



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“Comparación de dos variantes de la técnica de separación espermática Swim-Up en semen de cerdo fresco y descongelado”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JUNIOR FERNANDO GARCÍA BAUTISTA

ASESOR

Dr. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CO-ASESORA

M. en C. ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.
JUNIO 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación de dos variantes de la técnica de separación espermática swim-up en semen de cerdo fresco y descongelado

Que presenta el pasante: JUNIOR FERNANDO GARCÍA BAUTISTA

Con número de cuenta: 30225010-7 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 12 de enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Osnaya Gallardo	
VOCAL	M.V.Z. Mario Alberto Velasco Jiménez	
SECRETARIO	Dr. José Alfredo Medrano Hernández	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Elizabeth Araceli Quezada Fraide	
2do. SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Al Dr. José Alfredo Medrano, por brindarme el apoyo, la confianza necesaria y la paciencia eterna para poder realizar y finalizar este proyecto, a pesar de que no fue fácil el camino, agradezco el alentarme en esos momentos en lo que pensé tirar la toalla.

A la M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez por la paciencia y el tiempo dedicado para ayudarme a entender cada uno de los procedimientos que lograron la culminación de este proyecto.

Al Dr. Fernando Osnaya Gallardo, la Dra. María del Carmen Espejel Del Moral, el MVZ Mario Alberto Velasco Jiménez y a la MVZ Elizabeth Araceli Quezada Fraide, miembros del jurado por sus observaciones y disponibilidad para la revisión de este trabajo.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP – FMVZ), por brindarme su apoyo con el semen utilizado en este proyecto.

A mí querida y amada Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 2, UNAM.

A los profesores que contribuyeron en mi formación durante mis estudios de Licenciatura.

A los integrantes del laboratorio 2 de Reproducción de la UIM: Jessica Adame, Angélica García (Angie), Luis David Ortega (LD), Fernando Herrera, Carlos, Claudia, Julio, Lili, Dra. Alicia, Dra. Mari Espejel y al laboratorista Fernando (tocayo), sin su ayuda y apoyo este trabajo no sería posible.

Por el apoyo financiero a los siguientes proyectos UNAM:

PAPIIT – IN213815 “Efecto del enfriado lento pre-congelación, a temperaturas cercanas a la formación del hielo (-5°C), sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides de perro

PIAPIVC03 “Estudio de los factores que determinan la criosupervivencia de los espermatozoides sometidos a los protocolos de la crioconservación”

PIAPI1615 “Biología de la Reproducción: fisiología y conservación de gametos y embriones de los animales domesticos”

Dedicatorias

**A mi madre Paula Bautista: Que durante 32 años ha dedicado cada día para formarme como persona, hombre y profesionista. Gracias por cada esfuerzo que realizaste para que yo pudiera lograr este sueño. Cada palabra, regaño, castigo y uno que otro jalón de orejas me sirvieron para que hoy pueda ser tu mayor orgullo. Gracias por la educación y el amor que me bridas día con día, gracias a ti hoy soy quien soy; sabemos que el camino no ha sido fácil pero aquí estamos. Doy gracias a Dios por darnos la oportunidad de disfrutar este gran triunfo que te mereces, ya que no hubiera sido posible sin ti a mi lado.*

**A mi hermano Guillermo Uriel: Gracias por haber hecho de mi infancia la mejor y mi juventud la más divertida. Te anhelé desde el principio. El ser el hermano mayor no es nada fácil, orientar, corregir y hacer lo correcto para que tú puedas ser un reflejo de mis errores y aciertos, espero que también logres tus metas. Sin ti yo no sería nada porque me haces ser mejor y predicar con el ejemplo, eres el mejor hermano. Te quiero mucho hermanito.*

**A mi abuelito Q.E.P.D. Guillermo Bautista Flores "Don Williar": Que fuiste un ejemplo de tenacidad y trabajo, nos dejaste justo en el momento que yo iniciaba mi carrera, pero ese no fue impedimento para que este logro también sea tuyo.*

**A mi abuelita Teodora Pacheco: Por ser el pilar más fuerte de mi seno materno y enseñarnos con el ejemplo que el verdadero trabajo llega con creces y nunca olvidar de dónde venimos.*

**A mi tía, pero como si fuera una madre Isa Bautista: Gracias por estar conmigo desde mi nacimiento, los consejos, las palabras de aliento, el cariño, la confianza y el impulso para ser mejor cada día, este triunfo es tuyo también.*

**A mis primas Denise y Karen: Por su cariño incondicional les deseo lograr sus metas y gracias por estar en cada etapa desde que las vi nacer, son mis pequeñas hermanitas. Las quiero.*

**Al Dr Hugo Zacarías: Gracias por la ayuda que me otorgas día con día desde el momento en que tuve la fortuna de conocerte. Por ser un libro abierto para cada una de mis dudas al momento de ejercer mi profesión. Gracias por ser mi mentor, tu eres para mí el mayor de los ejemplos a seguir, he aprendido de ti una de las principales enseñanzas: el ser humilde, sencillo, responsable y sobre todo comprometido, no solo con mis clientes sino con cada paciente, porque ellos son los que nos brindan la mejor de las satisfacciones.*

Gracias por siempre estar ahí tanto en lo profesional como en lo personal, por cada muestra de afecto y amistad, por cada palabra de aliento y, ¿por qué no? por cada jalón de orejas. Gracias por darme la primera oportunidad para ejercer laboralmente, a ti aprendí el sentido de urgencia.

**A mis amigos y ahora colegas Lalito Barrón, Chava, Checo, Mario Morett, LD, Jess, Angie, Fernando Herrera, Alex, Iván, Marquito, Tony, Marlen, Juanpi, Alain, Cabañas, Chabela y Oscar, porque cada uno de ustedes hicieron posible que mi camino estuviera lleno de risas, aventuras, diversiones y experiencias, porque siempre han tenido una palabra de aliento para cuando la he necesitado. Por compartir su manera de aprender y enseñarme que la amistad está en las buenas, en las malas y a pesar de las diferencias, logramos hacer que embonaran a la perfección.*

**A mi entrañable amigo y mi hermanazo Francisco Reyes (Negro): Que siempre me acompañas en cada momento de alegría, felicidad y tristeza que se me ha presentado en mi vida, gracias por tantos años de amistad, por tantas aventuras vividas, cada vez más maduros, más divertidos, mas hermanos. Gracias por cada regaño y cada llamada de atención para terminar este proyecto.*

**A mi amigo y compañero Enrique Ordoñez: Porque sin duda me di cuenta que los amigos se cuentan con una sola mano, sin tu ayuda en la familia Nestlé Purina serían más difíciles los procesos, por el apoyo en todos los sentidos, por tus experiencias compartidas en el ámbito laboral, tus palabras de aliento, por ser un ejemplo de coraje, pasión y disciplina y que a pesar de los grandes obstáculos que nos presenta la vida a todos, tienen solución.*

A Gaby Constantino (Babi): Gracias por permitirme entrar en tu vida y en la mejor etapa de la mía, por tu amor, tu apoyo y tu compañía, porque sin buscar llegaste cuando menos lo esperaba. Gracias por ser tu misma a cada momento, porque no se necesitan años para saber quién es tu naranja completa, por demostrarme que sí se puede y me diste el ejemplo, este logro es tuyo "tamééén".

A mis primeras ACD, Marchelina y Mia: Ustedes qué, aunque ya no están conmigo, marcaron mi estancia en la licenciatura, fueran y serán mis ganaderos australianos consentidas, mis momentos de soledad y de alegrías siempre estuvieron ustedes, y por ustedes comienzo un hoobie más.

El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas...

ÍNDICE

Índice	I
Resumen	II
1.Introducción	1
2.Marco Teórico	3
2. 1. Anatomía del aparato reproductor del macho porcino	3
2. 1. 1. Testículos	3
2. 1. 2. Epidídimo	5
2. 1. 3. Uretra	6
2. 1. 4. Pene	6
2. 1. 5. Prepucio	7
2. 1. 6. Glándulas accesorias	7
2. 1. 6. 1. Vesículas seminales	7
2. 1. 6. 2. Glándulas bulbouretrales	8
2. 1. 6. 3. Próstata	8
2. 1. 7. Erección y Protrusión	9
2. 1. 8. Emisión y eyaculación	9
2. 2. Gametogénesis	10
2. 2. 1. Espermatogénesis	10
2. 2. 2. Espermatocitogénesis	10
2. 2. 3. Espermioogénesis	11
2. 2. 4. Espermiaación	11
2. 3. Colección del semen porcino	11
2. 4. Características del semen porcino	12
2. 5. Factores que afectan la capacidad reproductiva del macho	13
2. 5. 1. Edad	13
2. 5. 2. Frecuencia de eyaculación	13
2. 5. 3. Genética	14
2. 5. 4. Temperatura ambiental	14
2. 5. 5. Nutrición	14
2. 5. 6. Estado sanitario	15
2. .6. Evaluación de las características del semen porcino	15
2. 6. 1. Evaluación macroscópica	16
2. 6. 1. 1. Volumen	16
2. 6. 1. 2. Temperatura	16
2. 6. 1. 3. Color	16
2. 6. 1. 4. Olor	16
2. 6. 1. 5. pH	17
2. 6. 2. Evaluación microscópica	17
2. 6. 2. 1. Motilidad	17
2. 6. 2. 2. Concentración espermática	18

2. 6. 2. 3. Morfología espermática -----	19
2. 6. 3. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática -----	19
2. 6. 3. 1. Tinción con Eosina/ Nigrosina -----	20
2. 6. 3. 2 Prueba de hinchamiento hiposmótico (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST) -----	20
2. 6. 3. 3. Tinciones fluorescentes -----	20
2. 6. 3. 3. 1. Tinción SYBR14 / Ioduro de Propidio (IP) -----	21
2. 6. 4. Evaluación de la integridad del acrosoma -----	21
2. 7. El espermatozoide -----	22
2. 8. Morfología del espermatozoide -----	23
2. 9. El espermatozoide porcino -----	23
2. 10. Membrana plasmática del espermatozoide -----	24
2. 10. 1 Estructura y composición -----	24
2. 11. Crio-conservación de semen -----	25
2. 11. 1. Antecedentes de la crio-conservación -----	25
2. 11. 2. Principios básicos de la crio-conservación -----	26
2. 11. 3. Enfriamiento -----	27
2. 11. 4. Daños causados por la crio-conservación -----	28
2. 11. 5. Diluyentes -----	28
2. 12 Métodos de preparación y separación espermática -----	30
2. 12. 1. Revisión bibliográfica -----	30
2. 12. 2. Técnicas de separación de espermatozoides -----	31
2. 12. 2. 1. Método de dilución y lavado de semen -----	32
2. 12. 2. 2. Métodos de centrifugación por gradientes de densidad -----	32
2. 12. 2. 3. Métodos de adherencia y filtración -----	33
2. 12. 2. 4. Método de migración: Swim- Up -----	34
2. 13. Enfriado pre-congelación a temperaturas bajo cero -----	36
3. Justificación -----	37
4. Objetivos -----	38
5. Material y Métodos -----	39
6. Diseño experimental -----	43
7. Resultados -----	48
8. Discusión -----	52
9. Conclusiones -----	53
10. Literatura citada -----	54

Anexos

Anexo 1.- Técnica de “mano enguantada”-----	59
Anexo 2.- DABCO-----	60
Anexo 3.- Medio Tyrodes-----	61
Anexo 4.- Preparación de Medio TALP.-----	62
Anexo 5.- Preparación de medio BTS.-----	63

RESUMEN

En la industria porcina el uso de semen congelado ha sido limitado en comparación con el de otros mamíferos domésticos, y esto principalmente radica en la baja fertilidad de este después de su proceso. Por esto, además de que es necesario mejorar los protocolos de crío conservación es importante seleccionar y separar los espermatozoides viables para su utilización en diferentes áreas de la reproducción asistida; los métodos de selección de espermatozoides se suelen considerar para los programas de fertilización in vitro (FIV) para lograr una población de espermatozoides viables, móviles y morfológicamente normales. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficiencia de dos variantes de la técnica de separación espermática Swim-Up en semen de cerdo fresco y descongelado. Para este trabajo se utilizaron 17 eyaculados en total, cada eyaculado se diluyó (1:1 v/v) en un medio de transporte comercial (Androstar Plus) para llevarlo al laboratorio 2 de la UIM de la FESC. La primera etapa consistió en comparar diferentes tiempos de incubación para la realización de la técnica de separación espermática en semen fresco de cerdo, el cual una vez llegado al laboratorio era atemperado y posteriormente evaluado macroscópicamente, se realizó una dilución 1:10 en medio BTS y se realizó la evaluación microscópica, el semen fue centrifugado a 500 g/5 min. para retirar el plasma y medio de transporte el cual después se re suspendió en medio BTS hasta llegar a 2 ml, se tomó una décima parte ajustando su concentración a 100×10^6 espermatozoide/mililitro. En esta etapa se llevaron tres fases experimentales: en el primer experimento se tomaron 2 ml. de semen en medio BTS + 500 μ l de medio TALP y se incubó durante 30 y 60 min., en el segundo se tomó 1 ml. de semen en BTS + 1 ml. de medio TALP alternamente se utilizó otro tubo con las mismas características sin embargo este fue sometido a centrifugación 500g/5 min. con la intención de formar un pellet ambos fueron incubados durante 15, 30, 45 y 60 min., en el último experimento se centrifugaron 2 tubos de 10 ml. de semen fresco a 500g/10 min. logrando formar un pellet, en uno de ellos se agregó 500 μ l de medio TALP (Tyrodes+Albumina+Piruvato) y el otro se ajustó a 100×10^6 espermatozoide/mililitro, ambos fueron incubados a 45 min. La segunda etapa consistió en enfriar los espermatozoides a dos temperaturas pre-congelación y evaluar su crío-supervivencia, en esta etapa es donde después de una centrifugación a 600g/10 min. el semen es agregado al diluyente Lactosa-Yema de Huevo sin glicerol con una concentración de 1200×10^6 células/mililitro. para ser refrigerado una vez alcanzado la temperatura de entre 5 y 7°C se agrega el nuevamente el diluyente de Lactosa-Yema de Huevo ahora con 6% de Glicerol entre tiempos para de esta manera obtener una concentración de 600×10^6 células/mililitro en un volumen de 14 ml y 3% de Glicerol. Posteriormente se envasaron los espermatozoides en pajillas de plástico de 0.5 ml agrupándolas por tratamientos, el tratamiento 1, pajillas enfriadas a 5°C fueron expuestas a vapores de nitrógeno durante 15 min. mientras que el tratamiento 2, pajillas colocadas en un recipiente de hielo salino hasta alcanzar -5°C, una vez alcanzada la temperatura de igual manera se expusieron a vapores de nitrógeno 15 min. ambos tratamientos se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron durante 4 semanas. La tercera etapa consistió en la aplicación de la técnica de separación espermática sobre los espermatozoides descongelados, las pajillas fueron descongeladas en baño maría y se evaluaron para posteriormente ser colocadas en tubos de ensaye (2 por cada tubo) logrando obtener 1200×10^6 células/mililitro en 2 ml., se centrifugaron dos tubos a 500g/5 min. se retiró el sobrenadante de los tubos se formó un "pool" y se agregaron 500 μ l de medio TALP, con los otros dos tubos también se formó una alícuota sin ser centrifugados, todos los tubos fueron incubados durante 30 y 45 min., una vez terminando el tiempo se obtuvieron 250 μ l de las superficies y se evaluó la motilidad progresiva, viabilidad, concentración, viabilidad con tinción SyBR14/PI y la integridad del acrosoma. Los resultados de la crío supervivencia de los espermatozoides previo a la separación con la técnica Swim-up no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de enfriado pre congelación (+5, -5°C) para ninguna de las variables evaluadas; así mismo, no hubo diferencias entre métodos de Swim-up ni entre tiempos de incubación. En conclusión, el enfriado lento previo a la congelación no mejoró la supervivencia de los espermatozoides, sin embargo, en el semen fresco fue donde se observó de manera más notable el efecto de la separación con Swim-up, se considera que la centrifugación de forma repetida puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS), y en consecuencia un daño de la función de los espermatozoides, por lo tanto en las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, la separación espermática mediante dos variantes del método Swim-up no mejoró de manera notable la calidad de los espermatozoides en el semen fresco, y no tuvo ningún efecto en el semen descongelado.

Palabras clave: Swim-Up, cerdo, selección, crío-conservación

ABSTRACT

In the pig industry the use of frozen semen has been limited compared with other domestic and large mammals, and this mainly lies in the low fertility after this process. Therefore, in addition to the need to improve cryo protocols conservation is important to select and separate the viable spermatozoa waited for use in different areas of assisted reproduction; selection methods sperm are usually considered for programs in vitro fertilization (IVF) to achieve a population of viable, mobile and normal spermatozoa. The aim of this study was to compare the efficiency of two variants of sperm separation technique Swim-Up fresh semen and thawed sperm. For this work 17 ejaculates were used to such, each ejaculate was diluted (1:1 v/v) in commercial transportation means (Androstar Plus) for transport to the laboratory UIM FESC. The first step was to compare different incubation times for the realization of the technique in sperm separation fresh pig semen, which once reached the laboratory was subsequently tempered and evaluated macroscopically, a 1:10 dilution was performed in half BTS and microscopic evaluation was performed, semen was centrifuged at 500 g / 5 min. to remove plasma and means of transport which is then re-suspended in half BTS up to 2 ml, one-tenth was taken adjusting its concentration to 100×10^6 sperm / ml. At this stage three experimental phases were taken: in the first experiment 2 ml were taken. of semen in BTS medium + 500 μ l of TALP medium and incubated for 30 and 60 min, in the second 1 ml was taken. of semen in BTS + 1 ml. TALP medium alternatingly another tube with the same characteristics but this was subjected to centrifugation 500g / 5 min was used. with the intention of forming a pellet both were incubated for 15, 30, 45 and 60 min. , in the latter experiment, 2 10 ml tubes were centrifuged. of fresh semen at 500g / 10 min. making it into a pellet, one of them was added 500 μ l of TALP and the other was set to 100×10^6 sperm / ml., were incubated at both 45 min. The second stage was cooled sperm two pre-freezing temperatures and evaluating their cryo-survival at this stage is where after 600g centrifugation / 10 min. semen is added to the diluent Lactose-Egg Yolk without glycerol with a concentration of 1200×10^6 sperm / ml. for reference radio once the temperature of 5 reached 7 ° C is added Diluent Lactose-Egg Yolk now again with 6% Glycerol enter times to thereby obtain a concentration of 600×10^6 sperm / ml. a volume of 3 ml of 14% glycerol. Subsequently sperm were packaged in plastic straws 0.5 ml grouped by treatment, treatment 1, straws cooled to 5 ° C were exposed to vapors of nitrogen for 15 min. while treatment 2 straws placed in a container of salt ice until reaching -5 ° C, once reached the temperature in the same manner were exposed to nitrogen vapors 15 min. both treatments were immersed in liquid nitrogen and maintained for 4 weeks. The third stage involved the application of the technique of sperm separation on the thawed sperm straws were defrosted in a water bath and were evaluated to be subsequently placed in test tubes (2 per tube) managing to obtain 1200×10^6 sperm / ml. in 2 ml., two tubes were centrifuged at 500g / 5min. the supernatant was removed from the tubes a pool was formed and 500 μ l of TALP medium was added, with the other two tubes also forming an aliquot without being centrifuged, all tubes were incubated for 30 and 45 min, once ending time 250 .mu.l of the surfaces were obtained and progressive motility, viability, concentration, viability staining SyBR14 / IP and acrosome integrity were evaluated. The results of cryo survival before separation technique with Swim-up sperm were no significant differences ($P < 0.05$) between treatments freezing pre-cooled (+5, -5 ° C) for any of the variables measured; likewise, there was no difference between methods Swim-up or between incubation times. In conclusion, prior to freezing slow cooling not improve survival of sperm, however, fresh semen was where it was observed most notably the effect of separation with Swim-up, it is considered that centrifugation repeatedly can produce reactive oxygen species (ROS), and consequently an impairment of the function of sperm, thus by the conditions under which was carried out this work, sperm separation intermediate two variants of the method Swim-up did not improve significantly the quality of sperm in fresh semen, and had no effect on the thawed semen.

