

Al Prof. Salvador Vegas y al DPTO.
de Producción Agrícola y Animal UAM-X.
Como un reconocimiento a su
excelente ayuda y colaboración durante la
realización de esta tesis.

¡¡ Mucha Gracia !!
A. Córdova F.



8390

~~12/11/21~~



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
Maestría en Biología de la Reproducción Animal.

Casa abierta al tiempo

**CAPACIDAD FERTILIZANTE IN VITRO DEL
SEMEN PORCINO DESCONGELADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL.**

P R E S E N T A :

EL MVZ ALEJANDRO CORDOVA IZQUIERDO

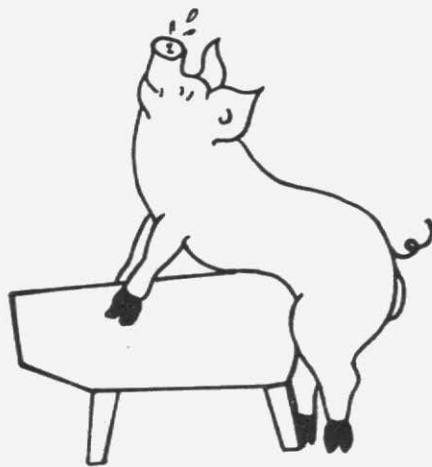
TUTOR:

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

MEXICO, D. F.

1994

COMO UN RECONOCIMIENTO ESPECIAL A LOS CERDOS, POR QUIENES
ESTA TESIS SE HIZO REALIDAD...



ALEJANDRO CORDOVA IZQUIERDO.

DEDICATORIAS.

* A mis padres: Sr. Benito Córdova de la Rosa y la Sra. Mercedes Izquierdo Jiménez, con todo mi cariño, respeto y admiración por darme la vida y el apoyo incondicional durante mis primeros pasos en mi formación profesional.

* Con todo mi amor a mi esposa Cleme, por el gran cariño, respeto y comprensión que me ha demostrado durante toda mi formación profesional.

* A mis hijos: Nelli, Silvia, Cristian y Gabi, por su gran cariño e inspiración, y por quienes la vida tiene más sentido para mí.

* Con todo mi respeto y cariño a mis hermanos: Octaviano, María, Marcelina, Aquileo y Francisca, por su comprensión desinteresada.

* Con todo cariño, respeto y admiración al Sr. Manuel Villuendas, Sra. Anita y a toda su familia, por su gran apoyo incondicional al iniciar mis estudios profesionales.

* A mis cuñados: Jesús, Rodolfo, Lázaro, Gabriel y Carlos, por su amistad desinteresada.

* Con cariño y respeto a mis cuñadas: Catalina, Noris, Elidia y Olga.

* Con gran admiración y respeto a Doña Adela, por su amistad incondicional y apoyo moral.

* A todos mis sobrinos, por su respeto y admiración; reciban esto como un ejemplo del trabajo y dedicación constante.

* En especial a la Srita. Claudia Díaz González Cortés, por su gran amistad y desinteresado apoyo moral.

* Al Sr. Fernando Sandoval, por su amistad y críticas constructivas valiosas.

* A todas aquellas personas, que de una u otra manera me han apoyado moralmente para alcanzar mis objetivos académicos.

AGRADECIMIENTOS.

* A Dios, por haber iluminado mi camino con su sabiduría infinita durante mi preparación académica.

* Al Dr. Miguel Betancourt Rule, por su excelente ejemplo de dirección y estilo de trabajo científico, expresado en la virtud de la sencillez humana.

* En especial a: Biol. Eduardo Casas, Biol. Edmundo Bonilla, M.en C. Yvonne Ducolomb, Srta. Irma Jiménez, Dra. Rocío Ortiz y M.en C. Cristina González y en general a todo el grupo del Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I, por su gran apoyo, asesoría y comprensión durante todo el tiempo de realización de esta tesis, caracterizado por una excelente relación de compañerismo.

* A los Drs. Miguel Arenas Vargas y Oscar Domínguez Vargas, por su orientación y excelente asesoría.

* A la Granja Experimental Porcina Zapotitlán de la FMVZ-UNAM, por la donación de las muestras de semen utilizadas.

* A los MVZ(s) Claudia García y MVZ Federico Villamil, por su colaboración desinteresada.

* A la Dra. Katherine Arancibia Salinas, por su amistad y gran apoyo.

* A los Drs. Marco Antonio Hidalgo y Rafael Bascós de la Comisión Nacional para el Mejoramiento Genético y la Reproducción Animal, A.C., por proporcionarme las pajillas y el nitrógeno líquido.

* Al Rastro ABC de Texcoco, por la donación de los ovarios para la obtención de los ovocitos.

* A la UAM-X, por todas las facilidades proporcionadas durante la realización de esta tesis.

* A todos mis profesores, por compartirme sus conocimientos y experiencias en el quehacer científico.

