



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

11674

MAESTRIA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD, ANIMAL

FES-Cuautitlán

Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la
congelación sobre la estructura y funcionalidad de la
membrana plasmática del espermatozoide porcino

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Héctor Fabián Flores González

Tutor: Dr. José Alfredo Medrano Hernández

Comité Tutorial: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
Dr. Javier Valencia Méndez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

2005

m. 345234



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Desearía poder expresar mi gratitud en la justa medida a todas y cada una de las personas que hicieron posible éste trabajo, sin embargo creo de antemano que pudiese faltarme alguien; si ese fuese el caso, ofrezco por anticipado mis disculpas.

A las personas que laboran en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores–Cuautitlán UNAM, por las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-CEIEPP) por haberme otorgado el permiso para realizar estos estudios de posgrado.

Al Centro de Inseminación Artificial del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (FMVZ-UNAM), por la donación de las muestras de semen.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar estos estudios.

A Alfredo Medrano por la confianza y paciencia que puso para que se lograra concluir éste trabajo.

A Esperanza Ríos por compartir conmigo el esfuerzo realizado para estandarizar la técnica de enfriado y a Arturo Trejo por su apoyo incondicional al proveernos del equipo faltante.

A los integrantes del jurado, por los comentarios aportados, los cuales enriquecieron el contenido de esta tesis.

A todas las personas que compartieron esta experiencia conmigo, creando día con día un agradable ambiente de trabajo: Rosalba, Angélica, Esperanza, Filiberto, Moisés, Alina, Marisela, Pedro.

Dedicatorias

A mi Muñe

Que siempre compartes los momentos especiales de mi vida con alegría y amor.

A mis hijos: Ramón y Paola

Para los que soy ejemplo y me brindan día a día su amor.

A mis padres: Emma y José

Por su apoyo y amor incondicional en todo momento.

A toda mi querida familia,

Que siempre están en mi corazón y que son mi motivo y anhelo de superación.

Índice

	Página
Índice	ii
Índice de cuadros y figuras	v
Resumen	vi
Abstract	vii
1. Introducción	1
2. Revisión de Literatura	4
2.1 Inseminación artificial porcina con semen refrigerado.....	4
2.2 Inseminación artificial porcina con semen congelado.....	5
2.2.1 Procesos fisicoquímicos que ocurren durante la congelación- descongelación.....	7
2.2.1.1 Sobreenfriamiento.....	7
2.2.1.2 Transición de fases.....	7
2.2.1.3 Formación de hielo.....	8
2.2.1.4 Liberación de calor latente.....	9
2.2.1.5 Daño por concentración de solutos.....	10
2.2.2 Efecto de la congelación sobre los espermatozoides.....	10
2.2.2.1 Daño estructural.....	11
2.2.2.2 Daño mitocondrial.....	13
2.2.2.3 Cambios similares a la capacitación.....	13
2.2.3 Factores que afectan la sobrevivencia de los espermatozoi- des al proceso de congelado-descongelado.....	15
2.2.3.1 Diluyentes y crioprotectores.....	15
2.2.3.2 Cambios de temperatura.....	16
2.2.3.3 Sistemas de envasado.....	18
2.2.3.4 Diferencias entre especies.....	19
2.2.3.5 Diferencias entre individuos.....	20

2.2.4	Métodos de evaluación.....	20
2.2.5	Protocolos de enfriado precongelación	22
3.	Justificación.....	24
4.	Hipótesis.....	25
5.	Objetivo general.....	26
5.1	Objetivos particulares.....	26
6.	Material y métodos.....	27
6.1	Diseño experimental.....	27
6.2	Variables.....	28
6.3	Colección de semen.....	28
6.4	Evaluación del semen fresco.....	29
6.5	Dilución del semen.....	33
6.6	Enfriado precongelación del semen.....	33
6.7	Congelación del semen.....	35
6.8	Descongelación del semen.....	35
6.9	Análisis estadístico.....	40
7.	Resultados	41
7.1	Motilidad.....	41
7.2	Integridad de la membrana plasmática.....	46
7.3	Integridad del acrosoma.....	46
7.4	Estado de capacitación.....	51
8.	Discusión	54
8.1	Motilidad.....	54
8.2	Integridad de la membrana plasmática.....	56
8.3	Integridad del acrosoma.....	57
8.4	Estado de capacitación.....	58

9. Conclusiones	60
10. Literatura citada	61
11. Anexos	73

Índice de Cuadros

	Página
1. Valores del semen fresco de cada macho.....	42
2. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre las variables ___ evaluadas al descongelado.....	43

Índice de Figuras

1. Sistema de enfriado usando solución salina-hielo salino hipertónico (7.85%)	34
2. Curva de enfriado desde temperatura de cuarto hasta 5° C ...	36
3. Curva de enfriado de la temperatura de +5° C hasta -5° C ...	37
4. Estado de capacitación espermática mediante la prueba de clortetraci- clina (CTC), patrones fluorescentes ...	38
5. Valores de motilidad progresiva de los espermatozoides al descongela- do de cada macho	44
6. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre el porcentaje _ de espermatozoides móviles al descongelado	45
7. Valores de porcentaje de espermatozoides con membrana intacta al _ descongelado de cada macho	47
8. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta al descongelado	48
9. Valores de espermatozoides con acrosoma intacto al descongelado de cada macho	49
10. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto	50
11. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados al descongelado	52
12. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados en los distintos machos	53

Resumen

El objetivo de este trabajo fue probar si el enfriado lento hasta -5°C puede mejorar la sobrevivencia al proceso de congelado-descongelado de los espermatozoides porcinos y reducir la ocurrencia del fenómeno de capacitación prematura. Se evaluaron tres diferentes tratamientos de enfriado precongelación de semen a $+5^{\circ}\text{C}$, a 0°C y hasta -5°C . Se utilizaron 33 eyaculados provenientes de 5 machos colectados por el método manual. Se diluyó cada muestra en el medio BF5 (medio congelador de Beltsville) con un porcentaje final de glicerol de 1%. Cada muestra de semen se evaluó y procesó en el laboratorio a temperatura de cuarto (22°C). El semen diluido se sometió a un enfriado en un sistema de recipientes con solución salina y hielo salino hipertónico (7.85%) dentro de un refrigerador hasta alcanzar la temperatura de -5°C . Cuando las pajillas alcanzaron la temperatura blanco de cada tratamiento se retiraron del refrigerador y fueron congeladas en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Se evaluó al descongelado: la motilidad progresiva en BTS (solución descongeladora de Beltsville), la membrana plasmática intacta mediante la tinción de Eosina-Nigrosina, la integridad acrosomal mediante microscopia de contraste de fase y el estado de capacitación de los espermatozoides mediante la prueba de la clortetraciclina (CTC) y microscopia de fluorescencia. El porcentaje de motilidad progresiva del enfriado a -5°C fue mayor (36.9% vs 34.7%; $p < 0.05$ respectivamente) que el tratamiento de $+5^{\circ}\text{C}$. No existió diferencia en cuanto al porcentaje de espermatozoides con membrana intacta. En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, el enfriado a -5°C (77.9%) fué mayor ($p < 0.05$) que los tratamientos de enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ (74.4%) y 0°C (75.1%). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura (patrones B y AR), el tratamiento de enfriado a -5°C mostró la menor proporción de éstos (57.5%) y fue diferente ($p < 0.05$) al obtenido por los tratamientos de enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ (61.9%) y 0°C (63.8%). Existió variabilidad entre individuos en la susceptibilidad del semen al proceso de congelado y descongelado. Se concluye que el enfriado precongelación a -5°C mejoró la supervivencia de los espermatozoides y redujo la incidencia del estado de capacitación prematura al descongelado en comparación con el tratamiento control de enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$.

Palabras clave: espermatozoide porcino; enfriado lento; capacitación; preservación de semen; clortetraciclina.

Abstract

The aim of this work was to test the hypothesis that slow cooling to -5°C , before ice formation occurs, may improve sperm cryosurvival and reduce the proportion of capacitated-like spermatozoa. Semen from 5 mature boars (at least 5 ejaculates from each) was collected by the gloved hand method, centrifuged, resuspended in a freezing medium (BF5) without glycerol and then slowly cooled from $+22^{\circ}\text{C}$ to: (1) $+5^{\circ}\text{C}$ control group, (2) 0°C and (3) -5°C . When semen reached 6.5°C , BF5 with glycerol was added (1% final concentration) and packaged in 0.5 ml plastic straws. Straws from the three treatments were exposed to nitrogen vapour when they reached their target temperature and were stored in liquid nitrogen. All samples were thawed at 39°C in a thawing solution (BTS) and sperm progressive motility, plasma membrane integrity (Eosin-Nigrosin stain), acrosome membrane integrity (phase-contrast microscopy), and the capacitation status (CTC probe and fluorescence microscopy) were assessed. Slow cooling to -5°C improved the percentage of motile spermatozoa vs slow cooling to $+5^{\circ}\text{C}$ (36.9 vs 34.7%; $P < 0.05$ respectively) and the acrosome membrane integrity (77.9%) vs 0°C (75.1%) and $+5^{\circ}\text{C}$ (74.4%); also, it reduced ($P < 0.05$) the proportion of capacitated-like spermatozoa (57.6%) vs 0°C (63.8%) and $+5^{\circ}\text{C}$ (61.9%). There were no significant differences regarding the percentage of sperm showing intact plasma membrane. There were differences on inter-boar cryosurvival to the freeze-thawing process. Slow cooling to -5°C of boar semen before freezing improves sperm cryosurvival and reduce the proportion of capacitated-like spermatozoa at thawing.

Keywords: boar sperm; slow cooling; capacitation; semen preservation; chlortetracycline

1 Introducción

En el sector pecuario durante el siglo XX se lograron importantes avances tecnológicos en el área reproductiva, estos avances han permitido el aprovechamiento del potencial reproductivo de la mayoría de las especies domésticas. Una de las herramientas que más ha influido en dicho avance es la inseminación artificial, que particularmente en los porcinos ha demostrado ventajas sobre la monta natural, como: la menor difusión de enfermedades, la diseminación rápida del avance genético y la mejora de algunos parámetros como fertilidad y prolificidad, además de disminuir los costos de operación.

La inseminación artificial (IA) consiste en depositar el semen por medios mecánicos en el aparato reproductor femenino en el momento más oportuno, no existiendo contacto directo entre el macho y la hembra; esto incluye la inseminación de la hembra con semen fresco, diluido o descongelado (Mc Donald, 1991).

En algunas especies como los bovinos el uso de la técnica de IA se ha extendido enormemente desde que se comenzó a utilizar en 1951, dependiendo casi exclusivamente del uso de semen congelado-descongelado, lo que ha hecho posible utilizar intensamente y difundir el potencial genético de sementales superiores en la población a un costo razonable. Sin embargo en otras especies domésticas, como los equinos, porcinos y ovinos, se utiliza en menor proporción y generalmente empleando semen fresco diluido o enfriado, no congelado (Curry, 2000).

En el caso de los equinos no se había utilizado ampliamente debido al rechazo de varias asociaciones de cría equina para permitir el registro de la progenie por medio de inseminación artificial (Mc Donald, 1991); sin embargo, recientemente se ha aceptado el uso de semen congelado por diversas asociaciones de criadores, por lo que actualmente, su utilización es más amplia, tanto con semen refrigerado en México (Boeta y Zarco, 2000) como con congelado en los Estados Unidos, obteniéndose tasas de preñez aceptables de hasta 75% (Loomis, 2001).

En la especie ovina las tasas de concepción con inseminación artificial transcervical con semen congelado son notoriamente bajas; sin embargo, si ésta se realiza con el auxilio de la técnica de laparoscopia los resultados mejoran significativamente. La inseminación intrauterina por el método quirúrgico mediante laparotomía es utilizada por los ganaderos de la mayoría de los países productores de borregos (Salamon y Maxwell, 1995).

En la especie porcina la situación es diferente ya que la conservación del semen históricamente ha sido difícil y probablemente es la causa que impide un mayor desarrollo y aplicación de la inseminación artificial, tanto con semen refrigerado como congelado; aún así, actualmente la mayoría de los países desarrollados la utilizan en aproximadamente un 50 % de sus piaras (Martín-Rillo, 1996). Este avance reciente se debe a que la utilización de semen diluido refrigerado para IA se ha triplicado en los últimos 15 años.

Más del 99 % de un estimado de 19 millones de inseminaciones alrededor del mundo, fueron realizadas con dosis de semen diluido refrigerado usadas en el mismo día o almacenadas entre 15 y 20° C por un periodo que va de 1 a 5 días (Johnson *et al.*, 2000).

Prácticamente todas las IA se realizan con semen diluido refrigerado, cuyo uso principal es la producción de cerdos para abasto y sólo el 1% emplea el semen congelado-descongelado, con el fin de transferir la base genética de una piara a otra (Watson, 2000). Lo anterior obedece a que los programas de IA basados en semen congelado-descongelado no son rentables en condiciones comerciales, ya que la fertilidad obtenida es menor, comparada con la obtenida con semen diluido refrigerado o con monta natural (Johnson, 2000). Huang *et al.* (1999) mencionan que el tamaño de camada disminuye de un 20 a 30% usando semen congelado-descongelado, en comparación con semen fresco. Esta baja en la fertilidad y prolificidad se debe a una serie de factores involucrados en el procedimiento de congelado-descongelado del semen, que afectan entre otras estructuras la integridad estructural de la membrana plasmática y por tanto disminuyen la funcionalidad espermática (Watson, 1995).

Por lo anterior, es necesario realizar estudios enfocados a mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides al proceso de congelado-descongelado, para que de esta manera se mejoren los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos mediante inseminación artificial con semen congelado en un sistema de producción comercial porcino.

2. Revisión de Literatura

2.1 Inseminación artificial porcina con semen refrigerado

La conservación del semen porcino puede realizarse de 3 formas: fresco, refrigerado y congelado.

El semen fresco se obtiene y se utiliza en la misma explotación, puede conservarse a temperatura ambiente y aplicarse en las 2 ó 3 horas próximas.

El semen refrigerado es el que se conserva por periodos de 2 a 5 días, al cual se le añade un medio que equilibre la acción de las sustancias que contiene el plasma seminal. El semen refrigerado se puede conservar a dos temperaturas: 5 °C y 15° C; actualmente la temperatura de conservación más utilizada es la de 15° C.

El semen conservado a 5° C necesita la adición de sustancias crioprotectoras, siendo la más utilizada la yema de huevo y/o leche. Los medios más utilizados son el Serdiuk y el Kato que están compuestos principalmente de glucosa, bicarbonato de sodio, ácido cítrico y yema de huevo. Además el descenso de temperatura hasta los 5°C se efectúa de manera gradual para evitar el choque térmico (Johnson *et al.*, 2000).

La conservación del semen a 15°C es la técnica más utilizada en todo el mundo, y es utilizada tanto por los pequeños productores como por los grandes productores, ya que han encontrado en este procedimiento una mayor confiabilidad y eficiencia para realizar la transferencia genética. Desde los años 70 se han empleado diversos diluyentes, sobresaliendo el IVT y el Plisco que contiene glucosa, bicarbonato de sodio, además de estar adicionado con ácido etilendiaminotetracetato disódico (EDTA), el cual disminuye el metabolismo del espermatozoide manteniéndolo en un estado de anaerobiosis. También a partir de los 70 se ha utilizado ampliamente el diluyente Kiev; sin embargo, en los años 80 el diluyente BTS (Beltsville Thaw Solution) se convierte en el medio de elección para preservar el semen por periodos cortos de 3 días (Conejo *et al.*, 1996).

En los años 90 se preparan diluyentes más complejos con una mayor capacidad de conservar las condiciones ideales para el espermatozoide. Estos diluyentes son denominados de larga duración y pueden preservar el semen por periodos de hasta 5 días; dentro de los más importantes, se encuentra el MRA, el Androhep y el Reading. Este avance en el tiempo de preservación ha permitido la difusión de la mejora genética de manera sorprendente (Conejo *et al.*, 1997).

Desde que se realizaron los primeros estudios para preservar el semen en la especie porcina, se ha entendido que sólo una porción de la población original de espermatozoides sobrevivirá a la preservación de cualquier tipo. Se sabe también que la supervivencia celular es mayor después de un almacenamiento en un medio líquido que en congelación, ya que conforme la temperatura desciende hay una inevitable reducción en la proporción de espermatozoides que mantienen de forma normal la integridad de su membrana plasmática así como su composición bioquímica y estructural (Johnson *et al.*, 2000).

2.2 Inseminación artificial porcina con semen congelado

La congelación de semen es un procedimiento que permite conservar a los espermatozoides por tiempo indefinido, preservando la información genética del individuo. El proceso consta de varias etapas donde sobresalen las siguientes: enfriado, deshidratación celular, congelación, descongelación y rehidratación celular (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Una vez finalizado el procedimiento, Palacios (1994) menciona que se deben mantener las siguientes características y propiedades en el espermatozoide para que tenga la capacidad de fecundar y transmitir la información genética contenida en su genoma:

- 1) Actividad metabólica productora de energía para realizar las diversas funciones celulares.
- 2) Integridad de las proteínas estructurales necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fecundación.
- 3) Mantenimiento de las enzimas acrosomales útiles para la penetración del espermatozoide en las vestimentas del ovocito.
- 4) Capacidad de realizar movimiento de manera progresiva.

