



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DEL ENFRIADO LENTO PRECONGELACIÓN, A
TEMPERATURAS INFERIORES AL PUNTO DE CONGELACIÓN, SOBRE
LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO.**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

ANGÉLICA YAZMÍN GARCÍA OLIVARES

Tutor: Dr. José Alfredo Medrano Hernández

Coasesor: M. en C. César Garzón Pérez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. en A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Efecto del enfriado lento pre congelación, a temperaturas inferiores al punto de congelación sobre la viabilidad de espermatozoides de cerdo.

Que presenta la pasante: **ANGÉLICA YAZMIN GARCÍA OLIVARES**
Con número de cuenta: **38307521-7** para obtener el Título de **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán local, Méx. a 23 de marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Olavey Gallardo	
VOCAL	Dr. Armando Enrique Espinosa Sumano	
SECRETARIO	Dr. José Alfredo Medrano Hernández	
1er SUPLENTE	Dra. María del Carmen Espel del Moral	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Luis Armando Cortés Méndez	

NOTA: Los miembros suplentes están obligados a presentarse en el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por escrito al departamento.
(art. 127.307)

IMM/ymf

La vida no solo está hecha de deseos, pero sí de los actos de cada uno.

AGRADECIMIENTOS

- ✚ **Al Dr. José Alfredo Medrano Hernández, gracias por compartir sus conocimientos, paciencia, confianza y tiempo dedicado para realizar este proyecto; por su valioso apoyo que me ha permitido cumplir otras expectativas de mi vida profesional.**

- ✚ **Al Dr. Cesar Garzón Pérez, gracias por su apoyo y dedicación, las contribuciones y observaciones son de gran aprendizaje.**

- ✚ **Al personal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, gracias especialmente al MVZ. Roberto Martínez Rodríguez, a su director Dr. Oscar Gutiérrez Pérez y al Ingeniero Agustín Gallegos por su apoyo y disposición para la obtención de las muestras.**

- ✚ **Al proyecto PAPIIT: Evaluación estructural y funcional de espermatozoides crioconservados de equino enfriados a cinco grados bajo cero previo a la congelación. Clave IT201713-2.**

- ✚ **Al proyecto PIAPI: Estudio de los factores que determinan la crio-supervivencia de los espermatozoides sometidos a los protocolos de crio-conservación. Clave: PIAPIVCO3.**

- ✚ **Al MVZ. Felipe García Solano por su apoyo, aporte y colaboración en la parte inicial de esta tesis.**

- ✚ **A todos los profesores que me impartieron cátedra durante la carrera y que compartieron sus conocimientos y experiencias para mi formación profesional, sé que me llevo lo mejor de cada uno.**

- ✚ **Al MVZ. Felipe García Solano por su apoyo, aporte y colaboración en la parte inicial de esta tesis.**

- ✚ **A todos los profesores que me impartieron cátedra durante la carrera y que compartieron sus conocimientos y experiencias para mi formación profesional, sé que me llevo lo mejor de cada uno.**

- ✚ **A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, gracias por hacerme formar parte de ella y por permitirme concluir mis estudios.**

- ✚ **A la MVZ. Alicia Alcántar y a todos mis compañeros del laboratorio 2 de la UIM por su apoyo y motivación diaria pero sobre todo por su gran compañerismo.**

- ✚ **A todas aquellas personas que intervinieron de alguna manera para poder llevar a cabo la realización de este trabajo.**

DEDICATORIAS

A mi hijo FABRIZIO

***Por su apoyo, paciencia y comprensión.
Gracias por estar conmigo siempre, por
pertenecer y alegrar mi vida.***

A mi padre GILBERTO

***GRACIAS por tu amor incondicional, por
motivarme todos los días de mi vida y ser mi
fuerte, por siempre estar a mi lado apoyándome.***

***A mi familia ALFONSO, ROCÍO,
CAROLINA, VICTOR y ALEJANDRA.***

***Gracias por su apoyo incondicional,
por sus cuidados y comprensión que
me permitieron concluir esta etapa.***

***A ARIZBETH, ERIKA, FRANCISCO, MARYLU,
LUCIA y ANTONIO JIMENEZ***

***Gracias por formar parte de mi vida y permitir que
juntos crezcamos profesional y personalmente,
gracias por su apoyo, amor y por estar conmigo
en todo momento. Sé que tengo lo mejor de
ustedes.***

***A esos seres que formaron parte de mi vida,
que me brindaron muchas alegrías, y que hoy
ya no están conmigo, pero que al verlos
siempre me impulsaron a ser lo que hoy soy.***

ÍNDICE:

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Antecedentes históricos del Cerdo	2
2.2 Introducción de cerdos en México	2
2.3 Reproducción del Cerdo	2
2.4 Selección de sementales	3
2.5 Inseminación artificial	3
2.6 Particularidades del eyaculado	8
2.7 Almacenamiento del semen porcino	9
2.8 Técnicas para la evaluación de semen de cerdo	12
2.8.1 EVALUACIÓN MACROSCOPICA:	12
2.8.2 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA:	13
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.0 Obtención y Transporte del Semen	20
6.1 Evaluación del semen	21
6.2 Evaluación microscópica	21
6.3 PRIMERA ETAPA: Determinación del punto de congelación	25
6.4 SEGUNDA ETAPA: Enfriado a diferentes temperaturas blanco antes de la congelación	25

6.5 Procedimiento de evaluación para las diferentes temperaturas blanco:	26
6.6 TERCERA ETAPA: Congelación – Descongelación	27
6.7 Procedimiento para la congelación:	28
6.8 Procedimiento para la descongelación:	30
6.9 Análisis estadístico	33
XVII. RESULTADOS	34
XVIII. DISCUSIÓN	47
IX.CONCLUSIONES	51
X. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Punto de congelación de espermatozoides de cerdo diluidos en medio de congelación BF5 con 1% de glicerol.....	33
Cuadro 2. Valores promedio de las características del semen fresco de cada macho (Etapas 1 y 2).....	36
Cuadro 3. Efecto del enfriado precongelación a cuatro diferentes temperaturas blanco sobre la calidad espermática al recalentado.....	37
Cuadro 4. Variables de los espermatozoides diluidos de cerdo de cada macho enfriados a +5°C y recalentados a 38°C.....	38
Cuadro 5. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -3°C y recalentados a 38°C.....	39
Cuadro 6. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -5°C y recalentados a 38°C.....	40
Cuadro 7. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -7°C y recalentados a 38°C.....	41
Cuadro 8. Variables de la viabilidad espermática e integridad acrosomal de los diferentes tratamientos de la etapa dos en relación al semen fresco.....	41
Cuadro 9. Valores promedio de las características del semen fresco de cada macho (Etapa 3).....	44
Cuadro 10. Calidad de los espermatozoides de cerdo al descongelado. Los espermatozoides diluidos fueron enfriados a tres diferentes temperaturas blanco antes de la congelación – descongelación.....	45
Cuadro 11. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho al descongelado. Los espermatozoides fueron enfriados a diferentes temperaturas blanco previo a la congelación.....	46
Cuadro 12. Variables de la viabilidad espermática e integridad acrosomal de los diferentes tratamientos de la etapa tres en relación al semen fresco.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Punto de congelación.....	34
Gráfica 2. Precongelación: descenso de temperatura por tratamientos...	42

FIGURAS

Diagrama.....	31
---------------	----

I. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aplicar un protocolo de enfriado lento a espermatozoides porcinos para mejorar la supervivencia al calentamiento y/o al descongelado. Se utilizó el semen de seis cerdos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM) ubicado en Jilotepec, Estado de México. El trabajo se llevó a cabo de agosto de 2013 a mayo de 2014. El semen se transportó al laboratorio número dos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, utilizando un diluyente comercial (Magapor® 1:1 v/v) en un tiempo de 45 minutos aproximadamente y a una temperatura de 30° C; a su llegada, se centrifugó a 500 x g por 10 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiéndolo en un medio de congelación estándar sin glicerol (Beltsville Freezing Medium - BF5), se ajustó la concentración a 400×10^6 células/mL, sometiendo a los espermatozoides a un enfriado lento de 23 a 5° C, en la que se le añadió BF5 con glicerol obteniéndose una concentración final de 1% de glicerol y 200×10^6 células por mL, posteriormente se envasaron en pajillas de plástico de 0.5 mL y éstas fueron mantenidas a 5° C durante 16 horas. Este procedimiento fue común a las tres etapas descritas a continuación: En la primera etapa se determinó el punto de congelación de 50 pajillas (5 eyaculados) expuestas al vapor de nitrógeno registrándolo con un termopar, que se colocó dentro de cada pajilla. En la segunda etapa, las pajillas se enfriaron aún más: a -3 (T1), -5 (T2) y -7° C (T3), las enfriadas a +5° C fueron el grupo control; una vez que se alcanzaron las temperaturas anteriores, se tomaron dos pajillas de cada una de esas temperaturas y se recalentaron a 38° C para evaluar la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática (Eosina-Nigrosina y la prueba del hinchamiento hiposmótico - HOST) y la integridad acrosomal (microscopía de contraste de fases). En la tercera etapa, las pajillas se enfriaron a +5 (T1), -3 (T2) y -5° C (T3), cuando alcanzaron dichas temperaturas se congelaron y almacenaron por un mes; las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 38° C evaluando la motilidad progresiva, la Integridad de la membrana plasmática y la Integridad acrosomal, empleando el procedimiento común descrito anteriormente. El punto de congelación fue -8.2 ± 0.3 ° C (media \pm ee). El enfriado de los espermatozoides a +5, -3 y -5° C produjo resultados similares entre tratamientos para todas las variables evaluadas, pero diferentes a los enfriados a -7° C, mostrando una mejor viabilidad de los tres primeros tratamientos, respecto al último. La congelación-descongelación de los espermatozoides enfriados a 5, -3, y -5° C, antes de la congelación, produjo resultados similares de criosupervivencia espermática. Para corroborar la criosupervivencia espermática y viabilidad obtenida en estos tratamientos es necesario continuar la línea de investigación empleando la inseminación artificial.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes históricos del Cerdo

Los cerdos denominados como verdaderos, se encuentran en la tercera subfamilia denominada Suidos, de ahí se han derivado todas las razas existentes en la actualidad. Los diversos géneros se desarrollaron en el centro de Asia, Europa y África, adaptándose a las particularidades del lugar (Flores, 1988).

En el periodo Neolítico ya se encuentra domesticado; la cría del cerdo era conocida por los chinos 4,800 años A.C., posteriormente surgieron tres especies que originaron a los cerdos actuales:

1. *Sus vitatus*: originarios de China, de cuerpo corto y grueso, de baja fecundidad y *rápido desarrollo*.
2. *Scrofa ferus*: originados de Europa, de cuerpo alargado, alto, dorso arqueado, desarrollo tardío, gran fecundidad y rusticidad.
3. *Sus mediterraneus*: tiene aspectos intermedios de los anteriores (Flores, 1988).

