promoters for weanling swine. *J. of Animal Sci.* 73:2640-2646.

Apgar G.A., Kornegay E.T. 1996. Mineral balance of finishing pigs fed copper sulfate or a copper-lysine complex at growth-stimulating levels. *J. Animal Sci.* 74:1594-1600.

Ardón M.F. 2005. Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract. Thesis Doctor of Philosophy. Institute of Reproductive Medicine. University of Veterinary Medicine Hannover. Pp. 1-119.

Arver S., Eliasson, R. 1980. Zinc and magnesium in bull and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertility* 60:481-84.

Ashmead H.D. 1993. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts. In: *The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition*, ed. H.D. New Jersey, USA: Noyes Publishers. Pp. 306-319.

Audet I., Laforest J.P., Martineau G.P., Matte J.J. 2004. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J. Anim. Sci.* 82:626–633.

Baker D.H., Easter R.A., Hollis G.R., Ellis M., Gabert V, Mavromichalis I. 1998. Nutrient allowances for swine. *Feedstuffs*. July 13:40-44.

Bedwal R.S., Bahuguna A. 1994. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Reviews*. Birkhäuser Verlag. *Experientia* 50, CH-4010 Basel/Switzerland. Pp. 626-640.

Behne D., Geftner H., Wolters G., Brotherton J. 1988. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. *Int. J. Androl.* 11:415-423.

Bernal C.J.M. 2006. Efecto del malati3n en la capacitaci3n y la reacci3n acrosomal de espermatozoides de cerdo. Tesis. UAM-I. M3xico. Pp.1-186.

Bhattacharya A.K., Kanjilal S. 2003. Assessment of sperm functional competence and sperm-egg interaction. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 253:255-261.

Blazak W.F., Overstreet J.W. 1982. Zinc does not inhibit the capacitation of human spermatozoa *in vitro*. *Gamete Research*. 5(2):153-160.

Boe-Hansen G.B., Morris I.D., Ersb3ll A.K., Greve T., Christensen P. 2005. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*. 63:1789-1802.

Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D., Nielsen M.B.F., Hedeboe A.M. 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69:728–736.

Braundmeier A.G., Demers J.M., Shanks R.D., Miller D.J. 2004. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *J. Anim. Sci.* 82:452-458.

Bredderman P., Foote R. 1969. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *J. Anim. Sci.* 28:496-501.

British Society of Animal Science. 2003. Nutrient requirement standards for pigs. Penicuik: BSAS.

Brown B.W. 1994. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:89:114.

Buff C.E., Bollinger D.C., Ellersieck, M.R., Brommelsiek W.A., Veum T. L. **2005.** Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 83:2380-2386.

Caballero P.I., 2007. Estudio del plasma seminal y la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre la funcionalidad de los espermatozoides de verraco. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Pp. 5.133.

Cao J., Henry P. R., Guo R., Holwerda R. A., Toth J. P., Littell R. C., Miles R. D., Ammerman C. B. 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J. Anim. Sci.* 78:2039–2054.

Cao J., Henry P.R., Davis S.R., Cousins R.J., Miles R.D., Littell R.C., Ammerman C.B. 2002. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101: 161-170.

Carlson M.S., Boren C.A., Wu C., Huntington C.E., Bollinger D.W., Veum T.L. 2004. Evaluation of various inclusion rates of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs. *J. Animal Sci.* 82:1359-1366.

Carlson D., Beattie J.H., Poulsen H.D. 2007. Assessment of zinc and copper status in weaned piglets in relation to dietary zinc and copper supply. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 91:19-28.

Case C.L., Carlson M.S. 2002. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 80:1917.1924.

Chan S.Y.W., Wang C., Chan S.T.H., Ho P.C., So W.W.K., Chan Y.F., Ma H.K. 1989. Predictive value of sperm morphology and movement characteristics in the outcome of *in vitro* fertilization of human oocytes. *J. of in vitro fertilization and embryo transfer.* 6(3):142-148.

Cheng J., Kornegay E.T., Schell T. 1998. Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from zinc sulfate and a zinc-lysine complex by young pigs. *J. Animal Sci.* 76:1064-1074.