* A mis sinodales: Dr. Efraín Mercado, Dr. Javier Valencia, Dr. Alejandro Reyes y M.en C. Yvonne Ducolomb, por dedicar parte de su tiempo y experiencia científica en la revisión crítica del presente trabajo.

LUGAR DE REALIZACION.

Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. En el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, bajo la dirección del Dr. Miguel Betancourt Rule.

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO EN PARTE POR EL CONVENIO CONACYT-
1505-M9207.

INDICE.

	PAG.
I.- INTRODUCCION-----	1
1.- PROCESAMIENTO DEL SEMEN-----	5
A).- DILUYENTES -----	5
B).- AGENTES CRIOPROTECTORES-----	8
C).- ENVASES-----	11
D).- PROCESO DE CONGELAMIENTO-----	12
E).- PROCESO DE DESCONGELAMIENTO-----	15
2.- FERTILIZACION IN VITRO (FIV)-----	15
3.- CAPACITACION ESPERMATICA-----	17
II.- JUSTIFICACION-----	20
III.- OBJETIVOS-----	20
IV.- MATERIAL Y METODOS-----	21
V.- RESULTADOS-----	26
VI.- DISCUSION-----	30
VII.- BIBLIOGRAFIA-----	39

I.- INTRODUCCION.

El congelamiento y descongelamiento de material biológico se ha desarrollado con éxito desde 1949 cuando Polge y colaboradores reportaron por primera vez el poder crioprotector del glicerol. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies de mamíferos después de congelarlos en una solución que contenía este agente. A partir de entonces, se han desarrollado diversas técnicas usando el glicerol con el fin de crioconservar una gran diversidad de material biológico como ovocitos, embriones, células somáticas y espermatozoides (Polge y col., 1949; Wilmut y Polge, 1977a,b,c; Pickett, 1983; Becerril, 1985; Brackett y col., 1988; Hafez, 1989; Hammitt y Martin, 1989a,b,c; Bwanga, 1990; Kolon y col., 1992).

La conservación de material biológico a través del congelamiento es de gran utilidad en distintas disciplinas de las ciencias biológicas, puesto que puede ser almacenado por tiempo prolongado sin modificaciones importantes de sus características fisiológicas originales (Brackett y col., 1988; Hafez, 1989; Bwanga, 1990; Morshedi y col., 1990).

En los Centros de Reproducción Animal, esta metodología hace posible el óptimo aprovechamiento de los mejores animales reproductores, mediante el almacenamiento de sus gametos para su uso posterior, incluso cuando el reproductor ha sido desechado o sacrificado. Por otro lado, permite la conservación de material germinal para su uso y evaluación posterior de animales con características genéticas

ventajosas (Brackett y col., 1988; Hafez, 1989; Bwanga, 1990).

La posibilidad de almacenamiento por un tiempo prolongado del semen en un estado de congelamiento sin perder su capacidad fertilizante dió origen al inicio de una nueva era en el desarrollo de inseminación artificial (IA) en los animales de granja.

Ya han pasado más de 40 años desde los primeros experimentos exitosos sobre el congelamiento del semen de los mamíferos en presencia de glicerol y sin embargo, en la actualidad sólo ha tenido una aplicación práctica más generalizada en la IA del ganado bovino; en cuanto al ganado porcino su aplicación ha sido restringida (Polge y col., 1970; Becerril, 1985; Bwanga, 1990).

A continuación se describen los avances en los procedimientos para la criopreservación de espermatozoides, los cuales han jugado un papel excepcional en el desarrollo del conocimiento actual en la criobiología.

El congelamiento y descongelamiento principalmente dañan a la membrana celular (Graham y col., 1972), por lo que los esfuerzos de los investigadores en esta rama se han enfocado a la minimización y prevención de esos daños.

El principal efecto de las bajas temperaturas sobre los sistemas biológicos es la reducción del movimiento molecular y los efectos inhibitorios proporcionan medios adecuados para alcanzar la preservación de las células, tejidos y órganos por un tiempo prolongado (Bwanga, 1990).

El fenómeno de choque por frío (CHF) fue primero descrito en el semen de bovino y después en el de porcino. La

susceptibilidad de las células al enfriamiento rápido a pocos grados abajo de 0°C, no solamente ocurre en los espermatozoides; también se ha reconocido en la mayoría de las células expuestas (Mazur, 1984; Amann y Pickett, 1987). La susceptibilidad de los espermatozoides de los mamíferos varía intra y entre las diversas especies (Wilmot y Polge, 1977a,b,c; Mazur, 1985; Koehler, 1985; Hofmo y Almlid, 1991). El CHF sobre los espermatozoides se hace evidente por la presencia de muchas células espermáticas nadando en movimiento circular en lugar de hacerlo en forma rectilínea, pérdida prematura e irreversible de la movilidad, baja producción de energía, aumento en la permeabilidad de la membrana y pérdida de iones y moléculas intracelulares (Watson y Plummer, 1985).