2.2 Introducción de cerdos en México

Fue Cristóbal Colon quien en su segundo viaje a México introdujo al cerdo en 1493. Por su rápida reproducción y la falta de contención, los cerdos se dispersaron por todo el territorio nacional propiciando que algunos se volvieran salvajes (Flores, 1988).

2.3 Reproducción del Cerdo

Los métodos de reproducción constituyen los procedimientos en los que interviene el hombre para la multiplicación de los animales domésticos, con la finalidad de conservar o mejorar caracteres y aptitudes o provocar la aparición de nuevas cualidades. En el caso de los cerdos se utiliza la selección en la mejora de razas con la finalidad de expresar las

características deseables y de eliminar las perjudiciales o indeseables (Flores, 1988).

2.4 Selección de sementales

En 1780 en Italia, Lázaro Spallanzani determinó que el potencial fecundante residía en el esperma (Bailey *et al.*, 2008), por lo tanto en una explotación el semental es un factor importante y este se elige por factores económicos como son la ganancia de peso, conversión alimenticia, porcentaje de grasa y rapidez en la ganancia de peso. Así mismo se intenta buscar como otra característica de selección, la capacidad que tienen de ser buenos o malos congeladores de semen (Watson, 1995).

La carne de cerdo es una fuente importante de alimento en el mundo, el 40% (94 millones de toneladas métricas) del consumo de carne roja es proveniente de la carne de cerdo (Gerrits *et. al.*, 2005). El consumo *per cápita* anual del cerdo en México 2006 (15kg) al 2018 (14.7kg); según las predicciones respecto al año 2018 este consumo disminuirá ligeramente (Subria, 2009).

Por ello, la finalidad de la explotación es obtener un cerdo de tamaño medio que alcance un peso de 100kg a los seis meses de edad, con un cuerpo lleno, miembros fuertes, cara larga, morro ancho, manteniendo su rusticidad (Flores, 1988).

2.5 Inseminación artificial

La inseminación artificial es la aplicación de dosis seminales en el aparato reproductivo de la hembra, con la finalidad de obtener la mayor tasa de fecundación. Se puede aplicar en tres puntos diferentes:

1. Tradicional: el semen se deposita en los primeros centímetros del cérvix.

2. Postcervical: el semen es depositado en el cuerpo del útero atravesando el cérvix.
3. Intrauterina profunda: el semen se deposita atravesando el cérvix en un cuerno del útero (Roche *et. al.*, 2014).

En las cerdas se recomienda hacer una inseminación artificial post-cervical, ya que se reducen los costos y tiempo, además de que se utiliza una menor cantidad de espermatozoides y de diluyente; al poder aumentar con cada semental de dos a tres veces más la dosis (1000 – 1500 millones de espermatozoides), que en la forma tradicional, generando un aumento en la transmisión del potencial genético de 600 a 16000 lechones al año (Roche *et. al.*, 2014).

La inseminación artificial ha tenido gran impacto y éxito en Europa y E. U. en los últimos 35 años, ya que mediante el uso de los diluyentes el semen en fresco (utilizados el mismo día o almacenados de 15-20° C durante 1-5 días) como congelado se ha podido preservar logrando con ello mejorar la base genética de los cerdos en el mundo o de una manada en particular (Johnson *et. al.*, 2000).

En México la inseminación artificial ha contribuido para el manejo de las explotaciones y para reforzar la bioseguridad bloqueando enfermedades siendo aplicada en el 100% de las explotaciones por ser una de las formas más rápidas y eficientes de transmitir material genético (Roche *et. al.*, 2014).

En nuestro país se comenzó a utilizar la inseminación post-cervical con la finalidad de reducir el número de espermatozoides por dosis sin que se vean alterados los parámetros reproductivos. El 30% de las inseminaciones es por vía post-cervical y el 70% se realiza tradicionalmente, ésta es

recomendable para cerdas de reposición o aquellas en que no es posible la IA post-cervical (Roche *et. al.*, 2014).

Se han seleccionado cerdos considerados de buena calidad genética con la ayuda de pruebas de genética molecular, esto complementado con la Inseminación artificial ha contribuido a elevar las tasas de crecimiento, calidad de la canal, mejoramiento reproductivo, cerdos más saludables con la propiedad de resistir enfermedades, mejorando en general la eficiencia en la producción porcina (Gerrits *et. al.*, 2005).

El sexado de los espermatozoides en cerdos no es recomendable, ya que tiene un impacto en los esquemas de selección, instalaciones, eficiencia reproductiva y en las estrategias de mercado (Bailey *et. al.*, 2008). Esto en los cerdos depende mucho de la finalidad zootécnica y de que en el caso del cerdo se necesitan altas dosis de semen o número de espermatozoides/mL para fecundar, lo que el costo de la citometría aumentaría (Barandalla *et. al.*, 2012-2013)

Los primeros intentos de inseminación artificial en cerdos fueron hechos por Ivanov en 1926-1927 y por Milanov en 1930 en Rusia, siendo este último quien propuso los diluyentes (glucosa-sulfato y glucosa-tartrato) para almacenar el semen porcino (Johnson *et. al.*, 2000).

La IA con semen criopreservado ha estado disponible en el mercado desde 1975 y se comenzó a utilizar de esta forma para obtener beneficios en aspectos como la exportación y transferencia genética en mercados nacionales y facilitar la obtención de semen en lugares inaccesibles (Johnson *et. al.*, 2000).

Cabe mencionar que si bien el uso de semen criopreservado trae muchos beneficios, también se debe considerar que se tiene que utilizar de 2 a 3

veces la dosis de espermatozoides (3×10^9), hay una reducción del índice de partos y las camadas se reducen entre 1 y 3 lechones (Gerrits *et al.*, 2005).

La fertilidad del semen congelado - descongelado da una tasa de partos del 50% con siete lechones por camada. En 1970 nacieron los primeros lechones a partir de espermatozoides congelados, esto se realizó por una inseminación quirúrgica por laparotomía (Polge *et al.*, 1970). En Estados Unidos se obtuvo la primera camada de lechones con espermatozoides criopreservados por medio de una inseminación tradicional; para 1975 se establecieron los primeros protocolos de criopreservación específicos para los espermatozoides porcinos; en este país se utiliza el método de Beltsville desarrollado por Pursel y Johnson (Johnson *et al.*, 2000). Lo que limita la técnica es que la inseminación artificial en México y otros países se realiza en su mayoría con semen fresco o refrigerado (Bonet *et al.*, 2006).

La criobiología es una ciencia multidisciplinaria que estudia el comportamiento físico, biológico de células y tejidos a bajas temperaturas, especialmente por debajo del punto de congelación del agua, 0°C (Gao y Critser, 2000). La conservación a bajas temperaturas permite que el metabolismo biológico de las células vivas disminuya drásticamente permitiendo la preservación a largo plazo de células y tejidos, teniendo ventajas en diferentes aplicaciones como son la inseminación artificial y la fertilización *in vitro*, esto tiene como objetivo comprender la biofísica en sistemas celulares al exponerse al efecto de las bajas temperaturas con la finalidad de desarrollar y mejorar los protocolos de criopreservación (Woods *et al.*, 2004).

La supervivencia del espermatozoide criopreservado en nitrógeno líquido no excede los 50 años (Yoshida, 2000). Los espermatozoides tienen cierto comportamiento durante el enfriado, esta célula tiene una subestructura compleja y rígida, que contiene un núcleo condensado en la cabeza,

mitocondrias y componentes móviles en el flagelo, poco citoplasma y un nivel bajo de agua intracelular (Watson y Duncan, 1988).

El espermatozoide es una célula altamente polarizada y especializada, es una estructura tripartita formada por cabeza (tiene cuatro regiones: región apical, pre ecuatorial, ecuatorial y post ecuatorial), pieza media y cola (Flesch y Gadella, 2000).

El daño celular directo inducido por la congelación está determinado por dos diferentes factores que son modificados por la tasa (velocidad) de enfriamiento:

1. La formación de hielo intracelular
2. “Efectos de solución”: Para extender la supervivencia es necesario reducir la actividad metabólica por inhibidores químicos o por reducción de la temperatura. Los espermatozoides responden a la dilución por un aumento inicial de la actividad, seguido por pérdida de motilidad y daño de la membrana.

Una dilución excesiva provoca una pérdida de la viabilidad celular como consecuencia de la pérdida de componentes y/o dilución de un agente protector en el líquido seminal intracelular (Watson, 1995).

Ambos factores son letales para célula, lo que significa que el enfriado muy rápido o muy lento provoque la muerte del espermatozoide, por lo tanto una tasa de enfriado óptima existe entre ambas (Devireddy *et al.*, 1999). El crioprotector eficaz del semen de cerdo es el glicerol ya que modula las concentraciones del soluto del medio de dilución durante la congelación (Johnson *et al.*, 2000).

2.6 Particularidades del eyaculado

Las primeras eyaculaciones del cerdo ocurren en la pubertad entre los cinco y seis meses de edad. El volumen del eyaculado es de 200 – 300mL y contiene entre 10×10^9 y 100×10^9 células espermáticas contenidas en el plasma seminal, estas son secreciones producidas en su mayoría por las glándulas accesorias (Bonet *et. al.*, 2013).

Fracciones del eyaculado

El proceso del eyaculado puede tomar hasta 30 minutos y consiste en tres fracciones:

1) Fracción pre-espermática: constituida por las secreciones de la próstata, glándulas vesiculares y algunos grumos de las glándulas bulbouretrales (Cowper) es transparente, carece de espermatozoides Y representa solo un 5% de su total. Su función fisiológica consiste en la preparación de la uretra al pase de la fracción espermática.

2) Fracción espermática: está constituida por células espermáticas contenidas en el plasma seminal, son secreciones de las glándulas vesiculares y próstata; la porción espermática representa del 10 – 30% y la porción líquida representa del 70 – 90% del volumen del eyaculado.

3) Fracción post-espermática: contiene poca cantidad de espermatozoides y está formada principalmente por secreciones de las glándulas de Cowper y la próstata; presenta grumos gelatinosos (Tapioca) cuya finalidad es formar un tapón en el cuello uterino.

2.7 Almacenamiento del semen porcino

Existen factores que influyen en la función de las células espermáticas después de la eyaculación y cuando son almacenadas considerando en ambas la temperatura, previniendo un choque frío ya que el semen de cerdo es muy susceptible a temperaturas inferiores a los 15° C (provocando la pérdida de la viabilidad (Pursel *et. al.*, 1973; Weber, 1989).

I. Choque frío

Existen diferentes factores en el que el choque frío influye:

a) La composición de lípidos de la bicapa de la membrana la cual afecta la fluidez de la membrana plasmática ya que cuando baja la temperatura, esta restringe el movimiento lateral de los fosfolípidos provocando la transición de un fluido a una fase de gel, el comportamiento de fase lo determinan la composición de ácidos grasos de fosfolípidos (Johnson *et.al.*, 2000).

b) Agrupamiento irreversible de proteínas.

c) El colesterol que provoca que la monocapa interna de la membrana sea susceptible a este choque por que la distribución de este en el exterior de la capa es de forma asimétrica haciéndola vulnerable.

d) La dilución, el enfriamiento y los factores anteriores influyen en la función de la membrana teniendo como consecuencias un aumento de la permeabilidad provocando una fuga de cationes y enzimas, reducción de la actividad enzimática, difusión controlada, cambios en el movimiento lateral de los canales (De Leeuw *et. al.*, 1990). La liberación de calcio en el medio ambiente de la célula estimula los procesos de capacitación en el espermatozoide esencial para la capacitación pero perjudicial para el almacenamiento de los espermatozoides. (Watson, 1995).