- Chenoweth** J.P. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 64:457-468.
- Chesters** J.K. 1978. Biochemical functions of zinc in animals. *Word Reviews of Nutrition and Dietetics*. 32:135-164.
- Chesters** J.K. 1997. Zinc. In: *Handbook of nutritionally essential mineral elements*, ed. B.L. O'Dell and R.A. Sunde. New York: University of Missouri. Pp. 185-217.
- Chikwanha** O.C., Halimani T.E., Chimonyo M., Dzama K., Bhebhe E. 2007. Seasonal changes in body condition scores of pigs and chemical composition of pig feed resources in a semiarid smallholder farming area of Zimbabwe. *African Journal of Agricultural Research*. 2(9):468-474.
- Chivers** P.T. 2007. A galvanizing story - protein stability and Zinc homeostasis. *Journal of Bacteriology*. 189 (8):2953–2954.
- Close** W.H. 1993a. Nutrition of the working boar. *Recent Development in Pig nutrition 2*. Nottingham University Press. Pp.347-370.
- Close** W.H., Roberts F.G. 1991. Nutrition of the working boar. *Recent advances in Animal Nutrition*. Ed. Butherwork.
- Close** W.H. 1993b. Alimentación para el verraco. *Industria Porcina*. 13(3):22-24.
- Close** W.H. 1998. Nutrición y alimentación del ganado porcino: nulíparas, cerdas adultas y verracos. *ANAPORC*. 178:5-31.
- Close** W.H. 2000. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advances in pork production*. 11:47-56.
- Close** W.H. Cole D.J.A. 2000. *Nutrition of Sows and Boars*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Cole** H.H., Cupps P.T. 1984. Reproducción de los animales domésticos. 3ª. Edición. Edit. Acribia. España. Pp.170-212.
- Colenbrander** B., Kemp B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reproduction and Fertility*. Supplement 40:105-115.
- Cousins** R.J. 1985. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65:238-309.
- Cousins** R.J. 1996. Zinc. In: *Present knowledge in nutrition*, 7th Edition. Eds. Filer, L.J. & Ziegler E.E. Washington D.C: ILSI Press. Pp. 293-306.
- Cousins** R., Liuzzi J., Lichten L.A. 2006. Mammalian Zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34):24085–24089.
- Cox** J.F., Fernandez P., Saravia F., Santa María A. 1998. Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Arch. Med. Vet.* 30(1):93-99.
- Creech**, B. L., Spears J.W., Flowers W.L., Hill G.M., Lloyd K E., Armstrong T.A., Engle T.E. 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source

(inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *J Anim Sci.* 82:2140-2147.

Cross N.L. 1996a. Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Mol Reprod Dev.* 45:212–217.

Cross N.L. 1996b. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology Reprod.* 54:138–145.

D'Allaire S., Leman A.D. 1990. Boar culling in swine breeding herds in Minnesota. *Can. Vet. J.* 31:581-590.

De Ambrogi M., Spinaci M., Galeati G., Tamanini C. 2006. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* 66:1994–2000.

Ebert J.C., Altman R.B. 2008. Robust recognition of zinc binding sites in proteins. *Protein Science.* 17:54–65.

Edwards H.M.III., Baker D.H. 1999. Bioavailability of Zinc in several sources of Zinc Oxide, Zinc Sulfate, and Zinc Metal. *J. Anim. Sci.* 77:2730-2735.

Emerick R.J., Kayongo-Male H. 1990. Interactive effects of dietary silicon, copper and zinc in the rat. *J. Nutritional Biochemistry.* 1:35-40.

Enciso M., López- Fernández C., Fernández J.L., García P., Gonsálbez A., Gosálvez J. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescent microscopy. *Theriogenology.* 65:308-316.

Estienne M.J., Harper A.F. 2004. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF₂α. *J. Anim. Sci.* 82:1494–1498.

Estienne M.J., Harper A.F. 2005. Maximizing boar productivity with optimum trace mineral supplementation. Livestock Virginia State University.

Evenson D.P., Emerick R.J., Jost L.K., Kayongo-Male H., Stewart S.R. 1993. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 71:955-962.

Evenson D.P., Thompson J.L., Jost L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology.* 41(3)637-651.

Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 14(4):1039-1049.

Evenson D. 2005. Sperm DNA fragmentation and pregnancy outcome. *Male Physiology. Reproduction, Fertility and Development.* 17(2):282.

Fakler T.M., Ward T., Rapp C.J., Johnson A.B. 2002. The effect of complexed trace minerals on semen quality. *American Association of Swine Veterinarians.* Pp. 143-145.

FEDNA. 2006. Necesidades nutricionales para ganado porcino: Normas FEDNA. Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España.

Foley C.W., Heidenreich C.J., Harrington R.B. 1964. Changes in fructose, lactic acid, pH, and motility of boar semen during incubation at 37°C. *J. Anim. Sci.* 23:558-561.

Ford J.J., Wise T.H., Lunstra D.D. 1997. Negative relationship between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *J. Anim. Sci.* 75:790-795.

França L.R., Cardoso F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tissue & Cell.* 30(5):573-582.

França L.R., Avelar G.F., Almeida F.L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63:300–318.

Fraser L., Gorszczaruk K., Strzezek J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Dom Anim.* 36:325-329.

Fraser L., Wysocki P., Ciereszko A., Plucienniczak G., Kotłowska M., Kordan W., Wojtczak M., Dietrich G., Strzezek J. 2006. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. *Reproductive Biology.* 6(1):5-20.

Fraser L., Strzezek J. 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing?. *Theriogenology.* 68:248-257.

Fuentes A., De Serrano G.L., Regueiro C., Valle A. 1989. Efecto de la edad y raza sobre las características reproductivas en verracos púberes. *Zootecnia tropical.* 7(1-2):119-1139.