La susceptibilidad del espermatozoide porcino al congelamiento está relacionada con factores intra y extracelulares. Los primeros, se asocian con las características propias de las células como la alta proporción de ácidos grasos polinsaturados-saturados y un bajo contenido de colesterol en sus membranas plasmáticas (Pursel, 1979). Los segundos, con la composición, tipo y método de adición del crioprotector, velocidad de enfriamiento y congelamiento, velocidad de calentamiento y descongelamiento, la proporción de dilución del crioprotector, así como el tipo de recipiente utilizado para su almacenamiento y el método de evaluación usado para descongelar (Pursel y col., 1978; Pursel, 1979; Hafez, 1989; Hammitt y Martin, 1989a,b,c; Bwanga, 1990; Fiser, 1991; Kolon y col., 1992).

La fracción rica en espermatozoides del semen porcino es más resistente al choque por frío que el eyaculado completo. Estos son extremadamente sensibles a la temperatura ambiente después de ser eyaculados, pero pueden recuperar su movilidad durante una incubación a 37°C (Pursel y col., 1972,1973,a,b) y está influenciada por factores, tales como: pH, dilución del semen y composición del diluyente (Pursel y col., 1972; 1973a,b).

El CHF afecta particularmente al acrosoma, con pérdida de su contenido, pero también se ha relacionado con la ruptura o pérdida de la membrana plasmática (Pursel y col., 1972).

Harrison y White en 1972, han estudiado la liberación de enzimas glucolíticas como la glucosa fosfato isomerasa y Lactato Deshidrogenasa (LDH) esto pudiera explicar parcialmente el daño causado a las células durante este proceso.

Los fosfolípidos específicos liberados por el espermatozoide porcino son propios de la membrana acrosomal, aunque pueden ser también de la membrana plasmática. Por otro lado, ocurre una alteración en la distribución de los iones como del calcio y magnesio de la célula espermática, así como una pérdida de ellos; resultando en un deterioro de la membrana plasmática del espermatozoide (De Leeuw y col., 1991).

El espermatozoide porcino epididimario es menos susceptible al frío que el eyaculado, debido a los cambios maduracionales que ocurren a lo largo del epidídimo, donde el contenido de lípidos de los espermatozoides disminuye considerablemente de la red de testis a la cola epididimaria, de tal manera que el desarrollo de la sensibilidad al CHF puede estar asociada

como ya se mencionó, con la composición fosfolipídica de las membranas plasmáticas de los espermatozoides (Nagai y col., 1988; Buhr, 1991; De Leeuw y col., 1991).

También el plasma seminal se ha asociado con la susceptibilidad de los espermatozoides al CHF. Se ha demostrado que el contacto de las células espermáticas con las secreciones seminales aumenta la susceptibilidad al CHF, probablemente debido a la integración de proteínas básicas en sus membranas (Moore y col., 1976).

Por esta susceptibilidad al CHF se han desarrollado diversas estrategias para lograr una adecuada recuperación de espermatozoides criopreservados para que no pierdan su integridad y sus funciones en la fertilización.

1.- PROCESAMIENTO DEL SEMEN.

Entre las razones por las cuales el semen tiene que ser diluido en un medio adecuado para su congelamiento están: abastecer nutrientes como fuente de energía, protección de los espermatozoides contra el daño por el enfriamiento y congelamiento, proporcionar un amortiguador para evitar los cambios perjudiciales del pH, mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico correcto (Hafez, 1989).

A).- DILUYENTES.

La sobrevivencia del espermatozoide porcino eyaculado en el plasma seminal está limitada solo a pocas horas, por lo que la remoción total del plasma seminal y la subsecuente resuspensión de los espermatozoides en un diluyente con las

características adecuadas, permite prolongar la sobrevivencia durante el proceso del enfriamiento-congelación (Paquignon, 1985).

Muchos de los diluyentes utilizados para congelar semen porcino fueron adaptados de los empleados para el congelamiento del semen de bovino (Paquignon, 1985; Bwanga, 1990).

A partir de los años 70, varios grupos de investigadores han desarrollado diversos diluyentes para la criopreservación del semen porcino (Polge y col., 1970; Visser y Salamon, 1974; Pursel y Johnson, 1975; Bwanga, 1990).

En la actualidad, se clasifican en dos grupos: con y sin componente amortiguador (Bwanga, 1990).

Dentro del primer grupo con amortiguador los componentes son: el Tris (hidroximetil aminometano), tris con fructosa y EDTA (ácido etilendiaminotetracético) en las concentraciones que se mencionan más adelante (Pursel y Johnson 1971; Visser y Salamon, 1974; Bwanga, 1990).

En el segundo grupo sin amortiguador se encuentran: yema de huevo (22.5%), glucosa (262 a 469 mM), fructosa (262 a 632 mM) y la lactosa (266 a 373 mM) en relación a los componentes del diluyente para congelar (Salamon y col., 1973; Visser y Salamon, 1974; Osinowo y Salamon, 1976; Wilmut y Polge, 1977a,b,c).

Cuando el diluyente no contiene amortiguador, ésta capacidad es reemplazada por la yema de huevo (Paquignon, 1985).