II. Efecto de la dilución y el desempeño de los diluyentes en el semen.

Con la eyaculación se produce una dilución de los espermatozoides con los fluidos seminales que producen las glándulas accesorias manteniendo la motilidad.

La respuesta que tienen los espermatozoides a una dilución excesiva es un aumento inicial de la actividad, seguido de una pérdida de movimiento más un daño en la membrana ocasionando la pérdida de la viabilidad celular, porque se pierden componentes o por que se diluye un agente protector intracelular contenido en el líquido seminal como es la albúmina de suero que estimula la motilidad así como adiciones milimolares de potasio (K) que contribuyen a superar la fluidez de membrana (Harrison *et. al.*, 1978).

IV. Almacenamiento del semen porcino

Al almacenarse el semen *in vitro* los espermatozoides sufren cambios estructurales y funcionales asemejándose al envejecimiento natural, siendo un proceso fisiológico que no se puede evitar. Evaluar la motilidad durante el almacenamiento indica la capacidad de fertilización, por lo que se debe considerar la inseminación en relación a la ovulación, ya que una inseminación sub óptima conduce a bajas tasas de concepción y/o tamaño de la camada (Johnson *et. al.*, 2000).

Otra de las formas de almacenar el semen es en estado de congelación, aunque el semen porcino es muy susceptible al choque frío existen diversos factores que influyen para la supervivencia de los espermatozoides a la congelación (Johnson *et. al.*, 2000).

Factores internos

- Diferencias entre verracos
- Diferencias entre eyaculados
- Características inherentes de los espermatozoides

Factores externos: pueden ser manipulados para optimizar la congelación

- Composición de los diluyentes
- Tipo y concentración del agente crioprotector
- Tasas de dilución, refrigeración y equilibrio
- Método de congelación y descongelación

V. Consecuencias del choque frío en los espermatozoides

Un enfriamiento rápido en los espermatozoides, da lugar a una transición de fluido a una fase de gel, ya que libera enzimas intracelulares, lípidos y una redistribución de iones provocando una pérdida en la integridad de la membrana y de la motilidad con reducción irreversible de metabolismo de los carbohidratos. Los espermatozoides del cerdo pueden adquirir resistencia al enfriamiento si se les deja incubar (2-7hrs) en su plasma seminal y a temperatura de cuarto (Pursel *et. al.*, 1973; Butler y Roberts, 1975).

VI. Diluyentes y crioprotectores

Los diluyentes están compuestos por azúcares, proteínas, lipoproteínas, aditivos, agentes crioprotectores y tampones como la yema de huevo que junto con la pasta Orvus ES proporcionan protección contra el frío en los espermatozoides. El glicerol es considerado el mejor crioprotector ya que promueve la supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación. La concentración de glicerol se determina por la velocidad del enfriamiento (3% a 30°C/min.) ya que un incremento de glicerol, así como una adición rápida del mismo pueden provocar toxicidad en los espermatozoides, pérdida de la motilidad e integridad acrosomal (Johnson *et. al.*, 2000).

2.8 Técnicas para la evaluación de semen de cerdo

Las evaluaciones en el semen del cerdo nos ayudan a evitar problemas de fertilidad y al predecirla con exactitud servirá para hacer una valoración reproductiva de los animales determinando así la viabilidad.

Es conveniente realizar una valoración rutinaria en los cerdos para evitar descensos en la fertilidad ya que existen diversos factores que hacen variar la calidad del semen como son la edad, manejo, estación del año, estado nutricional y enfermedades. Por lo tanto se tienen que aplicar las siguientes técnicas para la valoración rutinaria en centros que posean sementales (Bonet *et. al.*, 2006).

Las evaluaciones macroscópicas y microscópicas mencionadas a continuación fueron tomadas de Bonet *et al.* (2006) y Bonet *et al.* (2013).

2.8.1 EVALUACIÓN MACROSCOPICA:

I. Color: el color de eyaculado es resultado de la combinación de sus diferentes fracciones. El eyaculado total generalmente tiene un color blanquecino con variaciones hacia el gris.

En ocasiones se producen contaminaciones del semen con sangre, orina, secreciones prepuciales, pus, entre otras, las cuales determinan variaciones del color y que pueden alterar la calidad del eyaculado y confundir la evaluación.

II. Olor: el olor del semen de verraco es sui generis; en caso de contaminación con orina, presentará modificaciones características como mayor volumen, escasa concentración y un pH alto.

III. Densidad: viene dada por la concentración espermática del eyaculado. Altas concentraciones resultan en densidades más altas y viceversa. Para medirla se utiliza un densímetro.

IV. pH: es indicador de la concentración de iones de hidrógeno. La evaluación de la acidez o alcalinidad del eyaculado se debe realizar inmediatamente después de la extracción.

El pH de las secreciones de las glándulas seminales del verraco es de 7.2 – 7.5, una reacción ácida, debido a la alta concentración de glucosa, lo que permite el almacenamiento durante algunos días a temperatura ambiente y un pH alcalino indica escasa posibilidad fecundante (Johnson *et. al.*, 2000).

2.8.2 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA:

I. Concentración espermática: Nos permite calcular el número de dosis a realizar a partir de cada eyaculado. Es una evaluación muy importante y que se realiza de manera rutinaria, ya que al aumentar la concentración espermática se ve incrementada la fertilidad.

II. Motilidad espermática: Este parámetro nos permite medir la calidad del eyaculado. En un eyaculado se determinan dos tipos de motilidad:

a) Motilidad masal: es un movimiento de superficie que refleja la movilidad de los espermatozoides en conjunto.

b) Motilidad Progresiva: Es una prueba cuali-cuantitativa ya que se evalúa el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento y la calidad de este movimiento.

III. Morfología Espermática: esta prueba que se aplica de rutina y proporciona referencias sobre la viabilidad de los espermatozoides. Esta prueba nos ayuda a detectar reproductores con baja calidad seminal ya que se pueden determinar si existen alteraciones en la espermatogénesis o en la maduración en el epidídimo (Bonet *et. al.*, 2006).

Las anomalías se clasifican por su origen y la zona del espermatozoide donde aparezcan (Bonet *et. al.*, 2006):

- Espermatozoides Normales: Distinguidos por tres regiones principales (cabeza, pieza intermedia o mitocondrial y cola).

- Espermatozoides Anormales: se presentan 3 tipos diferentes:
 - a) **Primarias:** Son malformaciones que se originan durante la espermatogénesis como: macrocéfalos, microcéfalos, cabezas alargadas, piriformes, pieza intermedia doble o engrosada, colas rotas, colas dobles.

 - b) **Secundarias:** Son malformaciones que se producen a nivel del epidídimo (cola enrollada completamente o parcialmente, enrollada por el extremo distal, cabezas sin cola, colas en látigo).

 - c) **Terciarias:** Son producidas por un mal manejo (mecánicas, físicas/químicas, cambios en el pH, composición del diluyente o variación en la presión osmótica (colas en látigo, cabezas sin cola).

IV. Valoración acrosómica: Es una prueba importante para la valoración ya que tiene un papel importante en la fecundación, porque tras la capacitación, el contenido enzimático se encarga de disolver las envolturas del ovocito para fecundar y esto solo lo logran los espermatozoides que tengan un acrosoma intacto, demostrando que cuando hay acrosomas dañados disminuye la fertilidad (Bonet *et. al.*, 2006).

*La técnica de contraste de fases en el cerdo es menos sencilla que en otras especies pero es muy útil por su sencillez y rapidez para los centros de inseminación.

Acrosoma intacto: se diferencian tres zonas con la ayuda de microscopia de contraste de fases o tinciones fluorescentes.

- Zona acrosomal con borde apical nítido
- Zona post acrosómica
- Segmento Ecuatorial

V. Viabilidad espermática: Se refiere a la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. Esta es la que permite el intercambio de sustancias en el interior y el exterior de la célula, haciéndola una membrana selectiva; cuando esta selectividad se pierde, la membrana es incapaz de mantener las concentraciones de iones, solutos, metabolitos y coenzimas necesarios conduciéndole a una pérdida de la motilidad y de sus funciones. Para evaluar la integridad de esta membrana se utilizan tinciones no fluorescentes como Eosina-Nigrosina considerada como tinción de membrana impermeable; en la que aquellos espermatozoides con integridad estructural no permitirán que el colorante penetre y por lo tanto no se tiñen (Bonet *et. al.*, 2006).

VI. Integridad Funcional: Se realiza utilizando la prueba de Hinchamiento Hiposmótico (HOST- Hyposmotic Swelling Test) la cual se basa en la reacción que tiene la célula espermática a los cambios de presión osmótica (50 y 150 mOsm/kg incubados de 30 a 120 minutos), inferiores al fisiológico (300 mOsm/kg) proporcionando referencia sobre la integridad funcional de la membrana plasmática (Bonet *et. al.*, 2006). Cuando se reduce la presión osmótica del medio que rodea a la célula espermática, esta intenta equilibrar el desfase osmótico incorporando agua del medio al interior provocando un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, los que presentan un daño no experimentarán cambios (Bonet *et. al.*, 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, durante el proceso de enfriado y congelación los espermatozoides están expuestos a sufrir el fenómeno de choque frío que involucra la transición de fase de los lípidos que conforman la membrana plasmática, en consecuencia la membrana puede romperse. La inclusión de yema de huevo en el diluyente de congelación y el enfriado

lento atenúan o minimizan el daño ocasionado por ese fenómeno. El rango de temperatura en el que se presenta la transición de fase de los lípidos de la membrana es de los 20 a 0° C (Watson 1995). Sin embargo, los efectos del choque frío pueden manifestarse a temperaturas bajo cero grados y aún hasta los -10° C (Watson 1995; Noiles *et. al.*, 1995). Considerando estas observaciones, algunos investigadores han evaluado el efecto de mantener los espermatozoides a 15° C por 3 horas antes de enfriarlos hasta la temperatura estándar de 5° C (Maxwell and Johnson 1997), y otros han prolongado el enfriado hasta -5° C (Medrano *et. al.* 2001; Garzon-Perez 2008) con la finalidad de proporcionar a la membrana plasmática el tiempo suficiente para que se reorganice su estructura tridimensional, de esta manera se podría mantener su estabilidad y funcionalidad.