Fuentes A., Lago de S.G., Chang A., Semidey de S.G., Regueiro C., Soler L. 1995. Pubertad en machos porcinos. I. Biometria testicular. *Zootecnia Tropical.* 13(2):151-162.

Fuentes-Mascorro G., Vergara-Onofre M., Mercado P. E., Hernández-Pérez O., Rosado G.A. 2000. Participación de la estructura del ADN en la organización de la cromatina del espermatozoide. *Academia de investigación en biología de la reproducción, A.C., (AIBIR).* Pp. 7-12.

Fuentes-Mascorro G., Vergara-Onofre M., Mercado E., Hernández-Pérez O., Rosado A. 2000a. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. *Archives of Andrology.* 45:61-71.

Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado G.A. 2000b. Sperm chromatin. *Archives of Andrology* 45:215-225.

Fukada T., Civic N., Furuichi T., Shimoda S., Mishima K., Higashiyama H., Idaira Y., Asada Y., Kitamura H., Yamasaki S., Hojyo S., Nakayama M., Ohara O., Koseki H., dos Santos H., Bonafe L., Ha-Vinh R., Zankl A., Unger S., Kraenzlin M. E., Beckmann, J. S., Saito I., Rivolta C., Ikegawa S., Superti-Furga A., Hirano T.

2008. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways. PLoS ONE. 3(11):e3642-1-13.

Gadea M.J. 1997. Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro". Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España. Pp.1-84.

Gadea J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.16 (1):63-77.

Gadea J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish Journal of Agricultural Research. 1(2):17-27.

García C.A.C., Amaya S., Guevara G.J. 1999. Entrenamiento de verracos utilizados en monta natural y posteriormente em potro para I.A. 3er Congreso Nacional de la SOMEV. 13 y 14 de Diciembre. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.

García C.A.C. 2007. Nutrición del verraco. XII Symposium internacional de reproducción e inseminación artificial Porcina. Dr. Santiago Martín Rillo. Toledo, España.

García C.A.C., Guevara G.J.A., Martínez B.R., Amado O. J. 2007. Técnicas para La elaboración de premezclas mineral: Cerdos. Manual 21. CBS. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.

García C.A.C., De Loera Y.G. 2007. Nutrição do reprodutor suíno. Suínos & Cía (Revista Técnica de Suinocultura). 22:10-20. Brasil.

Gil C.M.A. 2001. Influencia de diferentes condiciones de cocultivo sobre la fecundación y la producción in vitro de embriones porcinos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Pp. 1-125.

Gil M.A., Abeydeera L.R., Day B.N., Vázquez J.M., Roca J., Martínez E.A. 2003. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. Theriogenology. 60:767-776.

Gil M.A., Almiñana C., Cuello C., Caballero I., Parrilla I., Hernández M., García E., Sánchez-Osorio J., Lucas X., Vázquez J.M., Roca J., Martínez E.A. 2006. Técnicas de análisis *in vitro* del poder fecundante del semen. Cap. 10. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Biotecnología de la Reproducción Porcina. Universitat de Girona y Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. España.

Gil M.A., Almiñana C., Cuello C., Parrilla I., Roca J., Vázquez J.M., Martínez E.A. 2007. Brief coincubation of gametes in porcine in vitro fertilization: Role of sperm: oocyte ratio and post-coincubation medium. Theriogenology. 67:620-626.

Gil M.A., Cuello C., Parrilla I., Vázquez J.M., Roca J., Martínez E.A. 2010. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. Reprod. Dom. Anim. 45(2):40-48.

Graham E.F., Schmehl M.K.L., Nelson D.S. 1980. Problems with laboratory assays. 8th NAAB Tech. Conf. A.I. Reprod. 1-8.

Gralak M.A. 2002. Absorption of certain trace elements in different nutritional conditions. In: Biology of the intestine in growing animals. Biology of Growing Animals. Poland: 1:579-604.

Gruenheid S., Canonne-Hergaux F., Gauthier S., Hackam D.J., Grinstein S, Gros P.1999.The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. The Journal of Experimental Medicine.189 (5):831-841.

González V. D., Quintero-Moreno A., Garde López-Brea J.J., Estes M.C., Fernández-Santos M.R., Rubio-Guillen J., Mejía S.W., González M.Y., León A.G., Bohórquez C.R. 2008. Caracterización morfométrica de la cabeza de espermatozoides porcinos mediante análisis computarizado (resultados preliminares). Revista Científica FCV-LUZ. 5:570-577.

Hacker R.R., Du Z., D'arcy C.J. 1994. Influence of penning type and feeding level on sexual behavior and feet and leg soundness in boars. *J Anim Sci* 1994. 72:2531-2537.

Hafez E.S.E. 1984. Reproducción e inseminación artificial en animales. 4ª Edición. Interamericana. México. Pp. 7-28.

Hahn J.D., Baker D.H. 1993. Grow and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J. Anim. Sci.* 71:3020-3024.

Hammerstedt R.J., Graham J., Nolan J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal Andrology* 11(1):73-88.