El daño ocurrido al espermatozoide porcino durante el proceso de congelamiento parece ser dependiente de la fuerza iónica de los diluyentes. La eficiencia de estos diluyentes es

menor, sobre todo cuando contienen una concentración baja en electrolitos (Visser y Salamon, 1974; Paquignon, 1985).

La mayor parte de los diluyentes para el congelamiento son iso o hipertónicos con respecto al plasma seminal. El espermatozoide porcino puede tolerar un intervalo relativamente amplio de presión osmótica, la cual puede ser de 280 a 420 mosm/kg H₂O. Sin embargo, el tipo de azúcar en el diluyente parece ser más importante que la tonicidad, Por el aporte energético que éstos proporcionan (Visser y Salamon, 1974; Paquignon, 1985; Bwanga, 1990).

El éxito de un diluyente va a depender de la combinación de varios factores como la concentración, el proceso de enfriamiento, el método de congelamiento y el criterio utilizado para la evaluación de la calidad del espermatozoide después del descongelamiento (Obando y col., 1979).

Los azúcares se añaden a los diluyentes para el congelamiento del semen porcino como factores osmóticos, mediante lo cual proporcionan crioprotección extracelular. La presión osmótica y los valores de pH de estos diluyentes se han ajustado a los parámetros normales que se encuentran en el plasma seminal de esta especie, los cuales son: 308 mosm/kg de presión osmótica y 7.3 a 7.9 de pH (Hafez, 1989; Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991; Rodriguez-Martinez, 1991).

Los azúcares no penetran a la membrana plasmática del espermatozoide porcino, por lo que se ha reportado que su acción de protección probablemente sea aumentando el porcentaje de agua no congelada a una temperatura dada o por la reducción de la concentración de sales en el agua extracelular (Mazur, 1984).

En la mayor parte de los diluyentes utilizados para el congelamiento del semen porcino, las proteínas y lipoproteínas se encuentran en la yema de huevo, la cual se agrega comunmente en un 20 %. Sin embargo, su eficacia como agente crioprotector es inferior a la del glicerol (Salamon y col., 1973). De tal manera, que el mecanismo por el cual la yema de huevo proporciona protección durante el proceso del congelamiento, aún no se conoce con precisión. Probablemente sea a través de una deshidratación celular menos intensa o por la estabilización de la membrana plasmática del espermatozoide de esta especie (Courten y Paquignon, 1985). En cuanto al Tris, la mayoría de los estudios mencionan una concentración de 200 mM (Pursel y Johnson, 1971; Paquignon, 1985). Aunque las concentraciones hasta 250 mM son eficaces. El EDTA proporciona alguna protección al espermatozoide porcino durante el proceso del congelamiento. Sin embargo, su efectividad puede variar de acuerdo a la composición del diluyente utilizado (Visser y Salamon, 1974).

B).- AGENTES CRIOPROTECTORES.

Desde el descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol por Polge y col., en 1949, otros agentes crioprotectores se han utilizados para asegurar la supervivencia de innumerables sistemas vivientes después de ser almacenados a bajas temperaturas. Pero a pesar de estos esfuerzos, en la actualidad pocas técnicas de criopreservación permiten una alta supervivencia después del congelamiento y descongelamiento, de tal manera que la

criopreservación de muchos sistemas han mostrado resultados pocos satisfactorios o infructuosos (Fahy, 1986).

Los crioprotectores no han resultado tan efectivos aún cuando son utilizados a velocidades óptimas de enfriamiento durante el congelamiento y de calentamiento, sin embargo durante el descongelamiento, juegan un importante papel en la protección de la membrana espermática (Mazur, 1984; Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

Los crioprotectores 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. En el primer grupo, se encuentran el glicerol, el dimetilsulfóxido, eritritol, adonitol y acetamida. En el segundo, se ubican 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 (Bamba y Adams, 1990; Bwanga, 1990; Anchordoguy y col., 1987 y 1991).

Aún cuando la concentración óptima del glicerol no ha sido establecida es de todos los crioprotectores antes mencionados el que más se ha incluido en los diluyentes para el congelamiento del semen, tanto del cerdo como de otras especies. Se ha reportado que concentraciones promedio entre 2 y 6 % han dado buenos resultados (Osinowo y Salamon, 1976; Murdoch y Jones, 1978; Hammit y Martin, 1989a,b,c; Bamba y Adams, 1990; Bwanga, 1990; Fiser, 1991; Hofmo y Almlid, 1991; Anchordoguy y col., 1991).

Existen reportes contradictorios en relación a la temperatura de exposición del semen porcino al glicerol (Maxwell y

Salamon, 1979). En la mayoría de los trabajos reportados, el glicerol es añadido a 5°C (Mazur, 1985; Paquignon, 1985; Bamba y Adams, 1990; Bamba y Cran, 1988a,b; Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

En 1988, Almlid y Johnson comparando el efecto del glicerol a 5 y 0°C; encontraron mayor movilidad e integridad del acrosoma y de la membrana plasmática del espermatozoide porcino después del descongelamiento, cuando el glicerol fue incorporado a 5°C, mencionando que a 20°C causa una reducción significativa en la calidad de los espermatozoides después del descongelamiento, en comparación con la adición a 5°C, sugiriendo un efecto tóxico del glicerol a temperaturas mayores a 5°C.

