

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



COMPARACIÓN DE DILUYENTES PARA LA
CRIPRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN EL ÁREA DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS Y VETERINARIAS

PRESENTA
MVZ. JOSÉ ALFREDO BENÍTEZ MEZA

TUTOR
MC. RAÚL NAVARRETE MÉNDEZ

ASESORES
Dr. CLEMENTE LEMUS FLORES
MC. JUAN ANTONIO HERNÁNDEZ BALLESTEROS
Dra. MARÍA GUADALUPE OROZCO BENÍTEZ

Xalisco, Nayarit, Junio de 2009

DR. DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO-AGROPECUARIAS
(CBAP).
P R E S E N T E.

Asunto: Liberación de la Tesis del
C. MVZ José Alfredo Benítez Meza

Los suscritos, integrantes del Consejo Tutorial del C. MVZ José Alfredo Benítez Meza, declaramos que hemos revisado en forma y contenido la tesis "Comparación de diluyentes para la criopreservación de semen porcino" y en nuestra opinión, cumple el requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.

CONSEJO TUTORIAL

TUTOR


MC. RAÚL NAVARRETE MÉNDEZ

ASESOR


DR. CLEMENTE LEMUS FLORES

ASESOR


MC. JUAN ANTONIO HERNÁNDEZ BALLESTEROS

ASESOR


DRA. MARÍA GUADALUPE OROZCO BENÍTEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Xalisco, Nayarit, Junio de 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/064/09

Xalisco, Nayarit, a 04 de junio de 2009

C. ING.-ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN DE ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 02 de junio del presente año, enviado por los CC. MC. Raúl Navarrete Méndez, Dr. Clemente Lemus Flores, MC. Juan Antonio Hernández Ballesteros, Dra. María Guadalupe Orozco Benitez, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza que el **C. José Alfredo Benitez Meza**, continúe con los trámites necesarios para que se autorize la presentación del examen de grado de Maestría en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR LO NUESTRO A LO UNIVERSITARIO"



DR. J. DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

C.c.p.-Minutario.

C.c.p.-Expediente.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino evaluando su calidad espermática y termorresistencia. Se evaluó la motilidad, espermatozoides vivos/muertos, espermatozoides normales/anormales e integridad acrosomal en el semen fresco y descongelado. Para determinar la termorresistencia se evaluó la motilidad del semen congelado en los diferentes diluyentes. El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit. La extracción del semen se realizó de un semental Pietrain-Yorkshire de 2.5 años de edad, la frecuencia de ordeña del semental fue semanal, las extracciones se realizaron durante los meses de marzo a diciembre de 2007. Para el congelamiento del semen, se emplearon cuatro tratamientos (diluyentes) (T1: Thilmant, T2: Westendorf modificado, T3: Trealosa con glicerol y T4: Trealosa sin glicerol), cada uno se subdividió en dos fracciones; A (diluyente de refrigeración) y B (diluyente de congelación). El semen fue envasado en pajillas de 0.5mL. Después de 15 días de su congelación, el semen fue descongelado en un baño María a una temperatura de 56°C durante 12 segundos. Se evaluaron 10 eyaculados del mismo semental, evaluándose 10 pajillas de cada eyaculado en cada tratamiento, quedando distribuidas bajo un diseño en bloques al azar, considerando a cada eyaculado como bloque anidado en cada tratamiento. Para las variables de calidad espermática se realizó análisis de varianza bajo un modelo de bloques anidados en cada tratamiento. Para evaluar la termorresistencia, se realizó análisis de varianza por separado en cada tiempo, comparando los tratamientos para establecer diferencias estadísticas por medio de la prueba de Tukey, bajo un modelo simple. Al comparar los valores globales del semen fresco con los del semen descongelado, se halló diferencia significativa ($P < 0.01$) para las variables motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro, para espermatozoides normales no se encontró diferencia. Para las variables motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro en el semen descongelado se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) entre los cuatro tratamientos, presentándose los valores más altos en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, y el valor más bajo se obtuvo en el diluyente

Trealosa sin glicerol. Para la variable espermatozoides normales no se encontró diferencia estadística. En la prueba de resistencia térmica del semen congelado/descongelado con los diferentes diluyentes, se observó que los mejores resultados de motilidad se dieron en los tiempos 15, 30 y 45 minutos, decayendo gradualmente del minuto 60 al 120. Para motilidad en la prueba de termorresistencia se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos, los resultados más altos se presentaron en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol en cada uno de los tiempos considerados, no encontrándose diferencias entre estos tres tratamientos. Mientras que el resultado más bajo se obtuvo en el diluyente Trealosa sin glicerol. En conclusión, si se afecta la calidad espermática y la sobrevivencia del semen porcino criopreservado en diluyentes que difieren en su composición. Se observó que los diluyentes que contienen glicerol (crioprotector permeable) presentan los mejores valores de calidad espermática, por lo que se recomienda el uso de estos diluyentes para la criopreservación de semen porcino.

SUMMARY

The aim of the present study was to compare different extenders for boar semen cryopreservation. The sperm quality and its thermo-resistance were also evaluated. The motility and relation of dead/alive spermatozoa and acrosomal integrity were studied in fresh and thawed semen samples. To determine the sperm thermal resistance, the motility was evaluated in frozen semen with different extenders. The research was carried out at the biotechnology laboratory of the Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, at the Nayarit Autonomous University in Mexico. Semen was obtained from a crossbred Pietrain-Yorkshire two and a half year old boar. Weekly sperm samples were collected from March to December. In order to freeze the semen, 4 treatments with different extenders were used: T1 (Thilmant), T2 (modified Westendorf), T3 (Trehalose with glycerol) and T4 (Trehalose without glycerol); each treatment was divided into two fractions: A (cool extender) and B (freeze extender). The sperm was thawed in a 56°C water bath for 12 seconds after being frozen for 15 days; ten ejaculates from the same boar were evaluated and 10 straws per ejaculate for each treatment were distributed under a randomized block model, considering each ejaculation as a nested block model for each treatment. The nested block model and an ANOVA analysis were carried out to compare sperm quality traits among treatments. Thermo-resistance was separately analyzed for each time period, comparing treatments through a Tukey test with a simple model. A significant difference ($P<0.01$) was observed between fresh and thawed global values for sperm motility, alive spermatozoa and alive spermatozoa with acrosomal integrity. However, for normal spermatozoa no difference was observed. The analyses among treatments showed significant differences ($P<0.01$) for motility, alive spermatozoa and alive spermatozoa with acrosomal integrity in the thawed sperm, the highest values were for treatments 1, 2 and 3. For the normal spermatozoa no significant differences were observed among thawed processed treatments. On the thermal resistance test on frozen-thawed semen with different extenders, the best results on motility were found at 15, 30 and 45 minutes, gradually decreasing from 60 to 120 minutes. Whereas for the same test comparisons among treatments showed a significant difference ($P<0.01$), higher values for motility in Thilmant, modified Westendorf and Trehalose without glycerol extenders were obtained. In conclusion, the sperm quality and survival of

cryopreserved semen with different composition extenders are affected. Glycerol based extenders (permeable cryoprotector) showed the best sperm quality values, thus the use of these extenders is recommended for swine semen cryopreservation.

DEDICATORIAS

A LAS INSTITUCIONES

**Universidad Autónoma de Nayarit
Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias**

A MIS PADRES

Antonio Benítez Hernández y Alicia Meza García

A MIS HERMANOS

**Luis Antonio
Santiago Alonso
Edgar Eduardo
Saúl Alberto
Jesús Noe
María del Rosario**

A MI ESPOSA E HIJA

**Alma Leticia Pérez Huerta
Fátima Leticia Benítez Pérez**

A MIS FAMILIARES

**Abuelos
Tíos
Primos**

A MIS AMIGOS

**Roberto García Sandoval
Salvador Delgado Duarte
Raúl Cuevas Martínez
Edgar Augusto Durán**

**A todos y cada uno de ellos, les dedico esta
tesis con todo respeto y admiración**

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida, salud y permitir que se cumpliera una etapa más de mi vida profesional.

A mis padres, **Antonio Benítez Hernández** y **Alicia Meza García** por todo lo que han hecho por mí durante mis 27 años de vida.

De una manera especial quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi tutor el **MC. Raúl Navarrete Méndez**, por la confianza brindada y por su apoyo incondicional en todo momento, también por brindarme su amistad, la cual valoro mucho.

A mis asesores, el **Dr. Clemente Lemus Flores**, el **MC. Juan Antonio Hernández Ballesteros** y la **Dra. María Guadalupe Orozco Benítez**, por la ayuda, confianza, amistad y asesoramiento constante en los diferentes aspectos inherentes a la tesis de maestría.

A mis compañeros de trabajo, el **MC. Agapito Gómez**, **MC. Venancio Orozco**, **CP. Bertha Cruz**, **MVZ. Armando Aguilar**, y **MVZ. Pompilio Arteaga** por su valiosa amistad, por sus consejos y por la motivación que me brindaron durante este proyecto de tesis.

A todos mis maestros del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, por transmitimos de manera incondicional sus experiencias y conocimientos, los cuales fueron fundamentales para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

Al **MVZ. Álvaro Tello Rodríguez**, por su valiosa cooperación en la donación de las muestras seminales de su semental porcino "EL PINTO", que fueron de suma importancia para la realización de esta tesis.

Al **COCYTEN** por el apoyo económico otorgado para la impresión y empastado de esta tesis.



CONTENIDO

SISTEMA DE BIBLIOTECAS

RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	vi
DEDICATORIAS.....	viii
AGRADECIMIENTO.....	ix
CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivo general.....	3
1.3. Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Historia de la congelación de semen.....	4
2.2. Efectos de la criopreservación sobre los espermatozoides de cerdo.....	5
2.3. Métodos de conservación y descongelación de semen porcino.....	7
2.3.1. Envases.....	9
2.3.2. Medios de descongelación.....	10
2.3.3. Velocidad de descongelación.....	10
2.4. Función de los diluyentes en la preservación de semen porcino.....	11
2.5. Efecto de los azúcares en la criopreservación de semen.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Macrolocalización.....	21
3.2. Microlocalización.....	23
3.3. Extracción del semen.....	24
3.4. Evaluación del semen.....	24
3.4.1. Evaluación macroscópica.....	24
3.4.1.1. Volumen.....	25
3.4.1.2. Color.....	25
3.4.1.3. Temperatura.....	25
3.4.1.4. pH.....	25
3.4.2. Evaluación microscópica.....	26
3.4.2.1. Motilidad.....	26
3.4.2.2. Concentración.....	26
3.4.2.3. Morfología.....	26
3.4.2.4. Relación de espermatozoides vivos/muertos.....	27
3.4.2.5. Evaluación de la integridad acrosomal.....	27
3.5. Diluyentes empleados para la congelación de semen.....	29
3.5.1. Preparación de los diluyentes.....	29
3.5.1.1. Diluyente de Westendorf modificado.....	29
3.5.1.2. Diluyente de Thilmant.....	29
3.5.1.3. Diluyente de Trealosa con glicerol.....	30
3.5.1.4. Diluyente de Trealosa sin glicerol.....	30

3.6.	Procedimiento para la congelación de semen con los diferentes diluyentes utilizados.....	31
3.7.	Centrifugación del semen, diluyente y curva de enfriamiento.....	32
3.8.	Esquema del procesamiento de semen para ser congelado.....	34
3.9.	Descongelación del semen.....	35
3.10.	Diseño Experimental.....	35
3.11.	Análisis Estadístico.....	36
3.12.	VARIABLES A MEDIR.....	37
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1.	Calidad espermática del semen porcino criopreservado con diferentes diluyentes evaluándose la motilidad, relación de espermatozoides vivos/muertos, normales/anormales e integridad acrosomal.....	38
4.1.1.	Motilidad antes de la congelación espermática.....	38
4.1.2.	Espermatozoides vivos antes de la congelación.....	39
4.1.3.	Espermatozoides normales antes de la congelación.....	40
4.1.4.	Integridad acrosomal antes de la congelación.....	40
4.1.5.	Motilidad después de la congelación/descongelación.....	41
4.1.6.	Espermatozoides vivos después de la congelación/descongelación.....	43
4.1.7.	Espermatozoides normales después de la congelación /descongelación.....	45
4.1.8.	Integridad acrosomal después de la congelación/descongelación...	46
4.1.9.	Concentración de resultados.....	47
4.2.	Coefficiente de correlación entre las variables analizadas en cada uno de los tratamientos.....	49
4.3.	Evaluación de la termorresistencia con base a la motilidad del semen congelado-descongelado en los diferentes diluyentes.....	52
V.	CONCLUSIONES.....	56
VI.	LITERATURA CITADA.....	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Distribución de cada uno de los eyaculados en cada tratamiento.....	36
Cuadro 2.	Valores globales para las variables evaluadas en el semen fresco.....	38
Cuadro 3.	Valores globales para las variables evaluadas en el semen descongelado.....	41
Cuadro 4.	Diferencia de medias globales para las diferentes variables evaluadas entre el semen fresco y el semen descongelado.....	42
Cuadro 5.	Comparación de medias para la variable motilidad espermática entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación...	42
Cuadro 6.	Comparación de medias para la variable espermatozoides vivos entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado y entre tratamientos empleados para la criopreservación.....	43
Cuadro 7.	Comparación de medias para la variable espermatozoides normales entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.....	45
Cuadro 8.	Comparación de medias para la variable espermatozoides vivos con acrosoma integro entre el semen fresco y el semen congelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.....	46
Cuadro 9.	Medias generales para las variables motilidad, vivos, normales y vivos con acrosoma integro evaluadas en el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes.....	48
Cuadro 10.	Correlaciones entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Thilmant.....	50
Cuadro 11.	Correlaciones entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Westendorf modificado.....	50
Cuadro 12.	Correlación entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Trealosa con glicerol.....	51
Cuadro 13.	Correlación entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Trealosa sin glicerol.....	51
Cuadro 14.	Medias y desviaciones estándar para la termorresistencia evaluada en el semen descongelado con los diferentes diluyentes en nueve tiempos (de uno a 120 minutos, con intervalo de 15 minutos).....	53
Cuadro 15.	Ecuaciones de predicción de la motilidad de acuerdo al tiempo.	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Localización geográfica del Estado de Nayarit.....	21
Figura 2.	Localización geográfica del Municipio de Compostela.....	22
Figura 3.	Localización geográfica de la UAMVZ-UAN tomada a 2000 pies de altura.....	23
Figura 4.	Localización geográfica de la UAMVZ-UAN tomada a 500 pies de altura.....	23
Figura 5.	Diferencias porcentuales entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado en cada diluyente para cada una de las variables.....	48
Figura 6.	Medias para la termorresistencia evaluada en el semen descongelado con los diferentes diluyentes en nueve tiempos (de uno a 120 minutos, con intervalo de 15 entre una y otra).....	53

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación espermática es una técnica que se ha desarrollado, sobre todo, para satisfacer dos necesidades fundamentales. En primer lugar, la conservación de material genético valioso por tiempo indefinido, aplicación con la que contribuye de manera importante a la conservación de razas o especies animales en peligro de extinción. En segundo lugar, el desarrollo de la Inseminación Artificial (IA), lo que representa, quizás, su aplicación por excelencia, y en la que se le utiliza como un instrumento de mejora genética (Bwanga, 1990; Córdova *et al.*, 2000).