Se ha documentado que el daño espermático observado en el procedimiento de crioconservación, puede ser reducido mediante el mejoramiento de los protocolos de congelación (Bayshia *et. al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la Inseminación artificial ha sido la herramienta más importante para mejorar la productividad de las piaras, el almacenamiento del semen a largo plazo trae ventajas adicionales a los productores de animales de importancia agrícola y la industria de la Inseminación Artificial (Johnson *et. al.*, 2000). La criopreservación de semen facilita en gran medida la distribución de genes deseables y el rápido aumento de la productividad de la piara. De particular importancia para el sector porcino, el uso de semen congelado ayudaría a controlar la transmisión de ciertos patógenos, protegiendo así la salud del hato. Por otra parte, una reserva de semen criopreservado reduciría al mínimo los efectos de un brote repentino de una enfermedad contagiosa o un desastre natural.

Para ello se evaluarán diferentes temperaturas en rangos inferiores a 5°C determinado y confirmando la temperatura óptima en la cual haya mejor viabilidad espermática, sin que los espermatozoides sufran capacitación prematura y mantengan su capacidad fertilizante.

IV. HIPÓTESIS

Si se someten a los espermatozoides a una temperatura de enfriamiento cercana al punto de congelación, se extenderá el tiempo para que la membrana plasmática se reorganice y mejore su supervivencia al recalentamiento (sin formación de hielo) y/o al descongelado.

V. OBJETIVOS

General:

Aplicar un protocolo de enfriado lento para espermatozoides porcinos, para mejorar la supervivencia al calentamiento y al descongelado.

Particulares:

- Determinar el punto de congelación del semen de cerdo
- Someter a los espermatozoides a diferentes protocolos de enfriado y evaluar su supervivencia al recalentamiento (sin formación de hielo).
- Someter a los espermatozoides a diferentes protocolos de enfriado sin formación de hielo, para su posterior congelación y evaluar la supervivencia al descongelado.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en el km 2.5 de la carretera Cuautitlán- Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

6.0 Obtención y Transporte del Semen

El semen de cerdo se obtuvo de 6 sementales híbridos (Yorkshire-Landrace, Duroc-Yorkshire, Duroc-Pietrain, Yorkshire-Pietrain), cuyas edades oscilaban entre 1.2 y 2.5 años de edad, pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Universidad Nacional Autónoma de México localizado en Jilotepec, Estado de México.

La colección se realizó dos veces por semana mediante la técnica de “mano enguantada”, posterior a ésta el semen se diluyó (1:1 volumen/volumen) con un diluyente comercial* para su transporte en recipientes aislados (termos) con camas de gel a una temperatura de 30°C para evitar cambios bruscos de temperatura.

*Diluyente comercial: **MAGAPOR®**

6.1 Evaluación del semen

A su llegada al laboratorio, el semen diluido se dejaba atemperar a temperatura de cuarto (23°C), posteriormente se determinó el volumen, olor, color y consistencia.

6.2 Evaluación microscópica

a) Motilidad Masal: Se colocó una gota en el centro de un portaobjeto previamente calentado en una parrilla térmica a una temperatura de 37°C, se observó en el microscopio a 100 y 200 aumentos la orilla de la gota, dando un valor del 1 al 3 considerando:

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

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

b) Concentración espermática: En un tubo se hizo una dilución 1:200 (1990µl de Solución Salina Formolada al 0.3% para suprimir la motilidad espermática más 10µl del semen diluido 1:1 volumen/volumen), se mezcló perfectamente y se llenó la cámara de Neubauer la cual nos va ayudar a determinar el número de espermas por unidad de volumen; antes de contar, se esperó 5 minutos para que los espermatozoides se asentarán.

Posteriormente en las cuadrículas superior e inferior se contabilizaron los espermatozoides contenidos en 5 cuadros (los dos superiores de los extremos, los dos inferiores de los extremos y un central), contabilizando los que queden dentro del cuadro y los que toquen alguna de las 3 líneas de la parte superior e izquierda del mismo.

Se calculó un promedio de ambas cuadrículas y se multiplicó por 10 millones, obteniendo la concentración de espermatozoides por mL.

c) Centrifugación: se colocaron 10 mL del semen diluido (1:1 volumen/volumen) en cada uno de 4 tubos para centrifuga, centrifugándolos a 500 gravedades durante 10 minutos.

De los cuales se obtienen dos partes:

1. Consta de un botón o pellet el cual tiene a los espermatozoides concentrados
2. El sobrenadante el cual contiene el diluyente y parte del plasma seminal.

El sobrenadante de los 4 tubos para centrifuga es extraído y desechado con una pipeta Pasteur, manteniendo intacto al pellet.

Posteriormente se colocó 1 mL de medio BF5 sin glicerol en cada uno de los tubos con el pellet y se mezcló; el medio fue previamente descongelado en el baño maría a una temperatura de 37°C, posteriormente se sacó del baño y se dejó atemperar a 23°C (temperatura de cuarto). Posteriormente se hizo una mezcla (pool) de los cuatro tubos; de este pool se hizo una dilución 1:10 (9 mL de medio BTS que se encuentra en el baño maría a 37°C más 1 mL del pool), se mezcló perfectamente y se realizaron las siguientes evaluaciones:

d) Motilidad Progresiva: Se puso una gota de la dilución 1:100 en el portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos encima previamente calentado a 37° C, observándolo a 100 y 200 aumentos. Este movimiento se evaluó estimando, visualmente, la proporción de espermatozoides con movimiento progresivo y rectilíneo asignándoles valores del 0 - 100%.

e) Viabilidad (Vivos y Muertos): Se colocó una gota de la dilución 1:10 en un portaobjetos previamente calentado a 37°C y se le colocó una gota de Eosina-Nigrosina que también se encuentra a 37°C haciendo una mezcla de ambas gotas creando una capa delgada, se dejó secar y se observó al microscopio a 1000 aumentos contabilizando 200 células.

Evaluación: Vivos no se tiñen, quedando en color blanco; muertos se tiñen de color rosa.

Anormalidades: de la misma tinción con Eosina-Nigrosina se contabilizaron 200 células evaluando las siguientes anomalías:

- Primarias: ocasionadas durante la espermatogénesis (cabezas dobles, macro y microcéfalos, cola enrollada o doble, gota citoplasmática proximal).
- Secundarias: ocurridas en el epidídimo (gota citoplasmática media o distal, colas rotas).

f) Prueba de Hinchamiento Hiposmótico (HOST): Se tomaron 100µl del semen diluido 1:100 más 100µl de solución hipo-osmótica (60mOsm/Kg.) se colocaron en un tubo, se mezclaron y se mantuvieron en baño maría por 30 minutos.

Pasados los 30 minutos se fijó la mezcla con una gota de glutaraldehído al 0.4%, se puso una gota en un portaobjetos colocándole un cubreobjetos previamente calentados y se observó a 1000 aumentos contabilizando 200 células.

Evaluación: Vivos presentan una hinchazón en la cola provocando su enroscamiento; muertos mantienen la cola intacta y lisa.

g) Integridad del Acrosoma: Se tomaron 100 µl de la solución 1:100 y mezclaron con 100 µl de glutaraldehído al 0.4%, se puso una gota en un portaobjetos colocándole un cubreobjetos previamente calentado y se observó en un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos.

Evaluación:

Intacto: borde apical liso bien definido

No Intacto: borde apical rugoso, craterizado, incompleto o ausente.

*Los resultados de todas las evaluaciones anteriormente mencionadas se expresaron en porcentajes (excepto para motilidad masal).

h) Concentración del semen diluido (pool): en un tubo se hizo una dilución 1:200 (1990µl de Solución Salina Formolada al 0.4% más 10 µl del pool del semen con BF5), se mezcló perfectamente y se llenó la Cámara de Neubauer dejándola reposar por 5 minutos. Posteriormente se hizo el conteo como se explicó anteriormente.

i) Refrigeración de los espermatozoides diluidos:

1. El tubo que contenía los espermatozoides en BF5 (400×10^6 espermatozoides/mL) se colocó dentro de un recipiente con agua salina al 10% (p/v) a temperatura de cuarto.
2. Se colocó otro tubo con BF5 con glicerol con la misma cantidad en mL del anterior y se colocó en otro recipiente con agua salina al 10% a temperatura de cuarto.
3. Otro tubo de BF5 con semen se empleó para monitorizar la temperatura, en este tubo se colocó un termómetro digital (**VWR**).
4. Cuando la temperatura descendió a 7° C (aprox.) se agregó la fracción de BF5 con glicerol a los espermatozoides diluidos en BF5 (sin glicerol) y se mezcló la concentración final fue de 200×10^6 células/mL con 1% de glicerol.
5. Enseguida se envasaron los espermatozoides en pajillas de 0.5 mL, previamente enfriadas, y se dejaron enfriar hasta 5° C.

*El protocolo anteriormente mencionado es un proceso común que se realizó para la evaluación de las muestras en fresco para las tres etapas respectivamente, que a continuación se mencionan.

6.3 PRIMERA ETAPA: Determinación del punto de congelación

Las pajillas que se emplearon en esta etapa no se llenaron en su totalidad, se dejó un espacio de 4.8 cm evitando así que se derramara la muestra al introducir la sonda del termómetro.

Procedimiento para determinar el punto de congelación:

1. En una caja de unicel con una capacidad de 5,964.8 cm³ se vertió nitrógeno líquido quedando a una altura de 8 cm.
2. Se colocaron unas varillas de alambre de cobre sobre la caja de unicel para sostener las pajillas sobre los vapores de nitrógeno, estas varillas tienen separaciones para evitar que se peguen las pajillas entre sí, la distancia entre las pajillas y la cama de nitrógeno fue de 4 cm. Alcanzando una temperatura de los vapores de nitrógeno a esa distancia de -100°C.
3. Se numeraron las pajillas y una por una se les introdujo la sonda de un termómetro digital (Hanna) que permite registrar: la temperatura de inicio, la temperatura de congelación, el calor latente de cristalización y el momento en el que éste se disipa.
4. Se realizaron 5 repeticiones utilizando 10 pajillas del semen de diferentes machos (n=50 pajillas). Posteriormente, se calculó la media de las 50 pajillas congeladas, determinando así el punto de congelación para el semen de cerdo diluido en medio BF5 con 1% de glicerol.

6.4 SEGUNDA ETAPA: Enfriado a diferentes temperaturas blanco antes de la congelación

Una vez que se determinó el punto de congelación, se evaluaron diferentes protocolos de enfriado:

- +5° C (control)
- -3° C
- -5° C
- -7° C

Los espermatozoides empleados en esta etapa fueron procesados de la misma manera que se describió anteriormente, desde la evaluación hasta el momento en que se quedan empajillados en el refrigerador. Se utilizaron 13 pajillas por cada eyaculado: 3 por cada temperatura de enfriado y 1 pajilla era el monitor que contenía la sonda del termómetro, indicando el descenso de la temperatura hasta alcanzar las temperaturas requeridas. En esta etapa se utilizó el semen de 12 eyaculados provenientes de 6 machos.

Al mismo tiempo se tenía preparado el baño maría y la platina térmica junto con el material de cristalería a una temperatura de 38°C para el recalentado de las muestras.

