

ORIGINAL

EFFECTO DE METILXANTINAS SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE TOROS DE LA RAZA CRIOLLA ARGENTINA

METHYLXANTHINES EFFECT ON SPERM CRYOPRESERVATION RACE BULLS CREOLE ARGENTINA

Robayo J¹, Tovío N I²

Universidad Nacional de Tucumán – Argentina Departamento de Producción Animal.
Universidad de Cundinamarca (Sede Fusagasugá) Facultad de Ciencias Agropecuarias
Laboratorio de reproducción animal - Grupo de investigación en Fisiología y Biotecnología Reproductiva Animal – GIFBRA.

Recibido: Mayo de 2013; Aceptado: Octubre de 2013.

RESUMEN

El objetivo consistió en evaluar la utilización de cafeína y teofilina sobre la criopreservación de semen de toros de la raza criolla Argentina, estudiando efectos en la motilidad, vigor espermático, y el pH en el semen. Se utilizaron 5 machos adultos, clínicamente sanos y aptos reproductivamente. Se utilizaron 5 diluyentes T1 (testigo): lactosa 11%, T2: cafeína 6 milimoles (mmol), T3: cafeína 10 mmol., T4: teofilina 6 mmol, T5: teofilina 10 mmol. Las muestras de semen se obtuvieron con Vagina Artificial. A cada muestra se le realizaron evaluaciones macroscópicas y microscópicas. Luego congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido para su posterior observación, para lo cual se descongelan 5 pajillas del mismo toro en baño María a 37 °C, luego se realiza la dilución en una proporción 3:1 (Diluyente: semen) de cada pajilla en un tratamiento diferente, a continuación se mantiene en baño María a 37°C durante el tiempo de observación. La observación se realiza a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos postdescongelación, evaluando la motilidad y el vigor espermático; el pH se midió al

¹Zootecnista Universidad de Cundinamarca

²Zootecnista, MSc. PhD (e). Docente Investigador Universidad de Cundinamarca. Lider Grupo de investigacion en fisiologia y biotecnologia reproductiva animal GIFBRA.

Contacto: nestortl55@hotmail.com

tiempo 0 y 120. Los datos de motilidad y vigor obtenidos no presentaron estadísticamente diferencia significativa ($p \leq 0,05$) a los 30, 60 y 120 minutos, la cafeína 6 mmol. presentó efecto (0 min) y la Teofilina a los 90 min; en cuanto al vigor presentó efecto a los 60 min la teofilina 10 mmol., el pH disminuyó los 120 minutos de observación en las muestras que contenían metilxantinas.

Palabras clave: teofilina, cafeína, motilidad, vigor espermático, pH.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the use of caffeine and theophylline on the cryopreservation of semen from bulls race Criolla Argentina, studying the effects caused in motility, sperm vigor, and pH in semen. Five adult males were used, de la Raza Criolla Argentina, clinically healthy and reproductively fit. T1 diluents using 5 (control): lactose 11%, T2: 6 mmol caffeine, T3: 10 mmol. caffeine, T4 theophylline 6 mmol, T5: 10 mmol. theophylline. Semen samples were obtained with Artificial Vagina. To each sample were performed Macroscopic assessments of color and volume, which determines if the sample is suitable for processing. Later microscopic evaluation is performed by measuring sperm concentration, mass motility and progressive .. Then the samples are frozen and stored in a tank of liquid nitrogen at - 196 °C. For subsequent observation thawed five straws the same bull in water bath at 37°C, then makes the dilution in the ratio 3:1 (Diluent: semen) of each straw different treatment, then maintained in a water bath at 37 °C during the observation time. The observation was made at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes post-thawing, assessing sperm motility and strength, the pH was measured at time 0 and 120. Motility data and force obtained showed no statistically significant difference ($p \leq 0.05$) at 30, 60 and 120 minutes 6 mmol. introduce caffeine effect (0 min) and theophylline at 90 min, in terms of force present 60 min to effect 10 mmol. theophylline, the pH decreased to 120 minutes of observation on the samples containing methylxanthines.

Key words: Theophylline, caffeine, motility, sperm vigor, pH.