El semen de porcino, a diferencia de otras especies, se caracteriza por ser producido en grandes volúmenes y por ser muy sensible al enfriado posterior a la colección. Debido a lo anterior, se han desarrollado diversos protocolos para la congelación del semen que han incluido el estudio de distintas combinaciones de diluyentes, crioprotectores, tasas de enfriado, condiciones del proceso de congelación y descongelación; además, de la concentración espermática y el método usado para el análisis de los resultados (Johnson *et al.*, 2000). A pesar de estos esfuerzos, no ha sido posible abatir la baja de fertilidad característica del semen descongelado, causada por una combinación de efectos en la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación (Medrano y Holt, 1998).

Por lo tanto, el problema en la crioconservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a -196°C , sino identificar el daño que ocurre durante la congelación-descongelación, al pasar la célula por un intervalo de temperatura crítica de -15°C a -60°C durante el cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriado, tales como formación de cristales intra y extra celular, deshidratación y distorsión de la membrana (Palacios, 1994).

Como se mencionó anteriormente, existen factores adicionales que modifican los resultados al usar semen congelado-descongelado, entre los que se pueden mencionar: los diluyentes y crioprotectores, el sistema de envasado, los cambios de temperatura, el efecto del congelamiento sobre el espermatozoide, los métodos de evaluación espermática y la variación en la respuesta al proceso de cada individuo.

2.2.1 Procesos fisicoquímicos que ocurren durante la Congelación-descongelación

2.2.1.1 Sobreenfriamiento

Este fenómeno ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0° C, entonces las reacciones bioquímicas dentro de la célula disminuyen, el agua extracelular se congela antes que el interior de la célula, mientras que el agua intracelular permanece sin congelar entre -5° C y -15° C (Franks, 1981; Mazur, 1985; Watson, 1995). Cuando el citoplasma celular está sobreenfriado, el agua que se encuentra intracelularmente puede congelarse dentro o salir de la célula y congelarse en el exterior, de cualquier manera la célula permanece sobreenfriada presumiblemente porque la membrana plasmática impide el crecimiento de los cristales de hielo que se están formando en el medio externo hacia el interior del citoplasma (Mazur, 1985). Lo anterior depende de diversos factores, uno de ellos es la tasa de enfriado; a tasas de enfriado mas rápidas que la óptima, la célula tiende a mantenerse en estado de sobreenfriamiento, donde el agua se congela en el interior aumentando el daño, mientras que a tasas de enfriado lentas el agua tiene oportunidad de salir de la célula y congelarse (Watson, 1995).

2.2.1.2 Transición de fases

La disminución rápida de la temperatura (choque frío) ocasiona una serie de alteraciones en la célula espermática, que incluyen disminución de la motilidad y

rompimiento de la membrana plasmática y acrosomal. Existen evidencias que asocian este daño con la transición de fase de la membrana plasmática, la cual ocasiona que los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide sufran un cambio en su estado físico. En condiciones fisiológicas, se encuentran en un estado líquido-cristalino, al disminuir la temperatura, cambian (transición de fase) al estado de gel; entonces, la fluidez disminuye y este cambio hace que la membrana se vuelva rígida y pierda elasticidad. En consecuencia, la membrana no puede manejar convenientemente los cambios osmóticos asociados, lo que puede provocar una pérdida de su integridad durante el proceso (Holt y North, 1985; Hazel, 1995). La composición bioquímica (principalmente los lípidos) de la membrana espermática es un factor fundamental en la susceptibilidad al daño por el enfriado. La membrana, está compuesta de una alta proporción de plasmalógenos que contienen ácidos grasos unidos por un enlace éter en lugar de un tradicional enlace éster, además de contener alrededor de 65 a 70% de fosfolípidos, cuyas cadenas de ácidos grasos están constituidas por los ácidos docosahexanoicos, que le confieren fluidez e inestabilidad (Holt, 2000).

2.2.1.3 Formación de hielo

La metodología de congelación también afecta la supervivencia espermática. La tasa de congelado modifica la dinámica de formación de hielo y el compartimiento (intra o extracelular) donde éste se forma. Se considera que la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular durante este proceso y aumentar la criosupervivencia espermática (Medrano y Holt, 1998). El enfriado de los espermatozoides a una velocidad lenta permite la deshidratación celular y el hielo se forma en el compartimiento extracelular, en cambio, el enfriado rápido evita que la célula se deshidrate y el hielo se forme intracelularmente (Mazur, 1985).

Durante el enfriado, el agua líquida es metaestable con respecto al hielo por debajo de 0 °C y se congela cuando se produce el fenómeno llamado "nucleación", durante el cual un grupo de moléculas de agua adopta una

configuración que es reconocida por otras moléculas de agua como una semilla de hielo, iniciando la formación de cristales de hielo. El crecimiento de estos cristales puede ser retardada por la concentración de solutos del medio y por el tiempo en que se disipa el calor latente de fusión, producido al formarse el hielo (Franks, 1981).

La formación de cristales de hielo está fuertemente influenciada por las tasas de enfriado. El enfriado rápido ocasiona que se formen cristales pequeños antes que estos puedan crecer, mientras que las tasas de enfriado lento permiten que el núcleo inicial de formación de hielo sea grande y continúe creciendo antes de que otros núcleos comiencen a crecer (Mazur, 1985), pero también ocasiona que el periodo de exposición a la elevada osmolaridad causada por la concentración extracelular de solutos, el llamado "efecto solución", sea mayor que en el enfriado rápido, ocasionando también un daño celular que se hace evidente al descongelado (Watson y Duncan, 1988; Muldrew y Mc Gann, 1990). De acuerdo a lo anterior, Mazur (1985) propuso una teoría donde menciona la existencia de éstos dos factores que causan daño a la célula durante este proceso y que trabajan en oposición dependiendo de la tasa de enfriado, donde se considera que la mejor tasa de enfriado es a una velocidad intermedia, ya que la curva de sobrevivencia espermática tiene forma de "U" invertida, la cual indica que tanto tasas lentas como rápidas ocasionan una menor sobrevivencia espermática.

2.2.1.4 Liberación de calor latente

La formación de hielo ocasiona la liberación de calor al que se ha llamado calor latente de fusión; esto ocurre por el cambio de estado de la materia. La temperatura sube desde el punto en que ocurrió la formación de hielo de acuerdo a la concentración de solutos en el medio y al nivel en que se ha incluido el crioprotector hasta cerca del punto teórico de congelación de la solución y se mantiene ahí hasta que el calor se disipa. Bwanga *et al.* (1991b) consideran que regularmente las curvas de congelado producen una meseta en el punto de congelación de alrededor de 1 minuto o menos para volúmenes de alrededor de

5 ml, siempre y cuando se tenga una tasa de enfriado rápida posterior a la cristalización. Se considera que mientras más largo sea el periodo de disipación del calor, mayor será el daño a las células (Parkinson y Whitfield, 1987; Bwanga *et al.*, 1991b). Algunos protocolos de congelación han tenido como objetivo disipar lo más rápido posible el calor para así disminuir la temperatura de una manera más uniforme usando la técnica de nucleación (Fiser *et al.*, 1991) o a través de máquinas congeladoras de operación manual que permiten incrementar el grado de exposición a los vapores de nitrógeno líquido, logrando con esto una disipación más efectiva del calor latente de fusión y una disminución de la temperatura más uniforme (Parkinson y Whitfield, 1987; Medrano *et al.*, 2002a; Kumar *et al.*, 2003).

2.2.1.5 Daño por concentración de solutos

Cuando ocurre la congelación, el agua pasa a formar los cristales de hielo. A medida que este fenómeno se sucede aumenta la concentración de solutos en el medio. El aumento en la osmolaridad provoca mayor deshidratación de las células y en consecuencia un mayor encogimiento de la membrana. La exposición de las células a tales condiciones de hiperosmolaridad es considerada perjudicial (Mazur, 1985). Este daño químico a la célula depende del tiempo de exposición a los solutos y se presenta cuando la temperatura permanece cercana al punto eutéctico (temperatura a la cual la concentración de solutos excede su solubilidad y dejan de ser solubles precipitándose), considerándose mayor el daño a tasas de enfriamiento lento debido a una mayor exposición de solutos (Mazur, 1985; Watson, 1995).

2.2.2 Efecto de la congelación sobre los espermatozoides

Los espermatozoides congelados poseen una menor capacidad de fertilizar que los espermatozoides provenientes de semen fresco. Aunque en parte esto se explica porque después del congelado y el descongelado, se tiene un porcentaje menor de motilidad progresiva. Sin embargo, este punto de vista ha ido cambiando ya que se encontró que aún realizando una inseminación artificial

intracervical con igual número de espermatozoides motiles, el resultado obtenido con el material congelado es inferior. Al respecto se piensa que el espermatozoide al ser sometido al proceso de congelación sufre un daño y solamente sobrevive una cierta población de espermatozoides que probablemente son resistentes debido a que sus membranas son inusualmente estables; de esta manera, se estaría seleccionando una cierta población viable pero a la vez infértil. Otra alternativa es que el proceso de congelado, por sí mismo, genera modificaciones en las membranas celulares (Watson, 1995). Al respecto, se ha propuesto que el daño a la membrana plasmática es ocasionado por un gradiente crítico de presión osmótica a lo largo de la membrana o por un desplazamiento selectivo de iones durante la formación del hielo que ocasionaría un incremento en el diferencial de potencial eléctrico que ocasionaría finalmente la ruptura de la misma (Muldrew y Mc Gann, 1990).

2.2.2.1 Daño estructural

Durante los procedimientos de congelación-descongelación se presentan daños particularmente en la membrana plasmática, el acrosoma y las mitocondrias (Graham *et al.*, 1990). En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo, que contiene la cromatina altamente condensada, la cubierta post-nuclear y el acrosoma. Este último contiene enzimas como acrosina, hialuronidasa, esterasa e hidrolasa, necesarias para que el espermatozoide penetre la corona radiada y la zona pelúcida durante la fecundación (Gadella *et al.*, 1996). Un daño en el acrosoma o en la cromatina puede dar lugar a infertilidad o a una muerte embrionaria precoz, esto último debido a una alteración en el proceso de condensación-descondensación de la cromatina espermática (Córdova *et al.*, 2001).

El proceso de criopreservación causa una disminución de aproximadamente 50% de la viabilidad de los espermatozoides en la especie porcina, esto debido a los cambios morfológicos que ocurren en la organización, la fluidez, la permeabilidad y la composición lipídica de las membranas del espermatozoide por efecto de la

temperatura y los cambios osmóticos (Thomas *et al.*, 1998). Curry (2000) reporta que las membranas citoplasmáticas del espermatozoide congelado tienen una menor capacidad de resistir un estrés osmótico que las de un espermatozoide fresco.

Estudios de criofractura de las membranas espermáticas después del proceso de congelado-descongelado indican cambios morfológicos de carácter irreversible, sugerentes de un proceso de separación de fases presumiblemente inducido por la transición de fases de los lípidos durante el proceso de enfriado, congelado y descongelado (De Leeuw *et al.*, 1990).

Buhr *et al.* (1994), reportan cambios en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide porcino durante el enfriado, congelado, descongelado y también consideran que algunos de estos cambios son irreversibles. Este aumento en la permeabilidad de la membrana por el enfriado se manifiesta permitiendo la entrada de calcio a la célula (Watson, 1995), por lo que al parecer el espermatozoide presenta un estado de capacitación parcial, con la consiguiente mayor capacidad de penetración de la zona pelúcida de ovocitos de Hamster inmediatamente después de ser descongelados (Critser *et al.*, 1988).

La consecuencia de este proceso de desestabilización de las membranas por el enfriamiento o congelado es que el espermatozoide experimenta una prematura reacción acrosomal, acortándose la vida reproductiva del espermatozoide y produciéndose una reducida fertilidad cuando se insemina cervicalmente (Marshburn *et al.*, 1992).

La membrana plasmática contiene proteínas que actúan como receptores de señales externas, de iones o moléculas, cambiando la conducta de la célula en respuesta a las condiciones del medio (Gadella *et al.*, 1996). Se ha visto que el enfriado induce cambios en el agrupamiento de proteínas a lo largo de la membrana plasmática durante la transición de fase lipídica y al parecer no son enteramente reversibles, lo que pudiera afectar las interacciones ligando-receptor que se dan durante la señalización y que son importantes durante el momento de la fertilización (Oehninger 1993, citado por Watson, 2000). El alto grado de

susceptibilidad al choque frío de una célula se asocia con la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática y con un bajo contenido de colesterol (White, 1993; Holt, 2000). Además, el análisis de la composición lipídica indica que existe una modificación en la composición lipídica de la membrana durante estos procesos (Buhr *et al.*, 1994).

2.2.2.2 Daño Mitocondrial

En la pieza media del flagelo del espermatozoide se encuentra la vaina mitocondrial, donde se localizan una gran cantidad de mitocondrias, estas mitocondrias proporcionan energía mediante la síntesis de trifosfato de adenosin (ATP) que se utiliza para generar el movimiento del flagelo y mantener la motilidad (Medeiros *et al.*, 2002). La vaina es rica en fosfolípidos y varía notablemente entre especies en cuanto a número de mitocondrias y composición química (Gadella *et al.*, 1996). Un daño a las mitocondrias del espermatozoide causaría una disminución de la producción de ATP, lo que reduciría la motilidad de la célula espermática ocasionando una disminución en su capacidad fertilizante (Thomas *et al.*, 1998).

2.2.2.3 Cambios similares a la capacitación

La capacitación de los espermatozoides es un proceso que involucra transformaciones metabólicas y morfológicas cuyo propósito es conferir al espermatozoide la capacidad de fertilizar (Yanagimachi, 1994).

El enfriado y la congelación del semen inducen cambios a los espermatozoides que simulan aquellos producidos por el proceso de capacitación (Watson, 1996). Esto ocasiona que la membrana plasmática esté desestabilizada (aumento de fluidez) y que sea susceptible a que ocurra la reacción acrosomal prematuramente; de esta manera, la vida de los espermatozoides se acorta considerablemente. Esto significa que los espermatozoides están "envejecidos" y que su oportunidad de poder fertilizar a algún ovocito se vea disminuida significativamente.

Aunado a lo anterior, se ha observado mediante la prueba de la clortetraciclina (CTC) que el espermatozoide enfriado muestra un aumento en el Ca^{2+} libre intracelular, siendo este un patrón típico de una célula capacitada, mimetizando las modificaciones de la membrana plasmática inducidos por la acción de los factores que soportan la capacitación, incluyendo el Ca^{2+} y el bicarbonato (Gadella,1996). Sin embargo, los patrones de fosforilación en tirosina son diferentes en los espermatozoides enfriados y en los descongelados, sugiriendo la existencia de una vía alterna de señalización para este fenómeno, por lo que se ha denominado “cambios similares a la capacitación” (Green y Watson, 2001).

2.2.3 Factores que afectan la sobrevivencia espermática al proceso de congelado-descongelado

2.2.3.1 Diluyentes y crioprotectores

Entre las características fisicoquímicas más destacables que deben de tenerse en cuenta al elegir un diluyente son su capacidad de regular el pH, la disponibilidad de carbohidratos para el espermatozoide en el momento de reconstituir el producto, además de que evite el daño producido por la disminución de la temperatura y los cambios osmóticos (Gilmore *et al.*, 1998).

La mayoría de los diluyentes utilizados para semen congelado contienen yema de huevo. La yema de huevo ha sido utilizada desde hace varias décadas porque su adición mejora la fertilidad del semen, disminuyendo el efecto del choque por frío, esto se debe a que su principal componente activo es una lipoproteína de baja densidad que tiene un efecto protector sobre la membrana plasmática, evitando que exista un doblamiento del flagelo ocasionado por el choque por frío (Holt, 2000). Regularmente, se agrega una sustancia surfactante a los diluyentes a base de yema de huevo, la mayoría contiene pasta Orvus como detergente, éste modifica las partículas que constituyen la yema de huevo facilitando la interacción de éstas con la membrana plasmática del espermatozoide (Watson, 2000; Holt, 2000).

En general los diluyentes están compuestos de azúcares, proteínas, amortiguadores, lipoproteínas, aditivos y agentes crioprotectores. Muchos crioprotectores han sido probados a lo largo del tiempo: exitriol, xilitol, adonitol, etilenglicol, acetamida y dimetil sulfoxido (DMSO) a bajas concentraciones, los cuales han mejorado la motilidad al descongelado, pero han disminuido la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto (Johnson *et al.*, 2000). De lo anterior se deduce que ninguno protege mejor que el glicerol, esta es la razón por la cual se usa frecuentemente, siendo adicionado cuando el semen es enfriado a cerca de 5°C de temperatura (Watson, 1995). Aunque existe variación en la

composición de los diferentes medios utilizados, la concentración de glicerol generalmente se mantiene baja, menor al 6% (Fiser y Fairfull, 1996).