6.5 Procedimiento de evaluación para las diferentes temperaturas blanco:

1. Se sacaron las primeras 3 pajillas del refrigerador (5° C) llevando un registro de la hora y la temperatura, se llevaron al baño maría en una caja de unicel evitando cambios en la temperatura de las pajillas; se colocaron las 3 pajillas en un tubo de vidrio vacío que se encontraba sumergido en el baño maría, se les cortó el tapón haciendo que el semen descendiera. Los espermatozoides diluidos se dejaban en el baño maría por 10 minutos antes de la evaluación.

2. Pasados los 10 minutos se hizo una dilución 1+5 (50 µl de semen + 250 µl de BTS previamente calentado). Enseguida se evaluó la Motilidad Progresiva, los espermatozoides vivos (prueba de HOST y Eosina/Nigrosina) y la integridad acrosomal.

3. Para los siguientes tratamientos de enfriado (-3, -5 y -7°C) se utilizó una caja de plástico (termo) que contenía hielo salino al 10%, en el cual se colocó el recipiente que contiene las pajillas enfriadas, para lo cual el hielo tenía una consistencia de agua nieve la cual se ajustaba a una temperatura de aproximadamente -12°C, esto con la finalidad de que el recipiente con

las pajillas se pueda sumergir perfectamente, de que el descenso de la temperatura sea paulatino.

4. Cuando se sumergió el recipiente con las pajillas en el hielo salino, se registró la hora y temperatura de las pajillas, esperando el descenso hasta las temperaturas requeridas; cuando se alcanzó cada una de las temperaturas esperadas se hizo el mismo procedimiento mencionado con anterioridad, se registró la hora y la temperatura a las que se llegó en cada tratamiento.

6.6 TERCERA ETAPA: Congelación – Descongelación

Al semen empleado en esta etapa se le hizo el mismo procedimiento (preparación común del semen en fresco ya mencionado), desde la evaluación hasta el momento en el que se queda empajillado en el refrigerador.

Se utilizaron 13 pajillas de 0.5 mL, de las cuales 1 pajilla era el monitor que contenía el termómetro (VWR) que nos indicaba el descenso de la temperatura hasta alcanzar las temperaturas blanco, cada pajilla se marcó con la fecha del día del empajillado y con unas marcas de diferentes colores distinguidas para los diferentes tratamientos de congelación y para facilitar la identificación:

* **Tratamiento 1:** Temperatura de **+5° C** identificada con color **naranja**.

* **Tratamiento 2:** Temperatura de **-3° C** identificada con color **negro**.

* **Tratamiento 3:** Temperatura de **-5° C** identificada con color **azul**.

Las pajillas se llenaron dentro del refrigerador lo más pronto posible evitando los cambios de temperatura, dejándoles un espacio de 1 cm, aproximadamente, permitiendo el sellado con el alcohol polivinílico (PVA).

Una vez selladas, se colocaron en un recipiente que contiene agua salina al 10% previamente refrigerada (a 5° C) manteniendo la misma temperatura que tienen las pajillas; éstas se encuentran separadas por cada tratamiento dentro del mismo recipiente. Las pajillas se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente durante 16hrs.

Antes de sacar las pajillas del refrigerador se colocó un termo debajo del refrigerador para evitar en lo posible la variación de la temperatura de las pajillas.

El termo contenía hielo salino al 10% donde se colocó el recipiente que contiene las pajillas enfriadas, para lo cual el hielo deberá tener una consistencia de agua nieve a una temperatura de aproximadamente -12° C, con la finalidad de que se pueda sumergir perfectamente y de que el descenso de la temperatura sea paulatino, pero alcanzando las temperaturas deseadas antes de que el hielo se caliente.

A su vez se mantuvo preparada a un lado del refrigerador una caja de unicel la cual tenía 17 cm de profundidad en la que se colocó una cama de nitrógeno líquido de 8 cm, que a su vez tendrá una separación de 4 cm entre el nitrógeno y las varillas donde se sobrepusieron las pajillas.

6.7 Procedimiento para la congelación:

1. Se sacaron del refrigerador las 4 pajillas del tratamiento 1 (+5°C) con la ayuda de unas pinzas, cogiéndolas de un extremo y pasándolas inmediatamente a la caja de unicel que contenía el nitrógeno líquido; enseguida se tapó la caja, las pajillas estuvieron expuestas a los vapores de nitrógeno durante 15 minutos (-100°C).

2. Una vez transcurrido ese tiempo se sumergieron rápidamente en el nitrógeno líquido (-196°C) con la ayuda de unas pinzas previamente enfriadas a la temperatura del nitrógeno, esto se logró sumergiéndolas en el

nitrógeno 1 minuto antes de que transcurrieran los 15 minutos evitando con ello un choque térmico al tomar las pajillas.

3. Para el resto de los tratamientos se retiró el recipiente del refrigerador el cual contiene las pajillas, de forma separada y por tratamientos, registrándose la hora y la temperatura de las pajillas, queriendo con ello disminuir gradualmente la temperatura sumergiéndolas en hielo salino que se encuentra a -12°C , hasta alcanzar las temperaturas blanco del tratamiento dos y tres.

4. Una vez alcanzadas las temperaturas en el hielo salino se repite el procedimiento en el nitrógeno líquido hasta que quedan sumergidos los 3 tratamientos.

5. Se sumergió en el nitrógeno un gobelet, que a su vez tiene gobelets de menor tamaño previamente identificados con números, éste se encontraba sostenido en la caja de unicel evitando que se mueva y se salgan las pajillas.

6. Con la ayuda de unas pinzas de mayor tamaño se separaron las pajillas de cada tratamiento y se colocaron en un gobelet pequeño e identificado, colocando en un gobelet los tratamientos 1 y 2 ($+5$ y -3°C) y en otro gobelet el tratamiento 3 (-5°C), colocando los tratamientos con las puntas de alcohol polivinílico hacia arriba.

7. El gobelet se colocó en la canastilla del termo de nitrógeno la cual estaba identificada con un color y un número dejándolas sumergidas por aproximadamente un mes. De cada muestra se llevó un registro de gobelet, color y canastilla en la que quedaron manteniendo un registro para posteriormente la identificación al momento de la descongelación.

6.8 Procedimiento para la descongelación:

Una vez que se congelaron todas las muestras y que transcurrió un mes aproximadamente, se prosiguió a sacar la muestra que se congeló primero y conforme transcurrieron los días se fueron sacando en el orden correspondiente.

1. Para la descongelación se acercaba el termo de nitrógeno al baño maría; el baño y el material de vidrio se mantuvieron listos a una temperatura de 38° C para hacer las evaluaciones al semen descongelado.

2. Se identificaba por color y número la canastilla del semen requerido para descongelar, posteriormente se localizaba el número de gobelet donde quedaron los tratamientos correspondientes a ese macho.

3. Se sacaban 3 pajillas una por una del tratamiento 1 (+5°C) para descongelar, pasándolas rápidamente al baño maría y dejándolas por 30 segundos.

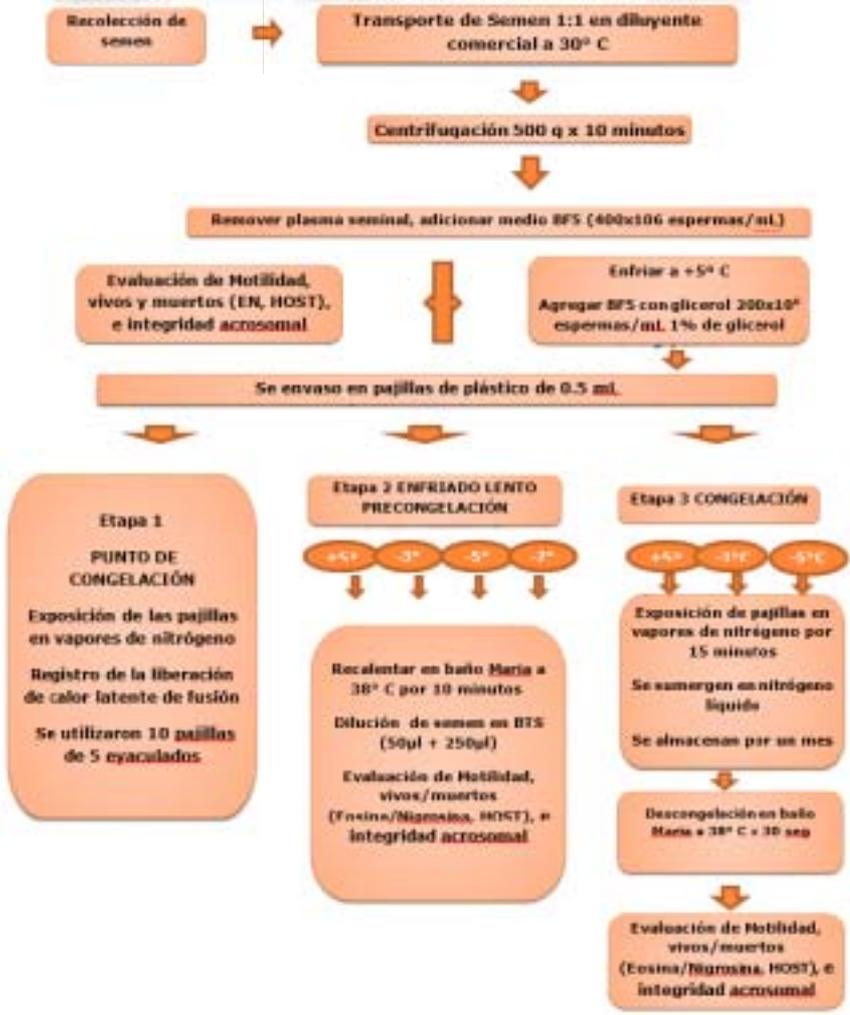
4. Transcurridos los 30 segundos se sacaron del baño maría y se colocaron en papel para retirarles el exceso de agua (secarlas suavemente sin frotar), se le cortó el tapón de PVA y se les colocó en un tubo de vidrio que se mantuvo sumergido en el baño maría, enseguida se cortó el tapón del otro extremo permitiendo que descendiera el semen al tubo.

Este proceso se realizó con todas las pajillas de los tratamientos que se evaluaron (3 por tratamiento).

5. Una vez que se descongelaron todas las pajillas, el semen de cada pajilla se diluyó en BTS 1:5 v/v (50µl de semen + 250µl de BTS) y se le dejó en ese medio por 10 minutos.

6. Transcurridos los 10 minutos, inmediatamente se tomó una gota de la mezcla de espermatozoides en BTS poniéndola en un portaobjetos con un cubreobjetos previamente calentado en la platina térmica y se observó la motilidad progresiva.

7. De esa dilución que se hizo de pajilla por pajilla se realizaron los conteos a 200 células para las pruebas de HOST, Eosina-Nigrosina e integridad acrosomal, asignándoles un valor en porcentaje. Se llevó un registro por machos, por pajillas y tratamientos para su posterior interpretación de resultados.



6.9 Análisis estadístico

Los datos que se obtuvieron en las tres partes experimentales de este trabajo, fueron analizados mediante el programa estadístico Stats Plus versión 5.0. Los datos de la primera etapa (punto de congelación) se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Kruskal-Wallis (estadística no paramétrica).