INTRODUCCIÓN

Se estima que la movilidad de espermatozoides es una de las más importantes características para evaluar el potencial de fertilidad de espermatozoides eyaculados, por lo que siempre se puso énfasis en mantener una adecuada cantidad de ellos mostrando motilidad progresiva y vigorosa (1). La motilidad es solo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un

eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Para que la migración espermática a través de la hembra ocurra normalmente y sobre todo para el establecimiento de un reservorio espermático en el oviducto, los espermatozoides han de tener movimiento activo; por otra parte la motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide (2).

La criopreservación de semen a largo plazo es económicamente viable e importante ya que permite mantener y conservar germoplasma, preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva de los animales que posean un alto valor genético. Un requisito indispensable para el desarrollo de esta biotecnología es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido congelado. Con la criopreservación se busca preservar células espermáticas, sin embargo se presentan algunos inconvenientes con los espermatozoides en el momento de la descongelación ya que hay variabilidad en las tasas de viabilidad espermática provocando una reducción de la motilidad espermática, se causa daños irreversibles en la membrana plasmática, la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) causa un estrés oxidativo lo que conlleva a: la muerte de un gran número de espermatozoides o en lo supervivientes, modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica de las membranas espermáticas, trayendo como consecuencia un acortamiento de su período de vida útil lo cual va afectar la fecundación (3).

En las últimas décadas se ha demostrado que la Inseminación Artificial en especies de producción es una de las tecnologías reproductivas que más ha contribuido a acelerar y mejorar el progreso genético, permitiendo un mayor aprovechamiento de los sementales que tienen características fenotípicas y genotípicas deseadas. Su resultado positivo se va a ver reflejado si se cumplen con todos los parámetros establecidos para llevarse a cabo; uno de los puntos más importantes a tener en cuenta en esta técnica es la calidad del semen (3).

La fertilidad potencial de una muestra de semen luego de ser descongelada va a depender en gran medida de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de

alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito y de contribuir al desarrollo embrionario; logrando como objetivo final una preñez (4).

La congelación y descongelación de espermatozoides induce un incremento en la generación de radicales superóxido que puede provocar la peroxidación de los lípidos de las membranas espermáticas alterando su fluidez y afectando a su función (3). Es importante para estas situaciones utilizar sustancias que produzcan un efecto estimulante sobre los espermatozoides, siendo el caso de las metilxantinas; como la cafeína y la teofilina, son compuestos que se caracterizan por que tienen un efecto prolongado en la motilidad espermática permitiendo que haya mayores probabilidades de éxito para la fertilización (5).

Se han realizado estudios de la pentoxifilina y la cafeína con semen de machos de distintas especies sobre la motilidad y la supervivencia espermática *in vitro*. Se ha revisado la información disponible, concluyendo en la necesidad de reconsiderar los efectos beneficiosos de las metilxantinas, incluyendo en un nuevo estudio a otra metilxantina (teofilina), realizando así comparaciones entre estas sustancias, con el fin de generar datos importantes para mejorar la calidad del semen post-descongelación, que podrían impactar en significativos avances en el área de biotecnología reproductiva, evaluando la influencia benéfica de estas sustancias sobre la motilidad de los espermatozoides criopreservados.

Se hace necesario mantener la motilidad espermática post-descongelación lo cual va a permitir que se obtengan resultados positivos en el momento de realizar la inseminación Artificial.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó bajo la supervisión de los docentes encargados del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ) de la Universidad Nacional de Tucuman e Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), INTA, Provincia de Tucuman- Argentina.

Colecta y congelamiento

El trabajo de campo de colecta y congelamiento del semen se desarrollara en el IIACS ubicado a 52 km al SE de la ciudad de San Miguel de Tucumán, a 27°11 de latitud Sur y 65°17 de longitud Oeste, y a una altitud de 335msnm. Pertenece al Parque Chaqueño distrito occidental, que es una faja boscosa de transición entre el Chaco seco y la selva tucumano-oranense. La precipitación media anual es de 880 mm y las lluvias se producen principalmente entre octubre y marzo. La temperatura media anual fue de 19°C, siendo 25°C la del mes más cálido (enero) y 13°C la del mes más frío (julio). El clima es de tipo subtropical-subhúmedo.

Postdescongelamiento

El trabajo postdescongelación del semen se realizo en el Laboratorio de Reproducción de la Cátedra de Zootecnia General I (FAZ) sede El Manantial, donde se realizaron las observaciones y cálculos de la motilidad individual progresiva, vigor espermático y pH. Se utilizaran los equipos de laboratorio para evaluación de calidad de semen no computarizada, equipamiento para procesamiento de semen.