Existe poca información en relación al tiempo en que el glicerol penetra la membrana plasmática del espermatozoide porcino (Hofmo y Almlid, 1991). Sin embargo, la exposición al glicerol del espermatozoide porcino por 5 a 20 segundos a 5°C requiere mayores concentraciones que exposiciones más prolongadas. En relación a esto, en 1988 Almlid y Johnson investigaron diversos tiempos de exposición de espermatozoide porcino al glicerol. El semen fue expuesto al glicerol durante 0.5, 2, 5, 15 y 75 minutos, no encontraron diferencia de penetración en los diferentes tiempos, concluyendo que el glicerol penetra al espermatozoide porcino en pocos segundos y que el equilibrio se alcanza a los 30 segundos, por lo que el efecto de este agente crioprotector sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide porcino descongelado pudiera ser dependiente de la temperatura y tiempo de exposición.

Los intentos de combinar el glicerol con otros agentes crioprotectores no ha dado buenos resultados, de tal manera que en la actualidad es considerado como el agente crioprotector de vanguardia en el congelamiento del semen porcino (Paquignon, 1985; Hofmo y Almlid, 1991; Bwanga, 1990).

C.- ENVASES.

Uno de los primeros intentos de congelamiento de semen porcino fue en forma de pastillas, las cuales eran guardadas en contenedores plásticos para su conservación en nitrógeno líquido, con algunos problemas en su manejo e identificación (Pursel y Johnson, 1975).

Existen reportes que a partir de 1975, el congelamiento del semen porcino se realiza en máxi y minipajilas plásticas de 0.5 y 0.25 ml, con ciertas ventajas sobre el congelamiento en pastillas: mejor higiene, optimización del proceso de enfriamiento y congelamiento, reducción del equipo para el almacenamiento, fácil identificación, manejo y descongelamiento (Aalbers y col., 1985; Hammit y Martin, 1989a,b,c; Bwanga, 1990).

Se ha reportado que existen algunas diferencias entre la máxi y minipajilla en cuanto a su eficiencia, siendo esta última la que mejores resultado ha proporcionado ya, que la máxipajilla presenta cierto problema durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Durante el primer proceso, presenta diferencias de enfriamiento entre la parte central y periférica; y durante el segundo, existe un calentamiento

retardado en el centro comparado con el de la periferia (Weitze y col., 1991; Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

Aún no está claro si la mejor calidad del semen porcino descongelado almacenado en pajillas plásticas más pequeñas, es debido a las mejores condiciones de congelamiento y/o descongelamiento. Sin embargo, puede ser que se deba a una tasa de enfriamiento más rápido, cuando se usa minipajilla.

Actualmente se llevan a cabo experimentos para investigar la posibilidad de congelar el semen porcino en bolsas PVC y teflón con 5 ml de volumen, así como en macrotubos de 4 ml, sin embargo, aún requieren especial consideración en el diseño de procedimientos para la criopreservación (Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

D.- PROCESO DE CONGELAMIENTO.

El semen porcino difiere del de otras especies de animales domésticos, ya que es producido en mayor volumen y es extremadamente sensible al CHF, inmediatamente después de su recolección; sólo tolera relativamente bajos niveles de glicerol para el congelamiento. Estas características son de gran importancia a considerar en el procedimiento para su criopreservación (Larsson, 1978; Bwanga, 1990; Bwanga y col., 1990; Fiser, 1991).

Mazur en 1985, y en 1991 De Leeuw y col. reportaron algunos eventos relacionados con la sobrevivencia del espermatozoide porcino durante el congelamiento lento, rápido y ultrarápido. Durante el congelamiento lento, se forma hielo fuera de la célula, resultando una deshidratación, pero pueden sobrevivir por no congelarse internamente.

En el congelamiento rápido, también se forma hielo fuera de la célula, resultando una deshidratación parcial, pero no suficiente para evitar la formación de hielo dentro de la célula espermática, por lo que pueden también sobrevivir.

Durante el congelamiento ultrarápido, solamente son formados muy pocos cristales de hielo, tanto fuera como dentro del medio extracelular, los cuales no causan daño celular directo por deshidratación, resultando una excelente sobrevivencia (Mazur, 1985; Buhr, 1991; Hofmo y Almlid, 1991; De Leeuw y col., 1991).

Las temperaturas de enfriamiento por arriba del punto de congelación, especialmente en el enfriamiento rápido pueden provocar una pérdida de la movilidad espermática y de lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides, lo cual aumenta su permeabilidad, reduciendo su actividad metabólica, se producen daños al el acrosoma y en las concentraciones de electrolitos (Courtens y col., 1989).