En relación a las etapas 2 (enfriado precongelación) y 3 (congelación – descongelación) se empleó ANOVA para determinar posibles diferencias entre tratamientos y entre machos, el nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$. Los valores de las diferentes variables expresados en porcentaje se transformaron al arcoseno para normalizarlos, previo al ANOVA.

XVII. RESULTADOS

Etapa 1. Determinación del punto de congelación

El valor promedio del punto de congelación, considerando las 50 determinaciones (10 pajillas x macho) que se hicieron en los espermatozoides diluidos de 5 machos, fue de -8.3 ± 0.24 (media \pm error estándar). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre machos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Punto de congelación de espermatozoides de cerdo diluidos en medio de congelación BF5 con 1% de glicerol

Macho	Punto de congelación (grados centígrados) $\mu \pm EE$	Rango de congelación entre pajillas
1	-5.8 ± 0.15^a	-5.1 / -6.3° C
2	-8.9 ± 0.39^b	-7.3 / -10.8° C
3	-9.0 ± 0.45^b	-6.5 / -11.2° C
4	-9.0 ± 0.34^b	-7.3 / -10.7° C
5	-9.0 ± 0.42^b	-7.3 / -11.1° C

Los valores son medias \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Se congelaron 10 pajillas de cada macho.

Grafica 1. Punto de Congelación



Etapa 2. Enfriado del semen a diferentes temperaturas blanco antes de la congelación

Evaluación del semen fresco

En el Cuadro 2 se presentan las características del semen en fresco de los 6 machos que se utilizaron para la etapa 1 y 2. En este cuadro se observa que en lo que respecta a la motilidad progresiva y espermatozoides normales hubo diferencias significativas entre individuos: el macho 5 respecto de los demás individuos. En general, los valores promedio obtenidos de cada variable muestran que se encuentran dentro del rango normal para la especie porcina (Bonet *et. al.*, 2006).

Cuadro 2. Valores promedio de las características del semen fresco de cada macho (Etapas 1 y 2).

Macho Número de espaladas	Cantidad Proteína (%) ± EE	Concentración (x 10 ⁶ /ml) ± EE	Viabilidad Eterna Normal (%) ± EE	Viabilidad Rápida (%) ± EE	Acrosoma Intacto (%) ± EE	Núcleo (%) ± EE	Acrosomales Plumosas (%) ± EE	Apomastocitos Tercerarios (%) ± EE
1 (2)	87.5 ±2.80 ^a	267.5 ±92.50	87.5 ±0	86.3 ±1.76	87.5 ±1.80	94.3 ±8.26 ^a	0.8 ±0.28	36 ±8.68 ^a
2 (2)	87.5 ±2.80 ^a	485 ±390	81 ±8	59.2 ±6.0	86.5 ±1.58	96 ±4.50 ^a	0	34 ±8.68 ^a
3 (2)	88.0 ±0 ^a	338 ±66	90.5 ±5.50	45.3 ±16.78	85.5 ±1.88	70.3 ±28 ^a	2.8 ±1.78	27±1.88 ^a
4 (2)	88.0 ±0 ^{ab}	182.5 ±77.50	83.5 ±3.50	46.8 ±14.28	85.5 ±2	46.8 ±2.20 ^{ab}	0.8 ±0.58	53.8 ±2.78 ^a
5 (1)	78.0 ^a	178	93	85.8	74.5	18.0 ^a	1	78.9 ^a
6 (3)	86.7 ±1.67 ^a	228.3 ±44.75	84.3 ±6.33	50.7 ±12.88	81.7 ±4.19	67.7 ±6.69 ^a	0.8 ±0.17	31.8 ±6.69 ^a

Los valores representan las medias ± error estándar de los espaldados empleados en la etapa 2.

Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

Comparación del enfriado a diferentes temperaturas blanco

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de los espermatozoides después de que se sometieron a las diferentes temperaturas pre-congelación con hielo salino. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la motilidad progresiva y porcentaje de vivos (Eosina-Nigrosina), el tratamiento 4 (enfriado a -7°C) fue diferente a los demás.

En la prueba de HOST hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento 1 ($+5^{\circ}\text{C}$) y el tratamiento 4 (-7°C); sin embargo, los otros dos tratamientos (-3°C y -5°C) no fueron diferentes a los anteriores.

Respecto a la integridad acrosomal, no hubo diferencias entre tratamientos.

Cuadro 3. Efecto del enfriado pre-congelación a 4 diferentes temperaturas blanco sobre la calidad espermática al recalentado.

Tratamiento	Motilidad Progresiva (%) $\mu \pm \text{EE}$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm \text{EE}$	Viabilidad Eosina Nigrosina (%) $\mu \pm \text{EE}$	Acrosoma Intacto (%) $\mu \pm \text{EE}$
$+5^{\circ}\text{C}$	74.6 ± 1.43^a	49.3 ± 5.64^a	89.7 ± 0.60^a	90.3 ± 2.11^a
-3°C	70.6 ± 2.10^a	43.0 ± 6.62^{ab}	89.3 ± 0.87^a	88.7 ± 2.73^a
-5°C	63.0 ± 2.74^a	39.5 ± 5.69^{ab}	88.8 ± 1.28^a	82.5 ± 5.47^a
-7°C	39.8 ± 6.39^b	25.3 ± 3.14^b	80.8 ± 2.26^b	81.2 ± 3.40^a

Los valores representan las medias \pm error estándar. Los valores con literales distintas (a, b) dentro de las columnas son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

En el cuadro 4 se muestran la calidad de los espermatozoides de cada macho en el tratamiento 1 de enfriado (+5°C). No hubo diferencias entre machos en ninguna de las variables evaluadas.

Cuadro 4. Variables de los espermatozoides diluidos de cerdo de cada macho enfriados a +5° C y recalentados a 38° C

Macho	Temperatura de enfriado	Motilidad Progresiva (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad Eosina/Nigrosina (%) $\mu \pm EE$	Acrosoma Intactos (%) $\mu \pm EE$
1	+5° C	72.5 ± 2.50	49.3 ± 2.26	89.3 ± 1.26	90.0 ± .50
2	+5° C	80.0 ± 0	70.5 ± 0	92.0 ± 0	95.5 ± 0
3	+5° C	72.5 ± 2.50	43.3 ± 23.26	88.0 ± 2.00	90.5 ± 3.00
4	+5° C	75.0 ± 5.00	45.5 ± 24.00	89.5 ± .50	94.0 ± 1.50
5	+5° C	65	57.5	88	68.5
6	+5° C	76.7 ± 1.67	39.0 ± 9.80	90.2 ± 1.67	91.5 ± .77
Los valores son medias ± e.e. No hubo diferencias significativas					

En el cuadro 5 se muestran la calidad de los espermatozoides de cada macho en el tratamiento 2 de enfriado (-3°C). Hubo diferencias entre machos en cuanto a motilidad progresiva y acrosomas intactos (P<0.05).

Cuadro 5. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -3°C y recalentados a 38°C.

Macho	Temperatura de enfriado	Motilidad Progresiva (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad Eosina Nigrosina (%) $\mu \pm EE$	Acrosomas intactos (%) $\mu \pm EE$
1	-3°C	74.0 ± 2.0 ^a	64.0 ± 25.50	88.8 ± 2.76	94.0 ± 0 ^a
2	-3°C	76.0 ± 0 ^a	28.5 ± 0	94.0 ± 0	94.0 ± 0 ^a
3	-3°C	73.5 ± 1.50 ^a	26.0 ± 9.0	86.5 ± 2.0	84.5 ± 1.0 ^b
4	-3°C	67.5 ± 2.50 ^a	45.0 ± 33.50	88.5 ± 1.0	92.8 ± 2.26 ^a
5	-3°C	50.0 ^b	55.5	88	61.0 ^c
6	-3°C	71.7 ± 1.67 ^a	44.5 ± 2.02	89.5 ± 1.32	90.8 ± 1.42 ^a
Los valores representan las medias ± el error estándar. Valores con literales diferentes (a, b, c) dentro de las columnas indican diferencias significativas.					

En el cuadro 6 se muestran la calidad de los espermatozoides de cada macho en el tratamiento 3 de enfriado (-5° C). Hubo diferencias entre machos en cuanto a la motilidad progresiva (P<0.05).

Cuadro 6. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -3°C y recalentados a 38°C.

Macho	Temperatura de enfriado	Motilidad progresiva (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad Eosina Nigrosina (%) $\mu \pm EE$	Acrosomas intactos (%) $\mu \pm EE$
1	-5° C	72.5 \pm 2.50 ^a	72.5 \pm 19.00	86.0 \pm 5.50	60.5 \pm 23.50
2	-5° C	65.0 \pm 0 ^a	32.5 \pm 0	92.0 \pm 0	98.0 \pm 0
3	-5° C	68.5 \pm 1.50 ^a	26.5 \pm 1.50	91.5 \pm 0	83.3 \pm 7.26
4	-5° C	50.0 \pm 0 ^b	24.0 \pm 9.00	90.3 \pm 3.25	93.3 \pm 3.76
5	-5° C	45.0 ^b	55	85.5	53
6	-5° C	66.3 \pm 2.40 ^a	36.0 \pm .29	86.7 \pm 3.0	89.0 \pm 2.30

Los valores representan las medias \pm el error estándar. Valores con literales diferentes (a, b) dentro de las columnas indica diferencias significativas (P<0.05).