La conservación de material biológico mediante la congelación tiene una gran cantidad de aplicaciones en las distintas disciplinas de las Ciencias Biológicas, puesto que el material puede ser almacenado por mucho tiempo sin modificar sus características originales (Hafez, 1997).

El uso de semen congelado puede hoy en día aportar ciertas ventajas sobre el semen refrigerado, como son el transporte a largas distancias o la conservación durante un tiempo muy prolongado (años) con resultados productivos que progresivamente mejoran y se acercan a los obtenidos con semen refrigerado (Gadea, 2004).

El semen 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. Por lo que 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 la concentración espermática; sin embargo a pesar de estos esfuerzos, no ha sido posible abatir la baja 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).

Entre los factores que se consideran hoy día que afectan el semen congelado porcino, cuatro de ellos son estimados como de mayor importancia por la Meat & Livestock Commission (1985) a través de una encuesta internacional: bajos niveles de fertilidad en comparación con el semen fresco; variaciones en la calidad del congelamiento entre los machos; procesos demasiado caros; y uso de altas concentraciones espermáticas por dosis (Wevar *et al.*, 1997).

Los estudios actuales para mejorar los resultados con semen congelado tienen como objetivo optimizar los procesos de congelación de los espermatozoides y garantizar el número suficiente de estos con capacidad fecundante al momento de la ovulación. Aunque los estudios y modificaciones más recientes en la técnica y aplicación de semen congelado han mejorado significativamente los resultados de fertilidad y prolificidad, las investigaciones deben continuar con el fin de minimizar los daños de la congelación sobre la célula espermática, así como encontrar nuevos métodos para valorar la viabilidad y capacidad fecundante del semen descongelado (Pallas y De Alba, 2003).

En el presente trabajo, se pretende obtener un diluyente para la criopreservación de semen porcino, que proporcione un efecto benéfico en la calidad espermática después del proceso de congelación/descongelación. En la actualidad, no existen diluyentes, técnicas estandarizadas o un protocolo específico para congelar semen porcino, ya que algunos investigadores reportan ciertas ventajas de unas técnicas o diluyentes respecto a otros, razón por la que se pretende estandarizar, adoptar una técnica y un diluyente para la congelación/descongelación de semen de verracos, para emplearla en programas de mejoramiento genético en el estado de Nayarit. Por último, para el caso de criopreservación del semen porcino, existe poca información sobre la utilización de azúcar trealosa en el diluyente de semen porcino, mientras que en otras especies, como los rumiantes y caninos se han reportado resultados positivos con la utilización de dicho azúcar.

1.1. Hipótesis

Al haber diferencias en la composición de los diluyentes para la criopreservación de semen porcino, se afecta la calidad espermática y su sobrevivencia.

1.2. Objetivo general

Comparar diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino evaluando su calidad espermática y termorresistencia.

1.3. Objetivos específicos

- 1.3.1. Comparar la calidad espermática del semen porcino criopreservado con diferentes diluyentes evaluando la motilidad, relación de espermatozoides vivos/muertos y normales/anormales e integridad acrosomal.
- 1.3.2. Determinar el coeficiente de correlación entre las variables analizadas en cada uno de los tratamientos.
- 1.3.3. Evaluar la termorresistencia con base a la motilidad del semen congelado-descongelado en los diferentes diluyentes.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Historia de la congelación de semen

El primer reporte de criopreservación de semen, fue realizado por Spallanzani en el año de 1776, quien observó que cuando los espermatozoides de humano, gafañon y rana eran enfriados en nieve por hasta 30 minutos se volvían inactivos pero podían ser reactivados; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. Un siglo después, Mantegazza (1866), observó que el espermatozoide de humano sobrevivió en semen congelado a -17°C , éste fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamífero después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación (citado por Bwanga, 1991).

La primera vez que se realizó con éxito la congelación de material seminal fue en 1949 cuando Polge *et al.*, demostraron el poder crioprotector del glicerol. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución con este agente crioprotector. El gran descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol abrió una era exitosa en la criopreservación no solo de gametos de varias especies, sino también de otras células y tejidos. Los reportes de fertilidad con espermatozoides congelados de toro condujeron a un intenso desarrollo en la siguiente década de métodos de criopreservación que pudieran ser aplicados en programas de inseminación. Stewart (1951) guió un intenso desarrollo de métodos de criopreservación que pudieran ser aplicables para los propósitos en práctica de inseminación. Además los esfuerzos de investigación aspiraban al desarrollo de un método de congelación de semen porcino. Las pruebas de fertilidad fueron llevadas a cabo con espermatozoides congelados-descongelados de cerdo, pero con resultados desalentadores. Sin embargo, fueron obtenidas esporádicas preñeces, aunque por regla general la fertilidad fue muy baja. La viabilidad del espermatozoide congelado-descongelado de cerdo fue reportada por Polge (1956), Hoffman (1959), Hess *et al.*, (1960), Dukelow y Graham (1962), Barder (1964) y

Bamba (1968). (Becerril, 1985; Bwanga, 1991; Abeydeera y Day, 1997; Candy *et al.*, 1997).

En la especie porcina la aplicación inicial de las técnicas de congelación espermática no proporcionó el éxito esperado, y no es hasta 20 años después, en 1970 en Cambridge, cuando se obtienen las primeras camadas a partir de semen congelado mediante el depósito del mismo a nivel uterino mediante una intervención quirúrgica (laparotomía) (Polge *et al.*, 1970). En estos trabajos está implicado el mismo Polge, junto con Salomón e Ian Wilmut (que posteriormente se haría mundialmente famoso como creador de la oveja clónica, Dolly). Un año después, en diferentes laboratorios se obtienen las primeras camadas con inseminación cervical mediante el uso de catéteres de inseminación. Durante la década de los 90's se mejoraron las condiciones del proceso de congelación con el estudio de nuevos envases, curvas de congelación y descongelación. En esta misma década se realizaron importantes estudios sobre las bases de crioconservación y las particularidades del proceso en la especie porcina, donde destacan los trabajos de los británicos Watson y Holt (Citado por Gadea, 2004).

Sin embargo, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la fertilidad del semen congelado en IA, obteniéndose resultados a nivel comercial muy prometedores (Thilmant 1998; Gadea *et al.*, 2001; Ericksson *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2002; Sellés *et al.*, 2003); quienes han reportado tasas de pariciones por encima del 70% y en otros estudios, incluso por encima del 80% (De Mirjyn, 1997).

2.2. Efectos de la criopreservación sobre los espermatozoides de cerdo

La viabilidad de los espermatozoides congelados de cerdo es mas baja en comparación con los espermatozoides de toro, borrego y macho cabrío; probablemente por la considerable sensibilidad de los espermatozoides de cerdo al choque por frío (Bwanga, 1990).

Sin embargo, aún a pesar de que la alta sensibilidad de los espermatozoides del cerdo al enfriamiento representa un problema científico y práctico a resolver, como limitante del uso de la técnica, se han obtenido recientemente rendimientos reproductivos excelentes para el semen congelado, siguiendo un esquema convencional de IA y sin necesidad de recurrir a condiciones de campo extraordinarias (70-80% de fertilidad; 10 lechones/camada de prolificidad) (Gadea *et al.*, 1998).

La explicación a esta especial sensibilidad del espermatozoide porcino en comparación a la de otras especies está en la respuesta de la membrana plasmática, esto a consecuencia de su composición lipídica (alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y poca presencia de colesterol). Con el enfriamiento los fosfolípidos y glucolípidos de la membrana celular se van gelificando a diferente ritmo quedando excluidas las proteínas integrales de la membrana en lo que se denomina separación lateral de fases. Esto provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana y alteraciones de los sistemas de transporte de iones y moléculas. El resultado de estos fenómenos es diferente según las velocidades de enfriamiento y descongelación a las que se sometan las células (Bwanga, 1991; Castañeda *et al.*, 1996; Sáiz, 2003).

Si la velocidad de congelación es muy rápida, se producen cristales de hielo intracelulares que provocan serias lesiones e incluso la muerte celular. Si por el contrario, la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la formación de cristales de hielo empieza en el exterior celular produciendo la salida de agua del interior de la célula en un intento de compensar el aumento de pH y de la osmolaridad en el medio extracelular. Esta deshidratación celular también provoca daño y niveles bajos de supervivencia celular. Existe pues, una velocidad óptima de enfriamiento con la que los daños celulares se minimizan. Ocurre lo mismo para el caso de la temperatura de descongelación, la cuál depende también del envase y método de congelación utilizado (Martín *et al.*, 1996; Echegaray, 2000; Sáiz, 2003).

Las repercusiones de la crioconservación en el espermatozoide son: rotura y/o alteraciones de la membrana plasmática y acrosoma, liberación de un alto porcentaje

de enzimas, aumento intracelular de iones (Ca y Na), salida de iones intracelulares (Mg y K), disminución de la producción de ATP, alteraciones del citoesqueleto y supercondensación de la cromatina nuclear (Leeuw *et al.*, 1991; Córdova, 1994; De Sáiz, 2003).

El conjunto de todos estos cambios supone la supervivencia de un 50 – 60% de la población original de espermatozoides congelados-descongelados, los cuales se verán más o menos afectados en: pérdida de motilidad, a consecuencia de los fallos en los mecanismos de transporte activo y permeabilidad de la membrana y la disminución del número de moléculas de ATP disponibles; capacitación espermática, como consecuencia de todos los procesos descritos y que supone una capacidad fecundante mas limitada en el tiempo; y, daños en la cromatina nuclear, con los consiguientes trastornos del desarrollo y viabilidad embrionaria. Los espermatozoides congelados tienen una capacidad de supervivencia en el tracto genital de la cerda de tan solo cuatro horas, por lo que al momento de la inseminación y de la ovulación deben de ir altamente sincronizados (Castañeda *et al.*, 1996; Petzoldt, 1996; Echegaray, 2000; Sáiz, 2003).

2.3. Métodos de conservación y descongelación de semen porcino

La conservación del semen porcino puede realizarse de tres 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 dos o tres horas próximas. El semen refrigerado, es el que se conserva por periodos de dos a siete 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; además el descenso de la 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 más utilizada en todo el mundo, tanto por los pequeños y grandes productores, ya que han encontrado en este procedimiento una mayor confiabilidad y eficiencia para realizar la transferencia genética (Johnson *et al.*, 2000).

Si bien se han descrito varios métodos para la congelación de semen de verraco, sólo dos se han utilizado y se siguen utilizando (con modificaciones) a nivel "comercial";

1. "Método Beltsville" de congelación en pastillas (Pursel y Johnson, 1975).
2. "Método Hülseberg" de congelación en pajillas (Westendorf *et al.*, 1975).

Ambas técnicas se han diseñado para minimizar las consecuencias negativas derivadas del proceso de congelación y aumentar la resistencia del espermatozoide. Así en ambas técnicas se realiza una etapa previa de enfriamiento y estabilización y otra posterior de congelación propiamente dicha (Bwanga, 1991; Sáiz, 2003).

La etapa de enfriamiento (hasta que el semen alcance los 5°C) se realiza en tres fases, en la primera se procede a una fase de equilibrio a temperatura ambiente, en la segunda fase, se baja la temperatura a 15°C y se mantiene por determinado tiempo, a esta temperatura y tiempo se ha demostrado que el espermatozoide va adquiriendo resistencia frente al enfriamiento. La duración de este periodo es diferente según los protocolos. Una vez efectuada esta fase se pasa a eliminar el plasma seminal mediante centrifugación a fin de reducir el volumen a congelar y minimizar el efecto negativo del descenso térmico. La fuerza y el tiempo de centrifugación afectan la calidad seminal, de manera que se ha comprobado que una mayor velocidad durante menor tiempo mejora los resultados. Tras este paso, prosigue la tercera fase que consiste en resuspender el sedimento (espermatozoides) obtenido de la centrifugación en un primer medio con crioprotectores para descender la temperatura hasta 5°C, tras lo que se le agrega glicerol en cantidades menores al 3%, ya que se ha

demostrado que cantidades mayores puede ocasionar daños en el acrosoma del espermatozoide (Sáiz, 2003).

La composición de los medios crioprotectores de dilución es diferente según el protocolo de congelación utilizado; finalmente se envasa y se congela. La velocidad de congelación varía, asimismo según el envase y el método empleado. Los mejores resultados se han obtenido con descensos de temperatura de entre 10 y 80°C por minuto (Córdova, 1994; Sáiz, 2003).

2.3.1. Envases

Son varios los tipos de envases para congelación que se utilizan en la actualidad y cada uno presenta ventajas e inconvenientes:

Pildoras: la relación volumen/superficie facilita una mejor distribución de la temperatura pero su limitado volumen y concentración supone la utilización de un número considerable de ellas para reconstituir una dosis con un número suficiente de espermatozoides para poder ser utilizados en una IA.

Maxi-pajillas: sólo se necesitan una o dos de ellas para reconstituir una dosis normal, pero su diseño geométrico no facilita la transmisión de la temperatura y ello supone que las zonas periféricas del envase se ven sometidas a un tiempo más prolongado de exposición a temperaturas extremas de congelación y descongelación.

Mini-pajillas: buena transmisión de la temperatura del exterior al interior pero su pequeño volumen dificulta la reconstitución de una dosis entera para su uso en IA.

Bolsas planas: contienen una dosis entera y su geometría facilita la rápida y homogénea congelación y descongelación. Presenta dificultades para su almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido (Cordova, 1994; Toretta *et al.*, 1996; Sáiz, 2003).