Grupo experimental

Cinco machos adultos de la raza Criolla Argentina. Estos machos pertenecen a un banco de germoplasma *in vivo* de la mencionada raza (IIACS).

Tabla 1: Características grupo experimental

# animal	edad (años)	Peso (Kg)	condición corporal (1 a 5)
X 3349	7	660	3
a 3459	5	700	3
X 3515	4	600	3
x 3511	4	560	3
a 3543	4	550	2,5

Metodología

Preparación del diluyente

El diluyente utilizado consistió en una solución de lactosa al 11% preparada un día antes de la recolección de semen se mantuvo refrigerado hasta el momento de ser utilizado, posteriormente se llevo a baño maría a una temperatura de 30°C para ser adicionado al semen. El diluyente se dividió en dos fracciones, las cuales tenían la siguiente composición:

Diluyente A

80 % de solución de lactosa al 11%, 20 % de yema de huevo y antibiótico (estreptomicina, 1000 mg/ml).

Diluyente B

70 % solución de lactosa al 11%, 20 % de yema de huevo, 10% de glicerol y antibiótico (estreptomicina, 1000 mg/ml).

Por otra parte se preparó otra solución de lactosa 11% que fue utilizado para diluir las muestras de semen, se prepararon 5 diluyentes diferentes; con un volumen de 100 ml cada uno. De la siguiente manera: 1: lactosa 11%, 2: lactosa 11% - cafeína 6 milimoles, 3: lactosa 11% - cafeína 10 milimoles, 4: lactosa 11% - teofilina 6 milimoles, 5: lactosa 11% - teofilina 10 milimoles.

Recolección de las muestras

A los 5 machos utilizados se les realizo la recolección de semen utilizando el método de vagina artificial. Posteriormente las muestras de cada macho se colocaron en baño María a 30°C para realizar una estabilización térmica durante 5 minutos, luego se efectuaban las siguientes evaluaciones:

Evaluación macroscópica

Volumen de eyaculado; el cual se midió en el tubo donde fue recolectado, Color lo cual permito inicialmente determinar si la muestra era normal y apta para procesar.

Evaluación microscópica

Con cada eyaculado obtenido se midió la concentración espermática con la cámara de Makler, posteriormente con estos valores se determino la dilución de cada muestras, con la finalidad de obtener pajuelas con una concentración de 20 millones de espermatozoides por pajuela.

Por otra parte se evaluó la motilidad masal, Motilidad individual progresiva: Posteriormente se adiciono la primera porción del diluyente, el diluyente A de la siguiente manera:

Protocolo de congelación

- Se adiciono el diluyente A y se realiza una fase de enfriamiento, disminuyendo la temperatura en relación a 2°C cada 5 minutos hasta alcanzar una temperatura de 5°C; y se realizo nuevamente una estabilización térmica.
- Cuando las muestras están a 5°C, se adiciona el diluyente B en tercios cada 10 minutos.
- Se realiza un periodo de Equilibración durante 45 a 60 minutos, dejando las muestras a 5°C, luego se empaco el semen en pajillas previamente marcadas con los datos de cada toro, para posteriormente ser congeladas.
- Para el proceso de congelación Primero se colocaron las pajuelas en una bandeja portapajillas, luego se introducen en una caja de telgopor que contienen Nitrógeno Líquido, se colocan a 5 cm del nitrógeno durante 10 minutos para una fase de estabilización a una temperatura promedio de -160°C, posteriormente se ponen dentro del nitrógeno líquido durante 5 minutos, luego son retirados y se

introducen en las gradillas del tanque de criopreservación a una temperatura de -196°C.