En el cuadro 7 se muestran la calidad de los espermatozoides de cada macho en el tratamiento 4 de enfriado (-7° C). Entre machos hubo una diferencia en cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho enfriados a -7° C y recalentados a 38° C

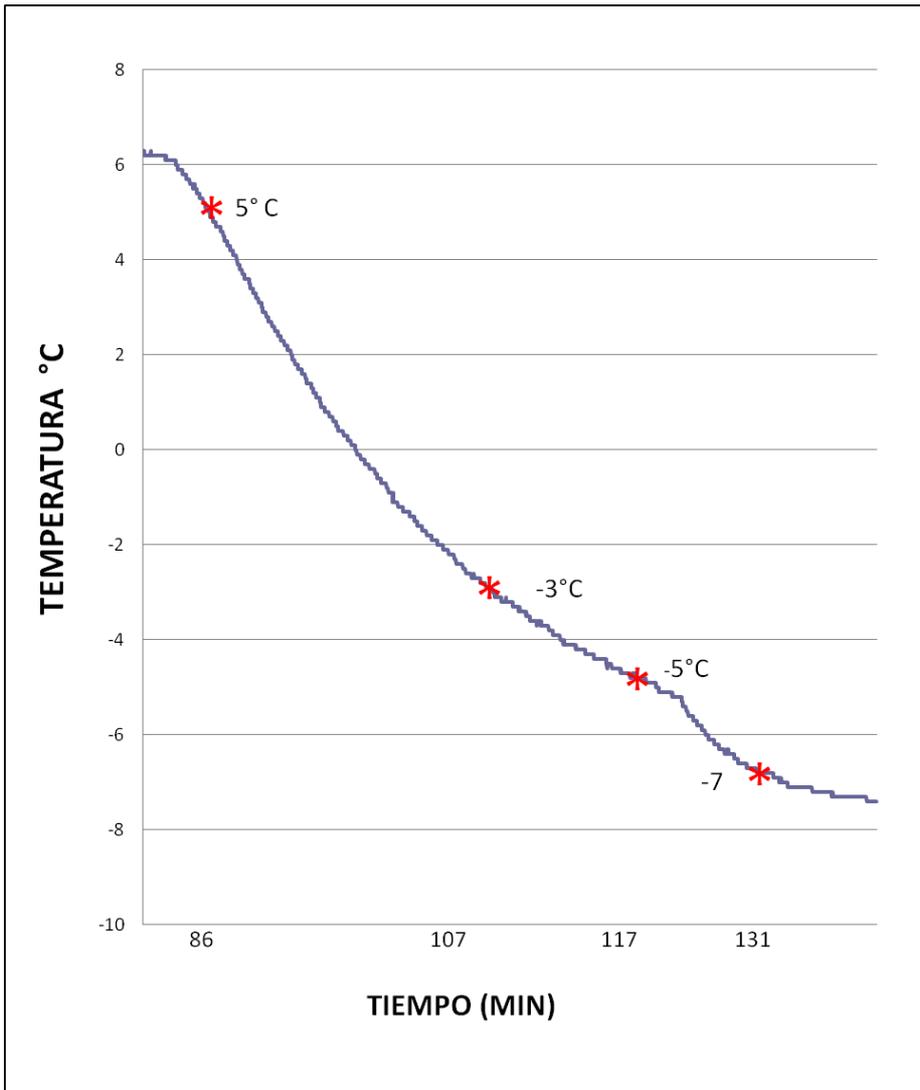
Temperatura de enfriado	Motilidad progresiva (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad Eosina/ Nigrosina (%) $\mu \pm EE$	Acrosomas Intactos (%) $\mu \pm EE$
-7° C	40.0 \pm 20.0	31.5 \pm 6.50	89.3 \pm 5.25	88.3 \pm 3.76 ^a
-7° C	60.0 \pm 0	20.0 \pm 0	74.5 \pm 0	84.5 \pm 0 ^a
-7° C	40.0 \pm 5.0	14.5 \pm 5.50	82.8 \pm 1.75	81.0 \pm 4.50 ^a
-7° C	15.0 \pm 5.0	15.7 \pm 4.26	77.3 \pm 9.25	81.3 \pm 1.26 ^a
-7° C	5	43	69	46.0 ^d
-7° C	54.3 \pm 9.93	32.5 \pm 4.26	84.5 \pm 1.04	86.0 \pm 2.18 ^a

Los valores representan las medias \pm error estándar. Valores con literales diferentes (a, b) dentro de las columnas indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 8. Variables de la viabilidad espermática e integridad acrosomal de los diferentes tratamientos en relación al semen fresco.

Variable	Fresco	T1 (5° C)	T2 (-3° C)	T3 (-5° C)	T4 (-7° C)
% MP	85 ^a	74.5 ^d	70.5 ^{bc}	63.0 ^c	39.8 ^d
% HOST	55.9 ^a	49.3 ^a	43.0 ^a	39.5 ^{ab}	25.3 ^b
% EN	85.8 ^a	89.6 ^a	89.3 ^a	88.7 ^a	80.8 ^b
% AC	93.3 ^a	90.2 ^{ab}	88.6 ^{abc}	82.5 ^{bc}	81.2 ^c

Los valores representan las medias. Valores con literales diferentes (a, b, c, d) dentro de las filas indican diferencias significativas.



Grafica 2. Etapa 2 Pre-congelación. Se muestra el descenso de la temperatura señalando los diferentes tratamientos y el tiempo en minutos al que llegaron cada uno ellos.

Etapa 3. Congelación y descongelación de espermatozoides de cerdo enfiados previamente a 3 diferentes temperaturas blanco.

Evaluación del semen fresco

Los valores expresados en el Cuadro 8 representan las características del semen en fresco de los 6 machos experimentales que se utilizaron para la etapa 3 de este trabajo. En este cuadro se puede observar que en las variables motilidad progresiva, vivos (Eosina-Nigrosina, HOST) y normales no existieron diferencias significativas entre los machos; sin embargo en lo que respecta a la integridad acrosomal y la concentración espermática si hubo diferencias ($P < 0.05$) entre algunos machos.

Los valores promedios obtenidos de cada variable muestran que se encuentran dentro del rango normal para la especie porcina (Bonet *et al.*, 2006).

Cuadro 9. Valores promedio de las características del semen fresco de cada macho (Etapa 3)

Macho (número de apareamiento)	Concentración (x 10 ⁶ ca) μ ± EE	Movilidad progresiva (%) μ ± EE	Viabilidad Esosmo Nigrosina (%) μ ± EE	Viabilidad HCST (%) μ ± EE	Acrosoma Intacto (%) μ ± EE	Normales (%) μ ± EE	Acros. Primitivos (%) μ ± EE	Acros. Secundarios (%) μ ± EE
1 (Q)	36.7 ± 0.52 ^a	76.8 ± 3.06	72.7 ± 2.04	96.8 ± 4.02	97.9 ± 1.81 ^a	83.3 ± 1.2	8.83 ± 8.44	45.7 ± 4.98
2 (Q)	296.7 ± 0.67 ^a	86 ± 2.85	85.7 ± 3.34	53 ± 0.30	98.9 ± 0.44 ^a	91.2 ± 2.36	8.67 ± 8.33	48.3 ± 2.12
3 (Q)	303.3 ± 0.77 ^a	86.7 ± 3.33	73.8 ± 8.67	95.9 ± 4.63	97.7 ± 0.89 ^a	48.1 ± 5.90	1.1 ± 8.57	58.7 ± 6.18
4 (Q)	750 ^c	85	98	62	99.0 ^b	53	8	47
5 (Q)	122.6 ± 1.50 ^a	77.6 ± 7.58	83 ± 1.58	78.2 ± 6.76	78.8 ± 3.70 ^b	25.0 ± 1.50	8.25 ± 8.25	48.8 ± 26.76
6 (Q)	367.5 ± 07.50 =	87.5 ± 2.58	88.5 ± 1.50	88.5 ± 0.8	96.5 ± 2.0 ^b	45.0 ± 11.0	2.5 ± 2.0	52.5 ± 8.0

Los valores representan medias ± desviación estándar obtenidos en la etapa 3. Acros. = Acrosomifalidos. Letras diferentes dentro de columna indican diferencias significativas.

Calidad de los espermatozoides de cerdo al descongelado

En el Cuadro 9 se muestran las variables de los espermatozoides al descongelado, después de que se sometieron a las diferentes temperaturas de enfriado pre-congelación. En este cuadro se muestra que no hubo diferencias significativas para ninguna de las pruebas, siendo comparativamente igual en todos los tratamientos.

Cuadro 10. Calidad de los espermatozoides de cerdo al descongelado. Los espermatozoides diluidos fueron enfriados a 3 diferentes temperaturas blanco antes de la congelación – descongelación.

Temperatura de enfriado precongelación	Motilidad Progresiva (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad HOST (%) $\mu \pm EE$	Viabilidad Eosina/Nigrosina (%) $\mu \pm EE$	Acrosoma Intacto (%) $\mu \pm EE$
+5°C	35.2 \pm 2.50	21.9 \pm 4.39	57.4 \pm 2.50	86.0 \pm 1.91
-3°C	36.9 \pm 2.77	21.9 \pm 4.26	60.4 \pm 2.33	85.1 \pm 1.92
-5°C	38.8 \pm 2.33	21.9 \pm 4.39	62.5 \pm 2.24	85.9 \pm 1.96

Los valores representan las medias \pm desviación estándar.
No hubo diferencias significativas entre tratamientos de enfriado.

En el Cuadro 10 se muestran los valores obtenidos de todos los machos por cada tratamiento de la etapa 3. En la cual, de la misma forma que el cuadro anterior, se indica que no hay diferencia significativa entre tratamientos comparándose entre todos los machos experimentales.

Cuadro 11. Variables de los espermatozoides de cerdo de cada macho al descongelado. Los espermatozoides fueron enfriados a diferentes temperaturas blanco previo a la congelación.

Macho	Temperatura de enfriado	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad HOST (%)	Viabilidad Eosina/Nigrosina (%)	Acrosomas Intactos (%)
1	+5° C	33.0 ±	22.3 ±	61.3 ±	88.7 ±
2	+5° C	33.7 ±	13.0 ±	49.7 ±	86.0 ±
3	+5° C	31.3 ±	12.3 ±	54.3 ±	85.3 ±
4	+5° C	40.0 ±	14.0 ±	58.0 ±	90.0 ±
5	+5° C	35.5 ±	57.0 ±	58.0 ±	77.5 ±
6	+5° C	44.0 ±	18.0 ±	66.5 ±	89.5 ±
1	-3° C	34.7 ±	19.7 ±	60.3 ±	86.3 ±
2	-3° C	48.3 ±	14.7 ±	63.0 ±	84.3 ±
3	-3° C	29.3 ±	14.7 ±	53.3 ±	83.0 ±
4	-3° C	38.0 ±	16.0 ±	65.0 ±	92.0 ±
5	-3° C	26.5 ±	56.5 ±	55.0 ±	79.0 ±
6	-3° C	44.0 ±	15.0 ±	70.5 ±	90.0 ±
1	-5° C	35.7 ±	24.3 ±	65.3 ±	89.0 ±
2	-5° C	45.0 ±	13.3 ±	60.3 ±	84.3 ±
3	-5° C	37.3 ±	14.3 ±	58.7 ±	87.0 ±
4	-5° C	30.0 ±	12.0 ±	65.0 ±	91.0 ±
5	-5° C	31.5 ±	53.5 ±	57.0 ±	76.0 ±
6	-5° C	48.0 ±	16.0 ±	71.5 ±	89.5 ±
Los valores representan las medias ± el error estándar					

En el cuadro 12. Se muestran las variables de la viabilidad espermática e integridad acrosomal de los diferentes tratamientos de la etapa tres en relación al semen fresco

Evaluación	Fresco	T1 (+5° C)	T2 (-3° C)	T3 (-5° C)
% MP	83.8 ^a	35.2 ^b	36.8 ^b	38.8 ^b
% HOST	58.4 ^a	21.9 ^b	21.8 ^b	21.9 ^b
% EN	80.7 ^a	57.3 ^b	60.4 ^b	62.5 ^b
% AC	95.1 ^a	86.0 ^b	85.9 ^b	85.0 ^b
Los valores representan las medias. Valores con literales diferentes (a, b) dentro de las filas indican diferencias significativas (P<0.05).				