2.3.2. Medios de descongelación

En el proceso de criopreservación de semen de verraco, la descongelación parece ser el paso más crítico para los espermatozoides. En estudios que se han realizado, se menciona que es mejor descongelar directamente en una solución que en un recipiente seco, por lo tanto se han propuesto algunas soluciones, las cuales se han clasificado en dos categorías:

- 1) En la primera categoría se encuentran las soluciones descongelantes con proteínas, entre las que se encuentra el plasma seminal, su eficacia ha sido contradictoria, por lo que su utilización ha sido desechada.
- 2) La segunda categoría esta compuesta por las soluciones descongelantes salinas, las principales que se conocen son: solución descongelante BTS (Beltsville Thawing Solution), OLEP (plasma seminal porcino sintético), INRA-ITP y el medio Hülsenberg, las tres primeras son isotónicas, sin embargo los mejores resultados se obtienen en condiciones hipertónicas. Estas soluciones difieren de los diluyentes para la congelación por su contenido de numerosos electrolitos (Paquignon, 1985; Sztejn *et al.*, 1997).

La presión osmótica de estas soluciones debe estar entre 330 y 450 mOsm/kg. Las soluciones INRA-ITP y BTS pueden utilizarse con alguna diferencia cuando se valorà la motilidad o el número de óvulos fecundados, sin embargo, al valorar la supervivencia espermática durante la incubación, tasa de gestación y supervivencia de embriones, la solución descongelante mas adecuada es la INRA-ITP (Paquignon, 1985).

2.3.3. Velocidad de descongelación

El semen congelado de verraco debe ser descongelado y diluido antes de que sea utilizado con fines experimentales y/o para realizar la IA. La velocidad de

descongelación es tan importante tanto como la de enfriamiento y congelación para la supervivencia de los espermatozoides, de tal manera que la curva y el tiempo de calentamiento durante la descongelación son factores que afectan la supervivencia espermática (Mazur, 1985; Fiser, 1991).

Al respecto se han investigado diferentes temperaturas y tiempos de descongelación que oscilan entre 0 a 80°C durante 10 segundos a un minuto. Los mejores resultados que se han obtenido de motilidad espermática después de la descongelación son a una temperatura de 52°C durante 40 segundos, para semen congelado en pajillas plásticas de 0.5mL (Pursel y Park, 1985). Pocos estudios han comparado la eficacia de las soluciones descongelantes. Aunque en 1976, Pursel y Johnson compararon el medio Hülsenberg, el plasma seminal, la leche desnatada y el BTS; encontrando que el BTS ofreció mejores resultados en cuanto al número de acrosomas normales y a la motilidad espermática. Sin embargo, existen estudios que demuestran que la solución descongelante INRA-ITP es mejor que el BTS en términos de la supervivencia de los espermatozoides durante la incubación, tasa de preñez y viabilidad embrionaria (Paquignon, 1985).

2.4. Función de los diluyentes en la preservación de semen porcino

Para llevar a cabo su misión, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (azúcares), la protección frente al shock térmico por frío [BSA (albúmina sérica bovina)], controlar el pH del medio [Bicarbonato, TRIS (hidroximetil metil amina), HEPES (ácido 4-{2- hidroxietil}-1-piperazina etanosulfónico)], la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos) (Gadea *et al.*, 2003).

Nutrientes: El espermatozoide tiene capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar el movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más

frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque se han usado otros como la galactosa, fructosa, ribosa o trealosa, sin que los resultados hayan superado a la glucosa (Gadea *et al.*, 2003).

Azúcares: Los azúcares más comunes que se agregan a los diluyentes, son la fructuosa y la glucosa, siendo generalmente esta última la más utilizada. La inclusión de azúcares en los diluyentes para semen puede desempeñar diferentes funciones. Se emplean como fuente de energía, ya que las células espermáticas la requieren para su motilidad y conservación y aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger sus reservas intracelulares. Además, contribuyen a la osmolaridad del diluyente, ejerciendo una fuerza osmótica sobre la membrana celular del esperma, dependiendo de su permeabilidad (Watson, 1990). Otro azúcar usado es la trealosa, un disacárido que está presente en la naturaleza en altas concentraciones en algunos organismos poiquilotermos, tolerantes al frío (nemátodos que habitan el suelo y levaduras). Por lo tanto, la trealosa puede jugar un papel importante como protector de los espermatozoides contra el frío (Rudolph y Crowe, 1985; citados por Revell y Glossop, 1989).

Regulación del pH: El pH del semen recién eyaculado se encuentra próximo a 7.4 ± 0.2 , al igual que otros fluidos orgánicos, y cuando se reduce este pH al mismo tiempo se reduce el metabolismo energético del espermatozoide y su motilidad. El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (carbohidrato principal es glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como índice de calidad seminal (Rigau *et al.*, 1996).

La adición de agentes tamponadores ayudan, por tanto, a controlar el pH del medio. Entre los tamponadores más simples se encuentran el bicarbonato y el citrato (sódico) que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros tamponadores más complejos [TES (ácido 2[[tris (hidroximetil) metil] amina] etanosulfónico), HEPES, MOPS (ácido 3- [N- morpholino] propanosulfónico), TRIS] pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la

temperatura (MOPS y HEPES). El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2, pero se debe de considerar que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60-90 minutos del inicio de la dilución en agua y que los distintos diluyentes presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo. Por lo que se han de tomar las medidas oportunas en el proceso de preparación de los diluyentes antes de su uso, para evitar problemas en el proceso de conservación (Newth y Levis, 1999).

Presión osmótica: El espermatozoide porcino presenta una presión osmótica de 290-300mOsm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240-380mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290mOsm (Fraser *et al.*, 2001), mientras que cuando se reduce por debajo de 200mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Gilmore *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 2001).

Aminoácidos: A algunos diluyentes producidos con base en subproductos lácteos, se les ha agregado la cisteína, para obviar la necesidad de hervir la leche e inactivar un factor tóxico, la lactenina. Sin embargo este aminoácido se ha incorporado aún en ausencia de leche, sin justificación aparente. Quizá su incorporación se deba al hecho de que es un elemento abundante en las protaminas (proteínas básicas), las cuales proporcionan un grado de condensación estable de la cromatina, parámetro valioso en la maduración espermática y el desarrollo embrionario (Watson, 1995).

Agentes antimicrobianos: Debido a tantos agentes patógenos exógenos, así como a la microflora propia del divertículo prepucial, uretra y pene pueden afectar negativamente la fertilidad del semen, es necesaria la inclusión de antibióticos en los diluyentes. La flora bacteriana produce toxinas, y éstas a su vez, putrefacción de los componentes de origen biológico del diluyente. Algunos de los antibióticos más utilizados son; penicilina, estreptomycin, lincomicina, espectinomycin, gentamicina y polimixina B. También se han incluido modernos antibióticos como la amikacina y la

dibekacina, este último se ha señalado como de mayor efectividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, sin afectar la motilidad y morfología acrosomal. Recientemente se ha admitido que el ceftiofur sódico además de suprimir el crecimiento bacteriano, no posee efectos espermicidas (Gadea *et al.*, 2003).

Otros compuestos y aditivos: Muchos de los diluyentes contienen agentes protectores como el EDTA (ácido etilendiamino tetra acético). Este compuesto desempeña un papel quelante para iones-divalentes, limitando el movimiento a través de la membrana plasmática, lo cual ocurre con la dilución y el enfriamiento. El EDTA, también protege contra la enzima aminoácido-oxidasa liberada por los espermatozoides muertos. Adicionalmente se ha demostrado que puede estimular y mantener una mayor motilidad del eyaculado o de espermatozoides porcinos lavados (Watson, 1995). Otros aditivos en los diluyentes para la criopreservación de semen son el Orvus Es Paste (OEP) y/o el Equex STM, que son detergentes sintéticos.

En 1971, Graham *et al.*, utilizaron sustancias tenso activas en ensayos de criopreservación de semen porcino. Entre 78 compuestos ensayados, la adición al diluyente de un detergente comercial (OEP) demostró tener un efecto favorable sobre la integridad de los acrosomas en presencia de la yema de huevo. Poco después, este efecto favorable fue corroborado por Graham y Crabo (1972) y Pursel *et al.*, (1978), quienes observaron que su efecto sobre la motilidad espermática e integridad de acrosomas se relacionaba con la concentración de yema de huevo en el diluyente de congelación. El efecto de algunos surfactantes o tensidos sobre las membranas de las células espermáticas aparece ligado a la constitución del diluyente, particularmente a la presencia de lecitina aportada por la yema de huevo. Mann (1964), describe que Na dodecil-sulfato (SDS) componente del tensido, causa la completa inhibición de la fructolisis y abolición de la motilidad del semen ovino en concentraciones de 0.0015M (0.043% p/v). En semen porcino, Pursel *et al.*, (1978) observaron un efecto protector del OEP al 1-1.5% en diluyente Beltsville F5 (BF5) con 20% de yema de huevo (citado por Hellemann y Jara, 1997).

Yema de huevo: Un importante componente de los medios de refrigeración y congelación para la criopreservación de semen de diversas especies, incluyendo el cerdo, es la yema de huevo de ave (gallina). Las propiedades protectoras de la yema de huevo sobre los espermatozoides durante la congelación fueron descubiertas por primera vez por Phillips (1939). Posteriormente, se encontró que la yema tenía al menos dos factores activos; protege contra el daño al enfriamiento y ayuda manteniendo la viabilidad (citado por, Bathgate *et al.*, 2006).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) contenidas en la yema de huevo fueron definidas como ingredientes activos. La adición de LDLs de otras fuentes fracasó por producir la misma protección que la yema de huevo. Esto fue probablemente porque las LDLs de la yema de huevo contiene otros componentes, proteínas particularmente que trabajan en conjunto para proporcionar protección a los espermatozoides (Watson, 1981). La yema de huevo de gallina ha sido utilizada convencionalmente en medios de criopreservación de semen, probablemente por su amplia disponibilidad (Bathgate *et al.*, 2006).

Crioprotectores: Los que se conocen en la actualidad han sido divididos en dos grupos: los que penetran a la célula y los que actúan desde el exterior, o bien, permeables y no permeables. En el primer grupo, se encuentran el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), eritritol, adonitol y acetamida. En el segundo, se encuentran varios azúcares como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la lactosa y la polivinilpirrolidona; sólo los del primer grupo han sido utilizados como verdaderos crioprotectores en una gran variedad de células y tejidos. Aún cuando la concentración óptima de glicerol no ha sido establecida es de todos los crioprotectores antes mencionados el que más se ha incluido en los diluyentes para el congelamiento de semen, tanto del cerdo como de otras especies. Concentraciones entre el 2 y 6% de glicerol en el diluyente de congelación han dado buenos resultados. En la mayoría de los protocolos de congelación de semen el glicerol es añadido a 5°C, ya que cuando es adicionado a esta temperatura mejora la motilidad, integridad del acrosoma y de la membrana plasmática (Córdova, 1994).

Agua: Aunque el agua constituye el mayor elemento de un diluyente ha tenido poca consideración. Actualmente no se encuentran cabalmente delimitadas las pautas de su calidad; sin embargo se ha encontrado que al comparar el uso de diversas fuentes de ésta, el agua con un pre-tratamiento por medio de un sistema de ósmosis inversa, produjo los más altos índices de motilidad en espermatozoides de hámster (Flowers y Esbenshade, 1993).

En general, en los Estados Unidos de América, la calidad de agua se clasifica en tres clases: tipo I, que es de la más alta pureza y se obtiene por una combinación de desionización, destilación, filtración y ósmosis inversa; tipo II, es producida por doble destilación y tipo III, que se elabora por simple destilación. En un estudio realizado con diluyentes de corta duración preparados en los tres tipos de agua, mencionados anteriormente, se presentaron los promedios más altos de viabilidad y fertilidad en los tipos I y II, cuando el período de conservación fue mayor a tres días, mientras que cuando el período de preservación fue en el lapso de los tres días postcoleción, los parámetros de viabilidad y fertilidad, no se afectaron significativamente, con ninguno de los tres tipos de agua. Lo anterior puede evidenciar que cuando se va a conservar el semen por períodos prolongados (más de 72 horas), la calidad del agua resulta fundamental (Flowers y Esbenshade, 1993).

2.5. Efecto de los azúcares en la criopreservación de semen

El efecto benéfico de la suplementación del azúcar en el diluyente sobre la viabilidad de células espermáticas descongeladas de mamíferos ha sido reportado en muchos estudios (García y Graham, 1989; Aslam *et al.*, 1992). Los azúcares tienen diversas funciones en el diluyente. Ellos proveen energía para la célula espermática durante la incubación, mantienen la presión osmótica del diluyente y actúan como un crioprotector. La temperatura de almacenamiento Lapwood y Martin (1966), el peso molecular del azúcar Molinia *et al.*, (1994) y el tipo de amortiguador Abdelhakeam *et al.*, (1991) son usados en el efecto del diluyente y en la habilidad crioprotectora de los azúcares. Muchos estudios han utilizado glucosa o fructosa Farstad y Andersen (1989)

y Thomas *et al.*, (1993) en el diluyente TRIS-ácido cítrico para la congelación de espermatozoides. Sin embargo, no hay estudios que se hayan realizado para evaluar la influencia de la suplementación de otros azúcares en el diluyente TRIS-ácido cítrico (Yildiz *et al.*, 2000).

Molinia *et al.*, (1991), encontraron que los monosacáridos son más apropiados que los disacáridos para preservar la motilidad del espermatozoide congelado de carnero en el diluyente TRIS-citrato. García y Graham (1989) indicaron que los trisacáridos no son tan efectivos como los mono o disacáridos para la preservación de la motilidad de los espermatozoides descongelados de bovino. Casi todos los azúcares (excepto glucosa, lactosa y rafinosa) disminuyen los porcentajes de daños al acrosoma. Sin embargo, únicamente la xilosa y la fructosa mejoran la motilidad en la descongelación. Los disacáridos, especialmente la trealosa, sacarosa y maltosa reducen la muerte espermática y/o el porcentaje de daños al acrosoma sin promover la motilidad post descongelación, mientras que los monosacáridos (excepto la galactosa y glucosa) mejoran la motilidad junto con la viabilidad y la tasa de acrosomas intactos. Únicamente el trisacárido rafinosa no altera los parámetros espermáticos. Conforme a estos datos concluyeron que la diferencia en el mecanismo de acción entre los mono y disacáridos determina el tipo o localización del impacto protector en el espermatozoide. Así, hipotizaron que el uso combinado de mono y disacáridos en la concentración apropiada puede proveer mejor protección comparada con el mono o disacárido solo (Yildiz *et al.*, 2000).