Pursel y Johnson (1975), sugieren inclusive concentraciones menores de 2% de glicerol en su protocolo de congelación, ya que concentraciones más elevadas son tóxicas para la célula, siendo este un requisito para obtener una sobrevivencia satisfactoria después del descongelado. El mecanismo de acción del glicerol radica en que puede insertarse en el interior de la bicapa lipídica de la membrana plasmática y producir alteraciones en sus propiedades debido al reacomodo de los lípidos y por lo tanto alterar la estabilidad y permeabilidad de la membrana celular del espermatozoide (Watson, 1995); además de afectar la viscosidad citoplasmática e interferir con la síntesis y utilización de ATP (Hammerstetd *et al.*, 1992).

Recientemente, han surgido investigaciones en las que se utilizan proteínas alternativas dentro del diluyente en lugar de la yema de huevo; así pues, se ha utilizado albúmina sérica bovina, suero equino, suero bovino y proteína de soya (Watson, 2000; Johnson *et al.*, 2000); pero ello sólo en diluyentes para semen fresco o refrigerado y no para semen congelado, excepto la albúmina sérica bovina.

2.2.3.2 Cambios de temperatura (tasas de enfriado y descongelado)

En el espermatozoide se presenta un daño importante en la capacidad funcional al ser sometido a bajas temperaturas y la severidad del daño ocasionado por el proceso de criopreservación será de diferente grado de acuerdo al factor involucrado (De Leeuw *et al.*, 1990). Un factor importante que afecta la supervivencia de los espermatozoides es la velocidad de enfriado y descongelado a través de una amplia gama de temperaturas.

Entre los espermatozoides de mamíferos, los de verraco son los más sensibles al choque frío, esto ocurre cuando el espermatozoide del eyaculado recién colectado es enfriado a temperaturas por debajo de 15° C, esto resulta en una pérdida de la viabilidad en un mayor número de espermatozoides, especialmente si el enfriado

es rápidamente continuado hasta temperaturas de cercanas a 0°C (Watson, 1981; White, 1993; Johnson *et al.*, 2000). Pursel (1979) ha propuesto previo al proceso de la congelación un enfriado de las suspensiones espermáticas a temperaturas alrededor de los 5°C, para lograr con ello un incremento significativo de la viabilidad espermática después del proceso.

Diversos autores han estudiado la velocidad de congelación y descongelación (Pursel y Park, 1985; Fiser y Fairfull, 1990; Woelders y Den Besten, 1993; Ericsson y Rodríguez-Martínez, 2000; Medrano *et al.*, 2002a) encontrando que la curva de congelado para la especie porcina de acuerdo a las tasas de enfriado tiene la forma de una "U" invertida y que van desde 1°C hasta 1500°C/min, reportándose como tasa de enfriado "óptima" 16°C/min para maxi pajillas (Pursel y Park, 1985), 30°C/min para pajillas de 0.5 ml (Fiser y Fairfull, 1990; Medrano *et al.*, 2002) y 50°C/min para pajillas de 0.25 ml (Woelders y Den Besten, 1993).

Existe cierta interacción entre las tasas de enfriado y la concentración de glicerol, ya que hay una mejora en el porcentaje de espermatozoides móviles conforme se aumenta la velocidad de enfriado y se disminuye la concentración de glicerol; a diferentes niveles de glicerol, el espermatozoide tolera un amplio rango de velocidades de enfriado sin mostrar cambios importantes en la sobrevivencia, ya que, aunque se varíe la concentración de glicerol la tasa de enfriado óptima sigue siendo 30°C/min (Fiser y Fairfull, 1990).

También es conocido que la concentración óptima de glicerol varía de acuerdo a la variable medida; de tal manera, que si se mantiene una tasa de enfriado constante, la mejor concentración de glicerol se ubica alrededor de 3% para la motilidad, pero a esta concentración se disminuye el porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal intacta (NAR), siendo una concentración óptima para esta variable de 0 a 1% (Fiser y Fairfull, 1990). Otros autores, incluso reportan daño en la membrana acrosomal cuando se utilizan concentraciones de glicerol tan bajas como de 1 a 2% (Almlid y Johnson, 1988). Por lo anteriormente mencionado, se sugiere la utilización de una concentración baja de glicerol, alrededor de 1% (Pursel y Johnson, 1975).

2.2.3.3 Sistemas de envasado

Los sistemas de envasado para el semen congelado del porcino tienen que superar una dificultad que es el elevado número de espermatozoides por dosis, motivo por el cual se han diseñado envases de gran volumen denominados macrotubos de 5 o 10 ml; sin embargo, estos envases tienen como desventaja que las tasas de enfriado no son homogéneas a lo largo del área comprendida entre la superficie y el centro del macrotubo (Bwanga *et al.* 1991a). Se ha reportado que la velocidad de congelación es 3.75 veces más rápida en la periferia que en el centro del macrotubo, resultando en una menor sobrevivencia espermática cuando se compara con el uso de pajillas de menor diámetro (Weitze *et al.* 1987, citado por Johnson *et al.*, 2000). Al respecto, Bwanga *et al.* (1990) reportan que tanto la motilidad espermática como el porcentaje de acrosomas no dañados fue mayor al descongelado cuando se usan minipajillas de 0.25 ml *versus* macrotubos de 5 ml; no obstante, otros investigadores mencionan que no han encontrado diferencia en la supervivencia post-congelación con el uso de minipajillas o macrotubos (Cordova, 2002).

Otro envase utilizado para congelar es una bolsa delgada de polietileno y teflón con capacidad de 5 ml denominado "Flat Pack", que comparado con los macrotubos de 5 ml parece disminuir el daño en la motilidad espermática porque el descongelado es más rápido y se evita la recristalización intracelular durante este proceso (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Hasta ahora, los mejores resultados de supervivencia post-congelación se han alcanzado con pequeñas dosis de semen congeladas en mini-pajillas, pajillas aplanadas, o en píldoras. Sin embargo, se requiere de una mayor concentración de espermatozoides por dosis para llevar a cabo la inseminación artificial (Bwanga *et al.*, 1991).

El sistema de envasado también es importante porque permite o interfiere con la eficiente disipación de calor (Medrano y Holt, 1998). Al respecto, se ha reportado una mejor disipación de calor durante el congelado cuando se usa Flat Pack en lugar de macrotubo (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000).

La concentración espermática es un factor importante para el éxito de la congelación, ya que para obtener una mejor eficacia reproductiva se requiere un número mayor de espermatozoides criopreservados (Penfold *et al.*, 1997). Las concentraciones más utilizadas están entre 450 y 1000 x 10⁶ espermatozoides / ml (Bwanga, 1991). Córdova *et al.* (2002), recomiendan una concentración para la congelación de semen de verraco que oscile entre 300 a 3000 x 10⁶ espermatozoides totales por pajilla plástica de 0.5 y 5.0 ml respectivamente. Otros autores, han utilizado distintas concentraciones espermáticas con resultados similares: 250 x 10⁶ en pajillas de 0.25 ml (Bwanga, *et al.* 1990); mientras que Medrano (1998) y Thurston *et al.* (2002) usaron 200 x 10⁶ y 333 x 10⁶ respectivamente en pajillas de 0.5 ml.

2.2.3.4 Diferencias entre especies

La membrana plasmática de los espermatozoides de ciertas especies animales como el verraco, toro y carnero (ungulados) tiene una composición lipídica que los hace más susceptibles al choque frío (De Leeuw *et al.* 1991) en comparación con otras especies como el conejo, perro, humano y algunas aves como los pavos (Watson, 1981). La susceptibilidad del espermatozoide al choque frío, se ha asociado a una mayor proporción de ácidos grasos insaturados *versus* ácidos grasos saturados y niveles bajos de colesterol dentro de su membrana plasmática (Watson, 1981; White, 1993). Esta diferencia en la composición lipídica de la membrana plasmática explica de cierta manera la diferencia en la susceptibilidad al enfriado entre especies. Sin embargo, en otras especies como los marsupiales la condición anterior no se cumple, puesto que la membrana plasmática de sus espermatozoides tiene bajo contenido de colesterol y altos niveles de ácidos grasos insaturados, pero son resistentes al choque frío (Miller *et al.*, 2004).

2.2.3.5 Diferencias entre individuos

En los porcinos se ha identificado diferencias en la susceptibilidad al proceso de congelado-descongelado entre diversas líneas genéticas (Woelders *et al.*, 1996), siendo muy importante la diferencia que existe en la criosupervivencia entre individuos, lo anterior ha provocado que incluso se clasifique de acuerdo a la capacidad de criopreservación en buenos y malos sementales congeladores (Medrano y Holt, 1998). Este componente individual se ha identificado mediante marcadores genéticos y se ha asociado a genes que determinan la susceptibilidad de las células espermáticas al proceso de congelación-descongelación (Thurston *et al.*, 2002).

2.2.4 Métodos de evaluación

La determinación de la fertilidad de un eyaculado incluye generalmente pruebas de la función del espermatozoide, incluyendo la evaluación de la viabilidad, perfiles de motilidad, la capacidad de reacción acrosomal y la penetración al ovocito (Medrano *et al.*, 2002a).

Los métodos para la evaluación de la viabilidad e integridad funcional del espermatozoide antes, durante y después de la criopreservación deben permitir el desarrollo de nuevos protocolos de congelación-descongelación. Desafortunadamente, los análisis actuales del laboratorio no son exactamente predecibles en relación a la fertilidad y no son repetibles de un estudio a otro. La capacidad de repetición sólo es alcanzada aumentando la objetividad en los análisis y el número de las células analizadas (Graham *et al.*, 1990).

Hoy en día el uso de la microscopía de fluorescencia y de la citometría de flujo para determinar la integridad de la membrana (a partir de la fluorescencia con fluorocromos) ofrece un análisis más específico de la viabilidad del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación de millares de

células individuales en pocos segundos (Maxwel y Johnson, 1997b). Dentro de los fluorocromos sobresale el uso de SYBR14 y de ioduro de propidio, que se han utilizado ampliamente por diversos investigadores para evaluar la integridad de la membrana plasmática (Garner y Johnson, 1995; Maxwell y Johnson, 1997a; Green y Watson, 2001; Medrano *et al.*, 2002a).

Otra aproximación que se ha usado para identificar los cambios que se dan durante la capacitación en la membrana plasmática es el uso del antibiótico fluorescente clortetraciclina (CTC). La sonda fluorescente CTC es usada para monitorear la redistribución del ion Ca^{2+} que ocurre durante el proceso de la capacitación espermática (Mattioli *et al.*, 1996). Esta sonda fluorescente ha mostrado ser útil también para valorar las alteraciones similares a la capacitación que ocurren durante el enfriado en los espermatozoides de diversas especies (bovino: Fraser *et al.*, 1995; ovino: Gillan *et al.*, 1997; porcino: Wang *et al.*, 1995; Maxwell y Johnson, 1997b; Green y Watson, 2001; Kaneto *et al.*, 2002).

El fundamento mediante el cual funciona esta técnica no ha sido del todo clarificado, sin embargo se consideran dos hipótesis:

a) la primera sugiere que el antibiótico fluorescente CTC entra de forma neutra y sin unirse a otros compuestos al interior de la célula, localizándose en los compartimentos intracelulares que contiene altos niveles de Ca^{2+} libre; cuando la CTC se une al calcio forma un compuesto estable y ocurre un aumento de la emisión de fluorescencia. El complejo CTC- Ca^{2+} se une a la membrana cerca de los sitios hidrofóbicos, permitiendo la visualización del proceso de remodelado que ocurre progresivamente en la membrana plasmática del espermatozoide (Tsien, 1990).

b) la segunda que considera que la fluorescencia emitida por la unión de Ca^{2+} al antibiótico clortetraciclina se produce en el exterior de la célula cuando el Ca^{2+} es bombeado fuera de la célula por la bomba ATPasa de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática, produciendo el patrón F. Por lo tanto, la capacitación es interpretada como el proceso de inhibición de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} ,

resultando en una disminución de la cantidad de Ca^{2+} externo a la membrana y una menor fluorescencia, tal hallazgo sería el patrón B (Fraser *et al.*, 1995). Con respecto a lo anterior, se sabe que existe una mayor proporción de esta enzima (ATPasa de Ca^{2+}) en la región posacrosomal, lo que fortalecería el argumento de la menor fluorescencia emitida en este dominio en las células capacitadas, patrón B (Fraser, 1995).

De esta manera, con la prueba de CTC se ha identificado la emisión de una fluorescencia específica en el espermatozoide, produciendo los siguientes patrones: (F) espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto, (B) espermatozoides capacitados con acrosoma intacto, (AR) espermatozoides capacitados con reacción acrosomal completa (Maxwell y Johnson, 1997b; Green y Watson, 2001).

2.2.5 Protocolos de enfriado precongelación

El daño producido a la célula espermática durante proceso de congelamiento ha sido ampliamente estudiado desde diferentes enfoques, algunos investigadores han estudiado la viabilidad espermática durante la etapa de enfriamiento, desde la temperatura de cuarto hasta la temperatura de la formación de hielo (regularmente a -5°C), encontrando que el espermatozoide muestra una pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de su función celular cuando es enfriado rápidamente en el intervalo de temperatura de 20 a 0°C ; siendo mayor el daño en el rango de 12 a 2°C y al parecer, este daño se continua por debajo de 0°C hasta -10°C , aunque se considera de menor magnitud (Watson, 1995; Gao *et al.*, 1993). La explicación a este fenómeno no es totalmente clara, pero se supone que en esta etapa los cambios de temperatura ocasionan que los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide sufran un cambio en su estado físico; siendo éste una transición de la fase del estado líquido-semicristalino al estado de gel. Esta

modificación hace que la membrana se vuelva rígida y pierda elasticidad. Uno de los rangos de temperatura identificados en el cual ocurre este cambio en los espermatozoides de los mamíferos, es entre 10° C y 17° C (Holt y North, 1994), aunque otros autores han propuesto un intervalo a menor temperatura, entre 0° C y 4° C para el caso del espermatozoide de ratón (Noiles *et al.*, 1995); además en algunos invertebrados acuáticos (camarón) ya se tiene identificado otro rango de temperatura a la que ocurre una transición de fases, alrededor de 0° C (Crowe *et al.*, 1989). De acuerdo a lo anterior, algunos investigadores retrasando el tiempo de enfriado a la temperatura de 15° C por 3 horas (Maxwell y Johnson, 1997a) previo al proceso de congelado, han logrado mejorar la viabilidad en los espermatozoides del cerdo al descongelado. Otros autores prolongando el tiempo de enfriado hasta temperaturas cercanas a 0° C en los ovinos (Ríos *et al.*, 2004) y hasta -5° C en caprinos (Medrano *et al.*, 2001) han mejorado la viabilidad del semen al descongelado. Lo anterior hace suponer que si se extiende el tiempo de enfriado previo a la congelación se permitirá el reacomodo transversal y de dominios de la estructura tridimensional lipídica de la membrana plasmática permitiéndole mantener su estabilidad y funcionalidad, disminuyendo así la incidencia temprana del proceso de capacitación espermática, aumentando con esto su capacidad de fertilización.

3. Justificación

Se pretende estudiar algunos procesos básicos que ocurren a los espermatozoides cuando son sometidos a bajas temperaturas, siendo el espermatozoide de cerdo un modelo útil debido a su alta susceptibilidad. Actualmente no es posible congelar exitosamente el semen de cerdo con los métodos desarrollados, por lo que si se pudiera mantener la viabilidad de las células se lograría dar un impulso al desarrollo del proceso de congelación de semen y su uso en la inseminación artificial porcina. Además se podría promover la creación de bancos de recursos genéticos para especies en peligro de extinción (por ejemplo el cerdo pelón mexicano) donde se mantenga su germoplasma de manera indefinida, ayudando en la introducción y conservación del material genético durante largo tiempo.

4. Hipótesis

Si se aumenta el tiempo de enfriado hasta la temperatura donde se forma regularmente el hielo (-5°C) previo a la congelación se disminuirá el daño a la membrana y a la funcionalidad del espermatozoide porcino, ya que permitiría que la membrana plasmática tenga tiempo para su reorganización tridimensional, favoreciendo la integridad de la membrana plasmática y disminuyendo la presentación de la capacitación prematura; por tanto, se favorecería su capacidad de fertilización.

5. Objetivo General

Determinar el efecto del enfriado lento precongelación sobre la integridad de la membrana y la funcionalidad del espermatozoide porcino.

5.1 Objetivos específicos

- a) Evaluar el efecto del enfriamiento lento precongelación sobre la motilidad, la integridad acrosomal y de la membrana plasmática del espermatozoide porcino.

- b) Determinar el efecto del enfriamiento lento precongelación sobre el estado de capacitación espermática.

- c) Establecer si el método de criopreservación utilizado disminuye el daño funcional y estructural del espermatozoide porcino.