Se han realizado numerosos estudios con respecto a la optimización del proceso de congelamiento del semen porcino, particularmente relacionados con la velocidad de enfriamiento. Se ha observado que cuando el congelamiento se realiza en vapor de nitrógeno líquido estático, la velocidad de enfriamiento es muy variable, la cual está relacionada con la distancia entre la superficie del nitrógeno y el material a congelar (Bwanga, 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

En 1990, Bwanga reportó algunas sugerencias que podrían ser de utilidad en el congelamiento del semen porcino, las cuales son:

- 1.- El equilibrio del semen debe llevarse a cabo en el diluyente durante el enfriamiento a 5°C, lo cual promueve la capacidad del espermatozoide para resistir el congelamiento y descongelamiento.
- 2.- El plasma seminal debe ser removido en su totalidad y los espermatozoides resuspendidos en el diluyente para el congelamiento, antes del enfriamiento por debajo de 5°C.
- 3.- Las concentraciones de espermatozoides que se han reportado para el congelamiento van de 0.45 hasta 4×10^9 espermatozoides/ml.
- 4.- Debe tomarse en cuenta que el espermatozoide porcino tolera relativamente bajas concentraciones de glicerol.

En la actualidad, se ha iniciado el uso de congeladores programables (PCT-200, Planer Products Ltd., England) los cuales han hecho posible el congelamiento del semen porcino a nivel comercial, ya que permiten un mejor control durante el proceso de congelación bajo condiciones estandarizadas, lo que bajo condiciones de nitrógeno líquido estático, difícilmente se alcanza, lo cual puede ayudar en el futuro a la criopreservación en general y del semen porcino en particular (Pursel y Park, 1985; Bwanga, 1990; Bwanga y col., 1990; Hofmo y Almlid, 1991).

E.- PROCESO DE DESCONGELAMIENTO.

La velocidad de descongelamiento es un factor tan importante para la supervivencia del espermatozoide porcino, como lo es la de enfriamiento, esto ha sido demostrado con el semen de toro (De Abreu y col., 1979) y con el de cerdo (Pursel y Johnson, 1975) en donde se ha reportado mayor movilidad y mejor mantenimiento de la integridad del acrosoma después de un calentamiento rápido.

El semen congelado en pajillas plásticas se ha descongelado a temperaturas que varían entre 35 y 90°C, durante 15 y 120 segundos. Sin embargo, la mayoría de los estudios respecto a la temperatura y tiempo de descongelamiento para las maxi y minipajillas sugieren descongelar en baño de agua a 50°C durante 40 y 20 segundos, respectivamente. De tal manera que la temperatura del semen recién descongelado bajo este sistema está entre 20 y 25°C al momento de retirar las pajillas del baño de agua caliente (Mazur, 1977; Bwanga, 1990).

2.- FERTILIZACION IN VITRO (FIV).

La FIV en mamíferos la inició Chang en 1959 en conejos. El conocimiento de los fenómenos reproductivos han contribuido de manera decisiva a mejorar y optimizar esta técnica, ayudando así a la optimización de su eficiencia reproductiva. Se han utilizado como modelos experimentales animales de laboratorio tales como: ratón, criceto, gato, perro y animales domésticos, entre los que se encuentran el cerdo, borrego y la vaca (Brackett y col., 1988; Nagai y col., 1988;

Mattlioli y col., 1989; Bavister, 1990; Betancourt y col., 1993). También se han realizado estudios en humanos con fines de reproducción asistida (Morshedi y col., 1990).

En particular, en el cerdo la FIV ha sido aplicada en investigación básica y técnicas de producción animal. En el primer caso se ha contribuido al conocimiento de la biología de los gametos de mamíferos desde su maduración e interacción del espermatozoide con el óvulo hasta las primeras etapas del desarrollo embrionario, favorecido por la gran cantidad de ovocitos que pueden ser colectados en los rastros y de espermatozoides en las granjas, contribuyendo de esta manera al desarrollo de la metodología de la FIV porcina (Yoshida, 1987; Yoshida y col., 1990; Rath, 1991; Betancourt y col., 1993).

En la crianza comercial porcina, la FIV ha sido utilizada para reducir el intervalo entre generaciones y para producir lechones con valor genético superior. En combinación con las técnicas de congelamiento de ovocitos y espermatozoides, la FIV ha contribuido al establecimiento de un banco de genes con características genéticas comercialmente importantes para esta especie (Hammit y Martin, 1989a,b,c; Nagai, 1988).

No obstante, que en cada una de las aplicaciones de la FIV existen avances importantes, su progreso y aplicación ha sido lento, debido a problemas relacionados con la técnica en relación a su complejidad y costo, interpretación de sus resultados y a la diversidad de técnicas empleadas por los diversos investigadores (Austin, 1990 citado por Ambriz, 1993).

Nagai y col. (1988), quienes realizaron FIV en cerdo utilizando espermatozoides epididimarios y eyaculados criopreservados, sólo obtuvieron éxito con los primeros. Dada la dificultad para obtener espermatozoides epididimarios, es importante establecer una técnica que permita utilizar espermatozoides eyaculados como alternativa para la FIV.