Hancock J.L. Hovell G.J.R. 1959. The collection of boar semen. *Veterinary Record.* 71:664–665.

Hansen C., Vermeiden T., Vermeiden J.P.W. Simmet C., Day B.C., Feitsma H. 2006. Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology.* 66:2188-2194.

Harder R.R., Lunstra D.D., Johnson R.K. 1995. Growth of testes and testicular morphology after eight generations of selection for increased predicted weight of testes at 150 days of age in boars. *J. Anim. Sci.* 73:2186-2192.

Hedemann M.S., Jensen B.B., Poulsen H.D. 2006. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *J Anim Sci.* 84:3310-3320.

Henkel R., Baldauf C., Bittner J., Weidner W., Miska W. 2001. Elimination of Zinc from the flagella of spermatozoa during epididymal transit is important for motility. *Reproductive Technologies.* 10(5):280-285.

Henkel R., Baldauf C., Schill W-B. 2003. Resorption of the element zinc from spermatozoa by the epididymal epithelium. *Reprod Dom Anim.* 38:97–101.

Hernández A. 2006. Influence of the form and level of organic versus inorganic copper and zinc in diets for growing and finishing pigs. Thesis Master of Philosophy. Division of Health Sciences School of Veterinary and Biomedical Sciences. Murdoch University, Australia. Pag. 153.

Hesketh J.E. 1982. Effects of dietary zinc deficiency on Leydig cell ultrastructure in the boar. *Journal of Comparative Pathology.* 92:239-247.

Hidiroglou H., Knipfel E.F. 1984. Zinc in mammalian sperm. *J. Dairy Sci.* 67:1147-1156.

Hollis G.R., Carter S.D., Cline T.R., Crenshaw T.D., Cromwell G.L., Hill G.M., Kim S.W., Lewis A.J., Mahan D.C., Millar P.S., Stein H.H., Veum T.L. 2005. Effects of replacing pharmacological levels of dietary zinc oxide with lower dietary levels of various organic zinc sources for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 83:2123-2129.

Hortin A.E., Oduho G., Han Y., Bechtel P.J., Baker D.H. 1993. Bioavailability of Zinc in ground beef. *J. Anim. Sci.* 71:119-123.

Hostetler C.E., Kincaid R.L., Mirando M.A. 2003. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *The Veterinary Journal.* 166:125-139.

Hoy R. 2007. Investigations on behavior of boars in semen processing centers. XII Symposium Internacional. Dr. Santiago Martin Rillo de Reproducción e I.A. en Porcino. Toledo. España.

Huacuja L., Delgado N.M., Hernández O., Rosado A. 1990. Differences in lipoprotein composition between heat and tails of human sperm: an infrared spectroscopy study. *Arch. Androl.* 24(1):17-27.

Huang Y-T., Johnson R.K. 1996. Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *J. Anim. Sci.* 74:750-760.

Hunt C.D., Johnson P.E., Herbel J., Mullen L.K. 1992. Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:148-157.

Iguchi K., Otsuka T., Usui S., Ishii K., Onishi T. Sugimura Y., Hirano K. 2004. Zinc and Metallothionein levels and expression of zinc transporters in androgen-independent subline of LNCaP cells. *Journal of Andrology.* 25 (1):154-161.

I'nstitut National de la Recherché Agronomique. 1985.

Iyer S.K., Daron H.H., Aull J.L. 1988. Purification and properties of alkaline phosphatase from boar seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 82:657-664.

Jackson K.A., Valentine R. A., Coneyworth L.J., Mathers J.C., Ford D. 2008. Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochemical Society Transactions.* 36(6):1262-1266.

Jacyno E., Kołodziej A., Kamyczek M., Kawęcka M., Dziadek K., Pietruszka A. 2007. Effect of L-carnitine supplementation on boar semen quality. *Acta Vet. Brno.* 76:595-600.

Jahanian R., Moghaddam H.N., Rezaei A., Haghparast A.R. 2008. The influence of dietary Zinc-Methionine substitution for zinc sulfate on broiler chick performance. *Journal of Biological Sciences*. 8(2):321-327.

Jeyendran R., Van Der Ven H.H, Perez-Pelaez M., Crabo B.G, Zaneveld L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.

Jiménez I., Gonzáles-Márquez H., Ortiz R., Herrera J.A., García A., Betancourt M., Fierro R., 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Teriogenology*. 59:1171-1180.

Johnson R.K., Eckardt G.R., Rathje T.A., Drudik D.K. 1994. Ten generations of selection for predicted weight of testes in swine: direct response and correlated response in body weight, backfat, age at puberty, and ovulation rate. *J. Anim. Sci.* 72:1978-1988.

Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172.

Johnson L, Thompson D L. Jr. Varner D.D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*. 105:23-51.

Katz D.F., Diel L. Overstreet J.W. 1982. Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 26:566-570.

Kemp B. 1989. Investigations on breeding boars to contribute to a functional feeding strategy. PhD Thesis, Agricultural University of Wageningen, the Netherlands.