6 Material y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán (FES-C, UNAM), ubicado en la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km. 2.5 Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Se utilizó el semen proveniente de 5 sementales híbridos (Pietrain x Landrace y línea PIC 326) alojados en corrales individuales con 6 m² de espacio por animal, dentro de una instalación con ambiente controlado y alimentados con 2.3 kg de alimento comercial (PC 13%, EM 3.1 Mcal / kg) para cerdos reproductores, pertenecientes al Centro de Inseminación Artificial del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, ubicado en Jilotepec, Estado de México, el cual tiene una altura de 2500 msnm, clima semifrío subhúmedo, con precipitación pluvial anual de 750 a 1200 mm y una temperatura media anual de 10 a 16° C.

6.1 Diseño experimental

Se realizó un experimento para evaluar el efecto del enfriado lento previo a la congelación. Se utilizaron los eyaculados de los 5 sementales (al menos 5 eyaculados por macho), donde el factor experimental fue la temperatura de enfriado precongelación. De cada eyaculado, se congelaron 15 pajillas (5 por cada tratamiento). El método utilizado fue el estandarizado por Pursel y Johnson (1975) y modificado por Medrano (1998); en el cual, después de una hora de efectuada la colección se inició la evaluación espermática, para posteriormente continuar con el enfriado.

El enfriado comenzó a partir de 22° C hasta llegar a las temperaturas blanco de: a) +5°C (control), b) 0°C y c) -5°C. La velocidad de enfriado inicial de 22°C hasta +5°C fue de 0.2°C / min. Inmediatamente después de alcanzar las temperaturas blanco, se procedió a congelar las muestras en nitrógeno líquido para alcanzar la

temperatura de -196°C . La descongelación y evaluación de las muestras se hizo a 39°C en un baño maría.

6.2 Variables

a) Variables independientes:

Factor: Semental

Factor: temperatura precongelación

Niveles: a) 5°C
 b) 0°C
 c) -5°C

b) Variables dependientes

- Viabilidad, membrana plasmática intacta (%).
- Acrosoma intacto (%).
- Espermatozoides con motilidad progresiva (%).
- Estado de capacitación espermática (%).

6.3 Colección del semen

Se usaron los eyaculados provenientes de 5 machos con edades comprendidas entre 2 y 2.5 años, con una frecuencia de colección de 1 vez por semana.

La colección se realizó mediante la técnica de la mano enguantada, obteniendo el semen (fracción rica) en un termo precalentado a 37°C , realizando una dilución de 1:2 con un diluyente comercial MR-A[®] (Kubus, S. A., Madrid, España) manteniéndola en un baño maría a 37°C en el laboratorio (Córdova et al., 2001).

6.4 Evaluación del semen fresco

6.4.1 Macroscópica

Se evaluó la calidad del eyaculado tomando en cuenta el volumen, olor, color, presencia de cuerpo extraños (Martín-Rillo *et al.*, 1996).

6.4.2 Microscópica

a) Evaluación de la motilidad

Porcentaje de motilidad progresiva. La motilidad progresiva se evaluó a partir de una dilución 1:10 (v/v) de semen en medio BTS (Pursel y Jonhson, 1975; ver anexo 1). Se tomó 0.1 ml de semen y se mezcló con 9.9 ml de BTS; posteriormente, se realizó la evaluación de la motilidad progresiva colocando una gota en un portaobjetos limpio y calentado a 37° C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio óptico con el objetivo de 10x, dando un valor de 0 a 100 % a la proporción de los espermatozoides con movimiento rectilíneo-progresivo (Martin-Rillo *et al.*, 1996). Esta evaluación fue realizada por dos personas para disminuir el efecto del evaluador.

b) Determinación de la concentración espermática

La concentración de espermatozoides por ml de eyaculado se determinó por medio de una cámara de Neubauer, el procedimiento consistió en colocar un cubreobjetos sobre la cámara de conteo y llenar la cámara por capilaridad con semen diluido previamente a 1:200 (v/v) en solución de Hancock; enseguida la cámara se colocó en la platina del microscopio óptico y se procedió al conteo de los espermatozoides localizados en 5 de los 25 cuadros totales (1/5 parte); al final del conteo, se multiplicó el resultado por 10^7 obteniéndose la concentración espermática por mililitro.

c) Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Se empleó la tinción de eosina-nigrosina (Barth y Oko, 1989). El porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (viabilidad), se estimó a través de la observación de un frotis en el microscopio óptico; para ello, se depositó una gota de semen diluido 1:10 (v/v) sobre el extremo de un portaobjetos, se agregó el colorante eosina-nigrosina (2 gotas) mezclándose perfectamente para extender el frotis en una capa lo más delgada posible y se secó rápidamente con aire. Posteriormente, se procedió a la evaluación empleando el microscopio óptico con el objetivo de 100x, observando 100 células, diferenciando aquellas que estuvieron totalmente teñidas de color rosáceo (muertas) de las que no permiten el paso del colorante (vivas) y aparecen de color blanco.

d) Evaluación de la integridad del acrosoma

El estado del acrosoma se determinó mediante una muestra de semen fijada, para lo cual se utilizó una solución de glutaraldehído al 0.4% (v/v) en una proporción de 2:1 solución fijadora: semen diluido en citrato sódico isotónico. Las muestras se observaron al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 100x empleando para ello el objetivo de inmersión. Se visualizaron 100 espermatozoides, clasificando como acrosomas normales aquellos que presentaran el borde apical bien definido y nítido en forma de una semiluna oscura (NAR). Los resultados se expresaron en porcentaje de acrosomas normales y dañados (Peinado et al., 1998b; Córdova et al., 2002).

e) Evaluación del estado de capacitación espermática

Se valoró el estado de capacitación espermática mediante el uso del microscopio de fluorescencia utilizando la prueba de la clortetraciclina (CTC, Sigma, MO, USA). Se tomó una muestra de 0.5 ml del semen fresco, se pasó por una columna de sephadex G 50(6.25% (p/v) en Citrato de Sodio al 2.9% (p/v); Sigma, MO, USA) para aumentar el porcentaje de células vivas a evaluar por fluorescencia y se procesó la tinción de CTC en duplicado.

Se preparó la fórmula del amortiguador y de la CTC según Green y Watson (2001) con la solución fijadora propuesta por Mattioli *et al.* (1996).

Amortiguador CTC:

Na Cl 130 mM

Tris 20 mM

La solución de CTC tiene que ser preparada antes de cada experimento y contiene:

CTC-HCl 805 mM

Cisteína 5 mM

pH 7.8

Procedimiento:

- 1.- Agregar 100 μ l de solución CTC a 100 μ l de semen filtrado y mezclar durante 30 segundos en un tubo de ensaye.
- 2.- Agregar 22 μ l de solución fijadora de glutaraldehido al 0.2% (v/v).
- 3.- Tomar 10 μ l de la solución y depositar en un portaobjetos.
- 4.- Agregar una gota de DABCO (Diluido en glicerol PBS 9:1), según la fórmula de Kaneto *et al.* (2002) y mezclar. Este compuesto sirve para retrasar la pérdida de fluorescencia.
- 5.- Colocar un cubreobjetos sobre la muestra, retirar el líquido excedente.
- 6.- Colocar las laminillas a resguardo de la luz solar hasta la observación en el microscopio de luz fluorescente (iluminación azul-violeta emitida a 470nm).
- 7.- Observación de 100 células por cada laminilla (duplicado) en los que se observaron los patrones de fluorescencia y se determinó un porcentaje para cada patrón observado.

Se determinó el porcentaje de presentación de los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide con la clasificación utilizada por Kaneto *et al.* (2002):

Patrón F fluorescencia total (espermatozoides no capacitados).

Patrón B una banda libre de fluorescencia en el dominio posacrosomal (espermatozoides capacitados con acrosoma intacto).

Patrón AR baja fluorescencia en la totalidad de la cabeza con una banda de fluorescencia brillante a lo largo del segmento ecuatorial y otra variación consistente en solo la emisión de fluorescencia en la región posacrosomal (espermatozoides capacitados con reacción acrosomal).

Los patrones de fluorescencia de CTC mostrados por los espermatozoides se agruparon de acuerdo al procedimiento usado por Watson y Green (2000) debido a que el efecto principal a evaluar es el estado de capacitación prematura y el aumento en la frecuencia del patrón AR durante este proceso se considera muy ligero y no significativo; además éste aumento se considera una consecuencia de la transformación en el tiempo del patrón B en AR.

Categorización según el estado de capacitación:

F = Espermatozoides no capacitados.

(B + AR) = Espermatozoides capacitados.

El procedimiento descrito anteriormente para realizar la tinción de CTC, es utilizado tanto para evaluar semen fresco como para evaluar semen descongelado.

6.5 Dilución del semen

Una vez obtenida la concentración espermática, la muestra se diluyó con un medio para congelación BF5 (Pursel y Johnson, 1975, ver anexo 2). Dicha dilución se realizó en dos pasos: la fracción sin glicerol se agregó en el baño María a 32° C y la fracción con glicerol a 6.5° C; el diluyente se agregó lentamente a la misma temperatura del semen por la pared del tubo, mezclándose perfectamente.

Para calcular el número de dosis a obtener por eyaculado, se requiere conocer el volumen del eyaculado, la concentración de espermatozoides por mililitro y el porcentaje de espermatozoides móviles. Se usó la siguiente fórmula para su cálculo:

$$\text{Número de dosis} = \frac{(\text{Volumen}) (\text{Concentración}) (\text{Porcentaje de células móviles})}{\text{Número de células móviles requerido por dosis}}$$

El número de células móviles utilizado por dosis fue de 200×10^6 .

6.6 Enfriado precongelación del semen

Después de la evaluación de la calidad seminal, el semen se centrifugó a 300 g durante 10 minutos eliminando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla espermática en el diluyente BF5 sin glicerol a 22° C, dilución 1:1 semen/diluyente, la concentración de espermatozoides resuspendidos en BF5 se ajustó para preparar las dosis a una concentración de 200×10^6 espermatozoides.

A continuación, el semen diluido se sometió a un enfriado en un sistema de recipientes: (A) con solución salina y (B) con hielo salino hipertónico (7.85% p/v) dentro de un refrigerador adaptado como enfriador hasta las temperaturas blanco preestablecidas de +5°C, 0°C y -5°C (ver figura 1). Cuando el semen alcanzó la

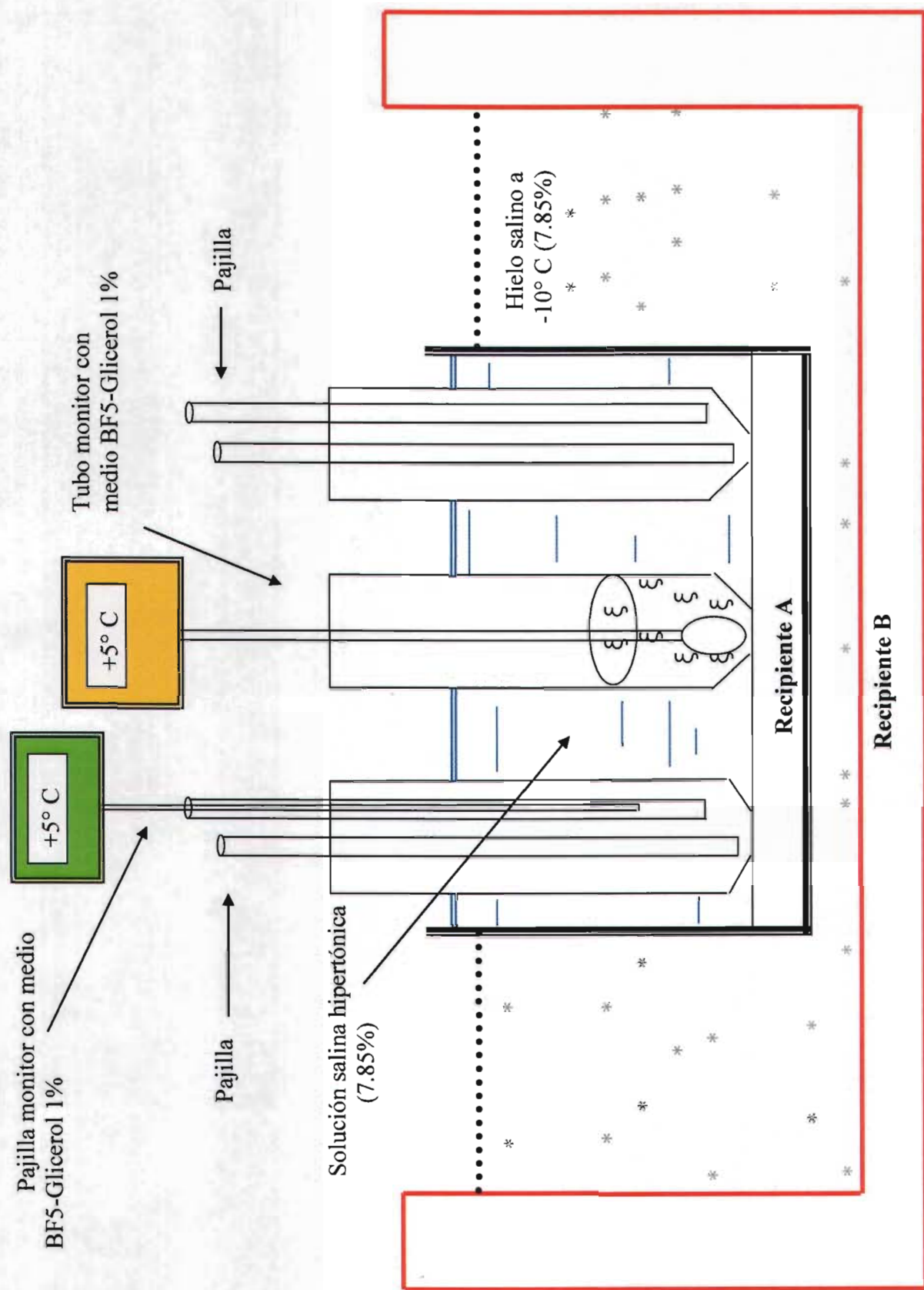


Figura 1. Sistema de enfriado de temperatura de cuarto +22° C hasta -5° C, usando solución salina-hielo salino hipertónico (7.85%).

temperatura de 6.5° C se agregó el medio con crioprotector (BF5 con 2% de glicerol) para alcanzar una concentración final de 1% de glicerol y se empajilló en pajillas francesas (IMV, Francia) de 0.5ml de volumen previamente identificadas anotando el tratamiento, número de macho y la fecha de congelación. Las pajillas se sellaron con plastilina utilizando el siguiente código de colores: color amarillo para el tratamiento de enfriado a + 5 °C, el color azul para las pajillas de enfriado a 0°C y el de color rosa para las de -5°C.

El enfriado del semen se realizó en dos etapas:

- a) Primera etapa, fue desde la temperatura de cuarto (22°C) hasta +5° C usando solución salina hipertónica a una velocidad promedio de 0.2°C / min.
- b) Segunda etapa, fue desde la temperatura de +5°C hasta -5°C usando hielo salino hipertónico a -10° C a una velocidad promedio de 0.12°C /min.

Este procedimiento ha sido validado previamente por Ríos *et al.*, (2004). Se muestra el sistema con sus respectivas curvas de enfriado en las figuras 1, 2 y 3.

6.7 Congelación del semen

El enfriado terminó cuando las pajillas alcanzaron la temperatura blanco de cada tratamiento, en ese momento se retiraron del refrigerador y se colocaron sobre una rejilla dentro de un recipiente doble de poli-estireno exponiéndose a los vapores de nitrógeno (-100 a -120°C) durante 15 minutos a una altura de 4 cm, finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196°C).