Protocolo de descongelación

Para descongelar las pajillas se colocaron en baño maría a 37°C durante un minuto. Luego se diluyo la pajilla con una proporción 3: 1 (diluyente: semen), los diluyentes utilizados fueron 5 diferentes soluciones que contenían las metilxantinas de la siguiente manera: 1: lactosa 11%, 2: lactosa 11% - cafeína 6 milimoles, 3: lactosa 11% - cafeína 10 milimoles, 4: lactosa 11% - teofilina 6 milimoles, 5: lactosa 11% - teofilina 10 milimoles. Se uso una pajilla de cada macho para cada solución. Posteriormente se realizaron observaciones de la motilidad individual progresiva y vigor de las muestras a 0, 30, 60, 90 y 120 min. Por otra parte se realizo medición del pH con papel indicador a los 0 y 120 minutos.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de motilidad, vigor y pH se evaluaron utilizando el Software Infostat de la Universidad Nacional de Córdoba, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis; permitiendo realizar un análisis de varianza no paramétrico a una vía de clasificación.

Efecto de la teofilina y la cafeína sobre la Motilidad y el Vigor espermática: se empleo un análisis de varianza no paramétrico a una vía de clasificación. Se utilizo el ANAVA propuesto por Kruskal y Wallis, el cual permite comparar las esperanzas de 2 o más distribuciones sin necesidad de realizar el supuesto de que los términos de error se distribuyen normalmente.

Los datos obtenidos de motilidad y Vigor durante la observación se clasificaron por 5 tratamiento (testigo, cafeína 6 mmol., cafeína 10 mmol., teofilina 6 mmol. y teofilina 10 mmol.) y particionaron por tiempo de observación (0, 30, 60, 90, 120 minutos). En la variable pH se clasificaron por tratamiento y se compararon los datos en los dos tiempo de medición (0 y 120 minutos).

RESULTADOS

Efecto de la cafeína y la teofilina sobre la Motilidad espermática

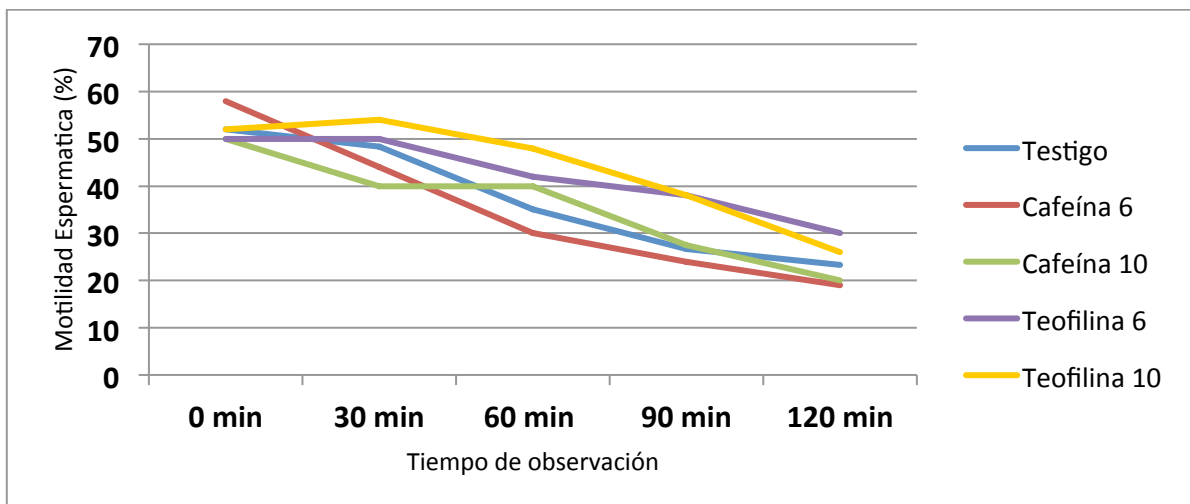
El análisis de varianza para la variable de motilidad indicó que se presentan diferencias significativas al tiempo 0', con mayor porcentaje en el tratamiento 2 (cafeína 6 mmol.), con respecto a los demás tratamientos. De igual forma en el tiempo 90' siendo mayor en los tratamientos con Teofilina con respecto a la cafeína y el testigo. En el tiempo 30', 60' y 120' no se presentan diferencias estadísticas. Por otra parte no se observan diferencia en las concentraciones utilizadas de metilxantinas (6 y 10 mmol.).