Kemp B., den Hartog, L.A., Grooten, H.J.G. 1989. The effect of feeding level on semen quantity and quality of breeding boars. *Anim. Reproduction. Sci.* 20(4):245-254.

Kemp B. 1991. Nutritional strategy for optimal semen production in boars, *Pig News Info.* 12:555.

Kendall N.R., McMullen S., Green A., Rodway R.G. 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace elements status and semen quality of ram lambs. *Anim. Reproduction Sci.* 62:277-283.

King G.J., Macpherson J.W. 1966. Alkaline and Acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 30:304-307.

Knox R.V. 2000. Semen processing, extending & storage for artificial insemination in swine. Swine Reproductive Extension Specialist Department of Animal Sciences. University of Illinois.

Krebs N.F. 2000. Overview of Zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *Zinc and Health: Current Status and Future Directions.* *J. Nutr.* 130:1374S-377S.

Kvist U., Bjorndhal L., Kjellberg S. 1987. Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. *Scanning Microsc.* 1(3):1241-1247.

Lee K-H., Diekman M.A., Moss G.E., Allrich R.D. 1987. Pituitary gonadotropins, hypothalamic gonadotropin-releasing hormone, and testicular traits of boars exposed to natural or supplemental lighting during pubertal development. *Biology of Reproduction.* 36:1164-1169.

Lewis A.J. 1997. Alimentación de cerdas y verracos en sistemas de producción intensivos. University of Nebraska, EE.UU. II Jornada Técnica. ADM bioproducts/Andrés Pinaluba S.A.

Liptrap D.O., Miller E.R., Ullrey D.E., Whitenack D.L., Schoepke B.L., Luecke R.W. 1970. Sex influence on the zinc requirement of developing swine. *J Anim Sci.* 30:736-741.

Liu D.Y., Baker H.W. 1992. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertility Sterility.* 58(6):1178-1184.

López-Fernández C., Crespo F., Arroyo F., Fernández J.L., Arana P., Johnston S.D., Gosálvez J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology.* 68:1240-1250.

López-Fernández C., Pérez-Llano B., García-Casado P., Sala R., Gosálbez A., Arroyo F., Fernández J.L., Gosálvez J. 2008. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim. Reproduction Sci.* 103: 87–98.

Louis G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994a. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72:2038-2050.

Louis G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Ermer P.M., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994b. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72:2051-2060.

Lunstra D.D., Wise T.H., Ford J.J. 2003. Sertoli cells in the boar testis: Changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biology of Reproduction.* 68:140-150.

Lleó C.B. 2000. Efecto del proceso de congelación sobre las características del semen de verraco y el inicio del desarrollo embrionario (5 días). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Pp. 22-24.

Macedo M.C. Jr., Lucia T. Jr., Rambo G., Ferreira E.B., Rosa A.P., Fabiane C., Cabral M., Deschamps J.C. 2010. *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: Distinct systems for gamete's co-incubation and oocyte's cryopreservation. *Anim. Reproduction Sci.* 117:295–301.

Madrid-Bury N., Pérez-Gutiérrez J.F., Pérez-Garnelo S., Moreira P., Pintado S.B., Gutiérrez-Adán A., de la Fuente M.J. 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology.* 64:232-241.

Mahan D., Zawadzki J., Guerrero R. 2002. Metabolismo mineral y fertilidad de verraco: Observaciones de América Latina y Europa. *Producción animal*. Febrero 152:41-55. España.

Malo L.C.M. 2009. Diseño de diluyentes de congelación de semen porcino. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Departamento de Patología Animal. España.

Marchesi M.G. 2003. Nutrición del verraco. ANAPORC. Pp. 23:63-77.

Marchesi M.G. 2004. How to feed the AI boar. *Pig International*. 34(2):27-28.

Marchesi M. G. 2005. Nutrición del verraco. *Producción Animal*. 20(207):4-14. España.

Maret W. 2001. Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis-recent insights and current trends. *BioMetals*. 14:187–190.

Martin G.B., White C.L., Markey C.M., Blackberry M.A. 1994. Effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101:87-96.

Martín-Rillo S. 1986. Aportación al estudio de la congelación del semen de verraco. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. España.

Martín-Rillo S., Pintado B., De Alba C., García P., Corchera B., García C.A., Sagües A., Díaz C., Saíz F., Pérez C. 1996. Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development. *Reprod. Dom. Anim.* 31(2):309-310.

Martín-Rillo S., De Alba C., Corchera C.B., Strzezeck J., 1999. Efecto de la calidad seminal sobre la supervivencia embrionaria. ANAPORC, 185:42-52.

Marin-Guzman J., Mahan D.C., Chung Y.K., Pate J.L., Pope W.F. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75:2994–3003.

Martínez E., Vázquez J.M., Roca J. 1996. Fecundación *in vitro* en la especie porcina. En: Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. J.J. Garde y L. Gallego (Eds). Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca. Pp. 139.159.

Martínez M.B. 2002. Estudio de la fecundación “in vitro” en porcinos: Reducción de la poliespermia y optimización de la producción “in vitro” de embriones. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Pp. 1-225.