6.8 Descongelación del semen

El semen congelado permaneció almacenado en un tanque con nitrógeno líquido por un periodo mínimo de 30 días. Para el descongelado, las pajillas fueron

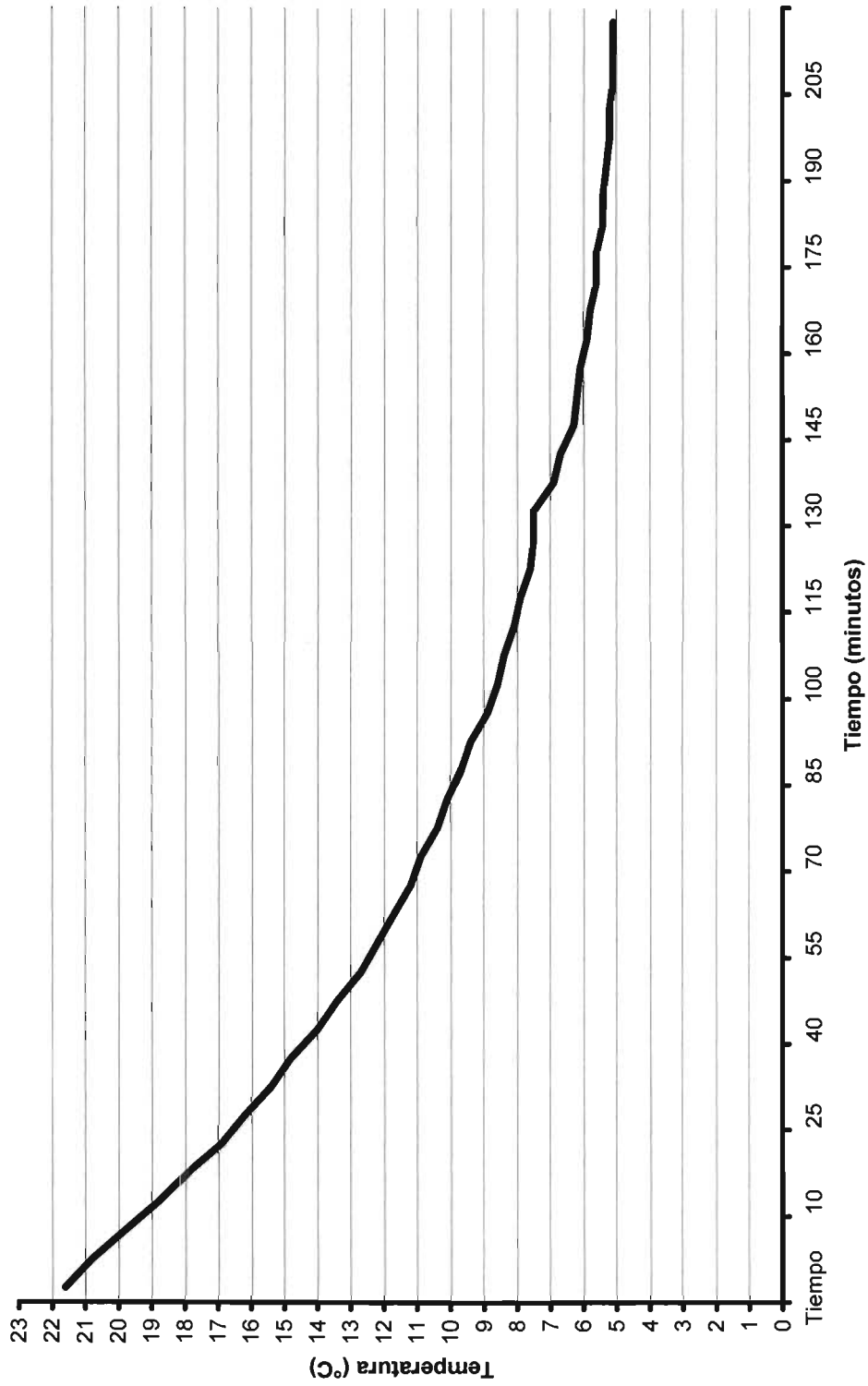


Figura 2. Curva de enfriado desde temperatura de cuarto (22°C) hasta 5°C usando solución salina hipertónica (7.85%).

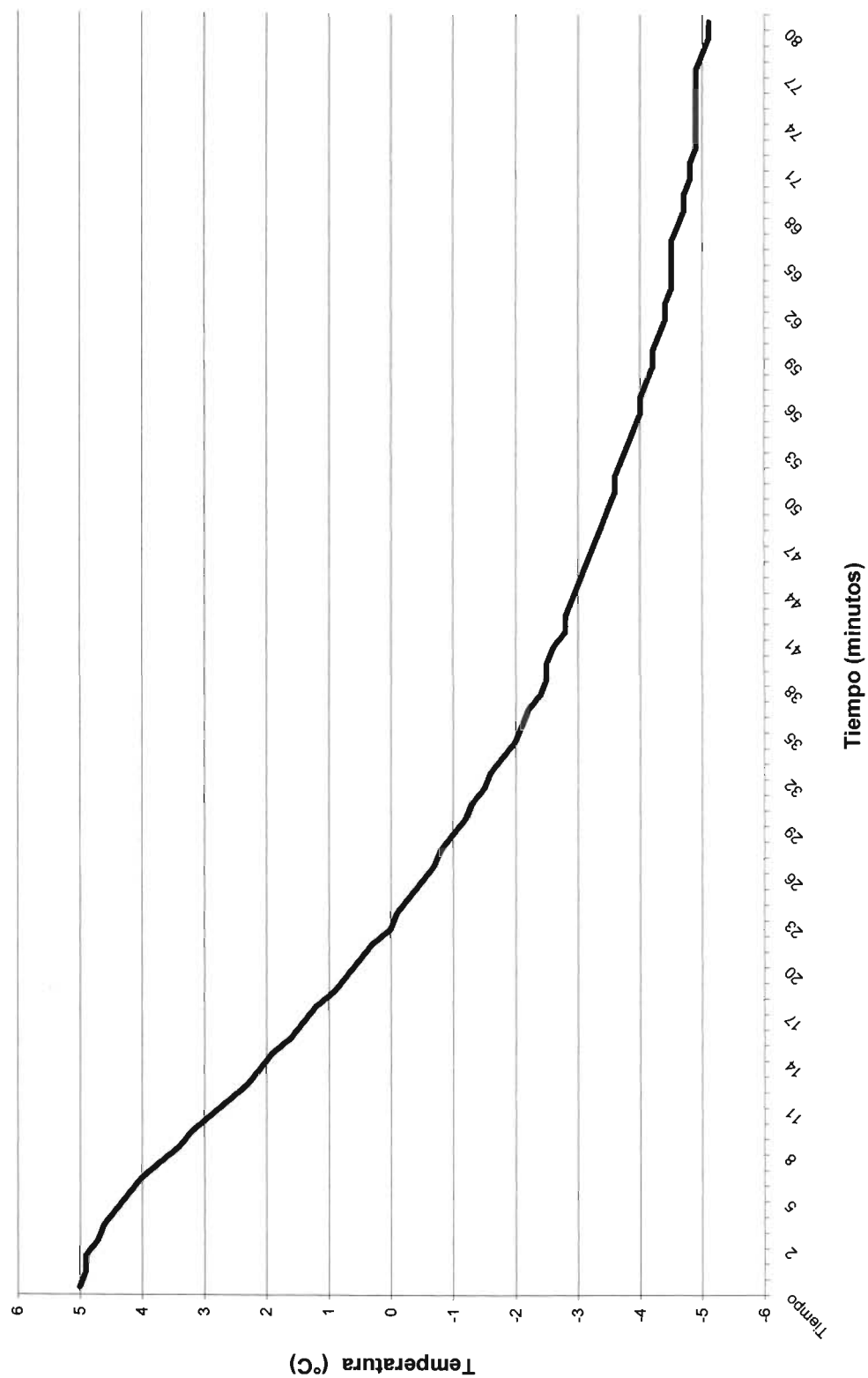


Figura 3. Curva de enfriado de la temperatura de +5° C hasta -5° C usando solución salina-hielo salino (7.85%).

sumergidas en un baño María a 39°C durante 30 segundos. Enseguida, las pajillas se secaron y el contenido se depositó en tubos de ensaye vacíos colocados en el mismo baño María. Se descongelaron tres pajillas de cada tratamiento de cada eyaculado. Se procedió inmediatamente a la valoración de la motilidad, la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma; al mismo tiempo, se tomó una muestra para la valoración del estado de capacitación mediante microscopía de fluorescencia.

Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- 1.- Motilidad progresiva en BTS (Pursel y Johnson, 1975) a una dilución de 1:10 (v/v).
- 2.- Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (eosina-nigrosina).
- 3.- Evaluación de la integridad del acrosoma (microscopía de contraste de fases).
- 4.- Evaluación del estado de capacitación usando la prueba fluorescente (CTC).

El estado de capacitación espermática al descongelado se evaluó también con la prueba de CTC; siendo el mismo protocolo utilizado para evaluar semen fresco, excepto que se usó la muestra descongelada (pajilla) con mejor porcentaje de motilidad progresiva de cada tratamiento y se pasaron los espermatozoides por una columna de 1.5 ml de Sephadex G 50 (6.25% p/v en Citrato de Sodio al 2.9% p/v) para aumentar el porcentaje de células vivas a evaluar con la prueba de CTC en el microscopio de fluorescencia (La descripción de los patrones fluorescentes de CTC están detallados en la sección de Evaluación de semen fresco y en las fotografías de la figura 4).



Patrón F



Patrón B



Patrón AR



Patrón AR

**Figura 4. Estado de capacitación espermática mediante la prueba de Clortetraciclina (CTC).
Patrones: F= No capacitado; B =Capacitado con acrosoma intacto; AR= Capacitado con reacción acrosomal**

6.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables de respuesta de la evaluación microscópica del semen fresco y descongelado se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), usando el programa estadístico Statistica versión 2000 (Stats Soft, Reino Unido). Se utilizó la prueba de Tukey para comparar diferencias entre medias. Previo al análisis, se realizó una transformación de los datos expresados en porcentajes mediante la aplicación de la transformación de arco-seno, para normalizarlos (Steel y Torrie, 1985).

El modelo estadístico utilizado es:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + E_j + R_{eij} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} es la observación individual realizada sobre una variable dependiente determinada

μ Es la media poblacional.

R_i Es el efecto de la i-ésimo tratamiento (+5° C, 0° C, -5° C).

E_j Es el efecto de la j-ésimo macho.

R_{eij} Es el efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo macho.

e_{ij} Es el error aleatorio.

7 Resultados

Los valores de las variables analizadas se muestran en los cuadros de resultados con las medias y su error estándar, se consideraron el efecto de tratamiento y del semental.

Los valores promedio del semen fresco para cada característica evaluada se presentan en el cuadro 1, donde se observa que los valores promedios para cada semental fueron muy similares y estuvieron dentro del rango normal de la especie. En el cuadro 2 se presentan las medias de cada variable según el tratamiento de enfriado aplicado.

7.1 Motilidad

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva medido inmediatamente después de la descongelación de las pajillas correspondientes al enfriado a -5°C (36.9%) fue mayor en dos unidades porcentuales al resultado del enfriado (control) a $+5^{\circ}\text{C}$ (34.7%) ($p < 0.05$), pero no difiere del tratamiento de enfriado a 0°C (35.4%) (cuadro 2 y figura 5), también se observa una disminución considerable en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva al descongelado cuando se compara con el porcentaje de motilidad en fresco (figura 5). La motilidad progresiva evaluada en fresco y al descongelado para el macho 1 fue menor ($p < 0.05$) a la registrada en los otros sementales (cuadro 1 y figura 6).

Cuadro 1. Valores del semen fresco de cada macho

Macho	Eyaculados n	Motilidad progresiva (%)	Espermatozoides con membrana intacta (%)	Espermatozoides con acrosoma intacto (%)	Espermatozoides no capacitados (%)
1	6	83.3 ± 2.1 a	89.8 ± 1.9 a	96.2 ± 0.9 a	63.9 ± 4.2 a
2	9	85.6 ± 1.3 ab	88.8 ± 1.2 a	97.1 ± 0.5 a	65.6 ± 2.8 a
3	6	88.8 ± 1.5 ab	87.0 ± 1.6 a	97.0 ± 0.6 a	74.8 ± 1.8 a
4	7	90.4 ± 0.6 b	91.3 ± 1.3 a	96.3 ± 0.7 a	71.9 ± 1.9 a
5	5	90.6 ± 1.2 b	89.6 ± 1.7 a	96.6 ± 0.5 a	75.4 ± 1.0 a

^{a,b,c} Valores con literales distintas dentro de las columnas son diferentes (P<0.05).
Valores expresados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

Cuadro 2. Efecto del tratamiento de enfriado precongelación sobre las variables del semen evaluadas al descongelado

Tratamiento	Motilidad progresiva (%)	Espermatozoides con membrana intacta (%)	Espermatozoides con acrosoma intacto (%)	Espermatozoides capacitados (%)
+5°C	34.7 ± 0.6 ab	57.5 ± 1.4 a	74.4 ± 0.7 a	61.9 ± 1.29 a
0°C	35.4 ± 0.6 bc	57.9 ± 1.4 a	75.1 ± 0.7 a	63.8 ± 1.29 a
-5°C	36.9 ± 0.6 c	61.3 ± 1.4 a	77.9 ± 0.7 b	57.6 ± 1.29 b

^{a,b,c} Valores con literales distintas dentro de las columnas son diferentes (P<0.05).
Valores expresados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

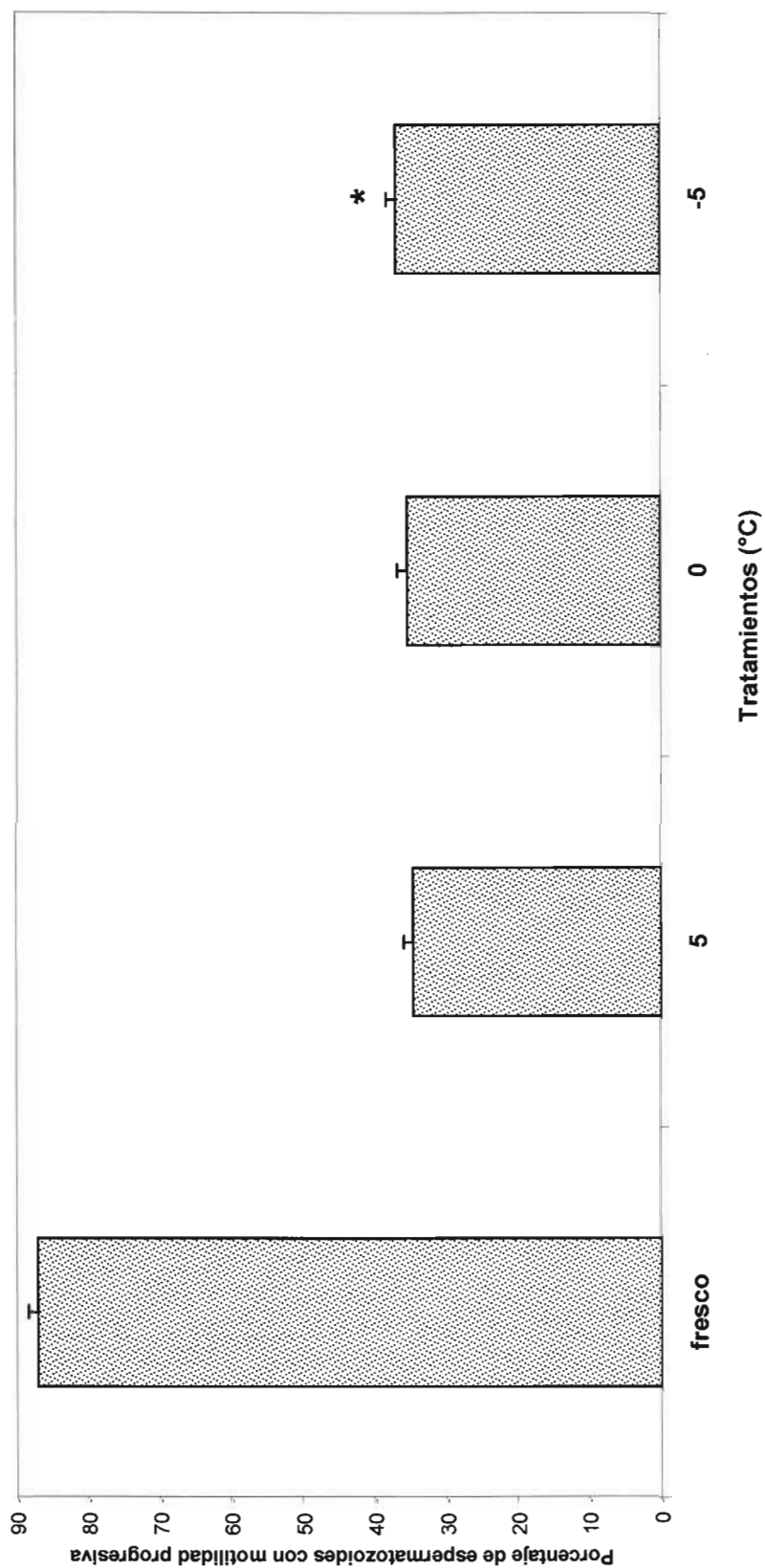


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en el semen fresco y al descongelado en los distintos tratamientos de enfriado pre congelación (+5°C, 0°C, -5°C). Los valores son las medias ± el error estándar.
* (p<0.05)