Keywords: Swim-Up, pig, selection, cryo-conservation

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 35 años la inseminación artificial ha tenido un gran impacto y éxito en Estados Unidos y Europa, ya que mediante el uso de diluyentes el semen fresco (utilizado el mismo día o conservados a 15-20 °C durante 1 a 5 días) así como, el congelado, se han podido preservar logrando con ello mejorar la base genética de diversas pjaras en el mundo o bien, de una en particular (Johnson *et al.*, 2000).

Los primeros intentos de inseminación artificial (IA) en cerdos datan de los años 1926 y 1927 por Ivanov, y que se continuó por Milovanov en los años 1930 y 1936; este último propuso los diluyentes (glucosa-sulfato y glucosa-tartrato) en los años de 1931-1933. Desde estos primeros estudios sobre el almacenamiento de espermatozoides se ha entendido que solo una porción de la muestra de semen fresco sobrevive a la preservación de cualquier tipo (Johnson *et al.*, 2000). Así mismo, a medida que la temperatura va disminuyendo existe inevitablemente una reducción de la proporción de espermatozoides que mantienen la integridad de la membrana normal, además de la estructura y componentes bioquímicos (Watson, 1995).

En la última década ha habido un gran desarrollo en el campo de la reproducción porcina mediante técnicas de gestión y control reproductivo, que han ido ligadas a la inseminación artificial (Levis, 2000), esto ha permitido maximizar la utilización del potencial genético de reproductores de alto valor siendo una herramienta fundamental para elevar las tasas de crecimiento, calidad de la canal, mejoramiento reproductivo, cerdos más saludables con la propiedad de resistir enfermedades, mejorando en general la eficiencia en la producción porcina (Gerrits *et. al.*, 2005).

Sin embargo, el 90% de las inseminaciones se realizan con semen diluido en fresco, debido a que la crio conservación presenta algunas desventajas por lo que en granjas porcinas no es una práctica común.

Así mismo, sabemos que las dosis de espermatozoides utilizadas para realizar la inseminación artificial afectan la tasa de fertilidad y más cuando se tratan de espermatozoides crio conservados, ya que se tiene que utilizar de 2 a 3 veces la dosis de espermatozoides (3×10^9) habiendo una reducción en el índice de partos y reducción a la camada de 1 a 3 lechones. La fertilidad del semen congelado - descongelado da una tasa de partos del 50% con siete lechones por camada (Gerrits *et. al.*, 2005).

Existen varias investigaciones que hablan sobre el tema de la calidad espermática en diferentes especies, incluyendo numerosas críticas sobre los deméritos de diversas técnicas de selección de espermatozoides utilizadas para mejorar precisamente su calidad en la preparación de los mismos, tanto en humanos como en animales para la reproducción asistida (Morell *et al.*, 2009); de igual manera varios métodos han sido propuestos para separar estas células del resto del eyaculado e incluso para seleccionar subpoblaciones de espermatozoides de mejor calidad proporcionando una barrera física al paso de anormalidades.

La preparación de espermatozoides es un requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida, incluyendo por supuesto la inseminación artificial, donde se busca eliminar todas aquellas sustancias inhibitoras de la capacitación, prostaglandinas, patógenos y proteínas antigénicas; de igual manera separar los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los leucocitos y de células germinales inmaduras (Holt *et al.*, 2010).

La finalidad de este proceso es seleccionar los espermatozoides móviles y morfológicamente normales para mejorar la calidad de los mismos; de esta manera se disminuye la liberación de linfocinas y se reduce la formación de radicales libres (Ombelet *et al.*, 2013).

Debido a que existen diferentes opiniones sobre el concepto de calidad del semen y las diferencias entre especies, esto en relación a los parámetros individuales, se considera que en términos generales el número de espermatozoides, la motilidad y la normalidad morfológica determinan su calidad (Colenbrander *et al.*, 2003).

En muchas ocasiones, estas técnicas se llevan a cabo con semen fresco, semen refrigerado y semen congelado, pero se sabe que la mayoría de los espermatozoides se dañan durante el proceso de congelación y descongelación. Este proceso es perjudicial para las membranas de los espermatozoides pues afecta su organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica, lo que ocasiona bajos porcentajes de movilidad y daños en sus estructuras membranales.

Existen algunas investigaciones que demuestran la existencia de subpoblaciones espermáticas en eyaculados frescos y conservados en algunos mamíferos. Estas subpoblaciones han sido definidas de acuerdo a patrones específicos de movimiento espermático, observándose en especies como el mono tití, gacela, cerdo y el perro (Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999, 2001; Rigau *et al.*, 2001; Thurston *et al.*, 2001). La existencia de este patrón en los mamíferos estudiados, a pesar de sus diversos orígenes filogenéticos, sugieren la existencia de alguna relación entre los cambios de estructura subpoblacional de una muestra seminal y su capacidad fecundante. El cerdo es la especie en la cual se ha profundizado más en esa línea de investigación, habiéndose determinado una estructura dividida en subpoblaciones espermáticas, ya sea por su motilidad o por su morfometría (Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2001).

Se ha reportado que la velocidad espermática y la longitud del flagelo, influyen sobre la competencia entre los espermatozoides y selección sexual obteniendo con ello la supervivencia del mejor adaptado, sugiriendo que la forma espermática puede optimizarse para una máxima eficiencia utilizando técnicas de separación espermática como el llamado “swim-up” (Holt *et al.*, 2010).

Existen cuatro métodos básicos para separar espermatozoides móviles y viables: 1) dilución y lavado mediante centrifugación y re-suspensión de los espermatozoides; 2) migración espermática como el procedimiento de swim-up; 3) lavado selectivo de subpoblaciones a través de centrifugación de gradientes de densidad, como el Percoll; 4) empleo de sustancias adhesivas para eliminar espermatozoides muertos, como filtración con fibra de vidrio o Sephadex (Sieme *et al.*, 2003).

En humanos se han empleado las técnicas de separación espermática en semen fresco, para incrementar la movilidad, viabilidad y morfología normal de los espermatozoides (Sills *et al.*, 2002; Trentalance *et al.*, 2002); en equinos para obtener una mejor calidad seminal en semen refrigerado y crio-conservado (Sieme *et al.*, 2003); en caprinos se ha usado en semen descongelado para comparar el Percoll con un gradiente específico de la especie (Batista *et al.*, 2001); en ovinos se han aplicado en semen fresco (Martí *et al.*, 2006). En cerdos se ha utilizado para recuperar espermatozoides de buena calidad de eyaculados provenientes de machos subfértiles (Bussalleu *et al.*, 2008). Realmente existen pocos datos concernientes a la efectividad de métodos de separación en semen descongelado de porcino.

La aplicación de técnicas para la separación de espermatozoides, sirve en gran medida para su evaluación ya que es de suma importancia saber si las células que se están evaluando en realidad están vivas, y más si los cambios observados en la función o la estructura espermática no están relacionados con la muerte celular; es por esto que este trabajo se basó en la evaluación de subpoblaciones viables de espermatozoides de semen fresco y crio-conservados posterior a la técnica de swim-up.

2. MARCO TEÓRICO

2. 1. Anatomía del aparato reproductor del macho porcino

2. 1. 1. Testículos

Los testículos son los órganos sexuales primarios que tienen como funciones principales la producción de espermatozoides y la producción de hormonas esteroideas. Ambas funciones son reguladas por una interrelación entre el hipotálamo, hipófisis y las gónadas. Macroscópicamente se diferencian dos estructuras: túnica albugínea o túnica vaginal propia, la cual está recubriendo la gónada y el parénquima testicular en el que se encuentran los túbulos seminíferos. La túnica albugínea es una membrana fibrosa que sirve como sostén del parénquima testicular el cual aloja a los túbulos seminíferos en donde las espermatogonias sufren cambios hasta transformarse en espermatozoides; éstos una vez que se producen pasan a los conductos eferentes, los cuales llevan esperma al epidídimo (Galina, 2008).

La posición de los testículos en el escroto y la dirección de su eje longitudinal en relación con el cuerpo, varía con las especies. En el caso de los porcinos el eje se encuentra diagonal. El escroto además de proteger al testículo, ayuda por medio de su túnica Dartos, junto con el músculo cremaster y la disposición anatómica de la vena espermática a mantener una temperatura adecuada para la espermatogénesis (Galina, 2008).

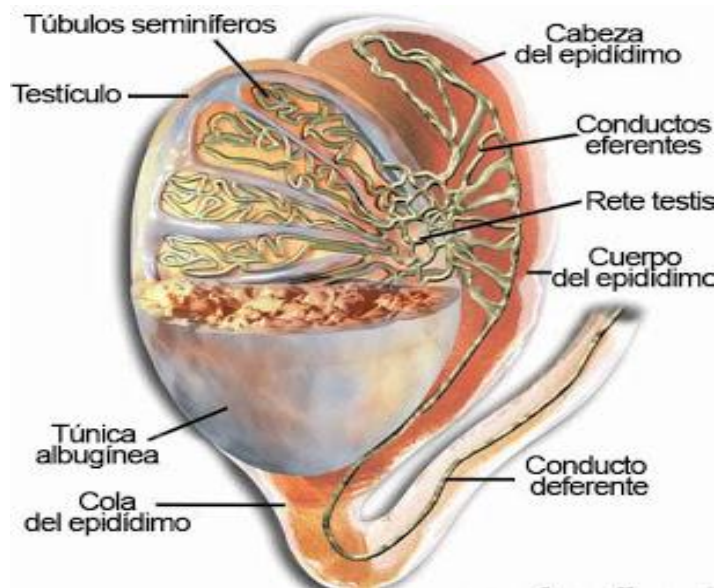


Figura 1. Corte esquemático del testículo de cerdo

El descenso testicular comienza en torno a los 77 y 109 días de vida fetal; alrededor de los 90 días se inicia la regresión de la porción extra abdominal del gubernaculum, creando espacio para el testículo externamente al canal inguinal. Durante varios días antes del final de la gestación, el testículo puede deslizarse hacia atrás y hacia delante por el canal (Dolf, 2008).

Los testículos son órganos elipsoideos de gran tamaño localizados en la región inguinal dorsalmente con la región anal, ventralmente con la región perianal y lateralmente con la región glútea y músculos semimembranosos; su eje longitudinal es vertical; en cerdos adultos miden de 10 a 15 cm de largo, y de 5 a 8 cm de ancho, y cada uno llega a pesar 450 gr (Hafez, 2002).

Cuando el descenso testicular no se completa, quedando uno o ambos testículos retenidos a nivel inguinal o abdominal, se desarrolla una patología llamada criptorquidia, situación muy frecuente en las granjas porcinas (Heyns, 1985).

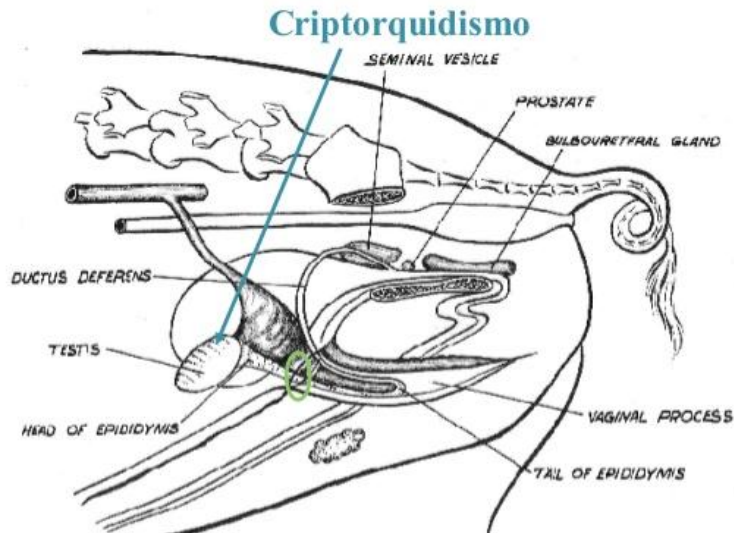


Figura 2. Topografía de los órganos genitales de un cerdo criptorquideo

El tamaño de los testículos es un rasgo importante de heredabilidad alta a media que nos da una estimación bastante exacta de la cantidad del parénquima productor de espermatozoides que hay en su interior, debido a la influencia del tamaño, existe un amplio intervalo de producción diaria de espermatozoides entre las distintas especies domésticas, sin dejar a un lado los diversos factores que esto conlleva (Bradley, 2014).

Cuadro 1. Variabilidad espermática entre especies

Es importante mencionar que también existe gran variabilidad dentro de la misma especie, así como, entre razas, el individuo determina el tamaño de los testículos y por tanto influyen sobre la

ANIMAL	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACION SEMEN (10 ⁹ /ml)	TOTAL DE ESPERMAS (10 ⁹)	MOTILIDAD ESPERMAS %	MORFOLOGIA NORMAL %	EYACULACIONES/ SEMANA
TORO	5.0	1.1	5.5	67	80	4
CARNERO	1.0	3.0	3.0	75	90	20
VERRACO	225	0.2	45	60	60	3
GALLO	1.0	3.5	1.8	85	90	3
CHIVO	0.8	2.4	2.0	80	90	20
PAVO	0.5	7.0	3.5	60	85	3
POTRO	60	0.15	9.0	70	70	3
CONEJO	0.6	0.7	0.03	80	80	6
PERRO	0.5	0.3	1.5	85	80	3
GATO	0.05	1.5	0.1	75	90	-

producción espermática diaria. El tamaño de los testículos tiene que ver con la especie y la raza, pero también con la edad y el índice del estado corporal, por lo tanto, los machos con testículos más grandes producirán en teoría más espermatozoides en comparación con los que los tienen más pequeños (Bradley, 2014).

2. 1. 2. Epidídimo

Es un conducto largo, tortuoso y enrollado, que presenta longitud variable dependiendo de la especie, en el caso del cerdo de 54 m (Hafez, 2002). Los espermatozoides pueden estar almacenados en este conducto unos 10-15 días.

Anatómicamente podemos dividirlo en tres porciones (Allen, 1992):

Cabeza: Se encuentra ubicada en el polo ventral y cumple funciones de reabsorción de fluido testicular

Cuerpo: Corre paralelo al eje mayor del testículo y se produce la maduración espermática

Cola: se localiza en el polo dorsal del testículo y cumple funciones de almacenamiento

Los espermatozoides son transportados a través del epidídimo durante casi 10.2 días y el tiempo de tránsito puede reducirse de 10 al 20 % al aumentar la frecuencia de eyaculados; la maduración de los espermatozoides ocurre durante el tránsito por el epidídimo. El ambiente de las células espermáticas en la cola del epidídimo proporciona factores que favorecen la capacidad fecundante ya que cuando se encuentran en esta región tiene mayor fecundidad que los del cuerpo epididimario.

Los espermatozoides almacenados en el epidídimo conservan capacidad fecundante por varias semanas: la cola de esta estructura es el principal órgano de almacenamiento, contiene alrededor del 75% de las células espermáticas. La capacidad especial de la cola depende de las temperaturas relativamente bajas del escroto y de la acción de la hormona sexual del macho (Hafez, 2002). La cola se continúa con el conducto deferente, la cual regresa por el cuerpo del mismo hasta la región de la cabeza, integrándose al cordón espermático que contiene la arteria y la vena espermática,

integrando así al cordón espermático que contiene la arteria y la vena espermática, el musculo cremáster, nervios y vasos linfáticos (Martínez *et al.*, 2011).

2.1.3 Uretra

Este órgano tiene una doble función: transportar la orina de la vejiga y el semen del conducto deferente durante la eyaculación. Este conducto se divide en dos porciones:

Uretra pélvica: Comprende desde su origen en la vejiga, hasta el lugar donde desembocan los conductos deferentes, los conductos eyaculadores de las vesículas seminales y algunos conductos prostáticos

Uretra peneana: Está ubicada en la porción ventral del cuerpo del pene y termina en meato urinario sobre la porción libre del mismo

Aparato genital del verraco

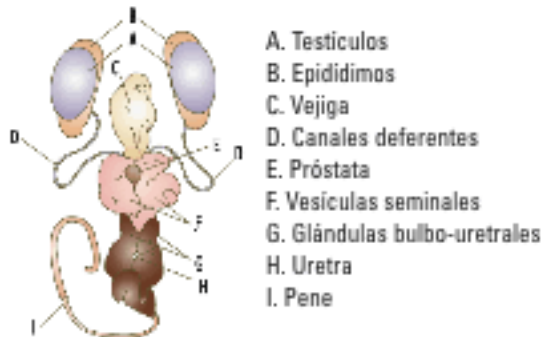


Figura 3.

2.1.4 Pene

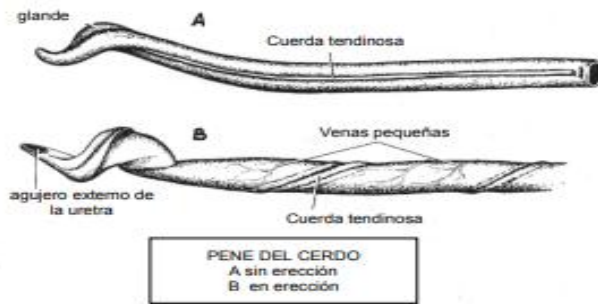
El pene es fibroelástico y se caracteriza porque el tejido eréctil está asociado con grandes cantidades de tejido conjuntivo. Este órgano se divide en tres partes:

Raíz del pene: Se localiza cerca del músculo bulbocavernoso y se considera la porción fija del mismo.

Cuerpo del pene: Está constituido por el cuerpo cavernoso y los músculos retractor del pene y bulbocavernoso, por donde pasa la porción peneana de la uretra.

Glándula del pene: Es el extremo del pene, y corresponde a la porción libre de éste; es de forma de espiral y está rodeado por el prepucio.

Durante la erección alcanza una longitud de 45 a 50 centímetros.



2. 1. 5 Prepucio

El forro prepucial es una prolongación de piel que conforma una cavidad larga que aloja al pene; cuenta con numerosos ganglios linfáticos en la pared dorsal, sobre su porción ancha; existe una apertura de manera circular donde conduce al fondo del saco conocido como, divertículo prepucial, de forma ovoide y parcialmente dividido por un tabique estrecho, en él se acumulan orina y detritos epiteliales.

2. 1. 6 Glándulas accesorias

Son las que proporcionan la mayor parte del plasma seminal que contienen abundantes carbohidratos, proteínas y aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles, minerales y una capacidad tampón alta, siendo este plasma esencial para mantener la vitalidad de un espermatozoide.

2. 1. 6. 1 Vesículas seminales

Son glándulas pares de tipo tubuloalveolar compuesto, formadas por epitelio glandular de tipo pseudoestratificado cilíndrico; miden aproximadamente 15 cm de longitud y 7 cm de diámetro, pesando aproximadamente 200 gr.

En el caso del cerdo las dos vesículas poseen una cápsula común, una capa muscular delgada y células epiteliales que junto con la lámina propia forman vellosidades que se proyectan al lumen; tienen una localización dorsal en relación a la vejiga y suelen compartir con el conducto deferente con un conducto eyaculatorio común que se abre en la uretra (Hafez, 2002).

La secreción de estas vesículas es el líquido seminal; en el cerdo corresponde del 10 al 30 % del volumen total del eyaculado; contenido principalmente por fructosa, potasio, bicarbonato, fosfatos ácidos solubles, prostaglandinas y proteínas; además de contener Inositol, donde éste ayuda a mantener la presión osmótica del fluido (Martínez et al., 2011).

Dentro de las principales funciones del líquido seminal se encuentran:

La modificación del pH ácido vaginal

Proporcionar fructosa como fuente de energía a los espermatozoides

Estimular al musculo liso del tracto reproductor femenino

Proporcionar protección al espermatozoos contra células de defensa (macrófagos)

2. 1. 6. 2 Glándulas bulbouretrales

Llamadas también como Glándulas de Cowper, son glándulas pares que se encuentran dorsolateralmente a la uretra, cercana a la porción pélvica. Cada glándula consta de una longitud de 16 cm de largo, 3 cm de diámetro, con un peso de 85 gr, aproximadamente (Martínez *et al.*, 2011).

Se encuentran rodeadas por musculo estriado esquelético, correspondiente del músculo bulbo-cavernoso uretral, el conducto de estas glándulas se abre directamente en la depresión uretral.

La secreción de tipo mucoso y sirve para limpiar y lubricar la uretra. En el cerdo, esta secreción es parte del eyaculado lo que ayuda a la formación de un tapón en el cérvix lo que impide la perdida de espermatozoides por reflujo, conocida también como *tapioca*.