3.- CAPACITACION ESPERMATICA.

En 1951, Austin y Chang en forma independiente observaron por primera vez que los espermatozoides recién eyaculados no podían penetrar al óvulo, sin antes permanecer por algún tiempo en el aparato reproductor femenino, en donde sufrían cambios fisiológicos y adquirían su capacidad fertilizante, a este proceso se le ha llamado capacitación y se cree que se inicia en el útero, sin embargo, parece ser que el principal sitio es el oviducto, específicamente en su región ístmica (Austin, 1951; Chang, 1951 reportados por Knobil y Neill, 1988; Pursel, 1983; Crabo, 1985; Hamano y col., 1989; Buhr, 1991), aunque este fenómeno hace ya 42 años de haberse descubierto, su significado biológico aún no está claro.

Aunque la permanencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino sea un requisito general, para que se lleve a cabo su capacitación, el tiempo varía en función de la especie: los del ratón requieren menos de una hora, en tanto que los del conejo necesitan por lo menos 5 ó 6 horas para alcanzar su plena capacidad fertilizante. Los espermatozoides de ovino y porcino requieren de 1.5 y 3 a 6 horas, respectivamente (Crabo, 1985).

Chang en 1957, observó que los espermatozoides de conejo capacitados pierden su capacidad fecundante al ser incubados en plasma seminal de conejo, toro u hombre; pero estos mismos espermatozoides ahora descapacitados, recobraban su habilidad fertilizante tras permanecer en el aparato genital femenino. Estas observaciones indican que existe un factor de descapacitación en el plasma seminal y que debe ser eliminado antes de que la célula espermática adquiriera nuevamente su capacidad fertilizante. Este factor se ha encontrado en los fluidos del aparato reproductor masculino, incluidos testículos y epidídimo, pero el papel que juegan aún está en debate. La eliminación del factor descapacitante puede dar como resultado la activación de una o más enzimas acrosómicas necesarias para llevar a cabo la fertilización, provocando una alteración de la membrana. Este factor se une a la membrana espermática estabilizándola e impidiendo la liberación de enzimas acrosómicas. Independientemente del mecanismo, la capacitación espermática supone la eliminación o inactivación de los agentes presentes en el plasma seminal que se encuentran unidos a la cabeza del espermatozoide (Crabo, 1985; Buhr, 1991).

En las especies animales, antes de que se lleve a cabo la fertilización se realiza un fenómeno llamado "reacción acrosomal", algunos autores lo consideran parte del proceso de capacitación espermática, mientras que otros lo estiman como una consecuencia de ésta (Crabo, 1985; Knobil y Neill, 1988; Buhr, 1991).

Austin en 1967 y Bedford en 1970 (reportados por Knobil y Neill, 1988) mencionaron que la capacitación y reacción

acrosomal pueden considerarse como dos fenómenos separados, en donde la capacitación es una serie de cambios estructurales que provocan una alteración en su membrana plasmática que hacen al espermatozoide capaz de sufrir la reacción acrosomal.

La reacción acrosomal consiste en la ruptura y fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, seguido por una vesiculación extensa en el segmento anterior del acrosoma, lo cual permite la liberación de las enzimas acrosómicas hidrolíticas como la hialuronidasa y acrosina. La fusión de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, permite que quede expuesta la membrana acrosomal interna.

Se estima que el espermatozoide capacitado experimenta la reacción acrosomal con la consecuente liberación de enzimas cuando ha establecido el primer contacto con el ovocito que implica: reconocimiento (específica de especie) y penetración de la masa del cúmulo ovífero y la corona radiada. Aún está en discusión el papel del cúmulo ovífero para inducir la reacción acrosomal del espermatozoide porcino (Crabo, 1985; Knobil y Neill, 1988).

Se ha reportado que en cerdos, una población de espermatozoides capacitados comienzan a estar disponibles para la fertilización 2 a 3 horas después de la monta natural o inseminación artificial con semen fresco (Hunter, 1972; Pursel, 1983). Sin embargo, a pesar de que se han generado numerosas investigaciones sobre la capacitación espermática, se cuenta con poca información relacionada con los efectos del congelamiento sobre el tiempo de capacitación del

espermatozoide porcino (Pursel, 1983; Crabo, 1985; Buhr, 1991).

II.-JUSTIFICACION.

Para llevar a cabo estudios de FIV en cerdos es necesario contar con la disponibilidad de muestras de semen con las características adecuadas en el momento que se requiera.

El semen de cerdo descongelado ha sido usado principalmente para llevar a cabo IA in vivo, muy poco ha sido utilizado con fines de emplearlo para FIV y menos aún para conocer cual sería el efecto de la criopreservación en este fenómeno. Estudios sobre este tema serían importantes ya que ayudarían a utilizar muestras de semen con la misma variabilidad de respuesta en la FIV, dado que cuando se utiliza semen fresco de cerdo para estudios in vitro la variabilidad en las características fisiológicas del semen es muy amplia, aún en diferentes eyaculados del mismo cerdo (Berger y col., 1989).