Tabla 2: Motilidad promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina a diferentes tiempos

Tratamiento	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Testigo	52 ab	48,3 a	35 a	23,3 a	52 a
Cafeína 6 mmol.	58 b	44 a	30 a	19 a	54 a
Cafeína 10 mmol.	50 a	40 a	40 a	20 ab	48 a
Teofilina 6 mmol.	50 a	50 a	42 a	30 b	38 a
Teofilina 10 mmol.	52 ab	54 a	48 a	26 b	26 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Grafica 1: Motilidad promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina a diferentes tiempos



Efecto de la cafeína y la teofilina en el Vigor Espermático

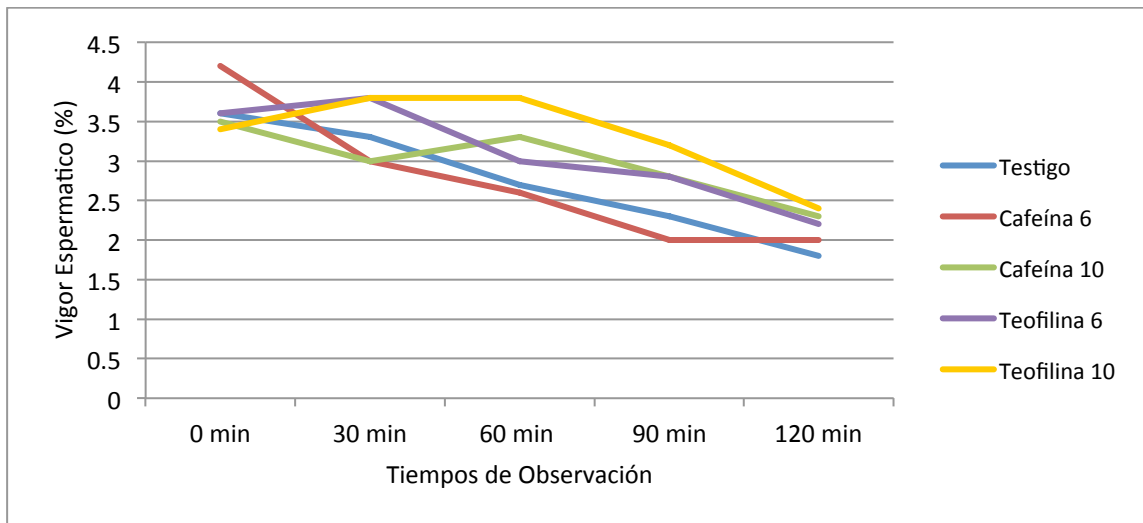
Para la variable vigor se presentó una diferencia significativa al tiempo 60' postdescongelación siendo mayor en los tratamientos con Teofilina (6 y 10 mmol.) y cafeína 10 mmol. respecto a la cafeína 6 mmol. y el testigo (Tabla 2). En el tiempo 0', 30', 90' y 120' no se presentan diferencias.

Tabla 3: Vigor promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina a diferentes tiempos

Tratamiento	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Testigo	3,6 a	3,3 a	2,7 a	2,3 a	1,8 a
Cafeína 6 mmol.	4,2 a	3 a	2,6 a	2 a	2 a
Cafeína 10 mmol.	3,5 a	3 a	3,3 ab	2,8 a	2,3 a
Teofilina 6 mmol.	3,6 a	3,8 a	3 ab	2,8 a	2,2 a
Teofilina 10 mmol.	3,4 a	3,8 a	3,8 b	3,2 a	2,4 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Grafica 2: Vigor promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina a diferentes tiempos