2. 1. 6. 3 Próstata

Esta glándula se localiza a lo largo de la superficie dorsal y lateral de la uretra, cubierta parcialmente por las vesículas seminales. El parénquima está formado por glándulas de tipo túbulo-alveolar compuesto, cuyas unidades secretoras se vacían mediante conductos que llegan a la luz uretral; el cuerpo mide de 2.5 a 3 cm de ancho por uno de diámetro, y una porción diseminada grande con respecto a otras especies. (Martínez *et al.*, 2011).

La secreción prostática es de tipo serosa conteniendo sustancias orgánicas e inorgánicas, ésta se produce antes y durante la eyaculación, es la encargada de limpiar y lubricar de igual manera la uretra; además esta secreción es lo que le da volumen al eyaculado, aumenta la motilidad espermática y contribuye junto a las glándulas de Cowper en parte a la formación del tapón vaginal.

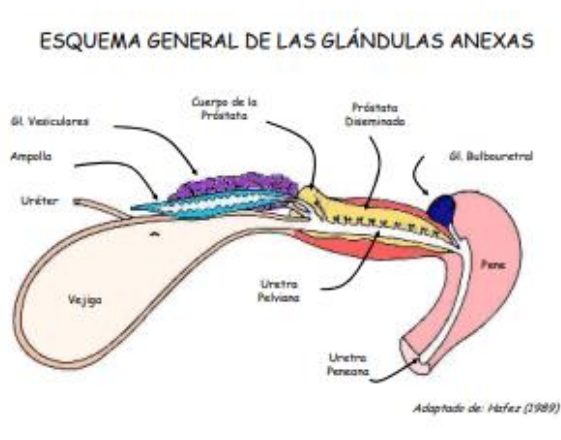


Figura 4. Esquema de glándulas anexas

2. 1. 7 Erección y protrusión

La estimulación sexual produce dilatación de las arterias que irrigan los cuerpos cavernosos del pene, especialmente las raíces. El pene del cerdo al ser de tipo fibroelástico crece poco durante la erección, así mismo, la protrusión o salida, tiene lugar gracias al estiramiento de la flexura sigmoidea, que permite que más que erección sea un alargamiento, cabe mencionar que el ascenso de la presión en el cuerpo cavernoso del pene es lo que produce su alargamiento también (Hafez, 2002).

En el verraco, aproximadamente los 5 cm. terminales del pene tiene forma de espiral, y durante la erección toda la longitud visible de su extremo libre se enrosca; la penetración dura hasta 7 minutos, tiempo en el cual eyacula un gran volumen de semen.

Tabla 2. Parámetros reproductivos del macho

Parámetros	Valor medio
Volumen de semen eyaculado	200ml
Concentración de semen	300x10 ⁶ espermatozoides/ml
Dosis mínima para la IA	2x10 ⁹ espermatozoides/ml
No. máximo de dosis para la IA	300 000 000/20 000 000=15 dosis

Producción animal y veterinaria. Manuel Sánchez Rodríguez

2. 1. 8 Emisión y eyaculación

La emisión consiste en el paso del líquido espermático a lo largo del conducto deferente hacia la uretra pélvica donde se mezcla con secreciones de las glándulas accesorias, este evento es realizado por los músculos lisos, bajo el control del sistema nervioso autónomo; la eyaculación consta del paso del semen resultante por la uretra peneana, y ésta es realizada por terminaciones nerviosas del integumento peneano y los tejidos sensoriales más profundos (Hafez, 2002).

La excitación sexual y eyaculación se acompañan de contracciones de la cola del epidídimo y el conducto deferente, lo cual aumenta la tasa de flujo, así mismo, la contracción muscular de la pared del conducto es controlada por nervios autónomos simpáticos del plexo pélvico provenientes de los nervios hipogástricos.

Durante la eyaculación, el musculo bulboesponjoso comprime el bulbo peneano, de modo que bombea sangre desde éste hacia el resto del cuerpo esponjoso; las ondas de presión que pasan por la uretra peneana ayudan a transportar el semen que se eyacula. (Hafez, 2002).

2. 2 Gametogénesis

2. 2. 1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico de transformación celular donde se producen las células germinales masculinas de tipo haploide a partir de células madre diploides; llamadas espermatogonias. Este proceso ha sido morfológicamente simplificado mediante asociaciones celulares o llamadas fases de espermatogénesis, que progresan mediante ciclos organizados en un tiempo preciso. Estos ciclos son esenciales para la continuación de la producción espermática que dependerá de diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos, además de ser diferentes entre las especies (Hess y França, 2005).

Un ciclo completo dependiente del tiempo de las etapas, es llamado ciclo del epitelio seminífero y se define como una serie de cambios en una área determinada de epitelio seminífero entre dos apariciones de la asociación celular o entre dos etapas del desarrollo (Hafez, 2002); el tiempo para completar un ciclo del epitelio seminífero descrito para la especie porcina es de los 8.6 días, donde se requieren hasta cuatro ciclos epiteliales antes de que las espermatogonias tipo A del primer ciclo haya completado la metamorfosis de la espermatogénesis; es decir 34.4 días la duración total de este proceso (Hafez, 2002).

Las espermatogonias, se dividen varias veces antes de formar espermatocitos; después, éstos experimentan una meiosis que reduce su contenido de DNA a la mitad del que tienen las células somáticas. Estas divisiones celulares, incluyendo la proliferación de las espermatogonias y las divisiones meióticas, se conoce como espermatocitogénesis. Las células haploides resultantes de este proceso son las espermátides, las cuales sufren una serie de cambios estructurales y de desarrollo para formar los espermatozoides; estos cambios metamórficos constituyen a la espermiogénesis. Todas las células germinales del desarrollo están estrechamente relacionadas con las células de Sertoli las cuales las rodean durante el desarrollo (Hafez, 2000).

2. 2. 2 Espermatocitogénesis

Consiste en la primera etapa de espermatogénesis, donde después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho las espermatogonias (tipo AO) se someten a una serie de divisiones rápidas y progresivas por mitosis; dando origen a espermatogonias tipo A1, A2, A3 y A4, células intermedias y tipo B, éstas a su vez forman espermatocitos primarios, todas ellas representando estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia (Galina, 2008).

En el espermatocito primario el material genético es recombinado y segregado por medio de la primera división meiótica para dar origen a los espermatocitos secundarios, esta es una fase prolongada donde ocurren cambios en el material genético de los pares de cromosomas donde, no solo se realiza la reducción en el número de cromosomas sino también la separación de cromosomas sexuales X y Y; los espermatocitos secundarios resultantes se dividen una vez más para formar células haploides conocidas como espermátides.

2. 2. 3 Espermiogénesis

Esta última fase, consiste en la transformación de las espermátidas redondas a espermatozoides maduros, donde pasa por una serie de cambios morfológicos, dentro de estos cambios sucede la condensación de la cromatina nuclear, la formación del aparato flagelar y el desarrollo del casquete acrosómico (Hafez, 2002); la transformación de espermátides se dividen en cuatro fases:

Fase de Golgi: Se caracteriza por la condensación de la cromatina, el aparato de Golgi se coloca invertida a la cara *trans* orientada al núcleo, se forma la vesícula acrosómica con el gránulo acrosómico adentro, se deforma la membrana nuclear que formara la foseta de implantación, donde migraran los centriolos.

Fase de encasquetamiento: Comienza la formación del flagelo, el gránulo acrosómico se adhiere a la superficie del núcleo de la espermátide, se alarga hasta cubrir con un saco membranoso a la envoltura nuclear.

Fase acrosómica: Caracterizada por cambios en los núcleos, los acrosomas y las colas, estos cambios se facilitan por la rotación de la espermátide, es decir, el acrosoma hacia la base del túbulo seminífero y la cola se dirige hacia la luz, existe desplazamiento del citoplasma hacia la parte caudal para envolver la cola, las mitocondrias se centran hasta el axonema y forman la vaina del segmento medio.

Fase de maduración: Esta fase de la espermiogénesis comprende la transformación final de la espermátide alargada en espermatozoides liberados en la luz del túbulo seminífero, durante esta última etapa la mayor parte del citoplasma restante después del alargamiento forma un lóbulo esferoide llamado cuerpo residual y ahí es donde la maduración termina.

2. 2. 4 Espermiación

Se le conoce así a la fase de liberación de las células germinales formadas al interior de los túbulos seminíferos hasta el lumen, y donde las células de Sertoli fagocitan los cuerpos residuales reciclando así los componentes protoplasmáticos (Hafez, 2002).

Figura 5 . Espermatogénesis: Representación esquemática de las tres etapas en las que se divide.

(Tomada y modificada de Navarro, 2012)

2. 3 Colección del semen porcino

La colección debe hacerse en una sala adecuada o bien en el corral del verraco, la edad adecuada para realizar la colección es hasta los 10-12 meses; así mismo, se puede realizar la recolección por cualquiera de los métodos disponibles: la técnica de mano enguantada conocida también como (método japonés), vagina artificial (VA) o por electro-eyaculación. Normalmente es usado un

maniquí llamado potro de metal, al cual los verracos tuvieron que haber sido entrenados a una edad entre los 5-7 meses y que montan sin mayor problema (Rodríguez, 2005).

La colección debe ser de la mejor manera higiénica, para ello es necesario vaciar el divertículo prepucial con el objeto de eliminar los restos de orina y limpiar la zona con toallas húmedas.

El semen se colecta en una bolsa de plástico montada dentro de un termo o bien un recipiente aislante de boca ancha, es importante evitar el contacto con las secreciones gelificantes de las glándulas bulbouretrales con el resto del eyaculado. En el caso del método japonés (mano enguantada), se permite al cerdo haga movimientos de búsqueda de la vulva o por debajo del potro con la finalidad de que la libido aumente obteniendo con ello una mayor cantidad de semen. Se ejerce fuerte presión manual colocando los dedos alrededor de la espiral del glande, ejerciendo una tracción suave hasta su total extensión. Se mantiene el pene horizontal (paralelo al suelo) para evitar contaminación; la presión provoca la eyaculación que tarada entre 5 y 15 minutos dependiendo del macho (Rodríguez, 2005).

Como se mencionará más adelante el eyaculado del cerdo es fraccionado y consiste en tres porciones, la presión debe mantenerse durante toda la eyaculación, ya que esta especie eyacula por presión y no por fricción, esto solo se disminuye si el cerdo intenta hacer movimientos de búsqueda, lo que marca que la eyaculación terminó, si esto no sucede vendrá otra onda de eyaculación, que algunos consideran incorrecto. El semen debe evaluarse lo más rápido posible, aunque si no fuera así puede mantenerse hasta una hora luego del muestreo.

2. 4 Características del semen porcino

El eyaculado de la especie porcina es el mayor de todas las especies domésticas, tanto su cantidad como la calidad va a estar condicionadas por diferentes factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Las características del eyaculado se pueden distinguir por tres fracciones; la primera fracción conocida como:

Pre-secreción o fracción pre-espermática, tarda en salir de 1 a 5 minutos, corresponde del 5 al 20 % y está constituida por la secreción de la próstata, vesículas seminales y unos grumos de textura gelatinosa procedente de las glándulas de Cowper que reciben el nombre de tapioca; esta fracción se caracteriza por carecer de espermatozoides, ser trasparente y tener un volumen aproximado a 10 c.c.

La segunda fracción o fracción espermática fluye de 2 a 5 minutos correspondiendo del 30 al 50 % del eyaculado, como su nombre lo indica, es la más importante y está constituida por un líquido blanquecino y uniforme compuesta por espermatozoides donde la concentración va de 500.000 a 1.000.000 de espermatozoides por cm^3 , de igual manera existen secreciones de las vesículas seminales y próstata cuyo volumen es alrededor de 70 cm^3 .

La ultima fracción conocida como post-espermática tarda aproximadamente de 3 a 8 minutos en salir, corresponde del 40 al 60 % del volumen total del eyaculado y forma un tapón gelatinoso en los genitales de la hembra, constituida principalmente por secreción prostática y de las glándulas de Cowper, tiene un volumen de 150 ml. aproximadamente, de color blanquecino- trasparente con

grumos gelatinosos y espermatozoides en pequeña cantidad. En general el volumen oscila normalmente entre 50 y 500 ml, siendo la media de unos 200 ml.

Este periodo dura alrededor de 34 días, una vez formado el espermatozoide y liberado en el túbulo seminífero, inicia su recorrido en el epidídimo, proceso que ocurre en alrededor de 10 días, durante este tiempo se generan ciertos cambios en su maduración obteniendo su capacidad fecundante. (Viloria 2013).

2. 5 Factores que afectan la capacidad reproductiva del macho

Aunque no parezca la fertilidad del verraco incide en la productividad de cualquier granja de forma aparente, reflejándose en el incremento de gestaciones por monta directa o bien programas de IA, de igual manera es difícil detectar un macho subfétil hasta que no aparecen hembras repetidoras o camadas de baja población (Martínez *et al.*, 2011)

Dentro de los principales factores podemos citar los siguientes:

2. 5. 1 Edad

La producción de semen está establecida poco a poco, y esta sucede desde los cuatro meses de edad donde se pueden obtener eyaculados con espermatozoides, aunque su capacidad de fecundación se retrasa por cierto tiempo. Entre los 7 y 20 meses de edad, la producción y la concentración espermática aumentan gradual y en forma lineal, teniendo como periodo de mejor potencial entre los 8 y 12 meses llegando a un máximo entre los 24 y 30 meses de edad, lo cual corresponde con el crecimiento testicular.

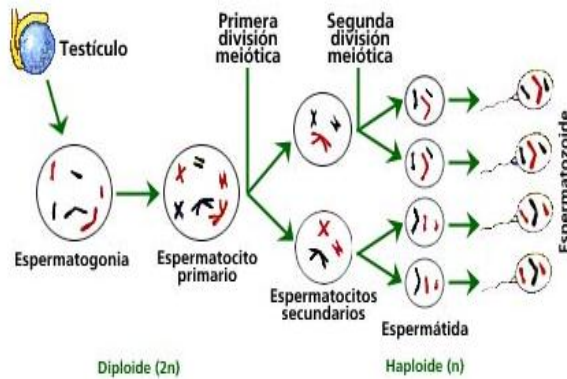
2. 5. 2 Frecuencia de eyaculación

Dependerá de la edad y del programa de reproducción ya sea monta natural o para recolección, en cualquiera de los dos casos es muy importante evitar el exceso de trabajo al semental, ya que esto trae como consecuencia un agotamiento de reservas espermáticas, disminución del volumen, disminución de la concentración total del eyaculado, así como, aglutinaciones, aumentos en los porcentajes de anormalidades espermáticas.

En la práctica es recomendable hacer recolecciones cada cinco días, con un máximo de tres recolecciones cada 2 semanas, sin embargo, cada centro determina el ritmo de recolecciones y estas pueden ser variadas por efecto de exigencia demanda, después de cinco días de descanso, la segunda y la tercera eyaculación tiene entre 47 y 52% menos de espermatozoides respectivamente con respecto a la primera (Martínez *et al.*, 2011).

De manera general (de Alba, 2001) recomienda:

Animales menores de 12 meses: 1 recolección a la semana



Animales de más de 12 meses y menos de 20 dosis/ extracción: 1 recolección semanal

Animales de más de 12 meses con 20-25 dosis/ extracción: 2 recolecciones semanales

Animales de más de 12 meses con más de 25 dosis/ extracción: 2 recolecciones semanales, siendo el cerdo más

reproductivo el primero a seleccionar.

2. 5. 3 Genética

Se ha descrito que en machos de razas maternas (Large White y Landrace) producen eyaculados con mayor volumen y concentración espermática que los de las razas de líneas paternas (Duroc, Hampshire o Pietrain). Esto además se asocia a una alta selección genética y se ha observado un menor desempeño en machos con alta consanguinidad. La heterosis puede corregir estos defectos, por lo que, el uso de machos híbridos o bien llamados F1 de alta calidad genética pueden ser utilizados (Galina, 2008).

2. 5. 4 Temperatura ambiental

Las temperaturas ambientales elevadas causan un mal funcionamiento del mecanismo termorregulador del escroto y los testículos, y origina un efecto adverso en la espermatogénesis y la calidad del semen. El incremento constante en la temperatura superior a los 28°C, repercute en la disminución de la cantidad de espermatozoides y del volumen del eyaculado, aunado al incremento de anomalías en estos, como lo es la gota citoplasmática, defectos en pieza media, cola y cabeza.

El incremento de temperatura entre 20 y 35°C, por un periodo de 20 días provoca disminución de la motilidad; y cuando el cerdo está expuesto a una temperatura ambiental de 35°C su frecuencia respiratoria aumenta de 20 a 40 por minuto, esto se considera como estrés térmico lo que afecta considerablemente la espermatogénesis (Martínez *et al.*, 2011).

2. 5. 5 Nutrición

Se ha demostrado que los efectos que tiene la nutrición sobre el comportamiento sexual es solo en casos de subalimentación, en lo que nos refiere a la producción de semen, la nutrición interactúa con muchos factores y es manifestada hasta 8 semanas después del consumo de alimento de baja calidad nutricional. La capacidad de fertilización sufre alteraciones, esto por las variaciones de proteína o energía (Martínez *et al.*, 2011).

La presencia de Micotoxinas en el alimento conduce también a una menor concentración de semen y mayor cantidad de anomalías, principalmente por la Zearalenona o Aflatoxinas B, por lo que es importante realizar un manejo adecuado de los ingredientes y su conservación.

2. 5. 6 Estado sanitario

Cualquier proceso patológico que produzca fiebre de 40 °C traerá consigo problemas en la calidad del semen, de los cuáles por mencionar algunos son interrumpir el proceso natural en la espermatogénesis, eyaculados azoospermicos, aumento de anomalías de tipo primario, disminución de la concentración espermática, reducciones de la motilidad y viabilidad de los mismos, así como, daños a la integridad del acrosoma (Martínez *et al.*, 2011).

2. 6 Evaluación de las características del semen porcino

Entre todas las células existentes en el organismo, los espermatozoides son los únicos en su forma y función, y al ser producto final de diversos procesos éstos pueden sufrir cambios tanto endógenos como exógenos; los métodos de evaluación estándar nos ayudan a determinar el estado de fertilidad de los machos reproductores, los resultados de estos métodos se verán reflejados en las hembras y su productividad en cualquier granja.

Aunque ninguna prueba por si misma nos predice con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides, la evaluación de diversas características físicas nos puede orientar mejor para la determinación del mayor potencial de la misma mediante técnicas rápidas y baratas (Cole y Cupps, 1998).

En términos generales, los requisitos mínimos para una muestra de semen de cerdo probablemente fértil son:

Motilidad de por lo menos el 65%

Anomalías morfológicas menores del 20%

Por lo menos 100 millones de espermatozoides / ml

Un mínimo de 60-75 ml de semen por eyaculación

La evaluación de semen se realiza teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas. Para la evaluación macroscópica hay que tomar en cuenta las características físicas: volumen, color, olor, consistencia y pH; y en la evaluación microscópica la concentración espermática, motilidad masal y progresiva, relación de espermatozoides vivos y muertos, morfología espermática e integridades de membrana.

La evaluación macro y microscópica aquí mencionada, es de acuerdo a los criterios publicados por varios autores: Bonet *et al.* (2006; 2013), Trujillo *et al.* (2011) y Hafez *et al.* (2012).

2. 6. 1 Evaluación macroscópica

Las muestras de semen se estudian en cuanto a sus características físicas: color, olor, volumen, temperatura y pH (Gadea, 2001).

2. 6. 1. 1 Volumen

Este es definido como el resultante de las uniones de las fracciones espermática y seminal expresada en ml

Los parámetros promedio esperados son de 240 a 250 ml del volumen total, del cual cerca del 20% consta de líquido semigelatinoso, el 20 al 30% consiste en espermatozoides, las diferencias resultantes son de los líquidos pre-espermáticos y pos-espermáticos; la edad, ambiente, época del año, estado de salud, el procedimiento mismo y la raza influirán sobre la concentración y volumen (Hafez, 2002).

Williams (1981) señaló que el volumen del eyaculado puede mejorar y aumentar con la edad y cambia de acuerdo a su vigor sexual, nutrición, estado higiénico y frecuencia de uso.

2. 6. 1. 2 Temperatura

La temperatura se mide con termómetro mercurial, el cual se introduce en el eyaculado inmediatamente de haber sido obtenido, hay que recordar que los espermatozoides del cerdo son muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura, es por eso que todo el material y equipo debe estar a temperatura de 35 a 37°C (García, 1995).