Mateos G.G., Medel P., Carrión D. 1997. Necesidades nutricionales del verraco de alta selección. XIII Curso de Especialización FEDNA. Madrid.

Mateos G.G., García J.M., Gracia L.M. 1998. Composición micromineral y vitamínica de correctores comerciales: premezclas para porcino. XIV Curso de Especialización. Avances en nutrición y alimentación animal. FEDNA. Barcelona, España. Pp. 313-340.

- Mateos** G.G., Lazaro R., Astillero J.R. Pérez M. 2005. Trace minerals: What books don't tell you. In: Redefining mineral nutrition, Ed. J. A. Taylor-Pickard and L. A. Tucker, 21-62. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press.
- Mavromichalis** I., Peter C.M., Parr T.M., Ganessunker D., Baker D.H. 2000. Growth-promoting efficacy in young pigs of two sources of zinc oxide having either a high or a low bioavailability of zinc. *J. Anim. Sci.* 78:2896–2902.
- McMahon** R.J., Cousins R.J. 1998. Mammalian Zinc transporters. *Recent Advances in Nutritional Sciences. J. Nut.* 128:667-670.
- Miller** E.R., Kornegay E.T. 1983. Mineral and vitamin nutrition of swine. *Journal of Animal Science.* 57(2):315-329.
- Molokwu** C.O., Li Y.V. 2006. Zinc Homeostasis and bone mineral density. *Ohio Research and Clinical Review.* 15:7-15.
- Mozo** M.R. 2006. Valoración del eyaculado (II). Departamento Técnico-Veterinario de Magapor S.L. España.
- Mullan** B.P., Wilson R.H., Harris D., Allen J.G., Naylor A. 2002. Supplementation of weaner pig diets with zinc oxide or Bioplex® zinc. In: Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium, ed. T.P. Lyons and K.A. Jacques, 419-424. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press.
- Murakami** M., Hirano T. 2008. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Review Article. Cancer Sci.* 99(8):1515–1522.
- NSNG.** 2010. National Swine Nutrition Guide. Tables on nutrient recommendations, ingredient composition, and use rates. Pork center of excellence. Iowa State University. USA.
- NRC.** 1998. National Research Council. Nutrient requirements of swine. 9th Edition, Washington, DC: National Academy Press.
- Neary** M., Yager A. 2002. Body condition Scoring in Farm Animals. *Farm Animal Management.* Department of Animal Sciences. Purdue University. 9:1-8.
- Nevo** A.C., Polge C., Frederick G. 1970. Aerobic and anaerobic metabolism of boar spermatozoa in relation to their motility. *J. Reprod. Fert.* 22:109-118.
- Ng** S.C., Edirisinghe W.E., Wong P.C., Ratnam S.S. 1986. Effect of sperm motility on human embryo quality in vitro fertilization. *Gamete Research.* 15(1):35-42.
- Nicolaeva** M.A, Golubeva E.L., Kulakov V.I., Sukhikh G.T. 1998. Evaluation of stimulus-induced acrosome reaction by two-colour flow cytometric analysis. *Mol. Hum. Rep.* 4(3):243-250.
- O'Dell** B.L. 2000. Role of Zinc in plasma membrane function. *Zinc and Health: Current Status and Future Directions. J. Nutr.* 130:1432S-1436S.
- Ohana** E., Hoch E., Keasar C., Kambe T., Yifrach O., Hershfinkel M., Sekler I. 2009. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *The Journal of Biological Chemistry.* 284(26):17677–17686.

Okwun O.E., Igboeli G., Ford J.J., Lunstra D.D., Johnson L. 1996. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J. Reproduction and Fertility*. 107:137-149.

Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19(4):426-436.

Orlando C., Casano R., Caldini A.L., Forti G., Barni T., Bonfanti L., Serio M. 1988. Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *Journal of Andrology*. 9(3):220-223.

Oteiza P.I., Olin K.L, Fraga C.G., Keen C.L. 1995. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients. Journal of Nutrition*. 125:823-829.

Palmiter R.D., Findley S.D. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO Journal*. 14:639-649.

Palomo A., Carmona L., Delalleau J., García A., Bravo J., Pujadas P. 1997. Impacto de la nutrición del verraco sobre los parámetros productivos. *Nutrición*. Pp 48-52.

Peña F.J., Rodríguez H. 2006. Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino. *Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Biotecnología de la Reproducción Porcina. Universitat de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. España. Pp.133-144.*

Pérez-Llano B., Enciso M., García-Casado P., Sala R., Gosálvez J. 2006. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*. 66:2137-2143.

PIC 2008. Nutrient Specifications. Agrocereos. USA.

Piehl L.L, Cisale H., Torres N., Capani F., Sterin-Speziale N., Hager A. 2006. Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Anim Reprod Sci*. 92; 401-410.

Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Briz M., Snacho S., García-Gil N., Bassols J., Pruneda A., Casas I., Bonet S. 2006. Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino. *Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcinos. Pp.81-91.*

Popwell J.M., Flowers W.L. 2004. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. *Anim. Reproduction Sci*. 81:97-103.