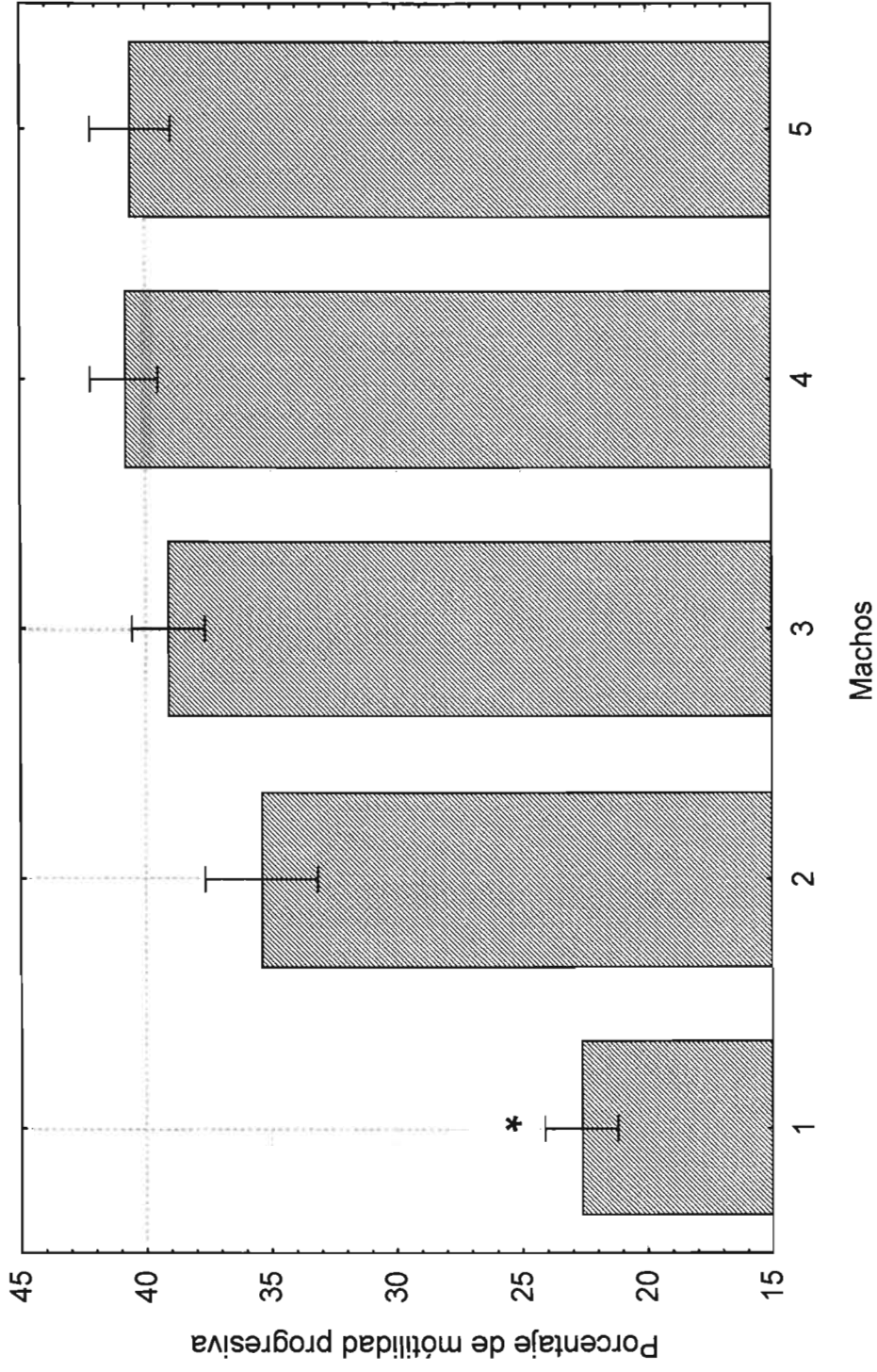


Figura 6. Porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides al descongelado de cada macho. Los valores son las medias \pm el error estándar. * ($p < 0.05$)

7.2 Integridad de la membrana plasmática

El tratamiento de enfriado no afectó esta variable, al existir sólo diferencias numéricas en cuanto al porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, siendo las proporciones obtenidas de 57.5%, 57.9% y 61.3% para los tratamientos de enfriado a +5° C, 0° C y -5° C respectivamente (Cuadro 2). Existió una disminución de aproximadamente un 30% en la viabilidad entre el semen fresco y el descongelado (figura 7) y los sementales 1 y 2 tuvieron menor ($p < 0.05$) porcentaje de espermatozoides viables que los demás sementales (figura 8).

7.3 Integridad del acrosoma

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, se observó que el tratamiento enfriado a -5°C tuvo una mejor respuesta (77.9%) que los tratamientos de enfriado a +5° C (74.4%) y 0° C (75.1%), y esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$; cuadro 2). También fue notoria la disminución del porcentaje de acrosomas normales (20% aproximadamente) cuando el semen fresco es sometido al proceso de congelado-descongelado (figura 9).

El macho 2 tuvo el mayor ($p < 0.05$) porcentaje de acrosomas intactos al descongelado (figura 10).

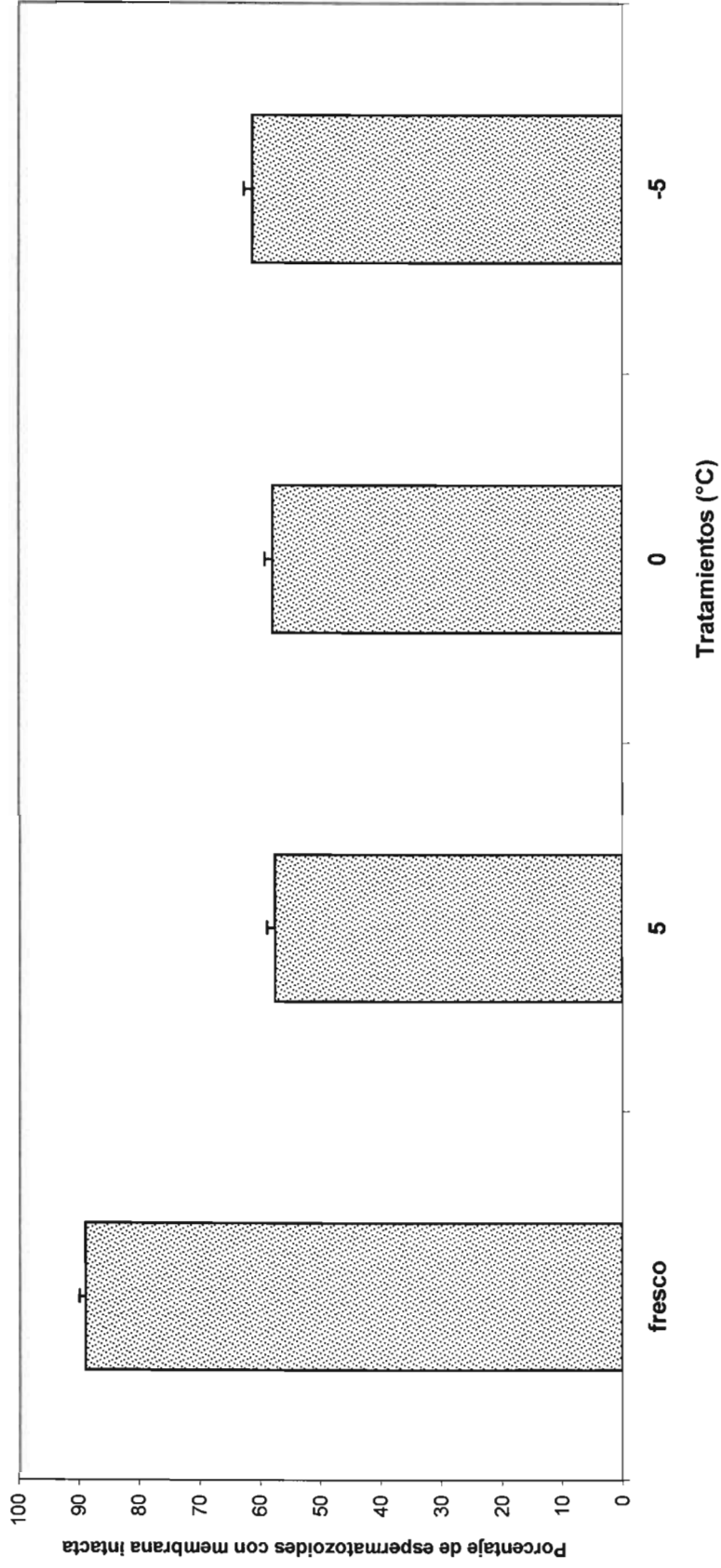


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta en el semen fresco y al descongelado en los distintos tratamientos de enfriado precongelación (+5°C, 0°C, -5°C). Los valores son las medias ± el error estándar. * (p<0.05)

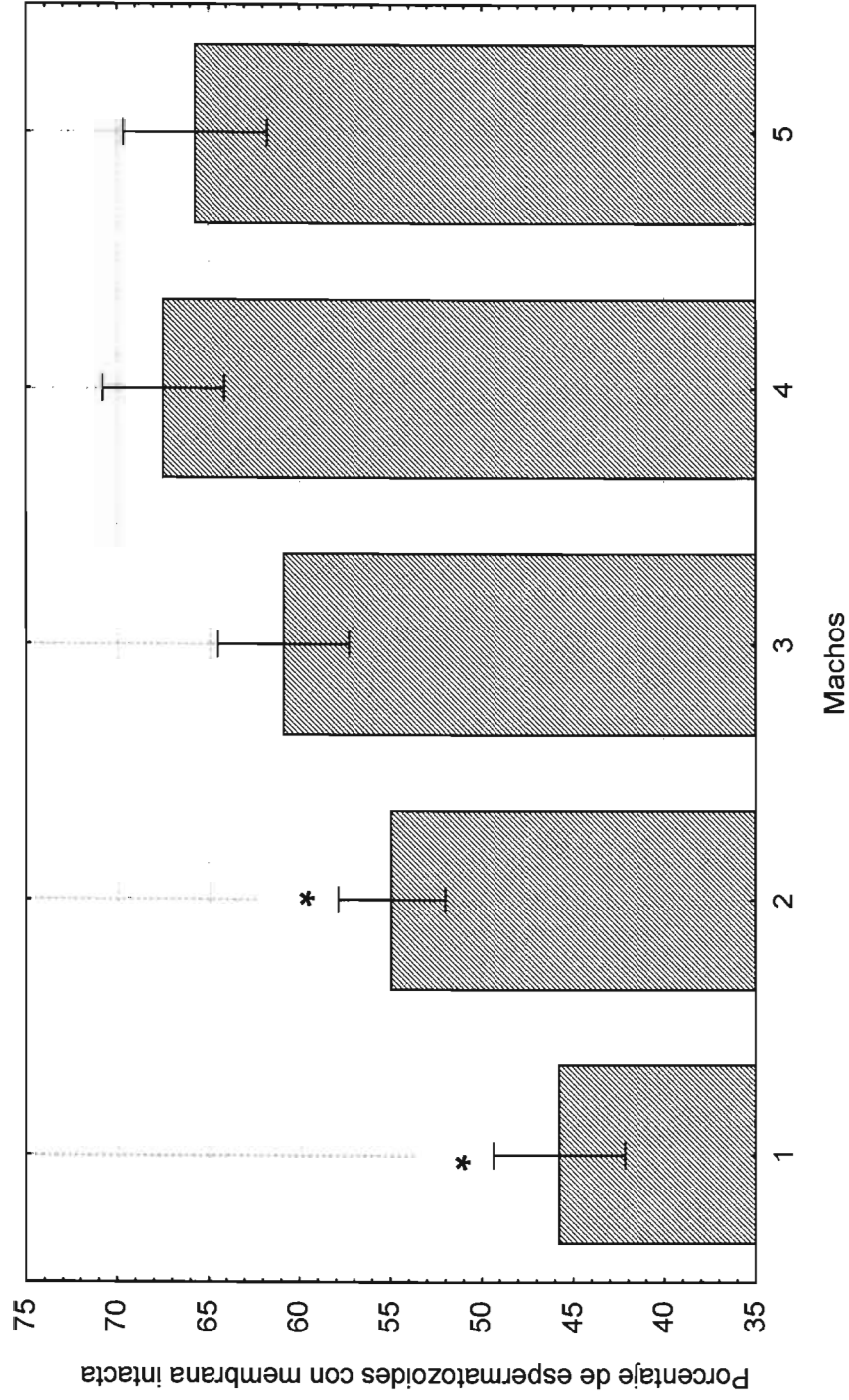


Figura 8. Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta al descongelado de cada macho. Los valores son las medias \pm el error estándar. * ($p < 0.05$)

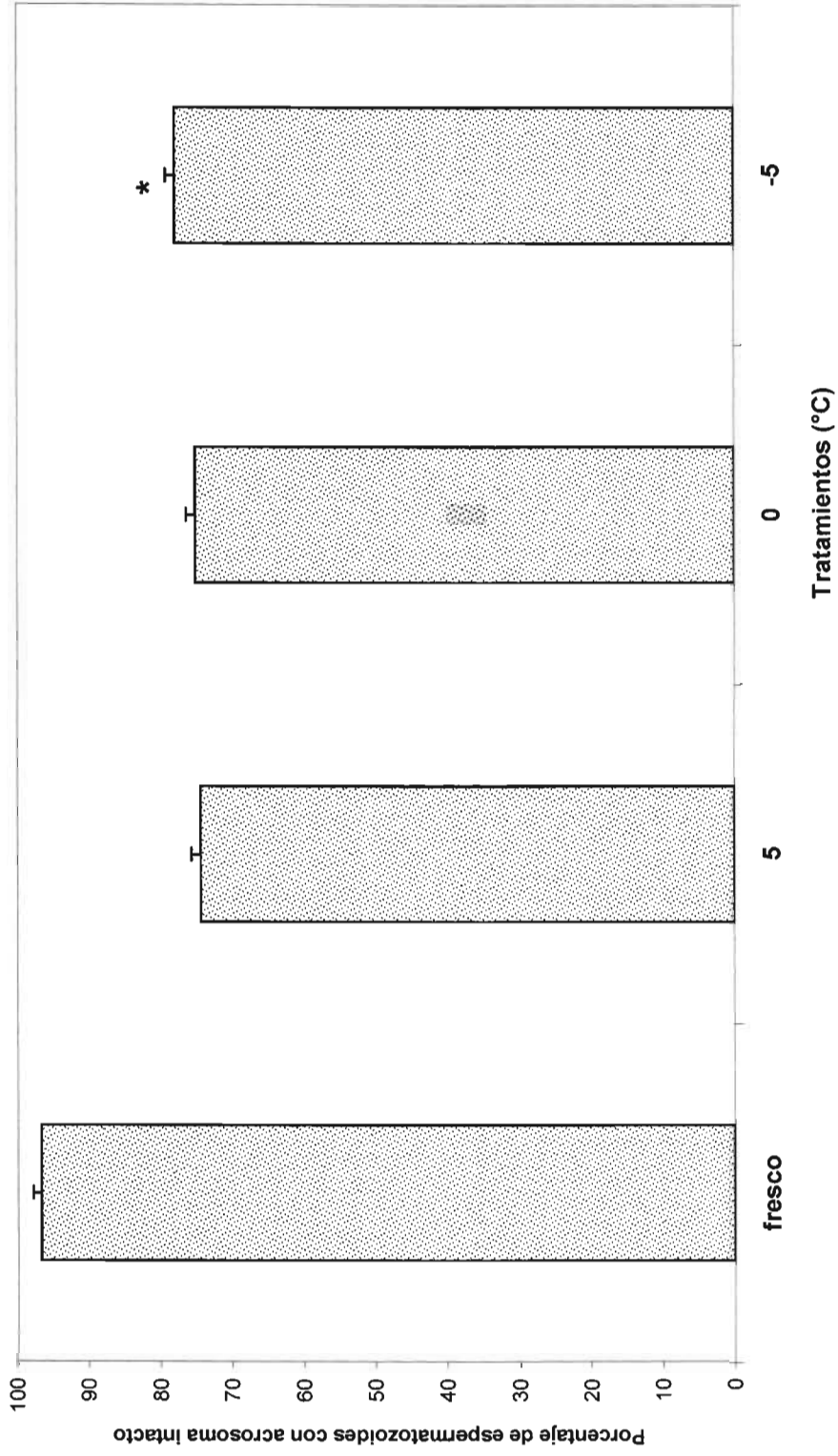


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en el semen fresco y al descongelado en los distintos tratamientos precongelación (+5°C, 0°C, -5°C). Los valores son las medias \pm el error estándar. * ($p < 0.05$)