2. 6. 1. 3 Color

El color es el resultado de la combinación de las tres fracciones, la tonalidad varía de acuoso opalescente a lechoso y cremoso, conforme a su concentración espermática va en aumento.

Cualquier cambio de coloración en el eyaculado indica alguna anomalía o presencia de alguna sustancia, tonalidades rosas o rojas pueden deberse a la existencia de glóbulos rojos, tonalidades amarillentas, presencia de orina, la contaminación con polvo nos da tonalidades oscuras.

Los tonos rosados no reducen la fertilidad ni viabilidad del eyaculado; sin embargo, un color rojo y de olor fuerte debe ser motivo para descartarlo (Rozeboom, 2000).

2. 6. 1. 4 Olor

El olor debe ser *sui generis*, significa que debe oler a cerdo, cada verraco nos presenta cierto aroma característico y este olor se acentúa en animales adultos sobre todo cuando son sometidos a una actividad sexual intensa, así mismo, puede existir aromas putrefactos ocasionados por una contaminación bacteriana o necrosis de genitales (Martínez, 1998)

2. 6. 1. 5 pH

Es un indicador de la concentración de iones de hidrogeno de la actividad metabólica de los espermatozoides, dando el grado de acidez o alcalinidad. Conforme pasan los días en el eyaculado aumenta la producción de ácido láctico y desciende el pH. Los valores normales de pH se encuentran entre 6.8 y 7.-8, con un valor óptimo de 6.9 y 7.2

2. 6. 2 Evaluación microscópica

La calidad espermática es dada en términos de porcentajes en cuanto a espermatozoides morfológicamente normales y su movilidad, la estimación de estas características es meramente subjetiva y ésta es influenciada por cada observador; sin embargo es el método estándar más utilizado en los laboratorios de reproducción.

2. 6. 2. 1 Motilidad

La función del espermatozoide básicamente es fecundar el óvulo, y para lograr ese objetivo se vale de ciertas características (Hernández, 2012); la motilidad es importante para lograr la fecundación, sin embargo, el movimiento no necesariamente nos indica capacidad de fecundación, ya que los espermatozoides pierden la capacidad fecundante antes que la motilidad (Hafez, 1996). Es por eso que este indicador se define como la estimación microscópica y valoración cuantitativa del movimiento rectilíneo uniforme de los espermatozoides, los valores que se obtienen proporcionan información sobre la actividad de las células espermáticas siendo un parámetro muy importante para calificar el semen (Coraza *et al.*, 1990).

El movimiento de un espermatozoide es muy importante e imprescindible para colonizar el tracto femenino para que dé lugar la fecundación; un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles o ausentes de movimiento es descartado automáticamente para su conservación (Kommisrud *et al.*, 2002 y Díaz *et al.*, 2008) y se dividen en dos formas de evaluarlo:

Motilidad masal: Es un movimiento de superficie que refleja un movimiento grupal de las células espermáticas, para esta evaluación se deposita una gota de semen sin diluir sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y se observa bajo microscopia óptica de 40x., la evaluación subjetiva se clasifica de 0 al 3 en función del número, densidad y velocidad de movimientos de ondas o remolinos que se forman en la superficie de la gota (González *et al.*, 2006).

0. Ondas inexistentes espermatozoides inmóviles.

1. Espermatozoides móviles, pero no alcanzan a formar ondas.

2. Formación de ondas, pero muy lentas.

3. Formación de ondas que se forman rápidamente

(Modificado de González-Urdiales *et. al.*, 2006).

Motilidad individual y calidad del movimiento: Se trata de una valoración cuanti- y cualitativa, donde, por un lado, se observa el porcentaje de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento y por otro lado la calidad de este movimiento; los valores aceptados para aceptar un eyaculado adecuado son de 75% de espermatozoides móviles y 65% de espermatozoides con movimiento progresivo (González *et al.*, 2006). Para esta evaluación se prepara una gota de semen diluido sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y es observado a 100x o 200x en algunos casos (González *et al.*, 2006).

2. 6. 2. 2 Concentración espermática

La determinación exacta del número de espermatozoides y el volumen del eyaculado define el número de hembras que pueden ser inseminadas o bien la preparación de dosis para su conservación (Hafez *et al.*, 2002), y es definida como la determinación del número de espermatozoides por unidad de volumen (ml). La concentración también es conocida como densidad del semen y es un parámetro extraordinario para determinar el grado de dilución y número de dosis por eyaculado (Caiza, 2009).

La concentración espermática puede realizarse por medio de diferentes métodos a partir de una muestra de semen, entre los métodos destaca la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de recuento celular como las cámaras de Bürker, Neubauer o Thoma (Quintero, 2003).

El recuento celular es el método más extendido para el conteo de la concentración espermática. El análisis se realiza mediante el uso de un microscopio óptico con el que se examina el semen previamente diluido en soluciones fijadoras (formaldehído, cloraceno, etc.), éstas muestras son observadas con el objetivo 100x o en algunos casos 400x, empleando un contador manual; el conteo puede realizarse de diferentes formas, contabilizando el total de los espermatozoides que se encuentran dentro de los cuadros de la cámara o bien contando solo los cuadros extremos de las esquinas y centrales. Se cuentan ambos lados de la cámara y finalmente se calcula el promedio, de modo que el resultado final nos dará el número medio de espermatozoides por mililitro que es de 250 millones por ml, oscilando entre 400-1200 millones en su fracción rica (González *et al.*, 2006).

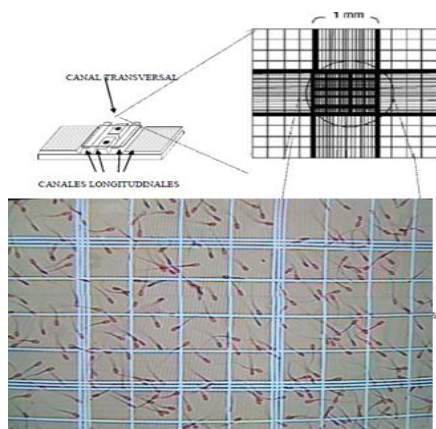


Imagen 6. Cámara de Neubauer. (Tomada y modificada de Alcántar, 2015)

2. 6. 2. 3 Morfología espermática

El estudio de la morfología del espermatozoide es de enorme valor diagnóstico y requiere de un manejo adecuado de las muestras, ya que nos puede aportar una referencia sobre la fertilidad de los reproductores a evaluar mediante sus eyaculados, así mismo poder detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria (González *et al.*, 2006).

Otro objetivo del examen de la morfología espermática es determinar la presencia e incidencia de formas anormales, como, células patológicas o anormales entre las diferentes causas encontramos, alimentación, manejo, edad y estrés. Los diferentes tipos de anomalías morfológicas se clasifican según su origen y en función de la zona del espermatozoide en que se aparecen (González *et al.*, 2006), por lo tanto, nos encontramos con:

- Anormalidades primarias: son aquellas malformaciones que se presentan por alguna deficiencia durante la espermatogénesis (Peña-Martinez, 2004), divididas a su vez en específicas o no específicas, siendo de origen genético, y las más frecuentes por alguna etiología diversa.

Tipo de movimiento	Valoración	Categoría del semen
Ondas escasas con movimiento muy rápido	5	Excelente
Ondas de movimiento vigoroso pero inferior al anterior	4	Buena
Ondas de movimiento lento	3	Regular
Ondas inexistentes pero movimiento observable en la mayoría de los espermatozoides	2	Escasa
Ondas inexistentes, pocos espermatozoides móviles	1	Deficiente
Ondas inexistentes espermatozoides inmóviles	0	Pésima

- Anormalidades secundarias: son aquellas que se producen a causa de problemas en la maduración dentro del epidídimo o posterior a la eyaculación (Peña-Martinez, 2004)
- Anormalidades terciarias: son aquellas que se producen por mal manejo del semen durante la recolección y procesamiento.

2. 6. 3 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática para muchos es uno de los parámetros a evaluar con mayor frecuencia en un laboratorio de reproducción durante el análisis seminal de rutina, ya que su evaluación determina la capacidad fecundante de un espermatozoide *in vitro* (Ortega, 2017).

2. 6. 3. 1 Tinción con Eosina/Nigrosina

Como cualquier otra célula, el espermatozoide está rodeado de una membrana citoplasmática que permite entre otras actividades fisiológicas, el intercambio de sustancias entre el interior y exterior de la misma célula, siempre y cuando esta mantenga una integridad funcional y estructural (González *et al.*, 2006).

Esta evaluación tiene como fundamento básico determinar la viabilidad espermática a través de su membrana plasmática, donde, en caso de perder la permeabilidad selectiva con la que cuenta el espermatozoide será incapaz de mantener las concentraciones de iones solutos, lo que conducirá a la supresión de funciones vitales de la célula (González *et al.*, 2006), y esto se dará por permitir la entrada del colorante a la célula, es decir, esta se tiñe por la eosina dando una coloración rosada, por el contrario si este se mantuviera blanco sobre un fondo oscuro de Nigrosina se determina como viva. Por ello se denomina “técnica de vivos y muertos” (Alcántar, 2015)

2. 6. 3. 2 Prueba de hinchamiento hiposmótico (*Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST*)

Esta prueba evalúa la integridad de la membrana desde otra perspectiva dada por la semipermeabilidad de las membranas celulares, donde durante una eyaculación los espermatozoides son transportados desde un ambiente hiperosmótico en la cola del epidídimo (420 mmol/kg) a un ambiente isosmótico del plasma seminal y del aparato reproductor de la hembra (330 mmol/kg) (Yeung *et al.* 2000).

La funcionalidad de la membrana está relacionada estrechamente con la función del espermatozoide, por lo que los espermatozoides intactos son capaces de adaptarse en soportar los desafíos osmóticos ya que son capaces de regular los cambios de volumen por el ajuste de la concentración de ion intracelular (Alcántar, 2015).

Por lo tanto, al ser expuestos en un medio hiposmótico con la prueba HOST, solo los espermatozoides capaces de regular los cambios de volumen entre los medios por el ajuste de las concentraciones de iones intracelulares serán las células intactas en su membrana plasmática, en esta condición los espermatozoides dañados se hinchan debido a la entrada de agua al interior de la célula por el desequilibrio osmótico entre el medio intra y extracelular, provocando aumento de su volumen (Alcántar, 2015).

2. 6. 3. 3 Tinciones fluorescentes

Son técnicas ampliamente difundidas y utilizadas, a pesar de requerir equipos más sofisticados, no presentan ningún tipo de limitación para el uso de las mismas. Se ha descrito una gran variedad de fluorocromos para la evaluación de la membrana: Bisbenzimidida (Hoechst 33258), Diacetato de carboxifluoresceína, Ioduro de Propidio (IP), Yo-Pro 1, Homodímero de etidio, 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Alcántar, 2015). Yániz *et al.* (2013) mencionan que hoy en día el método más utilizado es la combinación entre SYBR14 / Ioduro de Propidio (IP).

Todas estas sondas fluorescentes tienen la particularidad de ser afines al ADN del espermatozoide por lo que nos aseguran que solo se tiñen éstos y no algún componente del plasma o de los diluyentes (Bonet *et al.*, 2006).

2. 6. 3. 3. 1 Tinción SYBR14 / Ioduro de Propidio (IP)

La evaluación de la integridad de la membrana es un parámetro importante durante el análisis seminal de rutina, y su determinación es útil para predecir la capacidad fecundante de un espermatozoide *in vitro*. El SYBR14 es un colorante de membrana azulado, no fluorescente, permeable tanto en membranas intactas como membranas dañadas de los espermatozoides (Medrano, 1998); es desacidado por las esterasas intracelulares, convirtiéndose en un fluoróforo verde que es retenido intracelularmente por las membranas plasmáticas intactas (Silva y Gadella 2006; Peña *et al.*, 1999). Cuando ocurre la muerte celular, la membrana pierde la capacidad para resistir el influjo de la tinción fluorescente roja del Ioduro de Propidio (PI), reemplazando de esta manera al SYBR14; los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta exhibirán fluorescencia verde del SyBR14, mientras que los espermatozoides con membrana plasmática dañada se teñirán rojos por el PI (Gardner y Johnson, 1995).

2. 6. 4 Evaluación de la integridad del acrosoma

La integridad estructural del acrosoma es un requisito indispensable para que el espermatozoide sea capaz de unirse al ovocito y llevar a cabo la fecundación (Yanagimachi, 2015), es por eso, que conviene realizar una valoración específica del mismo. La reacción acrosomal tras la capacitación, se encarga por medio de su contenido enzimático de la disolución de las capas que envuelven al ovocito para llevar a cabo dicho propósito; ahora bien, esto solo ocurre en aquellos espermatozoides que presentan un acrosoma íntegro.

En un acrosoma íntegro, mediante la observación con microscopía óptica y contraste de fases, se pueden apreciar tres zonas claramente diferenciadas: la zona acrosomal, con un borde apical nítido, la zona post-acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Existe una amplia variedad de técnicas para detectar el daño a nivel acrosomal como son las que se han descrito anteriormente para la valoración morfológica, la observación al microscopio electrónico (Yanagimachi, 2015), la microscopía de contraste de fases (Woelders *et al.*, 1996), y la microscopía de contraste diferencial de interferencia (Pelaez, 2003).

La microscopía de contraste de fases es una técnica que se caracteriza por ser sencilla y rápida, y esto resulta de gran utilidad en la valoración rutinaria de los centros de inseminación; el fundamento de ésta se basa en observar el acrosoma normal que se determina por la presencia en el borde apical de una semiluna negra bien definida; aquellos que presenten irregularidades se consideran como dañados (Bonet *et al.*, 2006).

2.7 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula con diversas características estructurales y funcionales que le proporcionan la habilidad y capacidad única de unirse al gameto femenino para que se lleve a cabo la fecundación y la recombinación de genes (Eddy, 2015). Así mismo, el espermatozoide ha evolucionado originando diversidad entre especies, y que no tiene comparación ninguna con otro tipo celular, considerando que se integra de una cabeza que contiene un núcleo altamente condensado y el acrosoma, una vesícula llena de enzimas cuyo contenido se libera cuando se acerca o alcanza las capas superiores del ovocito para facilitar la fertilización y un flagelo que proporciona al espermatozoide la capacidad de impulsarse a través de un medio líquido (Johnson, 1996; Hafez, 2002).

Así mismo, existe una gran diversidad de mecanismos celulares y moleculares implícitos en funciones espermáticas, una de ellas, por ejemplo, la proporción de fosfolípidos o de ácidos grasos poliinsaturados, de igual manera los mecanismos que regulan el calcio intracelular, y todas ellas afectan la señalización intracelular durante los procesos que trascurren en la vida del espermatozoide. La gran variedad de funciones que se realizan para lograr la fecundación la hace una célula altamente especializada (Eddy, 2005).

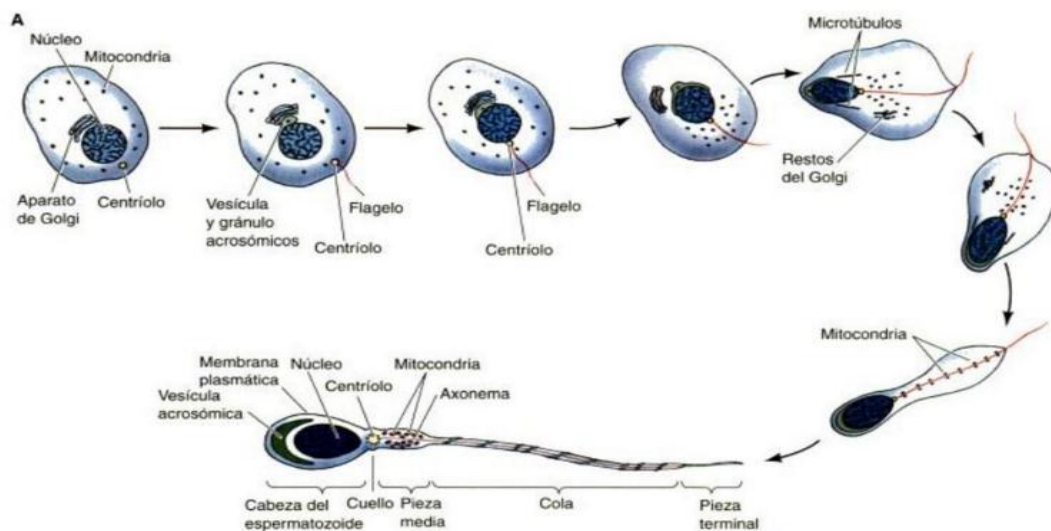


Figura 2. Espermatozoide de mamífero: Modificación de una célula germinal para formar un espermatozoide de mamífero (Tomada de Scott, 2005).

2. 8 Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides de mamíferos están formados básicamente por 2 zonas con distintas funciones: la cabeza y el flagelo.

La cabeza espermática se divide en cuatro regiones: la región apical, región pre-ecuatorial, región ecuatorial y la post-ecuatorial; además, en la cabeza se encuentra el núcleo el cual es haploide, de cromatina altamente condensada, un acrosoma y una membrana plasmática (Flesh y Gadella, 2000).

El flagelo a su vez se divide en 3 segmentos que por orden cráneo-caudal, se denominan parte intermedia, parte principal y parte terminal. Según Mortimer (2000) el flagelo está formado por una estructura radial de pares de microtúbulos; alrededor de esta estructura se sitúan algunas más que varían respecto al segmento del flagelo que se trate. Por lo tanto, la parte intermedia como la principal, contienen una serie de elementos semirrígidos (vaina fibrosa, columnas longitudinales) cuya función principal es la de otorgar direccionalidad y flexibilidad al movimiento flagelar. La parte intermedia, contiene las mitocondrias estructuradas en una vaina mitocondrial, cuya función es la de generar la energía necesaria para el mantenimiento del movimiento de este axonema (Gagnon, 1995).

Es importante mencionar que todo este sistema tan bien estructurado es para que el flagelo espermático presente un patrón de movimiento rotacional y elíptico, el cual es transmitido a la cabeza del espermatozoide desde el cuello; este movimiento rotacional es precisamente lo que le otorga en última instancia progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000).

2. 9 El espermatozoide porcino

En particular, esta especie es estructuralmente muy parecida al de otros ungulados domésticos, la cabeza mide aproximadamente 8.5 μm de largo; es el doble de largo que de ancho con respecto a los espermatozoides de otras especies, la pieza intermedia mide 10 μm de largo y la cola unos 30 μm aproximadamente. La cabeza está cubierta por una estructura proveniente del aparato de Golgi denominada acrosoma, constituida por una membrana acrosomal interna y externa siendo la primera más corta que la segunda; ambas cubiertas son una extensión de la membrana plasmática del espermatozoide, en el interior de ambas membranas se encuentra el contenido acrosomal, que ciertamente está constituido de enzimas hidrolíticas que son liberadas al momento de llevarse a cabo la reacción acrosomal con el ovocito (Valdés, 2015).

Esquema representativo del espermatozoide de cerdo.

- A) Espermatozoide seccionado. Las líneas enumeradas continúan representan todas las bicapas que constituyen a la membrana: 1, membrana plasmática; 2, membrana acrosomal externa; 3, enzima acrosomal; 4, membrana acrosomal interna; 5, envoltura nuclear; 6, núcleo; 7, zona posterior de anillo y cuello; 8, mitocondria; 9. Parte proximal del flagelo; 10, anillo anular; 11, vaina fibrosa; 12, axonema mas otras fibras densas.
- B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza media con sus subdominios 13, cresta apical; 14; zona pre-ecuatorial; 15, zona ecuatorial; 16, zona post-ecuatorial.
- C) Reacción acrosomal 17, durante la reacción acrosomal la formación de vesículas mixtas a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa.

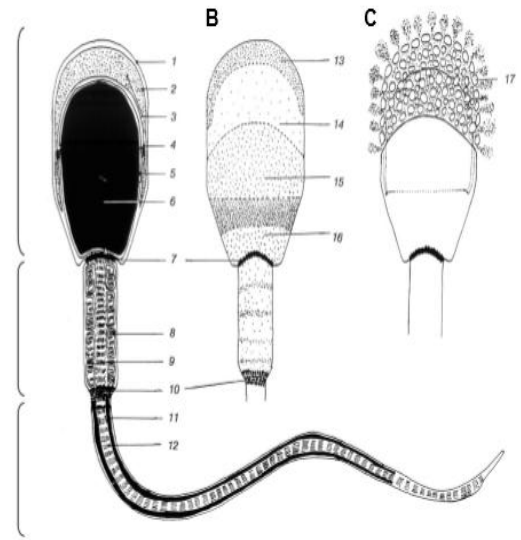


Figura 7. Esquema representativo del espermatozoide de cerdo (Flesh y Gadella 2000).