El porcentaje total de espermatozoides activos fue calculado después de la dilución, equilibrio y descongelación, encontraron que fue significativamente diferente entre los azúcares. La trealosa, xilosa y fructosa presentaron un porcentaje más alto de espermatozoides activos totales al descongelado que otros azúcares. El efecto benéfico de xilosa y fructosa en la motilidad del semen congelado – descongelado de bovino y carnero fue reportado anteriormente (Yildiz *et al.*, 2000). Chen *et al.*, (1993), notaron que la trealosa mejoraba la sobrevivencia de la célula espermática de bovino almacenada a 25°C por 24 horas. Posteriormente, Storey *et al.*, (1998), reportaron que

la trealosa aumenta la proporción de células espermáticas intactas de ratón después de la criopreservación.

Los azúcares adicionados al diluyente TRIS-ácido cítrico no mejoran la motilidad y viabilidad durante el equilibrio. Sin embargo, la galactosa, lactosa, trealosa, maltosa y sacarosa reducen los porcentajes de daños al acrosoma en las células espermáticas en equilibrio. Los disacáridos (excepto la lactosa) reducen la muerte espermática y/o la tasa de acrosomas dañados al descongelado sin promover la motilidad en la descongelación, mientras que los monosacáridos, especialmente la fructosa y xilosa mejoran la motilidad junto con la viabilidad y el porcentaje de acrosomas intactos al descongelado. La trealosa, fructosa y xilosa aumentan significativamente el porcentaje de espermatozoides activos totales en las muestras de semen congeladas-descongeladas comparadas con otros azúcares (Yildiz *et al.*, 2000).

El metabolismo espermático puede ser mantenido mejor en diluyentes que contengan azúcares degradables (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Aunque los diluyentes iso-osmóticos son comúnmente usados para la conservación de semen de carnero, los diluyentes hiper-osmóticos con un amplio rango de las concentraciones del azúcar son utilizados para mejorar la integridad espermática después de congelar y descongelar espermatozoides (Salamon y Visser, 1972; Veksler *et al.*, 1997). Los azúcares no degradables, por ejemplo, lactosa, sacarosa, trealosa y rafinosa presentan hipertonicidad media, causando deshidratación celular antes de la congelación (Schmeil *et al.*, 1986; Aisen *et al.*, 1990).

Los disacáridos son más efectivos que los monosacáridos, ya que aumentan la deshidratación osmótica (Platov, 1988). Este efecto osmótico disminuye la congelación del agua intracelular, y posteriormente el daño celular por la cristalización del agua. La eficiencia de los componentes naturales sintetizados por plantas y animales expuestos a bajas temperaturas ha sido probada. Entre estas sustancias la trealosa ha sido incorporada en los diluyentes para semen por varios investigadores Foote *et al.*, (1993), Aisen *et al.*, (1994) con resultados variables. En diluyentes sin glicerol, se

demonstró que la motilidad después de congelar espermatozoides de carnero, fue mas alta en presencia de trealosa o sacarosa que con glucosa, indicando un efecto crioprotector de los disacáridos (Molinia *et al.*, 1991).

Se ha demostrado la capacidad crioprotectora de la trealosa adicionada a un diluyente isotónico en ambas pruebas *in vivo* e *in vitro*. La adición de este disacárido en los diluyentes obtuvo resultados variables, evaluados por la motilidad espermática, integridad del acrosoma o termorresistencia de espermatozoides de carnero Molinia *et al.*, (1994), Aisen *et al.*, (2000) y conejo (Dalimata y Graham, 1997).

En trabajos previos, se demostró que la protección *in vitro* del semen de carnero durante el congelamiento se mejoró cuando se usaron diluyentes hipertónicos (Aisen *et al.*, 1990; Aisen *et al.*, 1996; Aisen *et al.*, 2000). En estos trabajos, se demostró que la acción crioprotectora de la trealosa depende de su concentración en el diluyente. Molinia *et al.*, (1994), concluyeron que las soluciones TRIS-monosacáridos proporcionaron la protección *in vitro* mas alta durante el proceso de congelación-descongelación, por más tiempo mientras se mantuvo la iso-osmolaridad. Por el contrario, el uso de una concentración hipertónica de un disacárido responde a una acción fisicoquímica diferente, no siendo así para la permeabilidad de la membrana plasmática. En adición a la acción deshidratante, la trealosa confiere una criopreservación específica sobre la bicapa lipídica (Bakás y Disalvo, 1991). Por esta razón, la trealosa pudo ser mejor crioprotector que otros disacáridos (Aisen *et al.*, 1996). El glicerol es usado frecuentemente en crioprotectores para evitar la formación de macro cristales del agua intracelular. Cuando la trealosa fue adicionada en condiciones hiperosmóticas, se pudo observar un efecto sinérgico con el glicerol sobre la integridad de la membrana, debido a que existe un secuestro de agua al lado extracelular y una estabilización de membrana en un estado fluido (Crowe *et al.*, 1989).

Yildiz *et al.*, (2000), estudiaron la influencia de la suplementación de diferentes azúcares en el diluyente y evaluaron los porcentajes de motilidad, viabilidad y acrosomas intactos de espermatozoides de canino durante la dilución, equilibrio y

congelación del semen. Utilizaron el diluyente TRIS-ácido cítrico que contenía TRIS 240mM, ácido cítrico 63mM, glicerol 8% (v/v), yema de huevo 20% (v/v) y 70mM de azúcar, los cuales fueron fructosa, galactosa, glucosa y xilosa (monosacáridos), lactosa, trealosa, maltosa, sacarosa (disacáridos) o rafinosa (trisacárido). No fue adicionado ningún azúcar en el diluyente del grupo control. Los porcentajes de motilidad, viabilidad espermática e integridad acrosomal disminuyeron gradualmente en todos los grupos después de la refrigeración y congelación, consecutivamente ($P < 0.001$). Encontraron que el tipo de azúcar afectó significativamente la motilidad, viabilidad espermática e integridad acrosomal durante el equilibrio y congelación ($P < 0.05$). Mostraron que la trealosa, xilosa y fructosa aumentaron significativamente los porcentajes de espermatozoides activos totales (motilidad x porcentaje de espermatozoides vivos x porcentajes de espermatozoides normales) comparado con los otros azúcares ($P < 0.01$) y el control ($P < 0.0001$) en las muestras de semen congelado-descongelado. El tipo o la localización del impacto crioprotector del azúcar sobre los espermatozoides de canino, varía de acuerdo al tipo de azúcar adicionado al diluyente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Macrolocalización

El estado de Nayarit cuenta con 20 municipios. Sus coordenadas geográficas extremas son: al norte $23^{\circ} 05'$, al sur $20^{\circ} 36'$ de latitud norte; al este $103^{\circ} 43'$, al oeste $105^{\circ} 46'$ de longitud oeste. Nayarit representa el 1.4% de la superficie del país. Colinda al norte con Sinaloa y Durango; al este con Durango, Zacatecas y Jalisco; al sur con Jalisco y el Océano Pacífico y al oeste con el Océano Pacífico y Sinaloa (INEGI, 2005).

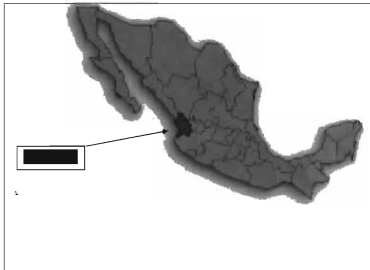


Figura 1.- Localización geográfica del Estado de Nayarit.

El municipio de Compostela se localiza a $21^{\circ} 14'$ latitud norte; $104^{\circ} 54'$ longitud oeste. Se encuentra a 860 msnm. Compostela se ubica en la parte sur del Estado de Nayarit, colinda al norte con el Océano Pacífico y con los municipios de Xalisco y San Blas; al este con los municipios de Xalisco, Santa María del Oro, San Pedro Lagunillas y el Estado de Jalisco; al sur con el Estado de Jalisco y con el municipio de Bahía de Banderas; al oeste con el municipio de Bahía de Banderas y con el Océano Pacífico (INEGI, 2005).

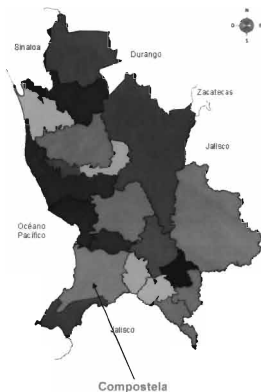


Figura 2.- Localización geográfica del Municipio de Compostela.

3.2. Microlocalización

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAMVZ- UAN); y en la granja porcina "El Embocadero" de la Ciudad de Compostela, Nayarit.

El laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal se encuentra situado en la ciudad de Compostela, Nayarit., en el kilómetro 3.5 de la carretera de cuota Compostela - Chapalilla, localizada geográficamente al suroeste del estado de Nayarit, a una altitud de 1,021 msnm, con una temperatura media anual de 22^oC, con un clima semicálido - subhúmedo (AcW), con lluvias en verano y una precipitación pluvial de 900 mm (SPPGEN, 1996).



Figuras 3 y 4.- Localización geográfica de la UAMVZ-UAN tomada a 2000 y 500 pies de altura, respectivamente.

En este laboratorio, se realizaron todas las evaluaciones y los procesos de congelación y descongelación que se consideraron para el desarrollo de la presente investigación.

La granja porcina "El Embocadero" se localiza al sur de la Ciudad de Compostela, Nayarit por la carretera Compostela - Borbollón a la altura del kilómetro 5, propiedad del MVZ Álvaro Tello Rodríguez, quién facilitó un semental de la raza Pietrain-Yorkshire para la extracción de semen.

3.3. Extracción del semen

La extracción del semen se realizó de un semental porcino de la raza Pietrain-Yorkshire de 2.5 años de edad, el semen se colectó por medio de la técnica de Mano Enguantada (Conejo1990; Hernández, 1998), en un recipiente térmico de boca ancha precalentado a 37°C, provisto de una bolsa de plástico limpia y con un filtro especial para separar la porción gelatinosa (tapioca) del eyaculado, sólo se colectó la porción del eyaculado rica en espermatozoides. La frecuencia de ordeña del semental fue en promedio de una vez a la semana, y solo se procesaron para la congelación los eyaculados (diez) que cumplían con los parámetros mínimos indispensables para ser congelados. Inmediatamente después de que se colectó el semen, se realizaron las evaluaciones macroscópicas y microscópicas del eyaculado. Las extracciones de semen para esta investigación se realizaron durante los meses de marzo a diciembre de 2007.

3.4. Evaluación del semen

3.4.1. Evaluación macroscópica

El objetivo de esta evaluación, es determinar las características organolépticas del semen, las cuales solo proporcionaron información muy general de la calidad de éste (Conejo, 1990; Hernández, 1998).

3.4.1.1. Volumen: Para medir el volumen, se pesó el termo con el eyaculado en una balanza digital, posteriormente se pesó el termo sin el eyaculado y se restó el segundo valor al primero. Cada gramo de eyaculado equivale a un mililitro de semen. El volumen permite registrar la producción de semen de cada verraco, además de que su valor se utiliza para calcular la concentración total de espermatozoides en el eyaculado y posteriormente, para determinar el número de dosis que se pueden preparar (García, 1998; Hernández, 1998).

El volumen del eyaculado completo de un verraco varía de 150 a 300mL con un rango de 100 a 500mL, dependiendo de las condiciones individuales y ambientales. (García *et al.*, 1998; Rozeboom, 2000).

3.4.1.2. Color: Es una evaluación física visual, en la que el semen se clasificó en sus diferentes tonalidades dependiendo de su concentración espermática: blanco diluido, blanco y blanco intenso, si tenía poca, regular o mucha concentración, respectivamente. El color del eyaculado depende de la fracción de que se trate. La primera fracción o preespermática tiene un color transparente, la segunda o fracción rica en espermatozoides es de color blanquecino lechoso y la tercera es de color blanquecino transparente, pero no tanto como la fracción preespermática debido a que siempre va mezclada con espermatozoides (Levis, 1996; Hernández, 1998).

3.4.1.3. Temperatura: Se determinó introduciendo un termómetro digital a la muestra de semen. La temperatura del semen varía de 35 a 37°C (Macháty *et al.*, 1992).

3.4.1.4. pH: El pH es una medida del grado de acidez o alcalinidad y en consecuencia es un indicador de la actividad metabólica de los espermatozoides. Conforme envejece el eyaculado aumenta la producción de ácido láctico y desciende el pH, el cual se determinó con un potenciómetro o peachímetro digital. El pH varía en relación con la fracción que se trate. La fracción rica en espermatozoides oscila entre 6.8 y 7.1, y la fracción pobre es ligeramente más alcalina oscilando entre 7 y 7.2. El conjunto total del eyaculado suele quedar normalmente alrededor de 7.1 a 7.2, es decir ligeramente alcalino (Conejo, 1990; Hernández, 1998).

3.4.2. Evaluación microscópica

El objetivo de esta evaluación, es reunir los elementos necesarios para el cálculo de dosis, además de que permite determinar si el semen es viable para su uso en la congelación. Las características del eyaculado que son determinadas mediante el microscopio tienen mayor valor que las obtenidas macroscópicamente (Conejo, 1990).

3.4.2.1 Motilidad: Se colocó una gota de semen sobre un portaobjeto previamente calentado a la temperatura de 37°C, y se cubrió con un cubreobjeto precalentado a la misma temperatura sobre la gota de semen. Enseguida se observó al microscopio con el objetivo seco débil (10x) y seco fuerte (40x), para estimar la motilidad según la rapidez con la que se movieron los espermatozoides hacia adelante y en línea recta. La motilidad progresiva se estimó en una escala de 0 al 100%, y solamente se procesaron aquellos eyaculados con más del 80% de motilidad. También se estimó el tipo de movimiento que tenían los espermatozoides en una escala del cero al cinco, de los cuales solo se procesaron los eyaculados que tuvieron un movimiento mayor de tres (Singleton, 1997; Hernández, 1998).

3.4.2.2. Concentración: Para su determinación se utilizó un fotómetro Porcine SpermaCue (Minitub®), modelo 12300/0500. Para la realización de esta prueba, se depositó una pequeña gota de semen en la microcubeta del fotómetro, misma que se introdujo en el lector del aparato, después de realizar la lectura y transcurridos 12 segundos, se mostró en la pantalla digital del aparato la concentración espermática expresada en millones por mililitro que presentaron las muestras.