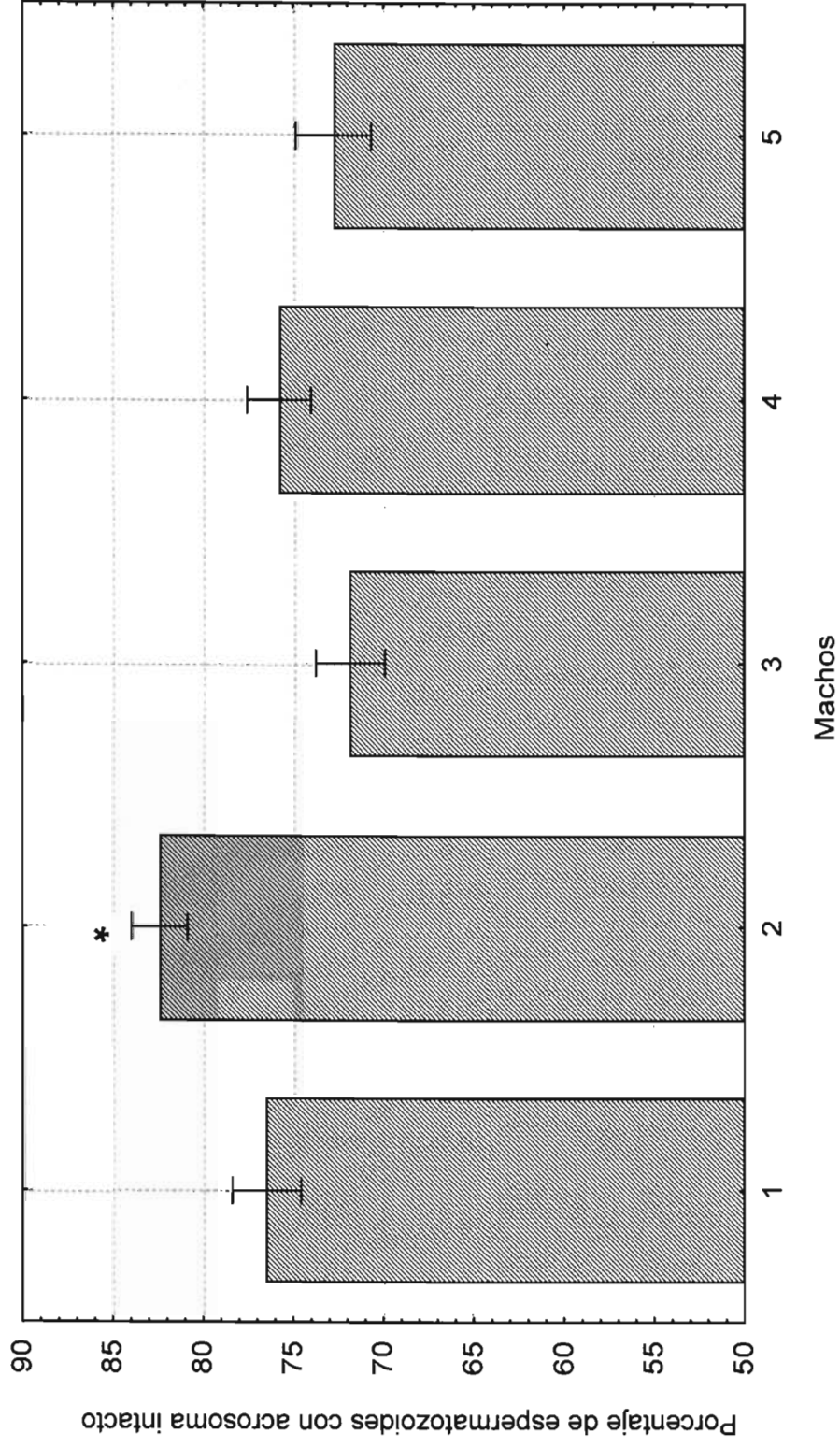


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto al descongelado de cada macho. Los valores son las medias \pm el error estándar * ($p < 0.05$)

7.4 Estado de capacitación espermática

Los patrones de fluorescencia observados mediante la prueba de la Clortetraciclina (CTC) se muestran en la figura 4.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura (patrones B y AR), el tratamiento enfriado a -5°C mostró la menor proporción de estos (57.6%) y fue diferente ($p < 0.05$) al obtenido del tratamiento de enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ (61.9%) y 0°C (63.8%); (cuadro 2).

El cambio en el estado de capacitación espermática fue notorio cuando se comparó la proporción de espermatozoides no capacitados (patrón F) entre el semen fresco ($F = 69.7\%$) y el descongelado; este proceso, disminuyó la proporción de patrones ($F = 40\%$) aumentando el porcentaje de espermatozoides capacitados con o sin reacción acrosomal (B + AR), ver Figura 11. El cambio en los porcentajes de espermatozoides no capacitados (patrón F) a capacitados (patrón B + AR) por efecto del proceso de congelado-descongelado en cada seminal fue similar, aunque existió diferencia en la magnitud de la respuesta por individuo (ver Figura 12).

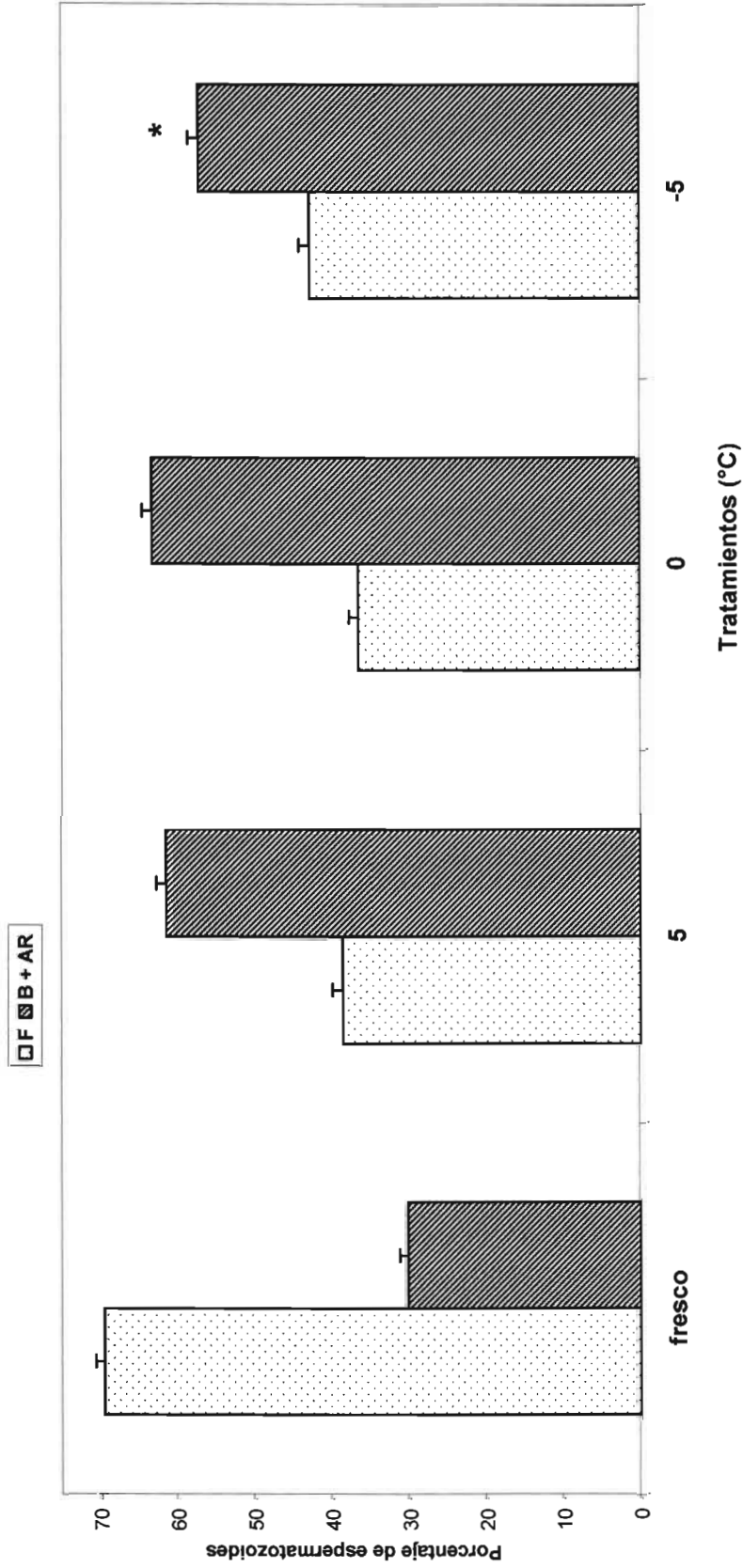


Figura 11. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrones B + AR) en el semen fresco y al descongelado en los distintos tratamientos (+5°C, 0°C, -5°C) usando la CTC. Los valores son las medias \pm el error estándar. * ($p < 0.05$)

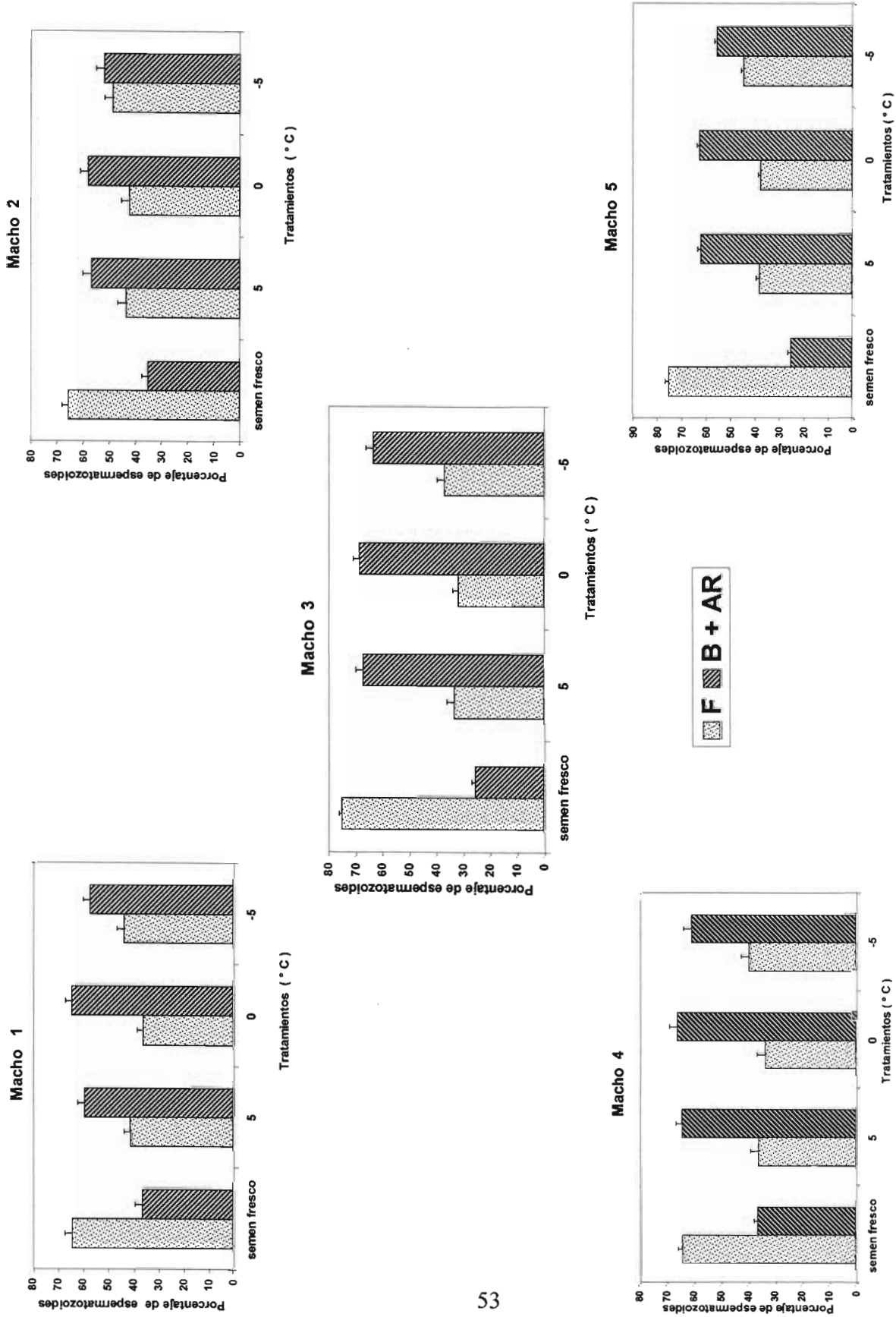


Figura 12. Porcentaje de espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrones B + AR) en el semen fresco y al descongelado en los distintos tratamientos pre congelación (+5°C, 0°C, -5°C) para cada macho usando la prueba de CTC. Los valores son las medias \pm error estándar.

Discusión

El sistema de enfriado lento a temperaturas cercanas a cero grados empleando solución salina – hielo salino hipertónicos, además de sencillo, proporciona curvas de enfriado constantes y repetibles (Ríos *et al.*, 2004). Esta herramienta es muy útil cuando no se dispone de un refrigerador programable a temperaturas bajo cero grados.

En el presente trabajo, con este sistema de enfriado se obtuvo una supervivencia espermática al proceso de congelado-descongelado similar a la reportada en semen de macho cabrío (Medrano *et al.*, 2001) y de carnero (Ríos *et al.*, 2004); cuyos autores, usaron una metodología similar, difiriendo solo éstos últimos en la temperatura final de enfriado (-2°C). Aunque estos resultados indican hasta el momento una discreta mejora, se pueden comparar con otros resultados obtenidos al preservar semen porcino con un sistema tradicional de enfriado a +5°C y congelado en pellets (Pursel y Johnson, 1975) y con los sistemas automáticos de enfriado a 3°C /min hasta -5° C y congelado en pajillas (Bwanga *et al.*, 1991b; Fiser *et al.*, 1991), que implica el uso de una máquina congeladora de difícil adquisición y elevado costo.

8.1 Motilidad

Con respecto al porcentaje de motilidad progresiva existieron diferencias entre tratamientos, siendo el porcentaje de células motiles al descongelado mayor en el tratamiento de enfriado lento hasta -5° C, esto coincide con lo reportado por Fiser *et al.* (1991) en semen porcino, aunque ellos utilizan una tasa de enfriado más rápida (3°C/min) y con los resultados obtenidos por Ríos *et al.* (2004) en semen ovino. Al respecto, se ha mencionado que este mejor desempeño está asociado a un enfriamiento lento en temperaturas cercanas a 0° C (previo a la formación de

hielo), ya que en experimentos donde se ha enfriado de +5°C a -5°C a tasas rápidas se ha visto un efecto detrimental en la criosupervivencia (Bwanga *et al.*, 1991b; Medrano *et al.*, 2002a), por lo que se recomienda usar un enfriado lento hasta -5°C y aumentar la velocidad de enfriado por debajo de esta temperatura (Bwanga *et al.*, 1991b; Medrano *et al.*, 2002a; Kumar *et al.*, 2003; Thurston *et al.*, 2003).

Para esta variable existió diferencia entre machos al descongelado, independientemente del tratamiento de enfriado, siendo menor la motilidad al descongelado en los machos 1 y 2. Al respecto, se debe tomar en cuenta que uno de estos machos registró en su evaluación en fresco un promedio de motilidad progresiva inferior al registrado por los otros machos antes de ser congelado y aunque sus valores estarían dentro de lo aceptable para poder ser congelado, se sugiere que la menor calidad de los eyaculados de éste macho pudo haber influido en sus resultados negativos al descongelado, independientemente de la mayor susceptibilidad de su semen al proceso de congelado-descongelado.

El proceso de congelado-descongelado del semen ocasiona una disminución en el porcentaje de espermatozoides motiles, lo que afecta el éxito en la gestación de las cerdas inseminadas con este tipo de células (Huang *et al.*, 1999). Aunque se ha considerado que la correlación de la motilidad espermática con la fertilidad es baja, en trabajos que han evaluado la motilidad mediante el sistema de análisis asistido por computadora (CASA) se ha identificado a ésta como un indicador consistente de la fertilidad obtenida en granja (Holt *et al.*, 1997). Además, se ha estimado que el porcentaje mínimo de motilidad progresiva en el semen diluido preservado a 15°C para asegurar que se tendrá una fertilidad aceptable es de 60% (Johnson *et al.*, 2000). No obstante, que en este trabajo el porcentaje de motilidad progresiva al descongelado fue relativamente bajo, alrededor de 35%, presentándose en todos los tratamientos una tendencia similar. Aunque este valor de motilidad sea ligeramente inferior a lo reportado por Bwanga *et al.* (1991a) al congelar semen porcino en minipajillas, es superior a lo obtenido por los mismos

autores pero mediante congelación en maxitubos y similar a lo reportado por Medrano *et al.* (2001) en semen de caprino y por Salamon y Maxwell (1995) en semen de ovino.

La diferencia positiva de alrededor de un 2% en el porcentaje de motilidad progresiva obtenida por el enfriado hasta -5°C puede considerarse muy pequeña; aun así, es posible que esta mejora en motilidad pudiera repercutir en un incremento en la fertilidad *in vivo*. Adicional a lo anterior, los resultados de viabilidad (integridad de la membrana plasmática) indican que existe una población de células que están vivas pero que no presentan movimiento, con lo que se podría estar subestimando el potencial fertilizante de las muestras al ser evaluada la supervivencia al proceso de congelado en el laboratorio.

8.2 Integridad de la membrana plasmática

En el presente estudio no existieron diferencias en el porcentaje de células con membrana intacta, esta situación contrasta con lo publicado por otros autores (Medrano *et al.*, 2001; Ríos *et al.*, 2004) que encontraron una mejora en el porcentaje de células con membrana intacta en los tratamientos de enfriado lento por debajo de 0°C. Aún así, los resultados de este trabajo mantienen una tendencia numérica similar, donde el enfriado por debajo de cero grados mejora la viabilidad. Se menciona que el enfriado del espermatozoide, en general, disminuye el porcentaje de células con membrana intacta, sobre todo cuando el enfriado se realiza de forma rápida, ya que se considera que la membrana plasmática es la estructura celular que presenta un daño mayor en su integridad (De Leeuw, *et al.*, 1990). La tendencia observada en los resultados de este trabajo coinciden con la hipótesis de que la desestabilización y daño a la membrana asociada a la criopreservación puede ser atribuida en mayor proporción al proceso de enfriado cercano a 0° C, que al congelado y descongelado (Maxwell y Johnson, 1997) y que esta integridad se ve

comprometida fuertemente si no se realiza el enfriado de forma lenta en este rango crítico de temperatura. Un elemento importante a considerar es el factor individuo (Parkinson y Whitfield, 1987; Holt, 2000), para ésta variable existió una población (dos individuos) que presentan una mayor susceptibilidad al proceso de enfriado-congelado, independientemente del tipo de tratamiento empleado. Medrano *et al* (2002a) mencionan que durante el proceso de congelado-descongelado del semen porcino, el factor individuo resulta inclusive más importante que las condiciones físicas del protocolo en la criosupervivencia espermática, considerándose que ésta diferencia se debe a un elemento de tipo genético que determina el éxito en la criosupervivencia espermática (Woelders *et al.*, 1996; Thurston *et al.*, 2002).