Para completar el proceso natural de la fecundación, los espermatozoides deben tener movilidad, sufrir el proceso de capacitación el cual consiste en una serie de transformaciones necesarias para alcanzar la capacidad de unirse a la ZP del ovocito de forma efectiva (Harkema *et al.*, 1998) y desarrollar la reacción acrosomal para atravesar la zona pelúcida (Juárez y Valencia, 2009).

2. 10 Membrana plasmática del espermatozoide

2. 10. 1 Estructura y composición

Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide, permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide (Davies, 1999).

La membrana plasmática es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y cola. La composición lipídica y proteica de cada membrana es única y ocurre muy poco o nada de intercambio de lípidos o proteínas entre ellas (Aurich, 2005).

Así mismo, estructuralmente se compone de tres capas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos-agua y glycocalix. La bicapa lipídica está subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos orientadas internamente unas a otras.

La mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos y colesterol, en una razón de 0.64: 0.36. De igual manera se ha sugerido que la cantidad de proteínas y lípidos es aproximadamente la misma siendo 0.68 en el cerdo en base al peso; la cantidad de colesterol, determina la fluidez de la membrana. En general mientras más alta la concentración de fosfolípidos más fluida es la membrana. El colesterol,

por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma (Davies, 1999).

La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide le confieren propiedades específicas. Aunque hay variación considerable entre las diferentes especies, la membrana plasmática contiene en promedio 70% fosfolípidos, 25% lípidos neutros y 5% de glicolípidos. (Frits *et al.* 2000).

Existe el dato que el cerdo precisa de una composición características de 60-70% de fosfolípidos, de los cuales, el 50% son lípidos esteres; lo que quiere decir que esta membrana tiene una mayor concentración proteínica y menos colesterol que las otras especies, es por eso que esta especie presenta una sensibilidad alta a los cambios de temperatura (Trujillo *et al.*, 2011).

El principal componente que varía en las especies es el colesterol siendo de 22% del total de lípidos, existen además presentes en la membrana aparte del colesterol, demosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol (Frits *et al.* 2000, Espinoza *et al.* 2009).

2. 11 Crio-conservación de semen

2. 11. 1 Antecedentes de la crio-conservación

El primer reporte de crio-conservación de semen, fue realizado por Lázaro Spallanzani en el año 1776, quien observó cuando los espermatozoides de humano, garrapato y rana eran enfriados en nieve hasta 30 minutos se volvían inactivos pero podían ser “reactivados”; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. Un siglo después Mantegazza (1866), observó que el espermatozoide de humano sobrevivió en semen congelado a -17°C , este fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamíferos después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación (citados por Ramonez, 2013).

Durante el siglo XX, enfriar y congelar medios, tuvo avances por las posibilidades que brindaba el uso de refrigeradores. Los primeros ensayos de “congelación” no tuvieron éxito; más tarde Jahnel en 1938 (citado por Salamon y Maxwell, 1995) demostró que el semen humano podría ser congelado utilizando diferentes sustancias con temperaturas muy alejadas de los 0°C ; por ejemplo, hielo seco (-79°C), nitrógeno líquido (-196°C) o helio líquido (-296°C) y que al descongelado los espermatozoides eran móviles, incluso después de 40 días almacenados a estas temperaturas.

La primera vez que se realizó con éxito una congelación de material seminal fue cuando Polge *et al.* en 1949 (citado por Salamon y Maxwell, 1995) demostraron el poder crio-protector del glicerol, ellos lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución con este

agente crio-protector, este descubrimiento de la acción del glicerol abrió una era exitosa en la criopreservación no solo de gametos, sino también células y tejidos; cabe mencionar que Bernstein y Petropavlovsky en 1937 (citado por Salamon y Maxwell, 1995) reconocieron también los efectos tóxicos del glicerol si es utilizado a altas concentraciones.

La crio-conservación de semen ha servido como una herramienta más para beneficiar la cría de animales de importancia ganadera, y se ha reconocido como una contribución a la conservación de especies en peligro de extinción, así como, superar aspectos de infertilidad en humanos. El semen preservado de diversas especies es de suma importancia en el área de investigación ya que, da lugar a varias posibilidades de reproducir diferentes individuos, además salvaguardar características genéticas encaminadas a mejorar las especies (Flesch y Gadella, 2000).

El proceso de crio-conservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn *et al.*, 1969) y por consecuencia es de esperarse que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida será menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

2. 11. 2 Principios básicos de la crio-conservación

El proceso de congelación de los espermatozoides es una interrupción del metabolismo de la célula espermática, por lo tanto, el objetivo de la crio-conservación es mantener indefinidamente en este estado la célula, sin alterar la capacidad fecundante de los espermatozoides una vez descongelados (Watson, 1995). Para que este método sea satisfactorio es importante tener en cuenta un conocimiento detallado de factores, tanto internos (propios de la célula, que no podemos modificar) como externos (aquellos que podemos manipular) que intervienen en la supervivencia espermática, así como de sus posibles interacciones (Johnson *et al.*, 2000).

Entonces, el objetivo principal de la crio-conservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un periodo prolongado de tiempo, para lo cual es necesario mantener temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros *et al.*, 2002), la crio-conservación de cualquier material biológico es efectuada indispensablemente en una solución que otorgue propiedades físico-químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Ramonez, 2013).

Cuando el medio en el cual se pretende crio-conservar alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se comienzan a formar núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular, ahí la membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Holt, 2000), al formarse la cristalización en el medio extracelular este da lugar a hielo puro, dejando solo los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, esto se conoce como crio-concentración, esta fracción se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001).

Cuando sucede la cristalización hay una liberación de energía en forma de calor latente, esto transitoriamente eleva la temperatura de la solución, este proceso rápido es perjudicial para las células (Boiso, 2001). Ahora bien, la velocidad de congelamiento es un factor muy importante en la crio-conservación ya que si es muy rápida la célula no es capaz de deshidratarse y el agua que se encuentra al interior de la misma forma cristales de hielo los cuales son letales, pero si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación es extrema ocasionando desnaturalización macromolecular y atrofia celular pudiendo colapsar la membrana plasmática siendo irreversible (Boiso, 2001). Es por esto que la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación de la célula. Holt, 2000 menciona que la supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada que es específica para cada tipo celular.

Las membranas celulares son las estructuras que sufren el mayor daño en los procesos de crio-conservación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, esta transición de lípidos se presenta entre 10 y 16°C alterando las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossman y Santalo, 1991).

2. 11. 3 Enfriamiento

En todo protocolo de congelación, existe una fase inicial de descenso de temperatura desde los niveles fisiológicos hasta los valores por encima de 0°C. Este enfriamiento causa un estado de hipotermia frente al cual el espermatozoide puede sufrir daños. La severidad del daño depende de la velocidad de enfriamiento, la duración y la temperatura final alcanzada. Los espermatozoides de porcinos se muestran extremadamente sensibles a descensos por debajo de los 15°C (Pursel *et al.*, 1973a).

Uno de los signos más evidentes de daño causado por el choque térmico es la pérdida de motilidad, seguida por la lesión a las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial (Watson, 1995), a estos efectos son sumados los aumentos de la permeabilidad de la membrana plasmática (Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994) y la pérdida de lípidos (Plummer y Watson, 1985; White, 1993), algunos de estos cambios han sido relacionados durante la capacitación espermática, y según Green y Watson (2001) fueron denominados como cambios similares a la capacitación "*capacitation-like changes*".

En los espermatozoides porcinos, el proceso de enfriamiento causa un aumento considerable del número de espermatozoides dañados (Green y Watson, 2001; Kaneto *et al.*, 2002, Vadnais *et al.*, 2005).

La susceptibilidad al daño por enfriamiento en los espermatozoides de las distintas especies se atribuye al rango de temperaturas en el que se producen los cambios de fase líquida a gel en los lípidos de la membrana (Arav *et al.*, 2000), en los espermatozoides porcinos la mayor susceptibilidad al choque térmico se ha relacionado con una cantidad menor de colesterol: fosfolípidos, particularidad que le permite un cambio de transición de fase de líquido a gel a mayores temperaturas durante el enfriamiento, y por lo tanto un aumento de la susceptibilidad al daño durante este proceso (White, 1993; Brouwers *et al.*, 2005).

La incorporación de yema de huevo durante el proceso de enfriamiento protege a los espermatozoides del daño por choque térmico (White, 1993; Buhr *et al.*, 2000; Baysha, 2014).

2. 11. 4 *Daños causados por la crio-conservación*

En trabajos realizados por diferentes autores se ha deducido que los fenómenos que se acontecen durante el proceso de congelación van a alterar la fisiología de las células espermáticas, como por ejemplo un estado de capacitación prematuro, originando una reacción acrosomal de una forma acelerada (Clarke y Johnson, 1987).

El movimiento de agua y los crioprotectores a través de la membrana plasmática del espermatozoide condiciona la deshidratación celular y esta a su vez, se relaciona con los daños observados tras la descongelación (Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994).

Existe un fenómeno al cual se le denominó como “choque frío” (Watson, 1990), se refiere cuando el semen es enfriado de forma rápida a temperaturas próximas a los 0°C, y un gran porcentaje de células espermáticas aparecen inmóviles, además se incrementa el número de células muertas y anormales, así como, la alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular. Las membranas celulares y la estructura acrosomal son las regiones espermáticas más afectadas por dicho proceso (Holt *et al.*, 1992).

La formación de hielo intracelular va a originar la ruptura de ciertas estructuras celulares y la desorganización de las membranas plasmáticas y acrosomal, con alteraciones en la fase lipídica y desplazamiento de las proteínas intrínsecas (Mazur, 1980; Watson, 1990). La concentración de los solutos produce la desnaturalización de los componentes de membrana y la deshidratación celular, lo que disminuye su volumen hasta un mínimo donde se compromete la integridad estructural de la célula (Watson, 1990).

Una de las principales características de los espermatozoides crioconservados es la disminución de la proporción de células motiles (Watson, 2000). El proceso de crioconservación espermática, además causa diferentes daños como consecuencia del choque frío, el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular durante la congelación y tras la descongelación (Watson, 2000), un factor que puede minimizar estos daños ocurridos durante la crioconservación es el diluyente de congelación.

2. 11. 5 *Diluyentes*

La viabilidad del semen descongelado siempre será influenciada por la composición de los diluyentes que se sean utilizados durante cualquier proceso de congelación, el principal objetivo que tienen los diluyentes son aportar nutrientes como una fuente de energía, proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento, congelado y descongelado, así mismo, son amortiguadores que impiden cambios perjudiciales en el pH, mantienen la presión osmótica y el balance electrolítico, inhiben la proliferación bacteriana e incrementar el volumen del semen (Hafez y Hafez, 2002).

Los crioprotectores son incluidos en el diluyente de criopreservación con el objeto de reducir el estrés fisiológico y químico que deriva del proceso de congelar y descongelar la célula espermática, y son clasificados en penetrantes y no penetrantes (Purdy, 2006).

Los crioprotectores penetrantes como el glicerol, el dimetil sulfoxido causan un arreglo en los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, lo que resulta en un aumento de la fluidez de la membrana y deshidratación de la célula. Reduce así la formación de hielo intracelular e incrementa la supervivencia de espermatozoides después del proceso de criopreservación (Holt, 2000; Purdy, 2006).

Por otra parte, los crioprotectores no penetrantes como la leche y la yema de huevo; como su nombre lo indican no atraviesan la membrana plasmática, sino que actúan de manera externa disminuyendo la formación de hielo extracelular (Aisen *et al.*, 2000).

En el caso de la criopreservación de espermatozoides de cerdo, el glicerol y la yema de huevo son utilizados de manera simultánea en los diluyentes de congelación para una mayor protección; pero a pesar de que el glicerol protege a la célula espermática también induce efectos tóxicos y de estrés osmótico, 6% en cerdos (Purdy, 2006) y debe agregarse en la segunda fracción de diluyente después de la fase de refrigeración del semen (Medeiros *et al.*, 2002).

La yema de huevo tiene una propiedad la cual le brinda una protección a la célula espermática y la integridad de su membrana plasmática del daño causado por el choque frío durante el proceso de congelado y descongelado, este mecanismo de protección se determina por los fosfolípidos y la baja densidad de lipoproteínas (Medeiros *et al.*, 2002; Purdy, 2006).

Los carbohidratos como la glucosa, lactosa, dextrosa o sacarosa y que normalmente son utilizados en este tipo de procesos por la característica principal la cual consiste en que no atraviesan la membrana plasmática e inducen la deshidratación de la célula, logrando así disminuir la formación de cristales de hielo intracelulares. Los azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática, incrementado así la supervivencia del gameto al proceso de criopreservación (Kundu *et al.*, 2002).

2. 12 Métodos de preparación y separación espermática

2. 12. 1 Revisión bibliográfica

El inicio de la reproducción asistida hace un cuarto de siglo, requería el aislamiento de espermatozoides móviles, y a medida que la reproducción asistida avanzaba el interés por investigar y entender la fisiología de la célula masculina (Henkel y Schill, 2003), la demanda de técnicas de reproducción asistida creció dramáticamente con el creciente número de hombres que mostraban mala calidad de semen; por lo tanto los científicos y médicos fueron instados a desarrollar una amplia gama de diferentes técnicas de laboratorio centradas en la selección y enriquecimiento de la motilidad y funcionalidad espermática del eyaculado (Henkel, 2013). Los primeros métodos de separación de espermatozoides consistían de uno o dos procedimientos de lavado con una posterior resuspensión de células germinales masculinas (Edwards *et al.*, 1969; Lopata *et al.*, 1978), posteriormente Mahadevan y Baker (1984) describieron un solo lavado seguido de un procedimiento llamado swim-up hasta formar un pellet de células de un sedimento.

Parrish *et al.* (1986) fueron de los primeros en utilizar este método de swim-up en semen congelado-descongelado de bovino con el objetivo de utilizarlo en un sistema de Fertilización *In Vitro* (IVF) del cual se obtendría una población de espermatozoides con un alto porcentaje de motilidad y así utilizarlos en ovocitos maduros *in vitro*.

Las técnicas sencillas de separación inicial ya no eran suficientes y se debían desarrollar nuevas técnicas mejoradas de separación espermática, persiguiendo dos objetivos principales: (i) eliminar el plasma seminal que contiene sustancias inhibitoras de la capacitación, prostaglandinas, agentes infecciosos y proteínas antigénicas; (ii) separar los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los leucocitos, de células germinales inmaduras y de otras células redondas (Sánchez *et al.*, 2009).

Si bien la eficacia de un método de preparación de espermatozoides se suele medir por la concentración de espermatozoides móviles totales recuperados, es importante también asegurar evitar o minimizar la presencia de microorganismos derivados del semen y la exposición a otros factores iatrogénicos (Álvarez, 2005).

La finalidad de cualquier proceso de separación es seleccionar los espermatozoides móviles morfológicamente normales y mejorar la calidad de los mismos, porque disminuye la liberación de linfocinas y reduce la formación de radicales libres (Ombelet *et al.*, 2003), de esta forma el adecuado procesamiento de la muestra va a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto *in vivo* como *in vitro* y será fundamental para el éxito de la reproducción asistida (Rogers *et al.*, 1983; Mortimer, 2000).

2. 12. 2 Técnicas de separación de espermatozoides

La preparación de los espermatozoides es un requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida, tanto inseminación artificial o inseminación *in vitro*, o alguna otra técnica, es importante mencionar que desde el nacimiento de Louis Brown el 25 de julio de 1978 y la posterior aparición de estas técnicas de reproducción asistida, al menos en el ser humano, los científicos y médicos de esas épocas se interesaban más por mejorar las técnicas de separación de espermatozoides (Henkel y Schill, 2003).

Bajo condiciones *in vivo* los espermatozoides potencialmente fértiles son separados de los espermatozoides inmóviles, detritus y plasma seminal en el tracto femenino por la migración activa en el moco cervical (Mortimer, 1989). Durante este proceso no solo se seleccionan los espermatozoides con movilidad progresiva, sino que estas células también experimentan cambios fisiológicos llamados capacitación, que es un requisito fundamental para la competencia funcional del espermatozoide con respecto a la reacción acrosomal (Henkel y Schill, 2003).

Como ya se mencionó, durante la década de 1980 con la introducción de la reproducción asistida especialmente FIV en humanos y tras el desarrollo del método clásico de swim-up por Mahadevan y Baker, se desarrollaron técnicas más complejas para aumentar el número de espermatozoides móviles aun en los casos más graves. En un principio estas técnicas se pueden diferenciar en técnicas de migración, centrifugación en gradiente de densidad y filtración, para todos los métodos de migración, el movimiento de autopropulsión de los espermatozoides es un requisito esencial, mientras que para las técnicas de centrifugación y filtración por gradiente de densidad la metodología se basa en una combinación de la motilidad y su retención en los bordes de fase y adhesión a las matrices de filtración, respectivamente (Henkel y Schill, 2003).

Existen requisitos que debe cumplir la técnica ideal de separación la cual debe ser rápida, fácil y rentable, aislar los espermatozoides tanto móviles como sea posible, no causar daño espermático, eliminar sustancias tóxicas y células muertas o reactivos específicos de oxígeno (ROS) y permitir el procesamiento de mayores volúmenes de eyaculado (Henkel y Schill, 2003), dado que ninguno de los métodos que se encuentran disponibles satisfacen todos los requisitos, es importante utilizar variedades de las técnicas de separación para obtener un rendimiento óptimo de los espermatozoides para los propósitos que se deseen.

Se sabe, que el plasma seminal reduce la vida media y útil del espermatozoide, por lo tanto, cuando se requiere la conservación espermática, refrigerado o congelado, el plasma seminal debe ser removido tanto como sea posible, esto se hace usualmente mediante la centrifugación a bajas velocidades, entre 400 y 900 g, de esta manera no debe ocurrir daño a la membrana o al ADN (Lengele, 2015). Asimismo, este plasma seminal es responsable de la capacitación del espermatozoide al cual este proceso le brinda la capacidad de ser fértil (Lengele, 2015).

2. 12. 2. 1 *Método de dilución y lavado de semen*

Es un método sencillo y de fácil utilización el cual ayuda a mejorar la calidad de las muestras en cuanto a número y motilidad de los espermatozoides para la inseminación artificial (Boomsma *et al.*, 2004). El procedimiento consiste básicamente en el lavado de semen con un medio estéril añadido con albumina humana, después de la licuefacción completa de la muestra todo el volumen se divide en fracciones de no más de 2 ml en tubos de centrifugación, es mezclado suavemente con una pipeta estéril y se someten a una centrifugación de 300 g durante 10 minutos, una vez terminado el tiempo se retira el sobrenadante cuidadosamente; el pellet formado se vuelve a re-suspender en 1 ml del medio ya mencionado, se mezcla y se centrifuga nuevamente solo 5 minutos a 300 g. El sobrenadante vuelve a ser retirado y el sedimento es re-suspendido en medio para la IA (Natali, 2011).

Es muy importante determinar el recuento y motilidad para cualquier aplicación futura, a pesar de la simplicidad y velocidad del método, hay que recordar que la repetición de centrifugaciones sin la separación de los espermatozoides de calidad del resto del plasma seminal, puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y un daño de la función de los espermatozoides (Natali, 2011).

2. 12. 2. 2 *Métodos de centrifugación por gradientes de densidad*

Es un método de centrifugación que ayuda a separar los espermatozoides muertos no viables de los espermatozoides vivos y viables, además ayuda a separar otro tipo de partículas, entre ellos, células, virus, piel, o células sanguíneas (Lengele, 2015).

Los primeros estudios de Beatty (1964) reportaron que la utilización de la sílice coloidal permitió la separación isopícnica de los espermatozoides, sin embargo, la fertilidad de estas células presentaba problemas, fue solo hasta que el advenimiento de la sílice coloidal se modificó a finales de los 70s cuando este método se hizo útil (Mortimer, 2000). Partículas de sílice de revestimiento con polivinilpirrolidona (PVP) fueron introducidas por Hakan Pertoft y comercializado como Percoll (Pertoft's Colloid), el cual se utilizó para hacer gradientes de densidad para preparaciones de esperma a partir de los 80s (Mortimer, 2000).