Efecto de la cafeína y la teofilina en pH

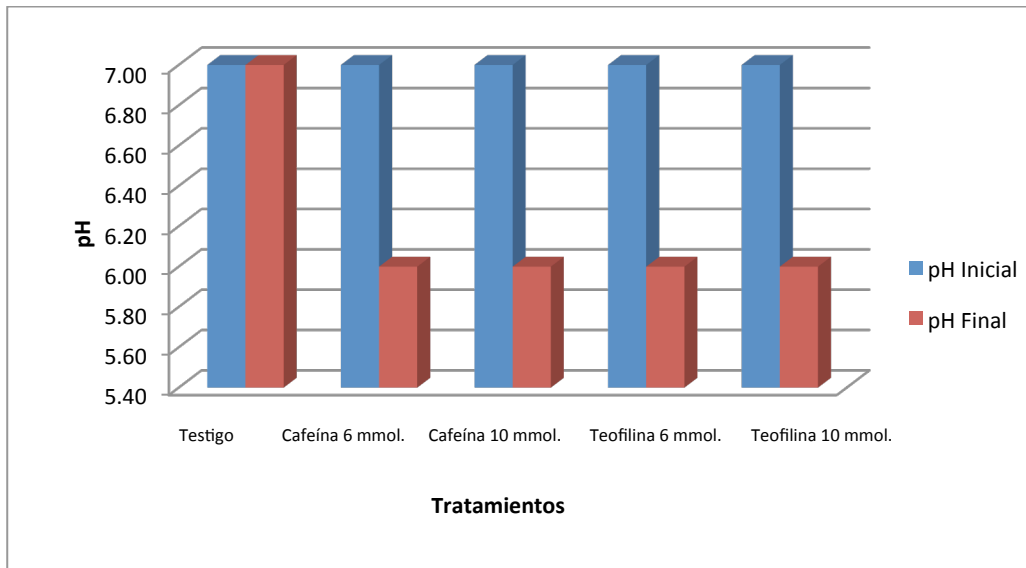
El análisis estadístico nos indicó para la variable de pH que se presentó diferencia significativa en el pH final del Testigo en relación a los demás tratamientos; tales resultados no son atribuibles a un aumento en el metabolismo postdescongelación ya que no se observó un aumento significativo en la motilidad, ni el vigor de las células espermáticas, finalmente a los 120' se observa un descenso similar en todos los tratamientos.

Tabla 4: pH promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina

Tratamiento	pH Inicial	pH Final
Testigo	7,00 a	7,00 a
Cafeína 6 mmol.	7,00 a	6,00 b
Cafeína 10 mmol.	7,00 a	6,00 b
Teofilina 6 mmol.	7,00 a	6,00 b
Teofilina 10 mmol.	7,00 a	6,00 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Grafica 3: pH promedio bajo el efecto de cafeína y la teofilina



DISCUSION

Varios estudios (3, 5, 6, 7, 8) han indicado que las metilxantinas puede ejercer un efecto sobre los la motilidad espermática, ya que tiene como principal efecto la inhibición de la fosfodiesterasa lo cual causa la elevación consiguiente de los niveles de AMP cíclico, causando un incremento en la proporción de células motiles; adicionalmente la estimulación de la tasa natatoria espermática y la longevidad de la actividad espermática. Además inhibe la generación de anión superóxido producidos por la actividad cinética de los espermatozoides, aumentando la motilidad y el vigor de espermatozoides en semen fresco y como antioxidante inhibe la generación de ROS. (3).

Por otra parte, el enfriamiento a 5°C induce una transición en la membrana espermática desde un estado líquido cristalino a gel, alterando su fluidez y por lo tanto su estructura molecular lo que contribuye al daño oxidativo (9). Éste es uno de los factores más importantes que comprometen la motilidad y fertilidad espermática durante la conservación y especialmente durante el enfriamiento. Se ha intentado minimizarlo reduciendo la tensión de oxígeno por adición de antioxidantes al medio de dilución, varios agentes fueron ensayados (9). Existen evidencias que sugieren claramente que las especies oxígeno reactivas (ROS) juegan un rol importante en la fertilidad, sobre todo en los procesos de congelamiento-descongelamiento dañando la función espermática (3). Ese exceso de ROS puede tener un efecto deletéreo sobre el ADN nuclear, axónema y membranas espermáticas. En consecuencia puede ser responsable, al menos en parte, de la significativa pérdida de motilidad que los espermatozoides sufren durante el proceso de congelación - descongelación.

El presente estudio, buscó probar los efectos beneficiosos de la metilxantinas (Cafeína y Teofilina) para mejorar la motilidad de muestras de semen criopreservadas, esta suplementación del semen postdescongelación no mejoró significativamente los porcentajes de motilidad progresiva. Los resultados de nuestro estudio son diferentes a los informados en el esperma humano estimulado con cafeína y pentoxifina (3, 7, 9), Sin embargo, los resultados de la presente investigación están de acuerdo con

investigaciones previas (1). La cafeína adicionada en el reconstituyente de semen congelado bovino (pellets), no resultó efectiva En tanto que su utilización en los diluyentes previo a la criopreservación dio resultados positivos con el agregado de 10 mmol., no así con 6 mmol. (5). Además, también se encontró que el número de espermatozoides móviles no aumentó.