3.4.2.3. Morfología: Para realizar esta prueba se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjeto calentado a la misma temperatura del semen, y se colocó una gota de tinción vital eosina/nigrosina (a la misma temperatura) con el objeto de colorear y fijar los espermatozoides; posteriormente, se puso un segundo portaobjeto en un ángulo de 45° con el primero, se deslizó suavemente a lo largo del primero para

extender la gota de semen teñida. Se esperó un minuto a que secase la muestra a temperatura ambiente para posteriormente observar la morfología espermática normal y anormal. Se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos del microscopio, clasificando las células en normales y anormales (con base a anomalías primarias y secundarias). En un eyaculado normal no debe admitirse una cifra superior al 20% de morfoanomalías espermáticas, considerándose una cifra media normal de 10% de anomalías primarias (de origen testicular). Generalmente, cuando se realiza el examen morfológico, se cuentan de 100 a 200 espermatozoides, y se toma el porcentaje de espermatozoides normales contra espermatozoides anormales; el eyaculado de menos de 80% de células espermáticas normales no se considera para congelar ni para su uso en programas de IA (De Mirjyn, 1997; Echeverría *et al.*, 1998; Rozeboom, 2000).

3.4.2.4. Relación de espermatozoides vivos/muertos: Para realizar esta evaluación, se depositó una gota de semen fresco sobre un portaobjeto previamente calentado a 37°C, y se colocó una gota de eosina/nigrosina para colorear los espermatozoides; posteriormente, se puso un segundo portaobjeto en un ángulo de 45° con el primero, deslizándolo suavemente a lo largo del primero para extender la gota de semen teñida. Se esperó un minuto a que secase la muestra a temperatura ambiente para posteriormente observar los espermatozoides, y poder determinar si estaban vivos o muertos durante la tinción. Se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos del microscopio. Se ha demostrado que las cabezas de los espermatozoides muertos o en fase letal, tienen la propiedad de dejar pasar los colorantes, esto se debe a la perturbación de la permeabilidad de la membrana cefálica; mientras que los espermatozoides vivos no permiten el paso de los colorantes, por lo que permanecen sin coloración; un eyaculado de buena calidad y para que pueda ser congelado no debe presentar un número menor de 80% de células espermáticas vivas (Diehl *et al.*, 1995; Levis, 1996).

3.4.2.5. Evaluación de la integridad acrosomal: Esta evaluación se realizó por medio de la triple tinción establecida por Talbot y Chacón (1981). Se tomó un volumen

de 100 microlitros de semen fresco y se le agregó el mismo volumen de azul de Tripán al 2% en PBS (buffer salino fosfato) , después se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se fijó la muestra celular después de lavar con PBS por medio de centrifugado a 1200 rpm por tres minutos hasta que el líquido sobrenadante presentó un color azul claro o transparente, la fijación se hizo adicionando 0.5mL de glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilato. Posteriormente, se incubó por 30 minutos a 4°C en su tubo tapado, enseguida este volumen se centrifugó a 1200 rpm por ocho minutos, se tiró el sobrenadante y se le adicionó un mililitro de PBS para volver a centrifugar a las mismas revoluciones y el mismo tiempo, se resuspendido nuevamente en un mililitro de PBS para hacer un frotis sobre un portaobjeto, éste se dejó secar a temperatura ambiente. Este frotis una vez ya seco, se introdujo durante 15 minutos en un vaso de Copplin que contenía café Bismarck (al 8%, con pH de 1.8) a 37°C.

Posteriormente se enjuagó el frotis con agua destilada y dejó escurrir hasta que seicara el frotis, a continuación se colocó dentro de un vaso de Copplin con Rosa de Bengala (0.8% en buffer Tris 0.1M, pH 5.3) durante un minuto a temperatura ambiente, después se lavó con agua destilada desionizada, se dejó secar para hacer posteriormente la observación y evaluación de la muestra en el microscopio. En caso de hacer después la evaluación, se le agregó resina y se le puso un cubreobjetos. Por último se observó con el objetivo de inmersión 100x y se contaron 100 células para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma integro.

La interpretación fue la siguiente:

- Cabeza rosa/café: espermatozoides vivos con acrosoma integro.
- Cabeza blanca/café: espermatozoides vivos con reacción acrosomal.
- Cabeza rosa/azul. Espermatozoides muertos con acrosoma intacto.
- Cabeza blanca/azul: espermatozoides muertos sin acrosoma (Talbot y Chacón, 1981).

3.5. Diluyentes empleados para la congelación de semen

3.5.1. Preparación de los diluyentes

Para el proceso de congelamiento de semen, se emplearon cuatro diluyentes que fueron diferentes en su composición, cada uno se subdividió en dos fracciones, que se identificaron como fracción A (diluyente de refrigeración) y B (diluyente de congelación), cuya composición son las siguientes:

3.5.1.1. Diluyente de Westendorf modificado (Roca *et al.*, 2003).

Diluyente A

- Dextrosa 2.5gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

Diluyente B

- Dextrosa 2.5gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Equex paste 0.563mL.
- Glicerol 6%.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

3.5.1.2 Diluyente de Thilmant (Thilmant, 1997).

Diluyente A

- Fructosa 8.5gr.
- Bicarbonato de Sodio 0.15gr.
- Yema de huevo 34mL.
- Cisteína 0.015gr.
- Agua ajustar a 150mL.

Diluyente B

- Fructosa 8.5gr.
- Bicarbonato de Sodio 0.15gr.
- Yema de huevo 34mL.
- Cisteina 0.015gr.
- Equex paste 1.69mL.
- 6% de glicerol
- Agua ajustar a 150mL.

3.5.1.3. Diluyente de Trealosa con glicerol

Diluyente A

- Trealosa 3.75gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

Diluyente B

- Trealosa 3.75gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Equex paste 0.563mL.
- Glicerol 6%.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

3.5.1.4. Diluyente de Trealosa sin glicerol

Diluyente A

- Trealosa 3.75gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

Diluyente B

- Trealosa 3.75gr.
- Yema de huevo 10mL.
- Equex paste 0.563mL.
- Agua destilada y desionizada ajustar a 50mL.

Para medir los pesos y volúmenes de los ingredientes de los diferentes diluyentes, se utilizó una balanza analítica para pesar los azúcares, el bicarbonato de Sodio y la cisteína; se utilizaron tubos de ensayo graduados para medir la yema de huevo; probetas graduadas para medir el agua destilada desionizada; micro pipetas para medir el Equex paste y pipetas graduadas para medir el glicerol.

3.6. Procedimiento para la congelación de semen con los diferentes diluyentes utilizados

Diluyentes A: En matraces diferentes de 200mL de capacidad se depositaron los gramos de azúcar correspondientes de cada diluyente y se disolvió en 20mL de agua destilada y desionizada; posteriormente, se separó una o dos yemas de huevo (de gallina) en un separador de yema, luego se colocaron en una servilleta de papel para hacer movimientos rotatorios con el fin de obtener la pura yema, excluyendo todo lo posible de la clara. De ésta yema, se colocaron los mililitros necesarios de cada diluyente en su respectivo matraz junto con el agua y el azúcar, enseguida se le adicionó la cantidad de agua destilada y desionizada necesaria para ajustar el total del diluyente (50mL y 150mL), se mezcló y agitó hasta que se homogenizó el diluyente.

Diluyentes B: Para la preparación de estos diluyentes, se utilizó el mismo procedimiento que se realizó para la preparación de los diluyentes A, solo que a estos diluyentes se les agregó el seis por ciento de glicerol del total del diluyente B.

3.7. Centrifugación del semen, diluyente y curva de enfriamiento

Para la centrifugación del semen más los diluyentes, se utilizaron tubos de ensayo cónicos de plástico con capacidad para 15mL, según la cantidad de semen que se congeló, fueron los tubos que se emplearon. En cada tubo se depositaron 10mL de diluyente A; por cada tubo de diluyente A se necesitó un tubo para el diluyente B. Posteriormente, a una temperatura de 15°C se introdujeron los tubos rotulados con sus respectivos diluyentes a la centrifuga a una velocidad de 2000 rpm durante 15 minutos. El semen previamente diluido (relación 1:1, semen: BTS) y a una temperatura de 15°C se centrifugó a la misma temperatura, velocidad y tiempo.

Una vez centrifugados los diluyentes, con el mayor cuidado se separó el líquido sobrenadante del sedimento, el líquido se colocó en diferentes matraces de 75mL, uno para cada diluyente, los diluyentes A se mantuvieron a 15°C en una cámara de conservación para semen porcino, y los diluyentes B se introdujeron a un refrigerador a 5°C. Posterior a la centrifugación del semen, se separó el plasma seminal y diluyente BTS de los espermatozoides (sedimento). Inmediatamente se le agregaron de dos a tres gotas del diluyente A a cada tubo con su respectivo sedimento, esto con el propósito de brindarle una mejor protección al momento de combinar los sedimentos necesarios (tres a cinco) suficientes para tener una concentración de 6000×10^6 espermatozoides viables en un solo tubo, tratando de que los sedimento del semen mas el diluyente A se hicieran 5mL; ya mezclados en un tubo los espermatozoides y el diluyente A se colocaron dentro de un vaso de precipitado con agua corriente a 15°C, posteriormente se introdujeron durante dos horas en una vitrina refrigerador donde se les bajó la temperatura hasta 5°C.

El líquido del diluyente B centrifugado se colocó en la vitrina refrigerador para que descendiera su temperatura a 5°C. Transcurridas las dos horas, o bien, que los espermatozoides con el diluyente A descendieran a 5°C, dentro de la vitrina refrigerador se le adicionó en fracciones el diluyente B; 10, 20, 30 y 40% respectivamente, en intervalos de 10 minutos entre una y otra adición, hasta llegar al

doble del preparado de diluyente A y el semen. Posteriormente, se procedió a envasar en pajillas de 0.5mL de capacidad con la llenadora y selladora semiautomática (minitube®). Enseguida, en una caja de nieve seca se depositó nitrógeno líquido hasta una altura de 9cm, y a una altura de 13cm se colocaron unas camas o rejillas especiales las cuales contenían a las pajillas y las mantuvieron a una altura de 4cm de la superficie del nitrógeno durante 20 minutos; a esto se le llama "vapores de nitrógeno", una vez terminado este proceso, se introdujeron las pajillas en tubos para cinco pajillas cada uno y estos en bastones especiales, los cuales fueron rotulados con la fecha y diluyente utilizado para introducirlos en las canastillas y posteriormente al termo con nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C donde permanecieron y se conservaron por un tiempo mínimo de 15 días o hasta la descongelación.

3.8. Esquema del procesamiento de semen para ser congelado



Extracción de semen 35 a 37°C (evaluación)



Diluir semen + diluyente BTS [1:1] a 35°C



Equilibrar a temperatura ambiente (hora y media)



Equilibrar a 15°C (dos horas)

(Puede permanecer 24 horas a 15°C)



Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos el volumen necesario de semen para 6000 millones de espermatozoides (spz) viables totales, eliminar sobrenadante



Suspender con diluyente A a 6000×10^6 spz en 5mL



Descender temperatura a 5°C, (dos horas)



Adicionar 5mL del diluyente B, en forma gradual

(10, 20, 30 y 40% cada 10 minutos)



Envasar en pajillas de 0.5mL (300 millones de spz cada una) y sellar



Colocar en vapores de N₂ líquido (-130 a -150°C)

20 minutos a 4cm de altura.



Almacenar en N₂ líquido (-196°C)

Indefinidamente, hasta su uso (Roca *et al.*, 2003).

3.9. Descongelación del semen

El semen fue descongelado después de 15 días de su congelación. La descongelación del semen se realizó en un baño María a una temperatura de 56°C durante un tiempo de 12 segundos, transcurrido este tiempo, inmediatamente se retiraron las pajillas manualmente del baño, después se secaron con papel absorbible y se dejaron por un minuto a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), posteriormente se "sacudieron" las pajillas para quitar las burbujas de aire y abrirlas del extremo donde está la esfera metálica (balln). De cada una de las pajillas descongeladas, se tomaron 100 μl para realizar la evaluación de acrosomas intactos por medio de la prueba de triple tinción propuesta por Talbot y Chacón (1981), se colocó otra gota del contenido de cada pajilla en un portaobjetos precalentado a 37°C para evaluar la motilidad, otra gota para hacer un frotis con eosina-nigrosina para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, así como el porcentaje de espermatozoides normales y anormales (morfoanomalías) para obtener la calidad del semen descongelado. El resto del contenido de cada una de 10 pajillas del mismo eyaculado y el mismo diluyente fueron diluidas en 30mL de una solución de BTS (80%) mezclado con el respectivo diluyente de refrigeración con yema de huevo (20%) para evaluar la motilidad del semen descongelado y diluido durante un tiempo de dos horas con intervalos de 15 minutos (termorresistencia), manteniendo el semen durante este tiempo en baño María a 37°C.

3.10. Diseño Experimental

Para comparar la calidad espermática y la termorresistencia en la criopreservación de semen porcino se formaron cuatro tratamientos:

T1: Dextrosa (Westendorf modificada).

T2: Fructosa (Thilmant).

T3: Trealosa con glicerol.

T4: Trealosa sin glicerol.

Se evaluaron 10 eyaculados de un mismo semental, evaluándose 10 pajillas de cada eyaculado en cada tratamiento, distribuidas bajo un diseño en bloques al azar, considerando a cada eyaculado como bloque anidado en cada tratamiento (SAS, 1999) de acuerdo al siguiente cuadro.

Cuadro 1.- Distribución de cada uno de los eyaculados en cada tratamiento

Tratamiento	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9	E 10
T1	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p
T2	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p
T3	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p
T4	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p	10 p

T1: Dextrosa (Westendorf modificada). T2: Fructosa (Thilmant). T3: Trealosa con glicerol. T4: Trealosa sin glicerol. E = eyaculado. p = pajillas.

3.11. Análisis Estadístico

3.11.1. Para las variables de calidad espermática se realizó análisis de varianza bajo un modelo de bloques anidados en cada tratamiento.

$$Y_{ijk} = u + T_i + E_j(T_i) + e_{ijk}$$

Donde:

Y= Son las variables medidas.

u= Media general.

T= Los tratamientos.

E= Eyaculados.

e= error aleatorio.

3.11.2. Para las variables de calidad espermática en cada tratamiento se realizó un análisis de correlación de Pearson por separado.

3.11.3. Para evaluar la termorresistencia se analizó solo la variable motilidad del semen congelado-descongelado, se realizó análisis de varianza por separado en cada tiempo, comparando los tratamientos para establecer diferencias estadísticas por medio de la prueba de Tukey, bajo un modelo simple.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde:

Y= Son las variables medidas.

μ = Media general.

T= Los tratamientos.

e= error aleatorio.

3.12. Variables a medir

Se evaluó y comparó la calidad espermática en el proceso de criopreservación mediante la determinación de:

1. Motilidad espermática.
2. Porcentaje de espermatozoides vivos/muertos.
3. Porcentaje de espermatozoides normales/anormales (morfoanomalías).
4. Porcentaje de integridad acrosomal.