Esta técnica es preferida para seleccionar el mayor número de espermatozoides móviles en casos de oligozoospermia severa, teratozoospermia o astenozoospermia, porque se ha podido seleccionar espermatozoides de buena calidad, pudiendo separarlos de espermatozoides muertos, leucocitos, y otros componentes del plasma (Natali, 2011).

Los gradientes disgregan las partículas en función de su densidad de flotación, así los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una posición en la que la densidad es igual a la de su entorno donde ya no puede desplazarse más, a esto se le conoce como situación de flotabilidad neutra. Los

espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad el cual se encuentra al fondo del tubo; el plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las células, espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan entre los dos gradientes (Sánchez *et al.*, 2009).

La mayoría de los gradientes de densidad utilizados en la actualidad parten de una suspensión coloidal de partículas de sílice unidas de forma covalente a moléculas de silano, utilizadas en forma discontinua en soluciones isotónicas a una concentración del 80 y del 40% y pueden adquirirse ya preparadas; existen varios medios comerciales en el mercado utilizados para la centrifugación por gradiente de densidad, incluyendo Percoll®, BoviPure®, PureSperm 100®, etc., estos llegan a variar el tipo de revestimiento y solución que contienen (Samardzija *et al.*, 2006).

La mayoría de los protocolos tienen el mismo origen, el cual requieren que dos o más soportes se sobrepongan, es decir, una capa inferior y una capa superior, con la muestra de semen sobrepuesta en la parte superior, las muestras son por lo general centrifugadas a 300 g durante 15 o 20 minutos (Sánchez *et al.*, 2009; Natali, 2011); pasado este tiempo se elimina la capa seleccionada y se superpone a otra capa de gradiente de densidad volviéndose a repetir el proceso; éste puede durar mucho tiempo y comparado con otros procedimientos se considera relativamente “complejo” el daño al ADN puede o no ocurrir debido a la centrifugación o al tipo de medio utilizado (Allamaneni *et al.*, 2005; Ghumman *et al.*, 2011). Si bien, la mayor parte de los efectos negativos de la centrifugación se pueden evitar debido a la acción de amortiguación del medio de centrifugación; los beneficios del método sobre otros, nos ofrece la separación no espermática del eyaculado, disminuyendo significativamente la cantidad de detritus, que otros métodos pueden quedar cortos en la obtención de los mismos (Phillips *et al.*, 2012).

2. 12. 2. 3 Métodos de adherencia y filtración

La filtración con fibra de vidrio fue utilizado con un enfoque diferente por Paulson y Polakoski (1977), ellos lograron separar los espermatozoides móviles de los inmóviles por medio de fibras de lana de vidrio densamente empaquetadas; el principio para la separación de los espermatozoides móviles de los inmóviles, detritus y leucocitos, no solo descansa en el movimiento autopropulsado de los espermatozoides, sino también en una filtración (Henkel, 2013).

El efecto de las fibras de lana de vidrio consiste en una retención mecánica de las partículas más grandes en el eyaculado, así como la adhesión de estas partículas a la superficie de las fibras de vidrio (Sánchez *et al.*, 1996). Por lo tanto, el tipo de fibra de vidrio utilizada desempeña un papel importante en el éxito de esta técnica, ya que no es posible utilizar cualquier tipo de lana de vidrio para el procesamiento de esperma (Henkel, 2013).

Este proceso de adhesión y filtración es una característica de la filtración en fibra de vidrio que puede contribuir a la selección de los espermatozoides con núcleos maduros, es decir, con buena condensación de la cromatina (Henkel, 2013). Grunewald *et al.* 2007 desarrollaron una fibra de vidrio, que activaron químicamente para que se uniera a una proteína celular, la Anexina V; esta proteína se fija externamente a un fosfolípido llamado fosfatidilserina, la cuál que se encuentra en la membrana plasmática de las células, y la cual es un indicador de apoptosis (Henkel, 2013); aún queda por ver los datos clínicos que apoyan la eficacia de esta nueva fibra de vidrio activada molecularmente.

Estos métodos no deben ser directamente perjudiciales para los espermatozoides siempre y cuando no exista un proceso de lavado previo, sin embargo, se puede considerar que cualquier método que emplee fibras de vidrio pudiera contaminar con fragmentos el producto final, así que pudiera considerarse un método con que dispone de estudios limitados sobre selección y separación de espermatozoides, y la competencia funcional de las poblaciones separadas.

2. 12. 2. 4 *Método de migración: Swim-Up*

La técnica original del swim-up que ha sido utilizada por los investigadores que estudian la fisiología del espermatozoide mamífero desde los años 50s mencionan que consiste en tener semen centrifugado y por encima colocar medio de cultivo, Mortimer en el 2000 no lo menciona, sin embargo se sospecha sea de un medio compatible en pH al moco vaginal , tenerlo durante un periodo de incubación que puede variar de 15 a 60 minutos depende la aplicación; el fundamento que se tenía era que los espermatozoides progresivamente móviles migrarían de la capa de semen al medio de cultivo, la inclusión de este paso de migración se considera que es funcionalmente equivalente al proceso por el cual los espermatozoides escapan del eyaculado y colonizan el moco cervical (Mortimer, 2000).

Mahadevan y Baker (1984) denominaron este método como swim-up convencional; este método se había utilizado con éxito en muchas clínicas de fertilización alrededor del mundo con excelentes tasas de fertilización, aún se utiliza para las técnicas de reproducción asistida, incluyendo la inseminación intrauterina.

En resumen, la técnica de swim-up es otro método de separación de espermatozoides viables, morfológicamente normales de un eyaculado, estandarizado por Parrish y Foote (1987). Este método utiliza un medio nutriente que se acumula en la parte superior del semen y luego se incuba; después de esta etapa de incubación, la capa superior contiene los espermatozoides progresivamente móviles y morfológicamente normales (Lengele, 2015). Las ventajas que ofrece esta técnica son: es un proceso muy simple de separación, económico y relativamente rápido, así como proporcionar espermatozoides con alta motilidad y disminución de porcentajes de espermatozoides anormales (Jameel, 2008).

Sin embargo, una desventaja es que no proporciona un gran número de espermatozoides para trabajar y las muestras obtenidas con la técnica de swim-up aplicada tendrían bajas concentraciones espermáticas (Len *et al.*, 2010).

Jameel (2008) menciona que cuando se trabaja con muestras de semen normales, sin problemas con la motilidad o baja concentración, el método de swim-up puede ser el preferido debido a su facilidad de desempeño.

El protocolo estándar de la técnica de swim-up implica una etapa de incubación durante una hora en un ambiente controlado: 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ (Parrish y Foote, 1998; Jameel, 2008). Sin embargo, existe evidencia que una incubación corta puede ser igual de efectiva que la hora estándar (García-López *et al.*, 1995). La técnica típica es mezclar 1 ml de la muestra de semen centrifugado con 4 ml del medio VIF el cual contiene 10 mg/ ml de albúmina sérica o suero inactivado al 10% el cual es centrifugado durante 10 minutos a 300 g, el sobrenadante es retirado cuidadosamente y se desecha; para esta etapa es de gran importancia no aspirar las partes del pellet producido que se encuentra al fondo del tubo, ya que daría un rendimiento menor en motilidad; posteriormente, se coloca 0.5 – 1.0 ml de medio fresco deslizándolo por el tubo inclinado en un ángulo de 45° lentamente hasta colocarlo en la parte superior del pellet (Henkel, 2013). Trascorrido el tiempo de incubación, que ronda 30 -50 minutos, se recaptura el medio que se colocó sin alterar al pellet, el cual puede ser algo suave post-incubación. Lo ideal es obtener fracciones espermáticas con motilidad >90 %utilizando la técnica (Henkel, 2013).

El medio Tyrodes complementado con piruvato y albumina (TALP) es un medio originalmente usado en semen de toro, y a menudo es utilizado junto con la fertilización *in vitro* debido a su función secundaria eficaz de actuar como medio de capacitación con o sin la albumina de suero bovino que se incluye (Lengele, 2015).

Existen variaciones sobre este tema y la mayoría es basándose en la capacidad de los espermatozoides móviles para desplazarse en una suspensión, ya sea en eyaculados frescos, o muestras pre-lavadas y formándose un pellet dentro de un medio o diluyente de diferente composición (Mortimer, 2000). Los espermatozoides se eliminan efectivamente del plasma seminal, de tal manera que la población original queda por debajo de una subpoblación encontrada dentro del medio de migración (Mortimer, 2000). Por lo tanto, la selección está basada en la capacidad para ser móviles y como tal, no proporciona ninguna selección basada en la morfología espermática o bien integridad de la cromatina y acrosoma (Somfai *et al.*, 2002).

Los espermatozoides que presentan anomalías en la cola y que dificultan su capacidad de nadar no migraran al medio nutritivo, además es posible que la migración hacia medios que contienen ácido hialurónico también puede seleccionar espermatozoides con membranas intactas, y que por lo tanto la migración por swim-up debería ser considerada como una técnica de selección en lugar de una técnica de separación (Morrell, 2009).

En general la principal desventaja de cualquier método de migración es la baja tasa de recuperación que va entre 10 y 20 % (Morrell, 2009) por lo tanto no es práctico para la preparación de dosis de IA en la mayoría de las especies animales.

El procedimiento de swim-up se utiliza en la actualidad de forma rutinaria para la preparación de subpoblaciones de espermatozoides móviles en técnicas de reproducción asistida (ART) tanto en humanos como en otras especies, sin embargo, este procedimiento no es tan extendido en semen de verraco; se ha reportado que no han existido cambios en la motilidad después del procedimiento de swim-up (Morales, 2012).

2. 13 Enfriado pre-congelación a temperaturas bajo cero

El enfriado a temperaturas por debajo de los cero grados y cercanas al punto de congelación de los espermatozoides en diluyentes específicos para congelación, tiene como finalidad dar a la célula el tiempo suficiente para reacomodar cambios en su estructura ocasionados por la transición de fase de lípidos que conforman la membrana plasmática, esto sin que suceda la pérdida de la permeabilidad selectiva de la célula. (Alcántar, 2015).

Este proceso de aproximación experimental se ha empleado en diversos trabajos con varias especies, los resultados han sido contrastantes. El enfriado pre-congelación en el rango de -2 a -5°C ha mejorado la criosupervivencia de los espermatozoides de caprino (Medrano *et al.*, 2001), ovino (Ríos, 2005) y porcino (Garzón-Pérez *et al.*, 2010).

En contraste, el enfriado a -3°C no produjo ningún efecto sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos (Contreras-Méndez y Medrano, 2016). Así mismo, no se produjo ningún efecto sobre la criosupervivencia de espermatozoides de cerdo enfriados a -3 y -5°C (García, 2015) y enfriando a 5°C y -5°C (Orozco, 2016).

Las variaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de las distintas especies animales podrían explicar parcialmente estos resultados reportados (Parks y Lynch, 1992).

3. Justificación

La aplicación de técnicas para la separación de espermatozoides, sirven en gran medida para su evaluación ya que es de suma importancia saber si las células que se están evaluando en realidad están vivas y más si los cambios en la función o la estructura no están relacionados con la muerte celular; es por esto que este trabajo se basa en la evaluación de poblaciones viables de espermatozoides posterior a la técnica de swim-up dentro del laboratorio de investigación.

4. Objetivos

General

Comparar la eficiencia de dos variantes de la técnica de separación espermática swim-up en semen de cerdo fresco y descongelado.

Particulares

1. Establecer la concentración espermática más adecuada para llevar a cabo la separación de los espermatozoides viables empleando dos variantes de la técnica swim-up: tradicional vs botón.
2. Comparar diferentes tiempos de incubación sobre la eficiencia de la técnica de separación espermática swim-up.
3. Comparación de las dos variantes de la técnica de separación espermática swim-up: tradicional vs botón en cuanto a calidad espermática: motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, en semen fresco y descongelado.

5. Materiales y métodos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio No. 2 de Reproducción Animal de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, ubicada en la Carretera Cuautitlán–Teoloyucan km 2.5, San Sebastián Xhala, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

5.1 Obtención y transporte del semen

En el experimento se utilizaron 17 eyaculados de semen fresco provenientes de 3 verracos híbridos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la FMVZ de la UNAM localizado en el municipio de Jilotepec, Estado de México. Los eyaculados se obtuvieron mediante la técnica de la “mano enguantada” descrita por Hancock y Howell (1959).

Cabe mencionar que los eyaculados fueron colectados los días lunes y miércoles entre las 8:00 y 9:00 a. m.

Una vez obtenido, el eyaculado se diluyó (1:1 v/v) en un diluyente comercial Androstar® Plus (Minitube, Tiefenbach, Alemania), para ser transportado en recipientes aislados (termos) con camas de gel, estando a una temperatura inicial de 32°C, evitando de esta manera cambios bruscos de temperatura durante su traslado.

Una vez llegado el material biológico se dejó 30 minutos a temperatura de cuarto, alrededor de 22°C, y posteriormente se realizó la evaluación el semen como se describe enseguida.

5.2 Evaluación del semen

5.2.1 Evaluación Macroscópica

La evaluación macroscópica se realizó considerando las siguientes variables:

a) Volumen: el eyaculado fue medido en un matraz Erlenmeyer en ml.

b) Color, olor y aspecto: se observaba el color, olor y aspecto del eyaculado, poniendo atención en los colores rojizos, pardos, grises, amarillentos o con presencia de flóculos de pus, que denotan contaminación de la muestra seminal.

c) Consistencia: el eyaculado se clasificó como cremoso, lechoso o acuoso.

5.2.2 Evaluación Microscópica

La evaluación microscópica se realizó considerando las siguientes variables:

i) Motilidad masal: La motilidad o calidad del movimiento en masa se valoró mediante la colocación de una gota del semen (diluido 1:1 v/v en Androstar) en el centro de un

portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a una temperatura de 37°C; se observó al microscopio óptico (Leica®) a un aumento 10X el borde de la gota dándole un valor de 1 a 3 considerando los siguientes criterios:

0	Ondas inexistentes, espermatozoides inmóviles
1	Espermatozoides móviles, pero no alcanzan a formar ondas
2	Formación de ondas, pero muy lentas
3	Formación de ondas que se mueven rápidamente

(González-Urdiales *et al.*, 2006)

ii) Motilidad progresiva

Para seguir realizando la evaluación microscópica fue necesario realizar una dilución 1:10 (9 partes de medio BTS [Beltsville Thawing Solution] y 1 parte del semen).

Se dejó durante 10 minutos en baño maría y se procedió a realizar las siguientes pruebas. Cabe mencionar que el stock del medio BTS se mantuvo bajo refrigeración, pero para su uso se colocaba en el baño maría a 37°C para ser utilizado, una vez alcanzada esta temperatura.

Trascurridos los 10 minutos en el baño maría, se tomaba una gota de la dilución descrita con anterioridad y se colocaba en un portaobjetos, posteriormente se colocaba un cubreobjetos, ambos calentados previamente en una platina térmica a 37°C, enseguida se observó al microscopio óptico Leica® con el aumento 10X y 20X.

Esta evaluación se hizo visualmente estimando la proporción de espermatozoides con movimiento rectilíneo y progresivo; se asignaron valores de 0 a 100%.

iii) Concentración espermática

Se realizó una dilución 1:200 (1990 µl de solución salina formolada al 0.3%, esto para suprimir la motilidad espermática, más 10 µl de semen diluido 1:1 v/v). Para el conteo se utilizó la cámara de Neubauer; una vez que se llenaron ambos lados de la cámara, se dejó reposar 5 minutos hasta que los espermatozoides se asentaran. Enseguida se procedió a realizar el conteo de espermatozoides que se encontraban en los 10 cuadros a contar de las dos cuadrículas de la cámara, obteniendo así la concentración espermática resultante de la siguiente ecuación:

Concentración espermática por ml = \sum No. de espermatozoides en los diez cuadros x 10 millones/ 2.

iv) Viabilidad con la tinción Eosina/Nigrosina (vivos/muertos)

Esta prueba se realizó tomando una gota de la dilución de semen en BTS (1:10) y colocándolo en un porta-objetos calentado previamente a 37°C, y a un lado se colocó de igual manera una gota de la tinción Eosina/Nigrosina a 37°C; se mezclan ambas gotas durante unos segundos y se hizo un frotis de capa delgada, se dejó secar bajo un ventilador y se observó al microscopio óptico con el aumento de 100X, se contaron 200 células en total de cada frotis.

El fundamento de esta prueba es que los espermatozoides vivos no se tiñen porque la membrana plasmática está intacta, se aprecian de color blanco, mientras que los espermatozoides muertos se tiñen de color rosa porque la membrana plasmática ha perdido su permeabilidad selectiva (Barth y Oko, 1989).

v) Morfo-anomalías espermáticas

Para esta evaluación fue necesaria la utilización del mismo frotis utilizado para evaluar la viabilidad; los espermatozoides se clasificaron como:

Normales

Anormalidades primarias: macrocéfalos, microcéfalos, cola doble, etc.

Anormalidades secundarias: la gota citoplasmática, colas en forma de gancho, colas con ángulos, etc.

Se contabilizaron 200 células y el resultado se expresó en porcentaje de cada tipo.

vi) Funcionalidad de la membrana plasmática mediante la prueba de la hinchazón hiposmótica (HOST)

En un tubo de microcentrífuga (tipo Eppendorf) se agregaron 100 µl de solución hipo-osmótica (60 mOsm/kg), y 100 µl de la dilución de espermatozoides en BTS; se mezcló de manera homogénea y se mantuvo en baño maría por 30 minutos, pasando este tiempo se le agregó 10 µl de glutaraldehído al 0.4% para fijar; posteriormente se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos previamente calentado, así mismo, se colocó un cubreobjetos para poder observarse al microscopio óptico con el aumento de 100X.

La interpretación de esta prueba es que los espermatozoides con membrana funcional presentan un enrollamiento de la cola en la parte media o terminal; por el contrario, los que no presentaron este efecto indica que su membrana ya no es funcional (Barth y Oko, 1989). El resultado se expresó en porcentaje contabilizando 200 células en total en cada preparación.

vii) Integridad del acrosoma mediante microscopia de contraste de fases

En un tubo de microcentrífuga (tipo Eppendorf) se mezcló 100 µl de glutaraldehído al 0.4% y 100 µl de la dilución de espermatozoides en BTS, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente, posteriormente se tomó una gota para colocarla entre el portaobjetos y el cubre objetos calentados

previamente como ya anteriormente se ha citado, se observó en un microscopio equipado con contraste de fases marca Leica® con el aumento de 100X.

Esta evaluación se realizó contabilizando 200 células; se observó el borde apical, si éste era liso y bien definido el acrosoma se considera intacto, si el borde apical era incompleto, rugoso, craterizado o ausente se consideró como acrosoma dañado (Pursel *et al.*, 1972).

viii) Integridad de la membrana plasmática mediante las tinciones fluorescentes SYBR14/Ioduro de Propidio (PI)

La determinación de la integridad de la membrana de los espermatozoides descongelados se realizó utilizando las tinciones fluorescentes SYBR14/Ioduro de Propidio (PI) (Molecular Probes, USA). Se tomaron 50 µl de semen y se colocaron en un tubo de microcentrifuga (tipo Eppendorf), posteriormente se adicionaron 5 µl de SYBR14 (diluido a 100 nMol en Lactosa– Yema de huevo), enseguida se le agregó 5 µl de Ioduro de Propidio (12 µMol) y 5 µl de glutaraldehído al 0.4%, este último con la finalidad de inmovilizar a los espermatozoides y poder llevar a cabo el conteo con el microscopio equipado con lámpara de fluorescencia (Leica DMLS®).

Se realizó el conteo a 200 células, donde, las células espermáticas que presentaban una fluorescencia en color verde se consideraban vivos, mientras que los espermatozoides muertos presentaban una fluorescencia de color rojo, esto se observó con el objetivo 100X y el resultado se expresó en porcentaje.

Preparación del medio Tyrodes

Se preparó medio Tyrode (Anexo 1) el cual era conservado en congelación; antes de su utilización, fue descongelado en baño maría a una temperatura de 37°C, una vez descongelado se gasificó durante 2 minutos con CO₂, se añadió Piruvato (0.2 M 5 µl/ml) y Albumina Sérica Bovina (BSA 5 mg/ml), con este proceso el medio Tyrode se convierte en medio TALP (Anexo 2). Terminado este proceso se introdujo a la incubadora a 38°C y una atmósfera de 5% de CO₂, aquí se mantuvo hasta su utilización.