8.3 Integridad del acrosoma

El enfriado lento precongelación hasta -5°C realizado en este trabajo mejoró la estabilidad de la membrana espermática, disminuyendo el daño acrosomal, lo que coincide con el procedimiento de enfriado lento hasta una temperatura cercana al punto de congelamiento del medio extracelular sugerido por diversos autores (Bwanga *et al.*, 1991b; Fiser *et al.*, 1991). La mejor preservación de la integridad de la membrana acrosomal puede estar asociada a condiciones favorables al momento de congelar, ya que el daño a esta estructura que ocasiona disrupción y pérdida de la membrana acrosomal se ha asociado al choque frío (Watson, 1981; De Leeuw, *et al.*, 1990), al proceso de formación de hielo intracelular (Mazur, 1985) y al proceso de transición de fases de la membrana lipídica (Holt y North, 1984). Se ha identificado un rango de temperatura a la cual ocurre este cambio en los espermatozoides de mamíferos, entre 10°C y 17°C (Holt y North, 1994). Sin embargo, en otras especies (invertebrados acuáticos) se ha identificado otro rango de temperatura a la que también ocurre una transición de fases alrededor de 0°C (Crowe *et al.*, 1989) y en la membrana del espermatozoide de ratón se ha

identificado un rango de temperatura (de 0° C a +4° C) donde se da también una transición de fase lipídica (Noiles *et al.*, 1995); lo anterior sugiere que el enfriado lento por debajo de 0° C podría favorecer un mejor empaquetado de fosfolípidos y acomodo de proteínas en la membrana plasmática del acrosoma (Holt, 2000), lo que disminuiría el daño ocasionado a este organelo durante el proceso de enfriado en este rango crítico de temperatura.

8.4 Estado de capacitación espermática

El porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura fue menor en el tratamiento enfriado a -5° C, esto coincide con lo reportado anteriormente por Ríos *et al.* (2004) en el semen de carnero e indica que el tratamiento de enfriado a -5°C podría disminuir el proceso de desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide capacitado prematuramente, aumentando con esto el periodo de vida media de los espermatozoides dentro del aparato reproductor de la hembra; de esta manera, se favorece las posibilidades de fertilización del ovocito.

Aunque no esta claro el mecanismo exacto que produce las alteraciones similares a la capacitación en el espermatozoide, este efecto ya ha sido identificado en el proceso de enfriado y congelado de semen de carnero (Gillan *et al.*, 1997), verraco (Green y Watson, 2001) denominándose “efecto similar a la capacitación” (capacitation-like effect) o capacitación prematura. Este efecto ha sido reportado tanto en protocolos de enfriamiento a +4° C con medios que no contienen factores capacitantes, como en medios que promueven la capacitación y que contienen bicarbonato y calcio (Kaneto *et al.*, 2002) así como medios específicos como el Tyrode (Maxwell y Johnson, 1997; Watson y Green, 2000) cuando las muestras son incubadas para la promoción del proceso de capacitación; específicamente un incremento en el número de espermatozoides capacitados, clasificados como patrón B (Maxwell y Johnson, 1997b; Green y Watson, 2001; Kaneto *et al.*, 2002).

Lo mencionado anteriormente podría indicar que existe un menor daño a la membrana plasmática en los espermatozoides enfriados lentamente hasta -5°C ; ya que, parecería que esa mayor proporción de espermatozoides no capacitados con ese tratamiento, mantienen la integridad y funcionalidad de su membrana; ésta situación, pudiera retrasar ciertos eventos (mayor nivel de Ca^{2+} intracelular) asociados a la capacitación prematura y esto explicaría parcialmente la mayor proporción de espermatozoides con patrón F. Lo anterior es deseable, ya que se podrían dar posteriormente y de manera adecuada los cambios en la fluidez de la membrana plasmática que favorezcan la verdadera capacitación y reacción acrosomal en el aparato reproductor de la hembra.

Por otro lado, los cambios en los patrones de tinción de CTC reportados por diversos autores, confirman la utilidad de esta sonda para monitorear el estado de capacitación espermática (Wang *et al.*, 1995; Mattioli *et al.*, 1996; Green y Watson, 2001; Kaneto *et al.*, 2002). Al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo validan la utilización de la prueba de CTC, no solo para monitorear el estado de capacitación; sino también para utilizarla para estudiar el efecto que ejercen diversos factores sobre el estado de capacitación del espermatozoide porcino durante el proceso de congelado-descongelado.

9 Conclusiones

En el presente trabajo se determinó que el tratamiento de enfriado lento precongelación a -5°C disminuyó la proporción de espermatozoides que mostraron capacitación prematura y aumentó la proporción de espermatozoides móviles y con membrana acrosomal intacta al descongelado en comparación con el tratamiento de enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ (enfriado tradicional).

Se confirma que existe una variación importante en la susceptibilidad del semen entre machos al proceso de congelado-descongelado, ya que algunos individuos respondieron mejor que otros independientemente del tipo de enfriado utilizado.

Los hallazgos encontrados en este trabajo sugieren que existe la posibilidad de favorecer la supervivencia espermática al proceso de congelado-descongelado, enfriando el semen a temperaturas por debajo de 0°C previo al congelado, recomendándose seguir esta línea de investigación aumentando el número de machos donadores y comparando los hallazgos de laboratorio contra los resultados de fertilidad y prolificidad *in vivo* obtenidos en cerdas inseminadas artificialmente.

10 Literatura Citada

1. Almlid, T., Johnson, L.A., 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post thaw motility of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 66, 2899-2905.
2. Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa, Iowa State University Press, Iowa, United States of America, 8-16.
3. Boeta, M., Zarco, L., 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Vet. Méx.* 31, 67-69.
4. Buhr, M.M., Curtis, E.F., Somnapan Kakuda N., 1994. Composition and behaviour of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
5. Bwanga, C.O., Braganca, M., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1990. Cryopreservation of boar semen in mini-and maxi straws. *J. Vet. Med. A* 37, 651-658.
6. Bwanga, C.O., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1991a. Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.* 26, 117-125.
7. Bwanga, C.O., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1991b. Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini-and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32, 455-461.

8. Conejo, N.J., Becerril, A.J., Ortega, G.R., 1996. Diluentes de corto periodo de almacenamiento utilizados en la conservación del semen porcino. En: II Jornada en Producción Porcina, U.N.A.M., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México D.F. México pp. 99-107.
9. Conejo, N.J., Ochoa, V.G., Becerril, A.J., Ortega, G.R., 1997. Conservación de semen porcino en diluyentes de largo plazo. En: I Curso Internacional de Reproducción Porcina, Academia de Investigación en Biología de la Reproducción A.C., Centro Médico Nacional Siglo "XXI", México D.F. México pp. 93-106.
10. Córdoba, A., Ducolomb, Y., Jiménez, I., Casas, E., Bonilla, E., Betancourt, M., 1997. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 47, 1309-1317.
11. Córdoba, A., Pérez, J.F., Lleo, B., García Artiga C., Martín-Rillo, S., 2001. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 199-202.
12. Córdoba, A., Pérez-Gutiérrez, J.F., Lleó, B., García-Artiga, C., Álvarez, A., Drobchak, V., Martín-Rillo, S., 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology* 57, 2119-2128.
13. Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., Ancordoguy, T.J., Drobis, E., 1989. Lipid phase transition measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26, 76-84.

14. Critser, J.K., Huse-Benda, A.R., Aaker, D.V., Arnesson, B.W., Ball, G.D., 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. III The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril.* 50, 314-320.
15. Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5, 46-52.
16. De Leeuw, F.E., Cheng, H.C., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171-183.
17. De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1991. The role membrana damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.* 1, 95-104.
18. Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63, 205-220.
19. Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 123-129.
20. Fiser, P.S., Hansen, C., Underhill, K.L., Shrestha, J., 1991. The effect of induced ice nucleation (seeding) on the post-thaw motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 24, 293-304.
21. Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1996. Glycerol equilibration time revisited. Boar semen preservation III. *Reprod. Domest. Anim.* 31, 141-146

22. Franks, F., 1981. Biophysics and biochemistry of low temperatures and freezing. In: Morris, G.J. y Clarke, A. (Eds.), Effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press, London, UK, pp. 3-19.
23. Fraser, L., 1995. Ionic control sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 905-925.
24. Fraser, L.R., Abeydeera, L.R., Niwa, K., 1995. Ca²⁺-Regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 233-241.
25. Gadea, J., Matas, C., 2000. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 54, 1343-1357.
26. Gadella, B.M., 1996. Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 63-73.
27. Garner, D.L., Johnson, L.A., 1995. Viability assessment of mamalian sperm using SYBR14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53, 276-284.
28. Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Critser, J.K., 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa-separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 49, 112-123.
29. Gillan, L., Evans, G., Maxwell, M.C., 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 481-487.
30. Gilmore, J.A., McGann, L.E., Ashworth, E., Acker, J.P., Raath, J.P., Bush, M., Critser, J.K., 1998. Fundamental cryobiology of selected African

- mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 277-297.
31. Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H., 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43, 55-64.
 32. Green, C.E., Watson, P.F., 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reprod.* 122, 889-898.
 33. Hafez, E.S., 2000. *Reproducción e Inseminación artificial en animales*. Edit. Interamericana. México.
 34. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26-38.
 35. Hazel, J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57, 19-42.
 36. Holt, W.V., 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 309-319.
 37. Holt, W.V., 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
 38. Holt, W.V., North, R.D., 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 230, 473-483.

39. Holt, W.V., North, R.D., 1985. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 73, 285-294.
40. Holt, W.V., North, R.D., 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, 414-424.
41. Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., Reed, H.C., Curnock, R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: Results of two fertility trials. *J. Androl.* 18, 312-323.
42. Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Lee, W.C., Tsou, H.L., Chang, H.L., Wu, J.J., Yang, P.C., 1999. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology* 51, 1007-1016.
43. Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser P., Maxwell, W.M., 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143-172.
44. Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M., Kato, S., 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 197-209.
45. Kumar, S., Millar, J. D., Watson, P., 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246-253.

46. Loomis, P.R., 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 191-200.
47. Marshburn, P.B., Mc Intire, D., Carr, B.R., Byrd, W., 1992. Spermatozoa characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 58, 179-186.
48. Martín-Rillo, S., Martínez, E., García, A.C., De Alba, C., 1996. Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 519-526.
49. Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P., Seren, E., 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 45, 373-381
50. Maxwell, W.M., Johnson, L.A., 1997a. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209-219.
51. Maxwell, W.M., Johnson, L.A., 1997b. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 408-418.
52. Mazur, P., 1985. Basic concepts in freezing cells. In: Johnson, L., Larsson, K. (Eds.), *Deep freezing of boar semen*. Swedish Univ. of Agri. Sci., Uppsala, pp. 91-111.
53. Mc Donald, L.E., 1991. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Edit. Interamericana, México. Cuarta edición.

54. Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T., Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.
55. Medrano, A., 1998. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. PhD, thesis. Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, University of London.
56. Medrano, A., Holt, W.V., 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zootec.* 47, 319-327.
57. Medrano, A., Cabrera, F., González, F., Batista, M., Calero, P., Quesada, E., Gracia, A., 2001. Slow cooling to -5°C improves buck sperm cryosurvival. *Cryobiology* 43, 365-366.
58. Medrano, A., Watson, P.F., Holt, W.V., 2002a. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reprod.* 123, 315-322.
59. Medrano, A., Anderson, W.J., Millar, J.D., Holt, W.V., Watson, P.F., 2002b. A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *Cryoletters* 23, 397-404.
60. Miller, R.R., Sheffer, C.J., Cornett, C.L., Mc Clean, R., Mac Callum, C., Johnston, S.D., 2004. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. *Cryobiology* 49, 137-148.

61. Muldrew, K., Mc Gann, L. E., 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.* 57, 525-532.
62. Noiles, E.E., Bailey, J.L., Storey, B.T., 1995. The temperature dependence in the hydraulic conductivity L_p of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4°C and 0°C. *Cryobiology* 32, 220-238.
63. Palacios, A.A., 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet. Méx.* 25, 207-210.
64. Parkinson, T., Whitfield, C., 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27, 781-797.
65. Peinado, B., Poto, A., Gadea, J. Ruíz, S., 1998a. Estudios preliminares en la crioconservación de espermatozoides porcinos de raza chato murciano. *Arch Zootec.* 47, 305-310.
66. Peinado, B., Poto, A., Lobera, J. B., Martín, J., Fernández, A., 1998b. Calidad seminal de los eyaculados de verraco de raza chato murciano. *Arch Zootec.* 47, 311-317.
67. Penfold, L.M., Garner, D.L., Donoghue, A.M., Johnson, L.A., 1997. Comparative viability of bovine sperm frozen on a cryomicroscope or in straws. *Theriogenology* 47, 521-530.
68. Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.

69. Pursel, V.G., Park, C.S., 1985. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), Deep freezing of boar semen. Swedish Univ. of Agric. Sci., Uppsala, pp.147-166.
70. Pursel, G.V., 1979. Effect of shock on boar sperm treated with butylated hydroxytoluene. *Biol. Reprod.* 21, 319-324.
71. Rios, E., López, S., Palacios, P., Medrano, A., 2004. Pre-Freeze cooling below 0°C improves ram sperm cryosurvival. In: Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, BA-Brazil, vol. 2, 480 (abstract).
72. Salamon, S., Maxwell, W.M., 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 1-36.
73. Steel, G., Torrie, J., 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Editorial Mc Graw-Hill.
74. Tardif, S., Laforest, J.P., Cormier, N., Bailey, J.L., 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52, 447-459.
75. Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M., Marshall, C.E., 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58, 786-793.
76. Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V., 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.* 66, 545-554.

77. Tsien, R.Y., 1989. Fluorescent indicators of ion concentrations. Taylor, D.L., Wang, Y.L. (Eds.), In: Fluorescent microscopy of living cells in culture part B. Quantitative fluorescent microscopy-Imaging and spectroscopy, Methods in cell biology. Vol. 30, Academic press, New York, pp.127-156.
78. Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Fraser, L.R., Niwa, K., 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically-defined medium. J. Reprod. Fert. 104, 305-313.
79. Watson, P.F., 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J. y Clarke, A. (Eds.), Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic press, London, UK, pp. 189-218.
80. Watson, P.F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 7, 871-891.
81. Watson, P.F., 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reprod. Dom. Anim. 31,135-140.
82. Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60-61, 481-492.
83. Watson, P.F., Duncan, A.E., 1988. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology 25,131-142.

84. Watson, P.F., Green, C.E., 2000. Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common? In: Johnson, L.A., Guthrie, H.D. IVth International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, Maryland, USA, Allen Press, Inc. Lawrence, KS USA, p 53-60.
85. White, I.G., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fert. Dev.* 5, 639-658.
86. Woelders, H., 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.* 1, 145-164.
87. Woelders, H., Matthijs, A., Denbesten, M., 1996. Boar variation in freezability of the semen. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 153-159.
88. Woelders, H., Den Besten, M., 1993. Cryopreservation of boar semen with small between-boar variation of post-thaw sperm survival. *Cryobiology* 30, 645.
89. Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In the physiology of reproduction, edited by E. Knobil and J.D. Neill. New York: Raven press. 189-317.

ANEXOS

Anexo 1. Formula del medio para descongelar BTS^a.

BTS (Beltsville Thaw Solution)	
Fórmula	Cantidad (g)
Dextrosa anhidra	3.7
Citrato de sodio	0.6
Bicarbonato de sodio	0.125
EDTA*	0.125
Cloruro de potasio	0.075

*Disodio etilendiamino tetraacetato.

a Los ingredientes se disuelven en agua destilada y se afora a 100 ml.

Anexo 2. Fórmula del medio para congelación de Beltsville^b.

BF5 (Beltsville Freezing Medium)	
Fórmula	Cantidad
* TES-N-TRIS	1.2 g
**TRIS	0.2 g
Dextrosa anhidra	3.2 g
Yema de huevo	20 ml
Pasta orvus ES	0.5 ml
Dipenisol	0.5 ml

* Acido sulfónico (Hidroximetil) metil 2 aminoetano.

** (Hidroximetil) aminoetano.

b Aforar a 100 ml. de agua destilada.

Centrifugar a 12,000 g por 10 minutos

Dejar decantar y separar fracciones.