Pursel V.G., Johnson L.A., Rampacek G.B. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci*. 34:278-283.

Pursel V.G., Johnson L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci*. 40:99-102.

Quiles A., Hevia L. 2002. Cantidad y calidad espermática del verraco. Firma Ganadera. Pp.20-24. España.

Quiles A., Hevia L., 2004a. Influencia de la nutrición sobre la productividad del verraco. Porcinos. Ganadera. 25:28-32. España.

Quiles A., Hevia L. 2004b. La alimentación del verraco. Producción Animal. 199:14-26.

Quintero-Moreno A., González-Villalobos D., Garde L-B.J.J., Esteso M.C., Fernández-Santos M.R., Carvalho-Crociata J.L., Mejía-Silva W., León-Atencio G. 2009. Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. Revista Científica, FCV-LUZ. 2:153-158.

Rathje T.A., Johnson R.K. Lunstra D.D. 1995. Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis. 73:2177-2185.

Regalla L.M., Lyons T.J. 2005. Zinc in yeast: Mechanisms involved in homeostasis. Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. 14:37-58.

Revy P.S., Jondreville C., Dourmad J.Y., Nys Y. 2003. Le zinc dans l'alimentation du porc: oligoelement essentiel et risqué potentiel pour l'environnement. INRA Productions Animales 16:3-18.

Riopérez J. 1991. Nutrición de verracos. ANAPORC. 104:64-79. España.

Risopatrón J., Peña P., Miska W., Sánchez R. 2001. Evaluation of the acrosome reaction on human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. Andrologia 33:63-67.

Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez J.M., Martínez E.A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. J. Anim. Sci. 84:2692–2699.

Rodríguez V.A. 2008. Estudio citogenético de dos poblaciones porcinas: Efecto de las alteraciones cromosómicas sobre los parámetros reproductivos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp 10-12.

Rojas L.X., McDowell L.R., Cousins R.J., Martin F.G., Wilkinson N.S., Johnson A.B., Velasquez J.B. 1995. Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc sources fed to sheep. J. Anim. Sci. 73:1202-1207.

Romar R., Coy P., Campos I., Gadea J., Matás C., Ruiz S. 2001. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. Animal Reproduction Science. 68:85–98.

Rueda M., Perdigón R., Arias T., Mendoza D., Benitez J.A. Lemus C., Tosar M. 2009. Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubanoDICIP. Revista Computarizada de Producción Porcina. 16(1):26-30.

Rybar R., Faldikova L., Faldyna M., Machatkova M., Rubes J. 2004. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. Vet Med. Czech. 49(1):1–8.

SAS. 2003. Statistical Analysis Systems. User's Guide, Release 9.0. Inst. Inc. Cary NC., USA.

Saacke R.G.1984. Semen quality: Importance of and influencing factors. 10th Tech. Conf. A.I. Reprod. Pp. 30-36.

Saacke R.G. Nadir S., Nebel R.L. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*. 41:45-50.

Saavedra L.M.D. 2009. Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados *in vitro*. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. España. Pp. 1-184

Saiz-Cidoncha F., Rioperez J., Marigorta P., González E., Romero A. 1997. Effect of the addition of vitamin C or Vitamin E to boars feed on some morphological smen parameters. Poster NMPPh3.46. 48th Annual Meeting at European Association for Animal Production (EAAP). Viena. Austria.

Samuelson D.A., Lewis P.A., MacKay E., Whitley R.D. 1999. The influence of aging and low zinc nutrition on the choroid in the pig: I. The melanocyte. *Veterinary Ophthalmology*. 2:27-34.

Sandoval M., Henry P.R., Ammerman C.B., Miles R.D., Littell R.C. 1997. Relative bioavailability of supplemental inorganic zinc sources for chicks. *J. Anim. Sci*. 75:3195-3205.

Sansegundo G.M. 2008. Estudio de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.Pp. 1-160

Schell T.C., Kornegay E.T. 1996. Zinc concentration in tissues and performance of weanling pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Zn-lysine, or ZnSO₄. *J Anim Sci*. 74:1584-1593.

Schiavon S., Bailoni L., Ramanzini M., Vincenzi R., Simonetto A., Bittante G. 2000. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Animal Science*. 71:131-139.

Shipley F.C. 1999. Breeding soundness examination of the boar. *Swine Health Prod*.7 (3):117-120.

Smith J.W. 2nd, Tokach M.D., Goodband R.D., Nelssen J.L., Richert B.T. 1997. Effects of the interrelationship between zinc oxide and copper sulfate on growth performance of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci*. 75:1861-1866.

Smits R.J., Henman D.J. 2000. Practical experiences with Bioplexes® in intensive pig production. In: Proceedings of the Alltech's 16th Annual Symposium, ed. T.P. Lyons and K.A. Jacques, 293-300. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press.

Spears J.W. 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal Feed Science Technology*. 58:151-163.