Para evaluar y comparar la termorresistencia de los espermatozoides descongelados se determinó:

1. Motilidad espermática.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran por separado para cada una de las variables analizadas en los tratamientos; así mismo se presentan los resultados que se obtuvieron antes y después del proceso de congelación/descongelación del semen.

4.1. Calidad espermática del semen porcino criopreservado con diferentes diluyentes evaluándose la motilidad, relación de espermatozoides vivos/muertos, normales/anormales e integridad acrosomal.

4.1.1. Motilidad antes de la congelación espermática

En esta investigación, se establecieron parámetros microscópicos de calidad espermática para determinar si los eyaculados eran criopreservados o no. Los valores medios globales obtenidos para las variables de calidad espermática evaluadas en el semen recién eyaculado se muestran en la cuadro 2.

Cuadro 2. Valores globales para las variables evaluadas en el semen fresco

No. de eyaculados	Variables	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
10	Motilidad	87.50	2.63	85.00	90.00
	Espermatozoides Vivos	82.80	2.78	78.00	87.00
	Espermatozoides Normales	89.00	1.76	86.00	91.00
	Vivos con acrosoma integro	77.00	3.73	70.00	82.00

El resultado obtenido para la variable motilidad, es ligeramente superior al que reportó Guzmán, (2003), quien evaluó semen porcino antes de la criopreservación, y obtuvo una media global de 85%.

Por otra parte, Córdova *et al.*, (2004) realizaron un estudio de criopreservación de semen porcino, donde utilizaron 21 eyaculados y obtuvieron una media de 84.76% de motilidad espermática en semen fresco; este resultado también es ligeramente inferior al obtenido en la presente investigación.

Con base a los resultados obtenidos en la evaluación de la motilidad, se procedió a criopreservar los 10 eyaculados, ya que se encontraron dentro del rango que ha sido señalado por otros investigadores Singleton, (1997) y García *et al.*, (1998) quienes reportaron que un eyaculado de buena calidad debe tener como mínimo 80% de espermatozoides con movimiento progresivo (motilidad), para ser considerado apto para su congelación.

En trabajos que fueron realizados por Singleton, (1997) y Rozeboom, (2000) señalan que la tasa de fertilidad y el tamaño de la camada disminuirán si la motilidad del semen recién eyaculado es inferior al 80%.

4.1.2. Espermatozoides vivos antes de la congelación

Los resultados para la variable espermatozoides vivos obtenidos en esta investigación (cuadro 2) se encuentran dentro del rango establecido para que una muestra de semen pueda ser congelada, ya que en trabajos realizados por algunos autores como Conejo, (1990) y Poto *et al.*, (2000), señalan que cuando se realiza el examen de espermatozoides vivos y muertos, un eyaculado de buena calidad no debe presentar un número menor de 80% de células espermáticas vivas (sin tefirse).

El resultado obtenido en esta variable es similar con lo que reportó Benítez, (2004), quien evaluó la criopreservación de eyaculados de tres razas porcinas, y obtuvo el valor más bajo en la raza Pelón Mexicano (82.00% de espermatozoides vivos), por otra parte el resultado de la presente investigación es ligeramente inferior al reportado por el mismo autor, en las razas Landrace y Duroc, 90.00 y 87.66% de espermatozoides vivos, respectivamente.

El hecho que se haya presentado diferencia entre el porcentaje de espermatozoides vivos de esta investigación y la mencionada anteriormente, puede deberse a la diferencia de razas entre sementales, así como las edades y las condiciones ambientales que prevalecieron en ambas investigaciones.

4.1.3. Espermatozoides normales antes de la congelación

La media global obtenida para espermatozoides normales antes de la congelación (cuadro 2), fue superior a la que ha sido señalada para que el semen de cerdo pueda ser criopreservado, al respecto Rozeboom, (2000) menciona que en un eyaculado normal no debe admitirse una cifra superior al 20% de morfoanomalías espermáticas, considerándose una cifra media normal de 10% de anomalías primarias (de origen testicular).

El resultado obtenido, coincide con los reportados por Benítez, (2004) para las razas Pelón Mexicano, Landrace y Duroc, en las cuales obtuvo 89.33, 90.33 y 91.00% de espermatozoides normales, respectivamente.

Los resultados obtenidos en los eyaculados que se utilizaron en esta investigación, se encuentran dentro de lo establecido para que una muestra de semen pueda ser considerada para su congelación, ya que en un eyaculado normal no debe admitirse una cifra inferior al 80%.

4.1.4. Integridad acrosomal antes de la congelación

De acuerdo a los resultados obtenidos, se criopreservaron los 10 eyaculados para la presente investigación, ya que autores como Martín *et al.*, (1996) mencionan que para que una muestra de semen pueda ser criopreservada, deberá mostrar al menos 70% de espermatozoides con acrosomas normales.

El resultado obtenido para esta variable (cuadro 2), es similar al que reportaron Córdova *et al.*, (2004), quienes obtuvieron 79.76% de acrosomas normales (NAR) para semen fresco; en otra investigación realizada por Córdova *et al.*, (2005), mencionan que la integridad acrosomal se mantuvo en un rango de 70 a 80%, dicho resultado también es similar al obtenido en la presente investigación.

Por otra parte, el resultado reportado por Gosáñez *et al.*, (2003) es ligeramente inferior, ya que ellos reportaron una media de 72% de espermatozoides con acrosomas normales.

4.1.5. Motilidad después de la congelación/descongelación

En todas las muestras evaluadas (400 pajillas) de semen congelado – descongelado, para la variable motilidad, se encontraron valores inferiores respecto a los valores del semen fresco. Al comparar los valores globales del semen fresco con los del semen congelado – descongelado, se halló diferencia altamente significativa ($P < 0.01$), estos valores se muestran en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Valores globales para las variables evaluadas en el semen descongelado.

No. de pajillas evaluadas totales	Variables	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
400	Motilidad	26.35	12.33	5.00	60.00
	Espermatozoides Vivos	33.91	12.37	8.00	67.00
	Espermatozoides Normales	85.62	2.33	77.00	92.00
	Vivos con acrosoma íntegro	22.73	8.17	6.00	45.00

Cuadro 4. Diferencia de medias globales para las diferentes variables evaluadas entre el semen fresco y el semen descongelado.

Variables	Semen Fresco	N	Semen Descongelado	N	Diferencia
Motilidad	87.50a	10	26.35b	400	61.15
Espermatozoides Vivos	82.80a		33.91b	400	48.89
Espermatozoides Normales	89.00a		85.62a	400	3.38
Vivos con acrosoma integro	77.00a		22.73b	400	54.27

N= número de observaciones en cada tratamiento

a, b, Literales diferentes entre las filas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.01$).

Comparando la variable motilidad en el semen congelado/descongelado se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) entre los cuatro tratamientos, presentándose los valores más altos en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, y el valor más bajo se obtuvo en el diluyente Trealosa sin glicerol (cuadro 5), observándose una pérdida de la motilidad de 52.70, 57.40 y 58.55, respectivamente; no se encontró diferencias estadísticas entre los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol. El valor medio más bajo fue para el diluyente Trealosa sin glicerol, con una pérdida de 75.95.

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable motilidad espermática entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.

Medias para motilidad espermática					
Diluyentes	Semen fresco	N	Semen descongelado	N	Diferencia
Thilmant	87.50	10	34.80a	100	52.70*
Westendorf modificado			30.10a	100	57.40*
Trealosa con Glicerol			28.95a	100	58.55*
Trealosa sin glicerol			11.55b	100	75.95*

N= número de observaciones en cada tratamiento

* Las diferencias entre semen fresco y descongelado para motilidad espermática son significativas estadísticamente ($P < 0.01$).

a,b, Literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre medias de los tratamientos ($P < 0.01$).

Estos resultados son similares a los que reportaron Bathgate *et al.*, (2006), quienes analizaron la motilidad en espermatozoides criopreservados de porcinos, realizaron tres evaluaciones para la motilidad; a los 10 minutos, tres y seis horas de descongelado e incubado el semen a 37°C. Para sus mejores resultados reportaron un 33% para motilidad espermática a los 10 minutos de descongelado el semen, también reportan motilidades de 10 y 2% a las tres y seis horas de incubado, respectivamente.

4.1.6. Espermatozoides vivos después de la congelación/descongelación

Para esta variable se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), los resultados más altos se presentaron en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, no encontrándose diferencias estadísticas entre estos tratamientos. El resultado más bajo se obtuvo en el diluyente a base de Trealosa sin glicerol, con un resultado de 20,12% de espermatozoides vivos (cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias para la variable espermatozoides vivos entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado y entre tratamientos empleados para la criopreservación.

Medias para espermatozoides vivos					
Diluyentes	Semen fresco	N	Semen descongelado	N	Diferencia
Thilmant	82.80	10	40.06a	100	42.74*
Westendorf modificado			36.52a	100	46.28*
Trealosa con Glicerol			38.95a	100	43.85*
Trealosa sin glicerol			20.12b	100	62.68*

N= número de observaciones en cada tratamiento

* Las diferencias entre semen fresco y descongelado para espermatozoides vivos son significativas estadísticamente ($P < 0.01$).

a,b. Literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre medias de los tratamientos ($P < 0.01$).

Para los cuatro tratamientos se halló diferencia altamente significativa ($P < 0.01$), respecto al resultado obtenido de espermatozoides vivos antes de la congelación con los obtenidos después del proceso de congelación- descongelación (cuadro 6).

Los resultados de esta investigación son inferiores a los que reportó Thilmant, (1997), quien obtuvo 74% y 73% de espermatozoides vivos para semen congelado en diluyentes con y sin Equex STM, respectivamente. La diferencia entre estos resultados y el de la presente investigación, pudo deberse al efecto del detergente sintético Equex STM, el efecto de la temperatura durante el proceso de congelación/descongelación, la adición de glicerol y la concentración espermática en el diluyente de congelación.

Por otra parte, los resultado obtenidos en este estudio son ligeramente inferiores a los reportados por Guzmán, (2003), quien reportó porcentajes de espermatozoides vivos de 49.4, 46.0, 40.4 y 38.5, cuando las dosis fueron almacenadas por ocho, 15, 21 y 30 días, respectivamente, concluyendo en su investigación, que los valores de espermatozoides vivos fueron disminuyendo conforme fue transcurriendo el tiempo de conservación. Al respecto, cabe señalar, que en la presente investigación, las dosis fueron evaluadas a los 15 días posteriores a su congelación.

Los resultados obtenidos en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, son ligeramente superiores al obtenido por Benitez, (2004), quien preservó semen de cerdo de distintas razas con la técnica de Westendorf modificada y el porcentaje más alto de espermatozoides vivos lo obtuvo en cerdos Pelón Mexicano, con una media de 31.20; mientras que el valor más bajo se presentó en cerdos de la raza Duroc, con 20.07%, este último resultado es similar al obtenido en este estudio para el diluyente Trealosa sin glicerol, 20.12% de espermatozoides vivos después del proceso de congelación/descongelación.

Los valores obtenidos en esta investigación para esta variable son similares a los de Waterhouse *et al.*, (2006) ya que al evaluar la tolerancia a la congelación de semen de cerdo de diferentes razas, observaron que después de la congelación-descongelación los porcentajes de espermatozoides vivos se redujeron significativamente ($P < 0.001$) 48.9 y 45.6% comparándolo con el semen fresco, para las razas Landrace y Duroc, respectivamente.

4.1.7. Espermatozoides normales después de la congelación/descongelación

Para esta variable no se encontró diferencia estadística ($P > 0.01$) entre los espermatozoides de semen fresco y los que fueron sometidos al proceso de congelación/descongelación. Así también, para esta misma variable, no hubo diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los tratamientos (cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de medias para la variable espermatozoides normales entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.

Medias para espermatozoides normales					
Diluyentes	Semen fresco	N	Semen descongelado	N	Diferencia
Thilmant	89.00	10	85.87a	100	3.13
Westendorf modificado			85.86a	100	3.14
Trealosa con Glicerol			85.46a	100	3.54
Trealosa sin glicerol			85.19a	100	3.81

N= número de observaciones en cada tratamiento

Las diferencias entre semen fresco y descongelado para espermatozoides normales no son significativas estadísticamente ($P > 0.01$)

a, Literales iguales en las columnas indican que no hubo diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos ($P > 0.01$).

Los resultados que se obtuvieron para esta variable son ligeramente inferiores a los que reportó Benítez, (2004), quien al trabajar con tres razas de cerdos diferentes obtuvo porcentajes de espermatozoides normales de 90.60 para Pelón Mexicano, 89.57 para Landrace y 89.67 para Duroc, no encontrando diferencia entre las tres razas.

Respecto a los espermatozoides con alteraciones morfológicas, estos pueden presentar buena motilidad, pero si presentan formas inadecuadas no son aptos para fertilizar óvulos (Rozeboom, 2000).

4.1.8. Integridad acrosomal después de la congelación/descongelación

Para esta variable se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), los resultados más altos se presentaron en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, no encontrándose diferencias entre estos tratamientos. El resultado más bajo se obtuvo en el diluyente a base de Trealosa sin glicerol. Para los cuatro tratamientos existió diferencia altamente significativa ($P < 0.01$), respecto al resultado obtenido de espermatozoides vivos con acrosoma integro antes de la congelación con los obtenidos después del proceso de congelación-descongelación (cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias para la variable espermatozoides vivos con acrosoma integro entre el semen fresco y el semen congelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.

Medias para espermatozoides vivos con acrosoma integro					
Diluyentes	Semen fresco	N	Semen descongelado	N	Diferencia
Thilmant	77.00	10	26.55a	100	50.45*
Westendorf modificado			25.85a	100	51.15*
Trealosa con Glicerol			25.16a	100	51.84*
Trealosa sin glicerol			13.54b	100	63.46*

* Las diferencias entre semen fresco y descongelado para espermatozoides vivos con acrosoma integro son significativas estadísticamente ($P < 0.01$)

a, b, Literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre medias de los tratamientos ($P < 0.01$).

Los resultados obtenidos para esta variable son inferiores a los que obtuvieron Bathgate *et al.*, (2006), ya que en su estudio reportaron los mejores valores medios de 62, 57 y 50% de espermatozoides con acrosomas intactos a los 10 minutos, tres y seis horas después de haber descongelado e incubado el semen a 37°C. En otro estudio realizado por Poto *et al.*, (2000), encontraron valores medios de 59 y 33% para espermatozoides con acrosomas normales al comparar los métodos de congelación de semen propuestos por Thilmant contra el utilizado por Westendorf, respectivamente.