Por otra parte en otra investigación, Gil y Col. (10), evaluando la motilidad de semen porcino utilizando pentoxifilina en proporciones de 2, 4, 8 ,16 y 32 mmol., presento una disminución de la motilidad indicando los efectos negativos de la pentoxifilina añadida antes de la congelación por un periodo de 10 min, lo cual podría ser el resultado de una exposición a mayor tiempo de los espermatozoides a este compuesto en el momento de la congelación y descongelación. Lo que parece como si las concentraciones elevadas de AMPc promueven la interrupción de la actividad de AMPc asociada canales iónicos en la membrana plasmática; lo cual alteran el movimiento de iones y agua a través de la membrana del espermatozoide y el aumento membrana de daños. Maxwell y col. (11) por su parte evidenciaron a una exposición de la pentoxifilina de 90 a 120 minutos obteniendo resultados similares a los presentados en este trabajo.

Se observó durante la evaluación que las metilxantinas presentan un efecto en el tiempo 60 y 90 de observación con respecto al testigo, pero ninguna de las concentraciones ensayadas hace que la motilidad se mantenga tras capacitación post-descongelación durante los 120 minutos de observación.

Los resultados están acorde con lo que indico Blanes (3), el efecto beneficioso de las metilxantinas sólo se presenta a concentraciones bajas (1 mmol.); para concentraciones superiores provocan un claro efecto negativo; lo cual es atribuible a su papel como inhibidor de la fosfodiesterasa, provocando un incremento en exceso de adenosín monofosfato (AMPc) que desencadene una cascada de reacciones secundarias que acaben dañando la estructura del axónema. En este trabajo se utilizaron concentraciones superiores de metilxantinas; cafeína y teofilina 6 y 10 mmol..

Investigaciones realizadas descongelando el semen en reconstituyente cafeinado utilizando proporciones de 6 y 10 mmol. de Cafeína y pentoxifilina (5, 9) en bovinos y

equinos permitían concluir que al agregar metilxantinas, prolongaban la viabilidad de los espermatozoides manifestándose una marcada hipercinesis, traducida en un aumento de la motilidad y el vigor, estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos en otra investigación.

En otras investigaciones (1, 12) en donde la adición de metilxantinas se realizaba en los diluyentes usados para la congelación y reconstituyente de semen bovino congelado utilizando concentraciones de 6 y 10 mmol., siguen la misma tendencia observada en el presente trabajo; sin arrojar diferencias significativas estadísticamente.

Al no encontrar diferencias estadísticas en las variables de motilidad y vigor en el presente estudio, posiblemente podría deberse a el factor de calidad de semen, ya que como indicaron algunos autores (1, 8, 12), los efectos de las metilxantinas mejoran la viabilidad del semen de toros de baja fertilidad mientras que su incidencia no es significativa en reproductores de alta fertilidad.

En la literatura se reporta poca información de pH post-descongelación, aunque teóricamente el pH del diluyente puede disminuir debido a la actividad metabólica de los espermatozoides. Adicionalmente, es sabido que altas variaciones del pH durante procesos de criopreservación conllevan a un aumento en la mortalidad espermática (13).

La tasa de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos, que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en la misma (13). De acuerdo a esto, se puede inferir que la tasa de congelación seminal, utilizada en el presente estudio es adecuada desde el punto de vista del pH, lo cual puede explicar por qué no se observaron variaciones de pH Inicial en ninguno de los tratamientos y tampoco en el grupo Testigo luego de 120 minutos.

Los resultados indicados por Fernández y Col. (14), muestran claramente que el aumento o disminución mínima del pH, afecta de una manera significativa la movilidad espermática y a la viabilidad celular espermática, posiblemente por un mecanismo

bioquímico osmótico que modifica la permeabilidad celular y que ocasiona una lisis espermática. En este estudio no se atribuiría la disminución de motilidad y vigor al descenso de pH ya que se observó que en el grupo testigo fue igual el pH inicial al final.

CONCLUSIONES

Existe efecto en la motilidad progresiva individual de la cafeína 6 mmol., cuando es analizada inmediatamente después de la descongelación seminal frente a la aplicación de otras metilxantinas (Cafeína 10 mmol., Teofilina 6 mmol.), sin embargo este efecto no es aparente en muestras no tratadas con la metilxantinas

Existe efecto en la motilidad progresiva individual de la Teofilina 6 y 10 mmol., cuando es analizada a los 90 minutos pos descongelación seminal frente a la aplicación de otra metilxantina (Cafeína 6 mmol.), igualmente este efecto es evidente frente a las muestras no tratadas con la metilxantinas.