- Stevermer** E.J., Kovacs M.F., Hoekstra W.G., Self H.L. 1961. Effect of feed intake on semen characteristics and reproductive performance of mature boars. *J. Anim. Sci.* 20:858-865.
- Stohs** S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine.* 18(2):321-336.
- Strzezek** J. 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle gland. *Reproductive Biology.* 2(3):243-266.
- Strzezek** J., Hopfer E., Zaborniak A. 1987. Zinc ion-dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Animal Reproduction Science.* 13(2):133-142.
- Strzezek** J., Kordan W., Glogowski J., Wysocki P., Borkowski K. 1995. Influence of semen collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod. Dom. Anim.* 30:85-94.
- Strzezek** J., Fraser L., Demianowicz W., Kordan W., Wysocki P., Holody D. 2000. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology.* 54:949-963.
- Strzezek** J., Fraser L., Kuklińska M., Dziekońska A., Lecewicz M. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology.* 4(3):271-287.
- Sukardi** S, Curry M.R, Watson P.F. 1997. Simultaneous detection of acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Repro Sci.* 46:89-96.
- Sulabo** R.C., Quackenbush J., Goodband R.D., Tokach M.D., Dritz S.S., DeRouchey J.M., Nelssen J.L. 2008. Effects of different feeding regimens on growth, longevity, and semen characteristics of working boars in a commercial AI stud. *Swine Day. Kansas State University.* Pp. 21-30.
- Szabó** J., Hegedus M., Bruckner G., Kósa E., Andrasofszky E., Berta E. 2004. Large doses of zinc oxide increases the activity of hydrolases in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 15:206–209.
- Tabuchi** M., Yoshimori T., Yamaguchi K., Yoshida T., Kishi F. 2000. Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(29):22220–22228.
- Tokach** M., 2009. Boar nutrition. *Feed and Nutrition. Featured Articles. Pig articles from the pig site. Kansas State University.* Pp.1-6.
- Trudeau** V., Sanford L.M. 1986. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult landrace boar. *J. Anim. Sci.* 63:1211-1219.
- Tulsiani** D.R.P., Abou-Haila A., Loeser C.R., Pereira B.M.J. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research.* 240:151–164.

Turgut G., Abban G., Turgut S., Take G. 2003. Effect of overdose zinc on mouse testis and its relation with sperm count and motility. *Biological Trace Element Research*. 96:271-279.

Ugwu S.O.C., Onyimonyi A.E., Foleng H. 2009. Testicular development and relationship between body weight, testis size and sperm output in tropical boars. *African Journal of Biotechnology*. 8(6):1165-1169.

Underwood E.J., Suttle N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock*, 3rd Edition. United Kingdom: CABI Publishing.

van Heugten E., Spears J.W., Kegley, E.B., Ward J.D., Qureshi M.A. 2003. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution, and immune response of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 81:2063-2071.

Waberski D., Helms D., Bayerbach M., Weitze K.F., Bollwein H., Bluemig P., Willeke H., Acevedo N. Saacke R.G. 2002 Sperm chromatin structure in boars used in artificial insemination. *Reprod Domest Anim.* 37(146):257 (abstract).

Ward T.L., Asche G.L., Louis G.F., Pollmann D.S. 1996. Zinc methionine improves growth performance of starter pigs. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):182 Abstr.

Wedekind K.J., Baker D.H. 1990. Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc. *J. Anim. Sci.* 68:684-689.

Wedekind K.J., Hortin A.E., Baker D.H. 1992. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulphate, and zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 70(1):178-187.

Wedekind K.J., Lewis A.J., Giesemann M.A., Miller P.S. 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 72:2681-2689.

Wilson M.E., Rozeboom K.J. Crenshaw T.D. 2004. Boar Nutrition for Optimum Sperm Production. *Advances in Pork Production*. 15:295-306.

Williams S. B., Southern L. L., Bidner T. D. 2005. Effects of supplemental dietary phytase and pharmacological concentrations of zinc on growth performance and tissue zinc concentrations of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 83:386-392.

Wroblewski N., Schill W.B., Henkel R. 2003. Metal chelators change the human sperm motility pattern. *Fertility Sterility* 79(3):1584–1589.

Xu De-X., Shen H-M., Zhu Q-X., Chua L., Wang Q-N., Chia S-E., Ong C-N. 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research*. 534:155–163.

Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T. 2007. Zinc is a novel intracellular second messenger. *Journal Cell Biology*. 177:637–645.

Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B.J. 1976. The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology Reproduction*. 15:471-476.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. The physiology of reproduction. Raven Press. NY. Pp. 189-317.

Yang Y, Maret W., Vallee B.L. 2001. Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. Proc Natl Acad Sci. USA. 98(10):5556–5559.

Zamaratskaia G. 2004. Factors involved in the development of boar taint. Influence of breed, age, diet and raising conditions. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Zeng W., Avelar G.F., Rathi R., Franca L.R., Dobrinski I. 2006. The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. Journal of Andrology. 27(4):527-533.