XVIII. DISCUSIÓN

Se han utilizado diferentes protocolos de enfriado lento previo a la congelación (Medrano 1998, y Garzón 2008) con la finalidad de proporcionar a la membrana plasmática el tiempo suficiente para que reorganice su estructura tridimensional y de esta manera mantener su estabilidad y funcionalidad. Con base en el señalamiento anterior, en el supuesto de que el enfriado lento a temperaturas los más cercanas al punto de congelación mejorarían la supervivencia, la primera etapa del trabajo comprendió la determinación del punto de congelación en pajillas de 0.5 mL con espermatozoides diluidos en un medio de congelación estándar (BF5), observándose la congelación en un rango de -5.1° a -11.2° C.

Una vez que se determinó el punto de congelación, en la segunda etapa se emplearon diferentes protocolos de enfriado lento precongelación a $+5^{\circ}$, -3° , -5° y 7° C., con la finalidad de evaluar el efecto sobre los espermatozoides de éstos sin llegar a la congelación. Se observó que la motilidad, viabilidad espermática e integridad acrosomal entre los tratamientos a $+5^{\circ}$, -3° y -5° C no mostraron diferencias significativas entre sí; sin embargo fueron diferentes al enfriado a -7° C en el que se observó una disminución de los parámetros mencionados. Al parecer, cuando se enfrían los espermatozoides por debajo de los -5° C el efecto observado es ocasionado por el fenómeno llamado choque frío (Watson, 1995). En caninos se observó que los espermatozoides sometidos a un corto periodo de almacenamiento (2 días) a 5° C y el posterior recalentado a 39° C, mostraron que la calidad era superior a la del semen congelado y a los 49 días de almacenamiento la calidad fue equivalente a la del descongelado (England y Ponzio, 1995). Mediante la utilización de criomicroscopia y yoduro de propidio (PI), se observó que al recalentamiento aumenta la proporción de espermatozoides positivos a PI, argumentando que la permeabilización se induce por la transición de fase de lípidos y desestabilización de la membrana, identificándose al recalentamiento como un paso crítico del proceso congelación-descongelación (Medrano et al., 2002).

En relación a la tercera etapa de este trabajo, en la que se sometió a los espermatozoides a tres diferentes protocolos de enfriado lento a +5°, -3°, -5° y posterior proceso de congelación-descongelación, los resultados mostraron una supervivencia espermática a dicho proceso similar a los de Flores (2005) y Garzón (2008). En trabajos realizados con anterioridad, se muestra que la temperatura óptima para enfriar semen porcino es +5°C y de -5°C en pellets (Pursel y Johnson, 1975; Bwanga *et al.*, 1991; Fiser *et al.*, 1991).

Existen factores que influyen sobre la calidad de los espermatozoides criopreservados, y que en este trabajo no fueron la excepción: los factores internos que son inherentes a los espermatozoides como: diferentes líneas genéticas y cruzamientos de los cerdos, edades de los sementales y factores externos como los diluyentes. La evaluación de la capacidad funcional de los espermatozoides antes y después de la congelación conlleva a diferentes intereses como determinar la capacidad reproductiva de los sementales individualmente y a la vez determinar y hacer selección de los buenos y malos congeladores, para los cuales podría observarse un 50 vs 20% respectivamente, de motilidad al descongelado y entre eyaculados del mismo macho (Watson, 1996), esto con la finalidad de seleccionar verracos con buena criosupervivencia para tener éxito en la inseminación artificial.

En el presente trabajo, se decidió utilizar un protocolo de enfriado en dos fases, en primer lugar un enfriado lento +5°C y posteriormente un enfriado rápido -5°C (Bwanga *et al.*, 1991; Medrano *et al.*, 2002) agregándose dos temperaturas de enfriado a -3° y -7° C, con la intención de evitar que se presentaran cambios notables en la integridad de la membrana plasmática, desorden y empaquetamiento lipídico, viabilidad celular, motilidad y detrimento de la criosupervivencia (Meyers, 2005).

En relación a la etapa de congelación y descongelación, no se observaron diferencias significativas entre los protocolos de enfriado. Por otro lado, posiblemente el efecto de la temperatura puede ser una consecuencia del grado de fluidez de la membrana plasmática de cada cerdo (Medrano *et al.*, 2012) y por ello la temperatura de enfriado era variable antes de llegar al punto de congelación. Asimismo, se cree que puede influir la diferencia de edades y razas de los cerdos experimentales.

Al igual que en cerdos, en conejos también se ha observado variabilidad entre los parámetros de los eyaculados al descongelado categorizándose como buenos y malos congeladores, en los que se utilizaron diferentes puntos de enfriado pre-congelación a -5, -10, -15°C, en que se identificó que la temperatura óptima para congelar el semen de esta especie es de -15°C con un descongelando lento a 25°C (Chen y Foote, 1993).

En resumen con los resultados de este trabajo, se observó que la temperatura adecuada para mantener la viabilidad y posiblemente lograr una buena fertilidad con semen de cerdo congelado es de +5°C; esto significa que no hay ninguna ventaja en llevar el semen más allá de los -5°C previo a la congelación. Considerando lo anterior, rechazamos nuestra hipótesis.

Las variaciones observadas podrían deberse a que el semen procesado no se congelaba el mismo día de su obtención, sino que éste, después de su dilución con glicerol era refrigerado hasta alcanzar los +5°C, manteniéndose así hasta el siguiente día para posteriormente congelarlo; las diferencias entre edades y razas de los cerdos.

La finalidad práctica de este trabajo es mejorar la calidad de los espermatozoides congelados de cerdo y en consecuencia mejorar la fertilidad de las cerdas sometidas a programas de inseminación artificial. Este trabajo podría tener un impacto favorable en la reducción de tiempo y costos para el enfriado de semen,

acelerando el proceso para la congelación y almacenaje, evitando la mayor manipulación posible.

IX.CONCLUSIONES

Se determinó que el punto de congelación de espermatozoides de cerdo en un medio de congelación BF5, puede observarse en un rango que va de los -5° a los -11.2°C .

El efecto del enfriado lento sin formación de hielo, por debajo de los -5°C y su posterior recalentamiento a 38°C disminuye la motilidad progresiva, la viabilidad espermática y la integridad acrosomal.

La utilización de diferentes protocolos de enfriado lento por arriba de los -5°C previo a la congelación, mostró que esta temperatura límite es la adecuada para obtener mejores resultados de criosupervivencia.

Perspectivas

Se sugiere continuar esta línea de investigación empleando inseminación artificial. Así se podrá evaluar la fertilidad y prolificidad de los espermatozoides sometidos al proceso de crioconservación bajo este protocolo experimental utilizando dichas temperaturas de enfriado y a un congelado de -5°C ; además es necesario identificar a los machos con buena viabilidad e integridad acrosomal, antes y después del proceso de crioconservación y hacer inseminaciones para ver la fertilidad y el número de lechones por camada que proporciona un semen crioconservado.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey J, Lessard C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino- Hommer H. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70, 1251-1259.
2. Baishya SK, Biswas RK, Kardivel G.,Deka BC, Kumar S, Sinha S., Dutta DJ, Saika GK. (2014). Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 149, 231 – 237.
3. Barandalla SM, Carro ES, Murias-Torrecillas L. (2012-2013). Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción. Universidad de Oviedo, España.
4. Bonet S, Martinez E, Rodríguez JE, Barrera J. (2006). *Biología de la Reproducción Porcina. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. España.
5. Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. (2013). *Boar Reproduction Fundamentals and new Biotechnological Trends*. Berlin. pp 472 – 475.
6. Butler W.J, Roberts TK. (1975). Effects of some Phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following could shock or slow cooling. *J. Reprod. Fert.* 43, 183-187.
7. Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez – Martínez H. (1991). Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau of boar semen frozen in mini- and maxi – straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32, 455-461.

8. Chen Y, Foote RH. (1993). Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Animal reproduction Science* 35, 131-143.
9. Divireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Bischof JC. (1999). Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biology of Reproduction* 61,764-775.
10. England GCW, Ponzio P. (1995). Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Unit of Obstetrics. Department of Farm Animal and Equine Medicine Surgery. University of London, England.
11. Fiser PS, Fairfull RW. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 m. straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25,123-129
12. Flesch FM, Gadella BM. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 197- 235.
13. Flores HF. (2005). Efecto del enfriado lento hasta -5° C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Maestría. FES- Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Flores JA. (1988). *Ganado Porcino 1 y 2 Cría, Explotación, Enfermedades e industrialización*; Ediciones Ciencia y Técnica S.A. Editorial Limusa S.A de C.V. México D. F. pp 28 - 31, 407 - 421.

15. Gao D. y Critser JK. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *Cryobiology of Embryos, Germ Cells, and Ovaries*. Volume 41 (4).
16. Garzón C. (2008). Desarrollo y validación de una prueba de estrés osmótico precongelación para predecir la criosupervivencia de semen de cerdo. Tesis de Maestría. FES- Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México.
17. Gerrits R, Lunney JK, Johnson L, Pursel VG, Kraeling P. (2005). Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology* 63, 283 – 299.
18. González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC, Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal SY, Cardenas S. (2006). Capítulo 2, Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino. Universidad de Girona, España. pp 19-35.
19. Harrison RAP, Dott HM, Foster GC. (1978), Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and surface of mammalian spermatozoa In a simple medium. *J. Reprod. Fert* 52, 65-73.
20. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62, 143-172.
21. Maxwell WMC, Johnson LA. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209-219.
22. Medrano A, Watson PF, Holt WV. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm Cryopreservation: insights from the cryomicroscope *Reproduction* 123, 315-322.

23. Medrano A. (1998). The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Ph. D. thesis. University of London.
24. Medrano A., Watson Paul F., Holt V. William (2012). Investigation of pig sperm plasma membrane reorganization using progesterone- albumin- fluorescein probes. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 1, 27-33.
25. Meyers SA. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science* 89, 57-64.
26. Noiles EE, Bailey JL, Storey BT. (1995). Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm show a discontinuity between 4° and 0°C. *Cryobiology* 32, 220-238.
27. Polge C, Salamon S, Wilmut I. (1970). Fertilizing capacity of frozen semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87, 424-428.
28. Pursel VG, Johnson LA. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Ani. Sci.* 40, 99-102.
29. Pursel VG, Johnson LA, Shuman LL. (1973). Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Ani. Sci.* 37, 532-535.
30. Roche JL, Ubeda R, Ausejo YD. (2014). Magapor. Inseminación Artificial Porcina 1ª parte, Porcicultura.com
31. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios Base (2009- 2018). Proyecto del sector Agropecuario.

32. Watson PF, Duncan AE. (1988). Effect of salt Concentration and Unfrozen Water Fraction on the Viability of Slowly Frozen Ram Spermatozoa. *Cryobiology* 25, 131-142.
33. Watson PF. (1995). Recent Developments and Concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the Assessment of their Post-Thawing Function. *Reprod Fertil Dev.* 7, 871-891.
34. Weber H. (1989). Influence of dilution media, incubation and cooling rate on cold-shock sensitivity of boar spermatozoa. Thesis, School of Veterinary Medicine, Hannover, 103 pp.
35. Woods EJ, James DB, Yuksel A, Critser JK. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 146-156.
36. Yoshida M. (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Ani. Repro. Sci.* 60-61, 349-355.