Separación espermática pre y post descongelado mediante la técnica de Swim-up

Se tomaron cuatro tubos de ensaye (a, b, c, d) a los cuales se les agregó 1 ml de semen; dos de ellos se centrifugaron a 500 g/ 5 minutos, una vez que salieron de la centrifuga se retiró el sobrenadante quedando al fondo el botón espermático con la cantidad de espermatozoides anteriormente calculada (600 x 10⁶ células/ml.); se agregó 500 µl de medio TALP y se introdujeron a incubación a 38°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 30 (tubo a) y 45 minutos (tubo b).

Por otra parte, con los otros dos tubos restantes solamente se agregó medio TALP sin pasar por el proceso de centrifugación, y de igual manera se introdujeron a incubación a 38°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 30 (tubo c) y 45 minutos (tubo d).

Una vez pasando ambos tiempos, de cada tubo se retiraron 200 µl de la superficie y se realizó la evaluación de los espermatozoides considerando: motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad, integridad del acrosoma y la integridad de la membrana plasmática.

6. Diseño experimental

El trabajo se dividió en tres etapas:

Etapas 1. Comparación de diferentes tiempos de incubación para la realización de la técnica swim-up en semen fresco de cerdo

En esta etapa se siguieron utilizando los 6 cerdos iniciales (un eyaculado de cada uno) y dependiendo de su disponibilidad, de acuerdo al manejo que se les da en el CEIEPP, se logró hacer entre 2 y 3 repeticiones solo de los 3 mejores machos.

Para esta primera etapa, el semen se obtuvo, transportó y procesó como ya se ha mencionado; a su llegada al laboratorio se anotó en la bitácora los datos del cerdo donador del semen (nombre, número de eyaculado, volumen, fecha, hora de entrega y hora de llegada al destino), una vez terminado el tiempo de atemperado del semen, se prosiguió a evaluar la motilidad masal, asimismo, se realizó una dilución 1:10 (9 partes de medio BTS y una parte de eyaculado) (Anexo 3) para la evaluación de la motilidad progresiva, concentración espermática. Enseguida, el semen fue centrifugado a 500 gravedades durante 5 minutos para retirar el plasma seminal y el medio de transporte; el sobrenadante fue retirado y el pellet formado fue re-suspendido en medio BTS hasta 2 ml como máximo para medir la concentración espermática; se tomó la décima parte y se ajustó a 100×10^6 espermatozoides por mililitro.

Experimento I. Se tomaron 2 ml de semen en medio BTS y se añadió 500 µl de medio TALP de manera suave por las paredes hasta lograr que el medio quedara por encima del semen, el tubo fue colocado con una inclinación de 45° y se introdujo a incubación durante 30 y 60 minutos.

Experimento II. Se tomó 1.0 ml de semen ajustado a 100×10^6 células/ml y se le añadió 1.0 ml de medio TALP de manera suave por las paredes hasta lograr que el medio quedara por encima del semen (variante “tubo”); en otro tubo se colocó 1.0 ml de semen ajustado a 100×10^6 células/ml y se centrifugó a 500 gravedades por 5 minutos, enseguida se añadió suavemente 1 ml de medio TALP evitando en lo posible deshacer el pellet (variante “botón”). Ambos tubos fueron incubados durante

15, 30, 45 y 60 minutos; posterior a la incubación en los tiempos ya mencionados se tomó cuidadosamente de ambos tubos aproximadamente 200 μ l del medio TALP ubicado en la superficie, para poder evaluar la motilidad progresiva.

Experimento III. Se centrifugaron 2 tubos con 10 ml de semen fresco cada uno a 500 gravedades por 10 minutos: uno de ellos con el pellet formado (variante “botón”) se le añadió 500 μ l de medio TALP de manera suave por las paredes hasta lograr que el medio quedara por encima del pellet, el otro tubo fue ajustado a 100×10^6 células/ml agregando medio TALP, entonces ambos fueron incubados durante 45 minutos. Posterior a la incubación se tomó cuidadosamente de ambos tubos aproximadamente 200 μ l del medio TALP ubicado en la superficie, para poder evaluar la motilidad progresiva, viabilidad, funcionalidad de la membrana, integridad del acrosoma, concentración y morfoanomalías.

Etapas 2. Crio-conservación de espermatozoides de cerdo enfriados a dos temperaturas pre-congelación y evaluación de su crio-supervivencia

El manejo del semen fue similar a la primera etapa ya descrita; una vez anotados los datos en la bitácora se pudo determinar a los mejores tiempos de incubación, la concentración espermática de una de las variables antes y después a la técnica de separación espermática, de igual manera pudimos seleccionar a los mejores machos donadores de semen; siendo 30 y 45 minutos nuestros tiempos de incubación a una atmosfera de 5.0 % de CO₂, 38°C.

Para cada tiempo y tubo en incubación se evaluó motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad espermática y anomalías espermáticas mediante tinción de eosina-nigrosina, integridad del acrosoma mediante microscopio de contraste de fases y prueba de HOST, todos los datos fueron expresados en porcentajes y anotados en la bitácora.

Crio-conservación de los espermatozoides

Enfriado

El procesamiento del semen fue similar al de las etapas anteriores; el semen era atemperado al medio ambiente del laboratorio, una vez aclimatado se prosiguió con la evaluación de la motilidad masal, motilidad progresiva, viabilidad espermática, prueba del hinchamiento hiposmótico (HOST), integridad del acrosoma y concentración espermática; terminada la evaluación correspondiente se prosiguió a la centrifugación, 600 gravedades durante 10 minutos, en una centrifugadora Centrificient IV™ (CRM Globe) (Foto 1).

Una vez que terminó el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante de los 10 tubos introducidos, el pellet se resuspendió con la Fracción I del diluyente Lactosa- Yema de huevo (Anexo 4) sin glicerol hasta un máximo de 1 ml en cada tubo, se realizó el conteo de la concentración espermática y se ajustó a 1200×10^6 células/ml.

Ajustada la concentración espermática se evaluó la motilidad masal y se procedió al enfriado lento de los espermatozoides hasta alcanzar una temperatura de entre 5 y 7°C en aproximadamente 180 minutos. Cuando se alcanzó la temperatura deseada se agregó la Fracción II del diluyente con el 6% de glicerol, esto realizado en tres tiempos, cada uno con un periodo de 10 minutos entre cada uno, para al final tener una concentración espermática de 600×10^6 células/ml en un volumen de 14.4 ml y 3% de glicerol.

Para este proceso se requirió de los siguientes materiales:

Tubos de plástico (polipropileno) para centrifuga de 15 ml, previamente identificados, conteniendo espermatozoides diluidos en el diluyente lactosa-yema de huevo.

Tubos de plástico (polipropileno) para centrifuga de 15 ml con diluyente lactosa- yema de huevo con 6% de glicerol.

Tubo control con diluyente lactosa-yema de huevo con 3% de glicerol el cual fue empleado para monitorizar la temperatura.

Pajillas tipo francés de 0.5 ml marcadas con el nombre del cerdo, fecha del empajillado y con un color diferente para cada tratamiento los cuales fueron:

Tratamiento 1: enfriado a 5°C

Tratamiento 2: enfriado a -5°C.

2 frascos de vidrio (uno con agua destilada y el otro vacío).

Dos recipientes de plástico de 500 ml con agua salina (NaCl 10% p/v); cada recipiente contiene 16 espacios (cilindros de plástico) para introducir las pajillas.

Pipetas Pasteur, papel absorbente, alcohol polivinílico (sellado de pajillas), jeringas con bulbo.

Todo lo anterior se introdujo en un refrigerador el cual contaba con la sonda de un termómetro digital (VWR) (Foto 2).

En este punto se anotaron en la bitácora la hora de inicio de la refrigeración, la temperatura del semen al inicio y la temperatura del refrigerador.

Para el proceso de empajillado, y la adición de la fracción II del diluyente también fueron anotados la hora al inicio de procedimiento y sus respectivas fracciones en tres tiempos, temperatura del semen, el tiempo de duración del procedimiento, hora de termino, temperatura de refrigerador final y temperatura del semen final.

Los espermatozoides diluidos se envasaron en las pajillas francesas de 0.5 ml para tener un total de 24 pajillas; las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico y se colocaron dentro de los 16 espacios que contiene el recipiente, lo que facilita su manejo, ayuda al refrigerado y evita el contacto directo entre ellas, así como, evitar que se tuvieran que secar al momento de sacarlas del recipiente. Se dejaron enfriar hasta 5°C y se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente para su congelación.

Congelación

Las pajillas del tratamiento 1 (5°C) fueron expuestas a vapores de nitrógeno por 15 minutos, esto se hizo empleando una caja de unicel (\approx 5.9 L capacidad) en la cual se colocó una cama de nitrógeno líquido de 8 cm de altura; las pajillas se colocaron sobre unas varillas de cobre a 4 cm por encima del nitrógeno líquido permitiendo así su exposición a los vapores, terminando el tiempo fueron sumergidas en el nitrógeno líquido (-196°C).

Por otra parte, en el caso de las pajillas del tratamiento 2 (-5°C), estas fueron colocadas dentro del recipiente que contenía hielo salino (-12°C) las cuales tenían que alcanzar la temperatura blanco correspondiente, este descenso de temperatura fue monitorizado por la sonda del termómetro digital (VWR) colocada dentro de una pajilla control; una vez alcanzados los -5°C, las pajillas fueron expuestas 15 minutos a vapores de nitrógeno líquido como el anterior tratamiento y de igual manera se sumergieron dentro del nitrógeno líquido.

Las pajillas de ambos tratamientos se agruparon y se almacenaron en un tanque de nitrógeno (Thermo Scientific de Equipar S. A. de C.V.) dentro de gobeletes, estos a su vez en la canastilla correspondiente del termo la cual estaba identificada con un color y un número; se llevó el control mediante registro en una bitácora anotando la fecha, hora, nombre del macho y ubicación de los eyaculados dentro del termo para facilitar su identificación al momento de la descongelación.

Etapas 3. Aplicación de la técnica de separación espermática swim-up en espermatozoides descongelados

Las pajillas fueron descongeladas en el mismo orden en el que fueron congeladas 4 semanas después de su procedimiento de congelación.

Para este proceso se requirió de los siguientes materiales:

4 tubos de ensayo de vidrio grandes,

4 tubos de ensayo de vidrio chicos,

8 tubos de microcentrífuga (tipo Eppendorf) para la utilización en la integridad de la membrana

4 tubos de microcentrífuga (tipo Eppendorf) para la realización de la tinción fluorescente SYBR14/PI

4 tubos de ensayo para medir la concentración espermática

8 pajillas de semen congelado

Procedimiento

1. Para la descongelación se preparaba el baño maría a 37°C, y el material de vidrio necesario.
2. Una vez identificadas las pajillas a descongelar, se sacaban las 4 pajillas de cada tratamiento (una a una) introduciéndolas inmediatamente al baño maría y dejándolas por 30 segundos.
3. Enseguida, se sacaron las pajillas del baño maría y se colocaron en papel absorbente, secándolas suavemente sin frotar, se cortó el tapón de alcohol polivinílico y se vació el contenido en cada tubo de vidrio (dos pajillas por tubo); se realizaron las siguientes pruebas:
 - a) Motilidad progresiva
 - b) Viabilidad espermática por tinción Eosina/Nigrosina
 - c) integridad acrosomal con contraste de fases

Posterior a la evaluación espermática de los cuatro tubos, se tomaron dos de ellos, teniendo un total de 2 ml de muestra de semen descongelado con una concentración de 1200×10^6 esp. /ml; los espermatozoides descongelados fueron introducidos en tubos de plástico para centrifuga y se sometieron a una centrifugación de 500 gravedades por 5 minutos. Enseguida se retiró el sobrenadante de ambos tubos y se realizó un "pool" de ambos obteniendo así una alícuota, a ésta se le agregaron 500 µl de medio TALP y se introdujo a incubación durante 30 y 45 minutos. Por otra parte, los otros dos tubos restantes fueron utilizados para formar un "pool" y por lo tanto una alícuota con características semejantes a las ya descritas en cuanto a volumen total y concentración espermática, de igual manera a esta se le agregó 500 µl de medio TALP y se introdujo a incubación durante 30 y 45 minutos.

Concluido ambos periodos de tiempo de ambas alícuotas, se obtuvieron 250 µl de las superficies de las alícuotas y se realizaron pruebas de:

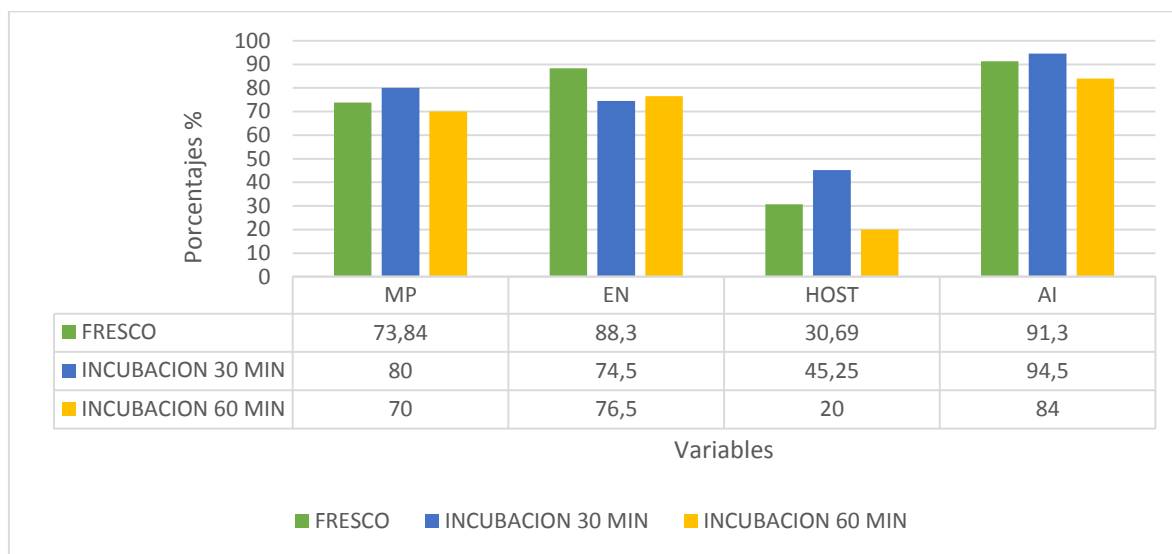
- a) Motilidad progresiva
- b) Viabilidad espermática por tinción Eosina/Nigrosina
- c) Concentración espermática
- d) Determinación de la integridad de la membrana plasmática con tinciones fluorescentes SYBR14/PI
- e) Determinación de la integridad acrosomal con contraste de fases

Ambas alícuotas fueron introducidas al mismo tiempo bajo la técnica de migración espermática swim-up, se llevó un registro de cada pajilla descongelada, por fecha, macho y tratamiento, así como las pruebas que se realizaron para su posterior análisis.

7. Resultados

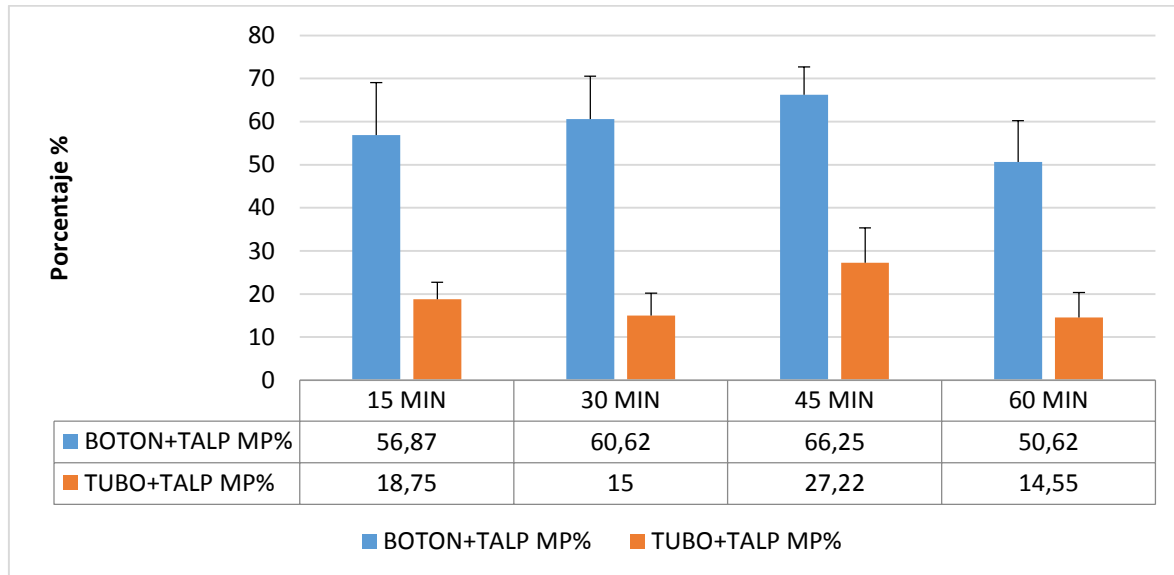
Etapa 1. Comparación de diferentes tiempos de incubación para la realización de la técnica swim-up en semen fresco de cerdo

En la gráfica 1 se muestran los resultados de la incubación a 30 y 60 minutos en cuanto a la motilidad progresiva, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma; hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos de incubación en cuanto a la motilidad progresiva y la integridad del acrosoma.



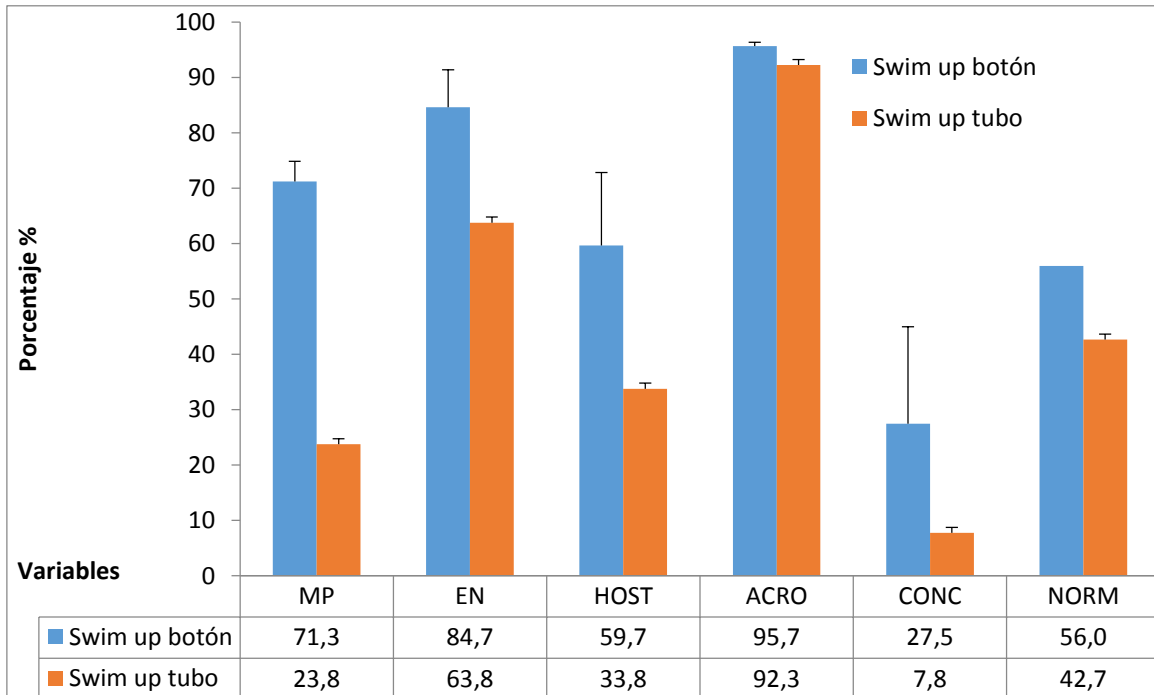
Gráfica 1. Evaluación de la calidad espermática posterior a la técnica swim-up en 2 tiempos (30 y 60 minutos) de incubación. MP=motilidad progresiva, EN= viabilidad mediante Eosina/Nigrosina, HOST= funcionalidad de la membrana plasmática mediante la prueba del hinchamiento hiposmótico, AI= integridad del acrosoma mediante contraste de fases.