Existe efecto sobre el vigor espermático de la Teofilina 10 mmol., cuando es analizada a los 60 minutos después de la descongelación seminal frente a la aplicación de otra metilxantina (Cafeína 6 mmol.), igualmente este efecto es evidente frente a las muestras no tratadas con la metilxantinas.

Existe efecto de las metilxantinas sobre el pH de las muestras seminales cuando es analizada a los 120 minutos después de la descongelación.

BIBLIOGRAFIA

1. DE LA VEGA, Adolfo; WILDE, Oscar Rafael; CRUZ, Liliana; falla de la cafeína en realzar la motilidad (Hiperactividad) en semen congelado, Revista Agronómica NOA, Vol. 28, 85-96 p, 1996.
2. MUIÑO, R.; FERNANDEZ M; PEÑA A.; Parámetros Cinéticos en Eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega. Universidad Santiago de Compostela, España; 2006.

3. BLANES R, FERNÁNDEZ P.J, JIMÉNEZ A, ROMEU A; La pentoxifilina como agente antioxidante en el proceso de criopreservación espermática; Revista Iberoamericana de Fertilidad, Vol. 21, 2004.
4. MUIÑO, Rodrigo; evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas, Universidad Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, 2007.
5. DE LA VEGA, Adolfo; WILDE, Oscar Rafael; CRUZ, Liliana; Efecto de la pentoxifilina y la cafeína sobre la motilidad de espermatozoides bovinos criopreservados, Avances en Ciencias Veterinarias, vol.12, N° 2, 1997.
6. ESTEVES, Sandro; SHARMA, Rakesh; THOMAS, Anthony; AGARWAL, Ashok Jr; Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improve the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate, Human Reproduction, Col 13. N° 12 pp 3384-3389, 1998.
7. JIANG C.; KILFEATHER S.; PEARSON R.; TURNER P.; The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysinetheophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility Department of Clinical Pharmacology, St Bartholomew's Hospital. Vol 18, 258-262, 1984.
8. GARBEN, David; LUST, W.; FIRST, Neal; LARDY, Henry; Effects of Phosphodiesterase Inhibitors and Cyclic Nucleotides on Sperm Respiration and Motility, Biochemistry, VOL.10, NO.10, 1971.
9. DE LA VEGA, Adolfo; WILDE, Oscar Rafael; CRUZ, Liliana; Efecto de la adición de cafeína y lactato sobre la motilidad del semen equino diluido en leche descremada-glucosa Zootecnia Tropical ,Vol. 22,:103-114 p., 2004.
10. GIL, Maria; HERNANDEZ, Marta; ROCA, Jordi; ALMIÑANA, Carmen; LUCAS, Xiomara; CUELLO, Cristina; VAZQUEZ, Juan; MARTINEZ, Emilio; Pentoxifylline added to freezing or post-thaw extenders does not improve the survival or in vitro fertilising capacity of boar spermatozoa, Society for Reproduction and Fertility, Vol:139, 557–564 p , 2010.
11. MAXWELL W., ROBINSON S., ROCA J., MOLINIA F., SANCHEZ-PARTIDA L. y EVANS G.; Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein, Reproduction, Fertility, and Development Vol:7, 1081–1087 p, 1995.
12. WILDE, Oscar Rafael; DE LA VEGA, Adolfo; PARRA R., respuesta del semen descongelado en diluyentes cafeinados, , Revista Agronómica NOA, Vol. 25, 65 – 83 p, 1990.
13. VALDERRAMA, Rubén Dario;, ARANGO Maria Elena; RENDÓN, Laura y ACEVEDO Carlos Mauricio; Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. Revista CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 21-30 p, 2011
14. FERNÁNDEZ, Pilar; GUTIÉRREZ, Marieta, GRIS, José; AULESA, Carlos; Estudio de las variaciones de la movilidad progresiva del espermatozoide (a+b%OMS) a

diferentes pHs “in vitro”, medidas con un sistema automatic de análisis de semen (CASA), Revista Iberoamericana de Fertilidad, Vol. 26 (1):41 – 45,2009.