En otra investigación realizada por Gosálvez *et al.*, (2003) al evaluar los acrosomas normales en muestras de semen descongelado a diferentes temperaturas y tiempos, reportan 36.2% para los mejores valores medios que obtuvieron al hacer dicha evaluación. Por otra parte, Thilmant, (1997) evaluó el efecto de la adición del detergente Equex STM en el diluyente para la congelación de semen de cerdo y determinó el porcentaje de acrosomas intactos en espermatozoides descongelados, en el cual reporta valores medios de 56 y 30% para el semen congelado en diluyentes con y sin Equex STM, respectivamente.

Los resultados de las investigaciones mencionadas anteriormente, son superiores a los obtenidos en este estudio, estas diferencias pueden ser debidas a las tinciones o técnicas empleadas para realizar dicha evaluación, por lo que no se especifica si estos espermatozoides con integridad acrosomal también tenían su membrana plasmática normal (espermatozoides vivos), ya que con la técnica empleada en este estudio solo se reportan los espermatozoides vivos con acrosoma integro, por lo que se descartó los espermatozoides muertos con acrosoma integro.

4.1.9. Concentración de resultados

En el cuadro 9, se muestran de manera general y agrupada los resultados obtenidos para las diferentes variables analizadas en el semen congelado/descongelado con cada uno de los tratamientos; así también, en la figura 5, se muestran las pérdidas de los porcentajes para cada una de las variables, considerando el semen fresco versus semen descongelado.

Cuadro 9. Medias generales para las variables motilidad, vivos, normales y vivos con acrosoma integro evaluadas en el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes.

Diluyentes	Motilidad	D.E.	Vivos	D.E.	Normales	D.E.	Vivos con acrosoma	D.E.
Thilmant	34.80a	9.07	40.06a	10.89	65.87a	2.38	26.55a	5.53
Westendorf modificado	30.10a	9.97	36.52a	8.83	85.86a	2.10	25.85a	7.24
Trealosa con glicerol	28.95a	9.62	38.95a	10.64	85.46a	2.71	25.16a	7.17
Trealosa sin glicerol	11.55b	4.90	20.12b	6.66	85.19a	2.02	13.54b	4.23

D.E. = Desviación estándar.

a, b, Literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos ($P < 0.01$).

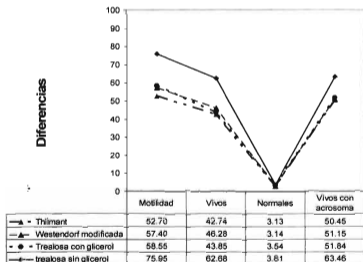


Figura 5. Diferencias porcentuales entre el semen fresco y el semen congelado-descongelado en cada diluyente para cada una de las variables.

4.2. Coeficiente de correlación entre las variables analizadas en cada uno de los tratamientos

El coeficiente de correlación es una medida del grado de asociación entre dos variables normalmente distribuidas (X y Y). Con el fin de encontrar relaciones funcionales entre las variables analizadas, se utilizó el modelo matemático de Pearson, el cual sirve de base para predecir el fenómeno estudiado. El conocimiento de la asociación de dos características en un individuo o animal, es de gran importancia, ya que la selección de alguna de ellas, se traduce automáticamente en la selección de la otra. Se dice que una correlación es positiva, si ambas variables se mueven en el mismo sentido, es decir, si una aumenta la otra también lo hace, y correlación negativa si al aumentar una la otra disminuye o viceversa. El coeficiente de correlación oscila entre -1 y 1 (Herrera y Barreras, 2001).

En los cuadros 10, 11, 12 y 13 se muestran las correlaciones entre las variables estudiadas en cada uno de los diluyentes; Thilmant, Westendorf modificado, Trealosa con glicerol y Trealosa sin glicerol, respectivamente.

Para las variables evaluadas en los espermatozoides congelados - descongelados con el diluyente Thilmant se encontraron correlaciones positivas significativas ($P < 0.01$) entre las variables motilidad y espermatozoides vivos; motilidad y espermatozoides vivos con acrosoma integro, así también con espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro. Los valores obtenidos para estas correlaciones se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Correlaciones entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Thilmant.

	Vivos	Normales	Vivos con acrosoma
Motilidad	0.68*	-0.15	0.55*
Vivos		-0.02	0.62*
Normales			0.01

* Indica correlaciones significativas ($P < 0.01$)

En el cuadro 11, se muestran las correlaciones para las variables evaluadas en el semen criopreservado con el diluyente Westendorf modificado existiendo correlaciones significativas ($P < 0.01$) entre las variables motilidad y espermatozoides vivos; motilidad y espermatozoides normales; motilidad y espermatozoides vivos con acrosoma integro; así también, espermatozoides vivos con espermatozoides normales y espermatozoides vivos con espermatozoides vivos con acrosoma integro.

Cuadro 11. Correlaciones entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Westendorf modificado.

	Vivos	Normales	Vivos con acrosoma
Motilidad	0.70*	0.11*	0.63*
Vivos		0.04*	0.55*
Normales			-0.23

* Indica correlaciones significativas ($P < 0.01$)

En lo que respecta al diluyente Trealosa con glicerol, se encontraron correlaciones positivas significativas ($P < 0.01$) entre todas las variables analizadas, (cuadro 12).

Cuadro 12. Correlación entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Trealosa con glicerol.

	Vivos	Normales	Vivos con acrosoma
Motilidad	0.81*	0.11*	0.82*
Vivos		0.08*	0.81*
Normales			0.17*

* = indica correlaciones significativas ($P < 0.01$)

Para el caso de las variables analizadas en los espermatozoides criopreservados con el diluyente Trealosa sin glicerol, se encontraron correlaciones positivas significativas ($P < 0.01$) entre las variables motilidad con espermatozoides vivos; motilidad con espermatozoides vivos con acrosomas integro, así como también espermatozoides vivos con espermatozoides vivos con acrosoma integro (cuadro 13).

Cuadro 13. Correlación entre las variables evaluadas en el semen congelado con el diluyente Trealosa sin glicerol

	Vivos	Normales	Vivos con acrosoma
Motilidad	0.82*	-0.04	0.61*
Vivos		-0.06	0.71*
Normales			0.01

* = indica correlaciones significativas ($P < 0.01$)

4.3. Evaluación de la termorresistencia con base a la motilidad del semen congelado-descongelado en los diferentes diluyentes

La evaluación de la termorresistencia se realizó durante dos horas analizando la variable motilidad, la primera observación se hizo al minuto después de diluir a 37°C el resto del semen contenido en las 10 pajillas descongeladas, las siguientes observaciones se hicieron con intervalos de 15 minutos entre una y otra, siendo un total de nueve observaciones en cada repetición para cada uno de los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos en la prueba de resistencia térmica del semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes se muestran en el cuadro 14 y figura 6.

Se observa que los mejores resultados de motilidad se dieron en los tiempos 2, 3 y 4 (15, 30 y 45 minutos) de termorresistencia para los diferentes tratamientos, decayendo gradualmente en los tiempos 5, 6, 7, 8 y 9 (del minuto 60 al 120).

Para la variable motilidad en el semen sometido a la prueba de termorresistencia se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos, los resultados más altos se presentaron en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol en cada uno de los tiempos considerados, no encontrándose diferencias entre estos tres tratamientos. Mientras que el resultado más bajo se obtuvo en el diluyente a base de Trealosa sin glicerol para cada uno de los tiempos considerados.

Cuadro 14. Medias y desviaciones estándar para la termorresistencia evaluada en el semen descongelado con los diferentes diluyentes en nueve tiempos (de uno a 120 minutos, con intervalo de 15 minutos).

Diluyentes	Tiempos de termorresistencia								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Thilmant D.E.	23.50a 5.79	43.50a 7.47	44.50a 8.31	43.50a 7.47	39.50a 6.43	37.00a 7.52	33.50a 4.74	27.00a 5.37	22.00a 4.83
Westendorf modificada D.E.	22.50a 5.40	41.00a 6.99	43.00a 8.23	39.50a 9.56	37.00a 10.59	32.50a 8.24	30.50a 7.97	27.50a 8.89	23.00a 7.52
Trealosa con glicerol D.E.	17.50a 8.57	39.50a 8.31	37.50a 5.40	35.50a 4.37	33.50a 4.11	29.50a 3.68	26.50a 4.74	22.50a 5.40	20.00a 6.66
Trealosa sin glicerol D.E.	8.00b 3.49	19.00b 7.74	18.50b 8.18	17.00b 8.56	15.00b 8.81	11.50b 7.47	8.50b 6.25	7.50b 6.34	5.50b 4.37

D.E. = Desviación estándar

a, b, Literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas entre medias ($P < 0.01$)

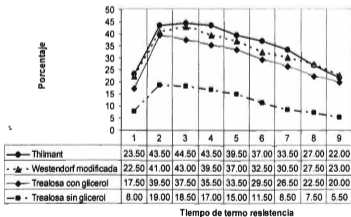


Figura 6. Medias para la termorresistencia evaluada en el semen descongelado con los diferentes diluyentes en nueve tiempos (de uno a 120 minutos, con intervalo de 15 entre una y otra).

Los resultados de la presente investigación son ligeramente inferiores a los que reportaron Cerolini *et al.*, (2001), cuando evaluaron la motilidad de eyaculados de 19 sementales, y las clasificaron en tres clases: alta, media y baja, según sus resultados después de la descongelación, y reportaron porcentajes de motilidad de 44.6, 42.1 y 27.7, para las clases alta, media y baja, después de una hora de descongelado e incubado el semen a 37°C, respectivamente. Posteriormente, a las cuatro horas de incubado el semen, reportan porcentajes de motilidad de 37.1, 37.6 y 22.5 y después de 6 horas obtuvieron motilidades de 35.5, 30.9 y 19.0%, para las clases alta, media y baja, respectivamente, los resultados que reportan a las 4 y 6 horas de incubación, son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Los resultados obtenidos en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, son similares a los que reportaron Tirapicos *et al.*, (2000), quienes compararon dos métodos de congelación de semen porcino (pellets vs maxi-pajillas) y evaluaron el porcentaje de motilidad espermática a los 15, 30, 45 y 60 minutos después de descongelado el semen a 42°C durante 40 segundos e incubado a 37°C (termorresistencia). Los mejores resultados los obtuvieron con el método de maxi-pajillas, encontrando diferencias altamente significativas ($P < 0.001$), y reportaron valores medios de 27, 37, 35 y 29% para motilidad espermática a los 15, 30, 45 y 60 minutos después de descongelado, diluido e incubado el semen a 37°C, respectivamente.

En el cuadro 15, considerando las covarianzas de las correlaciones por medio de regresión, se calcularon ecuaciones para poder predecir la motilidad, considerando el tiempo de termorresistencia. Como se observó en la figura 6, después del tiempo 4, hay una caída de la motilidad que de acuerdo a la regresión fue cuadrática. Sin embargo, el tiempo de máxima motilidad en los tratamientos más significativos pudiera ser suficiente para realizar la aplicación del semen dentro de una misma granja.

Cuadro 15. Ecuaciones de predicción de la motilidad de acuerdo al tiempo.

Thilmant	$Y = 21.75 + 9.58x - 1.10x^2$	$R^2 = 0.78$
Westendorf modificada	$Y = 22.98 + 7.47x - 0.86x^2$	$R^2 = 0.67$
Trealosa con glicerol	$Y = 18.93 + 7.54x - 0.87x^2$	$R^2 = 0.62$
Trealosa sin glicerol	$Y = 9.44 + 3.56x - 0.47x^2$	$R^2 = 0.70$

Y: Motilidad; X: tiempo de incubación intervalo de 15 minutos.

Todas las ecuaciones de predicción son moderadamente predictivas ya que las R^2 están alrededor de 70, y son de tipo exponencial de acuerdo al tiempo. Por lo que podemos predecir la motilidad.

V. CONCLUSIONES

1. Al comparar los diferentes tratamientos empleados para la criopreservación de semen porcino, se encontró diferencias significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos, manifestándose los mejores resultados en Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, no existiendo diferencias entre estos.
2. En la evaluación de la calidad del semen fresco y el semen congelado-descongelado, existieron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para las variables motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro; no así, para la variable espermatozoides normales, donde no hubo diferencia estadística.
3. Para las variables motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro en el semen descongelado, los mejores resultados los ofrecieron los tratamientos Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol, no encontrándose diferencias estadísticas ($P < 0.01$) entre estos, mientras que los valores más bajos para estas variables, fueron para el diluyente Trealosa sin glicerol.
4. En lo que respecta a la variable espermatozoides normales, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre los cuatro diferentes tratamientos utilizados para la criopreservación del semen porcino de este estudio.
5. Para los tratamientos Thilmant y Trealosa sin glicerol se encontraron correlaciones positivas significativas ($P < 0.01$) entre las variables motilidad y espermatozoides vivos; motilidad y espermatozoides vivos con acrosoma integro, así también con espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma integro.