En la gráfica 2 se presentan los valores de la motilidad progresiva posterior al swim-up para las dos variantes de la técnica, BOTON+TALP y TUBO+TALP, incubados durante 4 tiempos distintos. Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los métodos de swim-up en todos los diferentes tiempos de incubación; los valores más altos correspondieron a BOTON+TALP en todos los tiempos.



Gráfica 2. Evaluación de la motilidad progresiva (MP) post-incubación (15, 30, 45, 60 minutos) empleando dos variantes de la técnica de swim-up. Los valores son medias \pm error estándar; hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variantes de swim-up en todos los tiempos de incubación.

Con base en el resultado anterior se eligió el tiempo 45 minutos de incubación para hacer una evaluación más detallada de los espermatozoides sometidos a las variantes BOTON+TALP y TUBO+TALP. En la gráfica 3 se presenta la comparación entre las variantes de swim-up, post-incubación (45 minutos), en cuanto a motilidad progresiva, viabilidad, funcionalidad de la membrana, integridad del acrosoma, concentración y morfoanomalías; solamente existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de motilidad progresiva.



Gráfica 3. Calidad espermática post-incubación (45 minutos) empleando dos variantes de la técnica de swim-up. Los valores son medias \pm error estándar; hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variantes de swim-up en la motilidad progresiva.

Etapas 2. Crio-conservación de espermatozoides de cerdo enfriados a dos temperaturas pre-congelación y evaluación de su crio-supervivencia

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la crio-supervivencia de los espermatozoides previo a la separación con la técnica de swim-up. No hubo diferencias entre tratamientos de enfriado pre-congelación (+5, -5°C) para ninguna de las variables evaluadas.

Tabla 1. Crio-supervivencia de espermatozoides de cerdo enfriados a dos temperaturas pre-congelación

Características de los espermatozoides	Temperatura de enfriado pre-congelación	
	+5°C	-5°C
Motilidad Progresiva (%)	22.0 \pm 3.73	22.7 \pm 4.21
Viabilidad (%)	53.0 \pm 5.55	51.7 \pm 4.38
Acrosoma Intacto (%)	30.7 \pm 3.96	38.0 \pm 6.04
Integridad de la membrana plasmática (%)	40.9 \pm 3.83	39.1 \pm 4.69

Los valores son medias \pm error estándar. No hay diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las variables.

Etapa 3. Aplicación de la técnica de separación espermática swim-up en espermatozoides descongelados

En la tabla 2 se presentan las características de los espermatozoides descongelados posterior a la separación con la técnica de swim-up mediante dos métodos (tubo inclinado y botón) y dos tiempos de incubación (30, 45 minutos). No hubo diferencias en ninguna de las variables entre temperaturas de enfriado pre-congelación, ni entre métodos de swim-up, ni entre tiempos de incubación.

Tabla 2. Características de espermatozoides de cerdo crio-conservados, posterior a la separación mediante dos variantes del método swim-up y dos tiempos de incubación

Características de los espermatozoides	Temperatura de enfriado pre-congelación	Método swim up			
		Tubo inclinado 30 min	Botón 30 min	Tubo inclinado 45 min	Botón 45 min
Motilidad Progresiva (%)	+5°C	10.8±2.01	12.5±3.35	10.8±2.01	10.8±4.69
	-5°C	14.2±2.71	5.0±2.58	9.7±2.03	9.2±3.75
Viabilidad (%)	+5°C	54.4±5.72	45.8±4.98	52.6±2.91	42.1±4.01
	-5°C	49.4±4.97	46.8±5.25	51.8±1.94	44.3±3.93
Acrosoma intacto (%)	+5°C	51.2±7.91	40.3±7.99	48.8±7.28	34.8±8.22
	-5°C	44.2±10.72	43.3±8.65	40.5±9.53	33.5±6.72
Membrana plasmática intacta (%)	+5°C	41.0±4.20	27.3±5.76	36.3±2.84	23.3±2.35
	-5°C	39.8±5.78	28.7±5.36	35.1±4.54	22.8±4.42

Los valores son medias ± error estándar. No hubo diferencias en ninguna de las variables entre temperaturas de enfriado pre-congelación, ni entre métodos de swim-up, ni entre temperaturas de incubación.

Es notable que la motilidad progresiva fue menor que la obtenida inmediatamente al descongelado, en contraste la viabilidad fue similar. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto después de la separación con swim-up fue mayor que al descongelado. El porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta después de la separación con swim-up fue similar que al descongelado.

8. DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo fue estandarizar un método de separación de espermatozoides que nos permitiera seleccionar a los móviles y normales. La utilidad de disponer de una población espermática seleccionada es múltiple: fertilización *in vitro*, inseminación artificial intrauterina, y la evaluación de la población de espermatozoides que han sobrevivido al proceso de crio-conservación.

Para esto, se comparó la eficiencia de dos variantes de la técnica de separación espermática swim-up en espermatozoides frescos y crio-conservados; estos últimos, fueron sometidos a dos temperaturas diferentes de enfriado: +5°C y -5°C pre-congelación.

Primero se estableció la concentración espermática, así como el tiempo de incubación adecuados para llevar a cabo la separación de los espermatozoides; la intención era obtener la mayor cantidad de células móviles y vivas. En la primera etapa, la incubación durante 30 minutos produjo mejores resultados que a 60 minutos; aunque el protocolo estándar de la técnica de swim-up recomienda la incubación durante una hora en un ambiente controlado (Parrish y Foote, 1998; Jameel, 2008), una incubación más corta puede ser igual de efectiva (García-López *et al.*, 1995) como se observó en el presente trabajo.

Una vez establecidos los tiempos de incubación, las dos variantes de la técnica de swim-up fueron comparadas; la variante llamada botón (el formado tras la centrifugación) fue mejor que la variante llamada tubo (sin centrifugación). La primera es una modificación del método original descrito por Parrish *et al.* (1986) y Sieme *et al.* (2003). En relación a la cantidad de espermatozoides recuperados por ambos métodos, la variante “botón” permitió recuperar aproximadamente un 25% mientras que la variante “tubo” solo una décima parte, aproximadamente. Se ha reportado que las muestras de semen sometidas a la técnica de swim-up tendrán bajas concentraciones espermáticas (Len *et al.*, 2010).

En el semen fresco fue donde se observó de manera más notable el efecto de la separación con swim-up; sin embargo, en el semen descongelado el efecto fue nulo. Se considera que la centrifugación de forma repetida puede producir especies reactivas de oxígeno (ROS), y en consecuencia un daño de la función de los espermatozoides (Natali, 2011). Esto, aunado al estrés del proceso de crio-conservación explica parcialmente nuestros resultados.

En las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, la separación espermática mediante dos variantes del método swim-up no mejoró de manera notable la calidad de los espermatozoides en el semen fresco, y no tuvo ningún efecto en el semen descongelado.

9. CONCLUSIONES

Establecer una concentración espermática de inicio para identificar qué cantidad de espermatozoides viables tendremos al recapturar posterior a la técnica de separación, nos permite tener un panorama sobre la eficacia entre ambas variables, así mismo, determinar un tiempo de incubación exacto para lograr la capacitación espermática obtenemos una mejor viabilidad y especialización de los mismos.

El enfriando lento a -5°C , previo a la congelación, no mejoro a supervivencia de los espermatozoides descongelados de cerdo, sin embargo,

La centrifugación repetida en diversos procesos daña las células y su funcionamiento, lo que provoca especies reactivas de oxígeno

10. LITERATURA CITADA

Barth AD, Oko R J. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames IA: Iowa State University Press USA.

Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science* 34, 278-283.

Johnson LA, Weitze K.F, Fiser P, Maxwell WMC. 2000 Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62: 143-172.

Watson PF. 1995a The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481-492

Watson PF. 1995b Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7: 871-891.

Morell JM, Rodríguez-Martínez H. 2009. Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. *The Open Andrology Journal*: 1-9

Holt WV, Hernández M, Warrel L, Satake N. 2010 The long and the short of sperm selection in vitro and in vivo: Swim-up techniques select for the longer and faster swimming mammalian sperm. *Journal Evolutionary Biology* 23: 598-608.

Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, Klug E. 2003. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 134-140.

Martí E, Pérez-PE R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2006. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology* 27: 746-753.

E Bussalleu E, Pinart E, Rivera MM, Arias X, Briz M, Sancho S, García-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Yeste M, Casas I, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2008. Effects of Filtration of Semen Doses from Subfertile Boars through Neuter Sephadex Columns. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 48-52.

Ombelet W, Menkvel R, Kruger TF, Steeno O. 1997. Sperm morphology assessment: Historical review in relation to fertility. *Human Reprod. Up*, 1: 543-557.

Hirai M, Boerma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head Morphometric in boar (*Susscrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology* 22: 104-110.

Thurston LM, Wastson PF, Milehan AJ, Holt WV. 2001. Morphologically distant sperm subpopulations defined by founer shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*. 22: 382-394.

Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, del Barrio G. 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction* 60: 32-41.

Trentalance GM, Beorlegui NB. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. 2002. *Andrología* 34: 39-403.

Sills ES, Wittkowski KM, Tucker MJ, Perloe M, Kaplan CR, Palermo GD. Comparison of centrifugation- and noncentrifugation-based techniques for recovery of motile human sperm in assisted reproduction. 2002. *Archives of Andrology* 48: 141-145.

Levis DG. Liquid Boar Semen Production: Current Extender Technology En: Semen Boar Preservation IV. L.A. Johnson and H. D. Guthrie, eds. Alle Press, Inc. Lawrence, KS. 2000. pp. 121-128.

Alcántar A. 2015. Evaluación de la criosupervivencia y la fluidez de la membrana de espermatozoides de perro enfriados a -5°C , previo a la congelación. Tesis para Maestría en Ciencias. UNAM. FES Cuautitlán. Estado de México, México. 94 pp.

Aurich C. 2005. Factors affecting the Plasma Membrane function of Cooled- Stored stallion Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 89: 65-75.

Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, Sinha S, Dutta DJ, Saikia GK. 2014. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 149: 231-237.

Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera J. 2006. Biotecnología de la Reproducción Porcina. Manual de Técnicas de Reproducción asistida en porcino. Universidad de Girona. España.

Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*; 114: 3543-3555.

García AY. 2015. Determinación de la temperatura de pre-congelación óptima de semen porcino a temperaturas inferiores al punto de congelación, sobre la viabilidad de los espermatozoides. Tesis de licenciatura FES- Cuautitlán UNAM. Estado de México, México.

González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC; Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S, Cardenas S. 2006. En Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino. Universidad de Girona. España. 19-35 pp.

Hafez ESE. 2002. Preservación y crioconservación de gametos y embriones. En Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Editores Hafez ESE, Hafez B. McGraw-Hill Interamericana, México. 472-494 pp.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*; 62: 3-22.

Quintero MAA. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria Universidad de Barcelona, España.

Rodríguez GL. 2005. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona, España.

Valdés MC. 2015. Evaluación de la viabilidad de semen porcino tratado con estreptolisina o (SLO). Tesis de Maestría en Ciencia Animal. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 69 pp.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*; 60–61: 481–492.

Yanagimachi R. 2015. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Editors Knobil E. and JD. Neill. New York: Raven Press, USA. 189-315 pp.

Viloria PFA. 2013. Viabilidad en semen criopreservado de porcino incubado con plasma seminal fresco o congelado. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 1-18 pp

Pursel VG, Johnson LA, and Schulman LL. 1973. Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*. 37: 528–531.

Boiso, I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 18, pp 127-131.

Aisen, EG. 2000. Effect of trehalosa and EDTA on cryoprotective

action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53, 1053-1061. Obtenida de <http://www.academicjournals.org/ajar/pdf/pdf2011/18%20Feb/Yamashiro%20et%20al.pdf>

Holt. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, pp. 3–22.

Medeiros CM. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57, 327-344. Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5o C by egg-yolk lipoprotein. *Journal Reproduction Fertility*. 62: 483-492.

Quinn PJ, White IG. and Cleland RW. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal Reproduction Fertility*. 18, 209-220.

Grossmann M. and Santaló J. 1991. Aspect esteòrics de la congelació de gàmetes In embrions. *TrebSocCatBiol*. 42, 87-108.

Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lamming GE. (ed). *Marshals Physiology of Reproduction 2. Reproduction in the male*. Churchill Livingstone. Edinburgo. 747-869.

Ramonez C. JC. 2013 Evaluacion de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino. Tesis de Maestría. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. pp 4-44

Watson, PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lamming GE. (ed). *Marshals Physiology of Reproduction 2. Reproduction in the male*. Churchill Livingstone. Edinburgo. 747-869.

Caiza, D. J. 2009. Manejo de verracos para la obtención y procesamiento de semen porcino e inseminación artificial. Proyecto para la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.

Díaz O., Mesa H., Gómez G. y Henao F. J. 2008. Evaluación in vitro de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración. Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

Flowers, W. L. 1995. Relationships between estimates of fertility and motility for porcine spermatozoa. *Animal Science*. Vol. 10. No. 5. pp. 9-13.

Gadea J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Anim.* Vol. 16. No. 1. pp. 63-77.

García J. A. 1995. Evaluación práctica del semen porcino. *Acontecer Porcino*. Vol. 11. No. 32. pp. 34-42.

Hafez, E. S. E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc-Graw-Hill-Interamericana. 6th. ed. México. p. 543.

Kommisrud, E.; Paulenz, H.; Sehested, E. y Grevle, I. S. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet. Scand.* Vol. 43. No. 1. pp. 49-55.

Martínez, R. G. 1998. Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo. *Ciencia Veterinaria*. 8.

Rozeboom, K. J. 2000. Evaluating semen quality (en línea). *Animal Science Facts*, North Carolina, US. Disponible en: <http://mark.asci.ncsu.edu/Publications/factsheets/812s.htm>.

Brouwers J.F., Silva P.F. and Gadella B.M. 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63, pp.458-69.

Arav, A., Pearl, M. and Zeron, Y. 2000. Does membrana lipid profile explain chilling sensitivity and membrana lipid phase transition of spermatozoa and oocytes?. *CryoLetters*. 21, pp.179-86.

Buhr, M.M., He, L. and Kasimanickam, V. 2000. Lipids in extenders affect boar sperm function during cryopreservation. En: *Boar semen IV*, pp 61-70. L.A. Johnson and H.D. Guthrie (ed.). Allen Press, Inc. Lawrence, K.S. USA.

Green, C. E. y Watson, P. F. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122, pp.889-98.

Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M. and Kato, S. 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal of Reproduction Science*, 73, pp.197-209.

Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L. 1973a. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C. *Journal of Animal Science*, 37(2), pp.532-5.

Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Specher, D.J. and Chou, K. 2005a. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal of Reproduction Science*, 90, pp.347-54.

Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J. and Chou, K. 2005b. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal of Reproduction Science*, 87, pp.121-32.

Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*; 114: 3543-3555.

Scott GF. 2005. *Biología del desarrollo*. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 198-201 pp.

Anexos

Anexo 1.- Técnica de “mano enguantada”

PREPARACION DEL MATERIAL

1. Precalentar agua destilada a 37º C en un matraz, el volumen dependerá de las dosis que vayamos a producir (suele hacerse una estimación de dos litros por verraco). Agitar con la ayuda de un agitador magnético.
2. Añadir el diluyente correspondiente al volumen de agua que se tiene.
3. Coger un vaso de recogida y cubrirlo con una gasa que actuará a modo de filtro y asegurar esta con una goma. Al vaso se le pueden añadir 50-100 cc de diluyente ya preparado y calentado a 37º C con objeto de evitar cambios bruscos de temperatura al eyaculado y prevenir aglutinaciones.
4. El vaso se coloca en un termo previamente atemperado.
5. Mantener el matraz con el diluyente en el baño María a 37º C.
6. Es conveniente poner varios “portas” y “cubre” sobre la platina calefactora para que estén atemperados a la hora de la validación seminal (evaluación de la motilidad, aglutinación). Hay que tener en cuenta que el material ha de estar limpio y, en los casos que proceda, esterilizado.

RECOLECCION DEL SEMEN

Es recomendable realizarla sobre un potro fijo situado en una sala habilitada a tal efecto, así el animal se habitúa y se reduce el tiempo de salto simplificando el manejo al operario. La recogida se ha de realizar con el mayor grado de higiene que sea posible. Para ello debe vaciarse el divertículo prepucial cuando el verraco esté sobre el potro con objeto de eliminar los restos de orina y limpiar la zona con una toallita desinfectante. Una vez colocado el guante no se debe tocar ningún objeto ni superficie para minimizar el riesgo de contaminación; otra opción es colocarse dos guantes y quitarse uno justo antes de comenzar la extracción, es lo que se conoce como la técnica del doble guante. El pene debe sujetarse colocando los dedos alrededor de la espiral del glande, ejerciendo tracción suavemente hasta su total extensión. Se ha de procurar mantener el pene horizontal (en paralelo con el suelo) para evitar que por el escurra orina u otros contaminantes que caerían al vaso de recogida. Una vez en este punto, el verraco dejará de empujar y comenzará a bombear el eyaculado (Oberlender *et al.*, 2012).

Anexo 2: DABCO

DABCO 0.22 M (= 220 mM) en glicerol.

$$\begin{array}{r} 112.2 \text{ --- } 1M \\ x \text{ --- } 0.22M \\ x = 24.684g/l \\ x = 0.12342 g /5ml \end{array}$$

Preparación:

1. Después de calcular la cantidad de DABCO a mezclar con el glicerol, se procede a su dilución, para posteriormente agregar PBS.
2. La relación Glicerol: PBS es de 9:1, respectivamente.
3. Se realiza el cálculo correspondiente dependiendo la cantidad a utilizar.

Anexo 3: Medio Tyrodes

Preparación de solución stock para el medio Tyrodes

NaCl (0.5 M)	2.922 g / 100 ml
NaHCO ₃ (0.25 M)	2.100 g / 100 ml
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ (0.1 M)	0.690 g / 50 ml
Na-Hepes (0.2 M)	9.532 g / 200 ml
KCl (0.5 M)	3.728 g / 100 ml
CaCl ₂ (1.0 M)	14.702 g / 100 ml
Glucosa (0.5 M)	4.5 g / 50 ml
MgSO ₄ (0.01 M)	1.235 g / 50 ml

Nota: Cada gramaje se diluye en agua desionizada.

Una vez realizada cada una de las mezclas anteriores, se prosigue a realizar la preparación del medio Tyrodes.

Preparación para cada 100 ml:

NaCl	19.2 ml	MgSO ₄	0.400 ml
NaHCO ₃	6 ml	Glucosa	1 ml
Hepes	10 ml	CaCl ₂	0.460 ml
Na-phosphate	0.300 ml	Penicilia- estreptomina	1 ml
KCl	0.620 ml	Rojo Fenol	2 mg

Cada una de las cantidades mencionadas, se proceden a aforar.

Anexo 4: Preparación de medio TALP

Medio Tyrodes	10 ml
Piruvato	22 mg
Albumina de suero bovino (BSA)	50 mg
Agua MilliQ	1 ml

Procedimiento:

1. Colocar en baño María el tubo de 10 ml de medio Tyrodes.
2. Pesar 22 mg de piruvato y se colocan en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua MilliQ (el tubo debe estar protegido de la luz con papel aluminio).
3. Pesar 50 mg de BSA.
4. Gasificar Tyrodes con CO₂ durante 2 min.
5. Agregar al medio Tyrodes los 50 mg de BSA y 50 µl de piruvato, sin mezclar.
6. Se introduce en la incubadora de CO₂ (38°C / 5%).

Nota: Las cantidades de los reactivos que se mencionan, se utilizan por cada 10 ml de medio Tyrodes.

Anexo 5 Preparacion de medio BTS

EDTA	0.125 g / 100 ml
Dextrosa anhidra	3.7 g / 100 ml
Citrato de Sodio	0.6 g / 100 ml
Bicarbonato de Sodio	0.125 g / 100 ml
Cloruro de Potasio	0.075 g / 100 ml

Procedimiento

1. Se pesan los ingredientes.
2. Con ayuda de un embudo se colocan en un matraz.
3. Mezclar con agua MilliQ todos los ingredientes.
4. Una vez disueltos se afora hasta 100 ml.
5. Identificar y conservar.