6. Para el diluyente Westendorf modificado hubo correlaciones significativas ($P < 0.01$) entre las variables motilidad y espermatozoides vivos; motilidad y espermatozoides normales; motilidad y espermatozoides vivos con acrosoma íntegro; así también, espermatozoides vivos con espermatozoides normales y espermatozoides vivos con espermatozoides vivos con acrosoma íntegro.
7. En lo que respecta al diluyente Trealosa con glicerol, se hallaron correlaciones positivas significativas ($P < 0.01$) entre todas las variables analizadas.
8. Para la termorresistencia del semen congelado-descongelado en los diferentes diluyentes, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) obteniéndose los mejores valores en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y Trealosa con glicerol en cada uno de los tiempos de termorresistencia evaluados. Mientras que el valor más bajo se dio en el diluyente Trealosa sin glicerol para cada uno de los tiempos.
9. Finalmente, se puede concluir que si se afecta la calidad espermática y la sobrevivencia del semen porcino criopreservado en diluyentes que difieren en su composición. Con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación, se observó que los diluyentes que contienen glicerol (crioprotector permeable) presentan los mejores valores de calidad espermática, por lo que se recomienda el uso de estos diluyentes para la criopreservación de semen porcino.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YAGAJÁ



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

VI. LITERATURA CITADA

1. Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., Vázquez, I.A., and Chaloner, K.M. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Criobiology*. 28: 43 – 49.
2. Abeydeera, L.R. and Day, B.N. 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen – thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 57: 729 –734.
3. Aisen, E.G., Cisale, H., y Fernández, H. 1990. Criopreservación de semen ovino. *Vet. Argentina*. 63: 176 – 82.
4. Aisen, E.G., Álvarez, H., y Venturino, A. 1994. Acción de la trealosa sobre la criopreservación de semen ovino. *J Int Reprod Anim*. 1A. 285.
5. Aisen, E.G., Álvarez, H., Venturino, A., Larreguy, D., Garde, J., y Vázquez, I. 1996. Efecto comparativo de diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación de semen ovino. *Investigación Agraria*. 10: 223 –231.
6. Aisen, E.G., Álvarez, H., Venturino, A., and Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram seminal diluents. *Theriogenology*. 53: 1053 – 1061.
7. Aslam, M., Ahmad, K.M., Ahmad, M., and Gill, S.A. 1992. Additive effects of carbohydrates in tris as bull semen extenders equilibrated for three or five hours. *Pakistan Vet J*. 12: 174 – 177.
8. Bakás, L.S., and Disalvo, E.A. 1991. Effect of Ca^{2+} on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*. 28: 347 – 53.
9. Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., and Evans G. 2006. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with Different Avian Egg Yolk Types on *in Vitro* on Post-thaw Sperm Quality. *Reprod. Dom. Anim*. 41: 68 – 73.
10. Becerril, A.J. 1985. Avances en las técnicas para la preservación de semen porcino. XX Reunión Nacional AMVEC. 25 – 28.
11. Benítez, M.J.A. 2004. Comparación de la calidad del semen criopreservados con la técnica de Westendorf modificada en cerdos criollos y comerciales. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nayarit.
12. Bwañga, C.O. 1990. Cryopreservation of boar semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Uppsala, Sweden 13 – 113.
13. Bwanga, C.O. 1991. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. Department of Obstetrics and Gynecology. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. *Acta Vet. Scand*. Vol. 32 no. 4: 431 – 453.
14. Candy, C.J., Wood, M.J. and Whittingham, D.G. 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110: 11 – 19.
15. Castañeda, J., Becerril, J., y Valencia, J. 1996. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes de la congelación o después de la descongelación sobre la fertilidad, morfología acrosomal y motilidad de los espermatozoides. *Veterinaria México*., 27; 1.

16. Cerolini, S., Maldjian, A., Picci, F. and Giozzi, T.M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Journals of Reproduction and Fertility*. 121: 395 – 401.
17. Chen, Y., Foote, R.H., and Brockett, C.C. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hipotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Criobiology*. 30: 423 – 431.
18. Conejo, N.J.J. 1990. Manual de inseminación artificial del ganado porcino con semen diluido, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
19. Córdova, I.A. 1994. Capacidad fertilizante *in vitro* del semen porcino descongelado. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México, D. F.
20. Córdova, I.A., Peláez, L., Domínguez, J.C., Peña, F.J. y Alegre, B. 2000. Uso de semen congelado en la inseminación artificial del ganado porcino. Departamento de Producción Agrícola y Animal. México, D. F. 320 – 322.
21. Córdova, I.A., Pérez, G.J. y Martín, R.S. 2004. Fases previas y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5mL y capacidad de fecundación de los espermatozoides. *Universidad y Ciencia*. 20: (40): 61 – 68.
22. Córdova, I.A., Córdova, J.M.S., Córdova, J.C.A., Pérez, G.J. y Martín, R.S. 2005. Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides. *Ciencia ergo sum*. 12: (003): 271 – 274.
23. Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., and Anchordoguy T.J. 1989. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. In: Symposium on Cryosensitizing and Cryoprotective Agents at the 26th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charleston, South Carolina.
24. Dalimata, A.M., and Graham, J.K. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 48: 831 – 41.
25. De Mirjyn, A. 1997. Inseminación artificial en granjas porcinas. I Curso internacional de reproducción porcina. Memorias. México, D.F. 35 – 45.
26. De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., and Verkleij, A.J. 1991. The role membrana damage plays in cold shock freezing injury. Proc. Second Int. Conf. On Boar Semen Preservation. Beltsville, MD. USA. 95 – 104.
27. Diehl, J.R., Day, B.N., y Stevermer, E.J. 1995. Inseminación artificial en el cerdo. Compendio de la industria porcina. Servicio de extensión cooperativo Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana.
28. Echegaray, A. 2000. ¿Para cuando el semen de porcino congelado? <http://www.porcicultura.com/articulos>.
29. Echeverría, A.S., Alfonso, N.A., y Fell, N.A. 1998. Programa de transición para establecer la inseminación artificial en una empresa porcina. V simposium internacional de reproducción e inseminación artificial en porcinos. Memorias. León Gto. México. 215 – 224.
30. Eriksson, B.M., Petersson, H., and Rodríguez-Martínez H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*. 58:1065 – 1079.

31. Farstad, W., and Andersen, B.K. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fert Suppl.* 39: 289 – 292.
32. Fiser, P.S. 1991. Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar semen. *Proc. Second Int. Conf. On Boar Semen Preservation.* Beltsville, MD. USA. p 123 – 137.
33. Flowers, W.L., and Esbenshade, K.L. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *J. Reprod. Fert. Supp.* 48: 217 – 228.
34. Foote, R., Chen, Y., Brockett, C., and Kaproth, M. 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, and or blood serum. *J Dairy Sci.* 76: 1908 – 13.
35. Fraser, L., Gorszczaruk, K., and Strzezek, J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 325 – 329.
36. Gadea M.J. 2004. El uso de semen porcino congelado. *Mundo Ganadero.* 169: 60 – 62.
37. Gadea, J., Ruiz, S., Coy, P., Poto, A., Peinado, B., Romar, R., Campos, I., y Zubillaga, O. 1998. Fecundación in vitro con semen congelado en la especie porcina. *Arch. Zootec.* 47: 299 – 304.
38. Gadea, J., Ruiz, S., Selles, E., Romar, R., Matas, C., Coy, P., Poto, A., y Peinado, B. 2001. El uso de la fecundación in vitro para la evaluación de los sistemas de congelación de semen porcino. *ITEA* 22: 799 – 801.
39. Gadea, J., Ruiz, S., Selles, E., y Marco, M. 2003. Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino. *ITEA* 24: 330 – 332.
40. García, R.J.A. 1998. Evaluación práctica del semen. *Acontecer porcino.* 32: 34 – 41.
41. García, R.J.A., Lapuente, S., Corcuera, D., Sagüés, A., y Martín, R.S. 1998. Evaluación práctica del semen. Importancia de los resultados de fertilidad. V simposium internacional de reproducción e inseminación artificial en porcinos. *Memorias.* León, Gto. México. Pg. 27 – 36.
42. Garcia, M.A., and Graham, E.F. 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars and sugar alcohols on post thaw motility. *Theriogenology.* 31: 1029 – 1037.
43. Gilmbre, J.A., Du, J., Tao, J., Peter, A.T., and Critser, J.K. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fert.* 107: 87 – 95.
44. Gosálvez, L.F., Vidal, A., Valdeivira, J. y Babot, D. 2003. Influencia del tiempo de crioconservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heterospermicas con baja calidad. *Arch. Zootec.* 52: 81 – 84.
45. Guzman, A.L.E. 2003. Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen porcino. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit.
46. Hafez, E.S.E. 1997. Reproducción e Inseminación en animales. Ed. Interamericana. México. p 632 – 644.
47. Hellemann, M.V. y Jara, T.M. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Arch. Med. Vet.* 29 – 31.

48. Hernández, B.J.A. 1998. Variación anual de la calidad de semen porcino y su relación con parámetros reproductivos. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía.
49. Herrera, H.J.G. y Barreras, S.A. 2001. Manual de Procedimientos. Análisis estadístico de experimentos pecuarios (utilizando el programa SAS). Colegio de Posgraduados. 2ª ed.
50. (INEGI). Anuario Estadístico Nayarit. Edición (2005).
51. Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci* 62:143 – 172.
52. Lapwood, K.R., and Martin, I.C.A. 1966. The use of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37 °C and 5 °C. *Aust J Biol Sci.* 19: 655 – 971.
53. Levis, D.G. 1996. Artificial insemination of swine. Department of animal sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE. USA.
54. Macháty, Z., Takács, T., and Gáthy, I. 1992. Fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville TS (BTS) and Modified Kiev (MK) extender in relation to storage time and number of spermatozoa per insemination dose. *A. Reprod. Sci.* 29: 289 – 295.
55. Mann, T., and Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. In: *Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Berlin: Springer-Verlag.
56. Martín, R.S., Pintado, B., De Alba, C., Sánchez, R., García, P., Corcuera, D., Artiga, C., Sagúes, A., Díaz, C., Sáiz, F., and Pérez, M.C. 1996. Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development. *Reproduction Domestic Animal.* 31: 309 – 310.
57. Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. In: Johnson, LA, Larsson, K (eds), *Deep Freezing Boar Semen*. Proc 1st Int Conf Deep Freezing of Boar Semen. SLU, Uppsala, p. 91 – 111.
58. Medrano, A. y Holt, W.V. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zoot.* 47: 319 – 327.
59. Molina, F.C., Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1994. In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod Nutr Dev.* 34: 491 – 500.
60. Molihia, F.C., Evans, G., Casares, P.I., and Maxwell, W.M.C. 1991. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 36: 113 – 122.
61. Newth, M.S., and Levis, D.G. 1999. Change in pH boar semen extenders. *Nebraska Swine Report.* 3 – 6.
62. Pallas, R. y De Alba, C. 2003. Impacto de Nuevas Tecnologías de Inseminación Artificial sobre la Administración de un Centro de IA. *Cerdos – Swine*, 64: 18 – 22.
63. Paquignon, M. 1985. Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa. *Swedish Univ. Agric. Sci. Uppsala.* Pp 129 – 145.
64. Petzoldt, R. 1996. Ion movement on the boar sperm membrane during storage. *Reproduction Domestic Animal.* 31: 129 – 133.
65. Platov, E.M. 1988. Cryopreservation of ram spermatozoa. In: *Cryopreservation of spermatozoa of farm animals*. Leningrad: Agropromizda. 161 – 95.

66. Polge, C., Salamon, S., and Wilmut, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec*; 87: 424 – 428.
67. Poto, A., Peinado, B., Barba, C. y Delgado, J.V. 2000. Congelación de semen porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. *Arch. Zootec.* 49: 493 – 496.
68. Pursel, V.G., and 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., and Park, C.S. 1985. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: Johnson L.A., Larsson K. (Eds.), *Deep freezing of boar semen*, SLU, Uppsala, Sweden, 147-166.
70. Revell, S.G., and Glossop, C.E. 1989. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim. Prod.* 48: 579 – 584.
71. Rigau, T., Piedrafita, J., Reverter, J., Canal, M., and Rodríguez-Gil, J.E. 1996. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 161 – 172.
72. Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vázquez, J.M., and Arsenio, E.M. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoo. *Theriogenology.* 60: 77 – 87.
73. Rozeboom, K. 2000. Boar screening. *National Hog Farmer.* 45: 1 – 3.
74. Rudolph, A.S., and Crowe, J.H. 1985. Membrana stabilisation during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline. *Cryobiology.* 22: 367 – 377.
75. Ruiz, S., Selles, E., Gadea, J., Marco, M., and Murgas, L. 2002. Effect of freezing rate on boar semen frozen: preliminary result of AI. *Theriogenology.* 57: 480.
76. Sáiz, L.A. 2003. Congelación de semen porcino. *Hypor.* <http://www.porcicultura.com/articulos>.
77. Salamon, S., and Visser, D. 1972. Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Austr J Biol. Sci.* 25: 605.
78. SAS. 1999. *SAS/STAT User's Guide*. Release 6.12. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Company. Cary.
79. Schmeil, M., Vázquez, I., and Graham, E. 1986. The effect of non penetrating cryoprotectants added to test-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 23: 512 – 517.
80. Secretaría de programación y presupuesto y gobierno del Estado de Nayarit (SEPEGEN). 1996. En *síntesis geográfica de Nayarit*. Ed. Rekord Impresores S. A. México, D.F.
81. Selles, E., Gadea, J., Romar, R., Matas, C., and Ruiz, S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 66 – 72.
82. Singleton, W.L. 1997. Control points an IA program. I *Curso internacional de reproducción porcina*. Memorias. México, D. F. 52 – 57.
83. Storey, B.T., Noyles, E.E., and Thompson, K.A. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 37: 46 – 58.

84. Stewart, D.L. 1951. Store of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet. Rec.* 63: 65 – 66.
85. Sztejn, J.M., Farley, J.S., Young, A.F., and Mobraaten, L.E. 1997. Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing. *Cryobiology* 35: 46 – 52.
86. Talbot, P., and Chacón, R. 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zoo.* 215: 201 – 208.
87. Thilmant, P. 1998. Cryopreservation of boar semen in 0.5 ml frenches straws. 10th Meeting of A.I. Bruges, Belgium. p 1 – 15.
88. Thilmant, P. 1997. Congélation du Sperme de Verrat en Paillette de 0.5 ml. *Resultats sur le Terrain. Ann. Méd. Vét.* 141: 457 – 462.
89. Thomas, P.G.A., Larsen, R.E., Burns, J.M., and Hahn, C.N. 1993. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the preservation of canine semen. *Theriogenology.* 40: 1199 – 1205.
90. Tirapicos, N.J., Milhano, A., Charneca, R., Mendes, J. and Vila-Viçosa, M. 2000. Boar spermatozoa cryopreservation (pellets vs maxi-straws freezing). *CIHEAM – Options Mediterraneennes.* 41: 99 – 103.
91. Torretta, M.E., Wevar, V.C. y Forchetti, O. 1996. Calidad espermática *in Vitro*, del semen congelado en macropajuelas, micropajuelas y pastillas. *Avances en Producción Animal.* Vol. 21: 185 – 189.
92. Veksler, H.J., Ghirardi, M., Decaminada, E., Trezeguet, M., Lavalie, N. and Coppola, M. 1997. Ovine semen behaviour due to osmolarity and pH. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 21: 59 – 81.
93. Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A. and Miller, R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Soc. Rep. and Fert.* 131: 887 – 894.
94. Watson, P.F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Rep Fert.* 62: 483 – 492.
95. Watson, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lammig, G.E. (ed). *Marshal's Physiology of Reproduction.* 2. Reproduction in the male. Churchill Livingstone. Edinburgo. 747 – 869.
96. Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871 – 891.
97. Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebesperma. Labourund Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletenverfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 82: 261 – 267.
98. Wevar, C.C., Torretta, M.E., y Forchetti, O. 1997. Evaluación de dos técnicas de congelación de semen porcino. Resultados preliminares de fertilidad. *Latinoam. Prod. Anim.* 5: 448 – 449.
99. Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., and Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology.* 54: 579 – 585.