III.- OBJETIVOS.

GENERAL.

Determinar la capacidad de fertilización in vitro del semen porcino descongelado.

PARTICULARES.

1.- Establecer las diversas variables que influyen en una óptima eficiencia de descongelamiento del semen porcino:

a).-Componentes del diluyente.

b).-Envases.

c).-Tiempos de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento.

2.- Determinar la capacitación in vitro del semen porcino descongelado.

HIPOTESIS.

El proceso de congelamiento y descongelamiento del semen porcino bajo condiciones controladas de laboratorio no cambia sus propiedades fertilizantes in vitro.

IV.- MATERIAL Y METODOS.

La metodología propuesta para la congelación y descongelación del semen en el presente trabajo, fue el resultado de la integración de diversas técnicas, las que después de varios ensayos permitieron obtener los resultados mostrados (para revisión ver, Bwanga, 1990; Johnson y Rath, 1991).

OBTENCION Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

El semen utilizado fue proporcionado por la "Granja Experimental Porcina Zapotitlán" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El eyaculado se obtuvo por método de la mano enguantada (Fraser, 1971; King y Macpherson, 1973) y se depositó en un termo, separando el semen de la parte gelatinosa del

eyaculado filtrándolo a través de una gasa. Inmediatamente después se evaluó el volumen, movilidad y concentración de espermatozoides por ml.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

El semen se centrifugó en un tubo de policarbonato a 350 g por 10 min, en cantidad suficiente para tener una concentración de 160×10^6 espermatozoides/ml en la suspensión celular para congelar (Visser y Salamon, 1974; Osinowo y Salamon, 1976; Maxwell y Salamon, 1979). Se retiró el plasma seminal y el paquete celular se llevó a 4.5 ml a temperatura ambiente con el diluyente A (Tris 200 mM, ácido cítrico 70.8 mM, glucosa 55.51 mM, 25% de yema de huevo y 0.1 g de dihidroestreptomomicina en 100 ml de diluyente) (Comunicación personal: Laboratorio de Biología Celular, UAM-I y CONAMEGRA). La suspensión se enfrió en un cuarto frío de 1 a 1.5 h hasta alcanzar una temperatura de 5°C (Bwanga, 1990).

Posteriormente, en 2 etapas con intervalo de 15 min. se agregaron 4.5 ml, a 5°C del diluyente B (Tris 200 mM, ácido cítrico 70.8 mM, glucosa 55.51 mM más glicerol suficiente para tener una concentración de 5% en la suspensión final), manteniéndose a 5°C por 3 h, tiempo de equilibrio suficiente (Bwanga, 1990) para que el glicerol se difundiera a través de la célula. A continuación, la muestra se envasó por succión muy leve en mini y maxipajillas (aproximadamente 10 de cada una por ensayo) con 0.25 y 0.5 ml, respectivamente. Posteriormente, las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico (Comunicación personal, CONAMEGRA).

CONGELAMIENTO.

Las pajillas se congelaron en la fase gaseosa a 5 cms de distancia de la fase líquida de un contenedor de nitrógeno líquido durante 9 min, para después sumergirlas, almacenándolas hasta su uso (Comunicación personal, CONAMEGRA).

DESCONGELAMIENTO.

Las mini y maxipajillas se descongelaron en un baño de agua a 50°C durante 20 y 40 segundos, respectivamente. Inmediatamente después se tomaron alícuotas para evaluar la movilidad al microscopio de contraste de fases.

FERTILIZACION IN VITRO (FIV).

La capacitación de los espermatozoides y FIV fueron realizadas por el método habitual, con algunas modificaciones que consistieron en el tiempo de capacitación y evaluación de los resultados de la fertilización después de la inseminación (Betancourt y col., 1993).

A).- CAPACITACION IN VITRO DE LOS ESPERMATOZOIDES.

Las muestras descongeladas, de 0.25 ó 0.5 ml, se resuspendieron en medio de capacitación (TALP-HEPES) previamente incubado a 37°C, hasta tener un volumen final de 1.5 ml, se incubaron a la misma temperatura durante 30 min, se tomaron alícuotas de 0.25 ml de la fase superior de la

suspensión de espermatozoides ("swim up") (Berger y col., 1985; Graczykowski y Siegel, 1991) y se depositaron en cajas de cultivo de 4 pozos, conteniendo cada uno 0.25 ml de medio de capacitación, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 2 h. El volumen final por pozo fue de 0.5 ml con una concentración de espermatozoides de 10 a 20 millones.

B).- EVALUACION DE LA REACCION ACROSOMAL.

Después de la capacitación se añadió zona pelúcida porcina solubilizada a una concentración final de 150µg/ml (Bonilla y col., 1993). Se incubaron durante 30 min más, con la finalidad de inducir la reacción acrosomal que se empleó como un índice de capacitación, dado que sólo los espermatozoides capacitados pueden desarrollar dicha reacción.

Se hicieron frotis con las suspensiones de espermatozoides, se dejaron secar al aire y se fijaron con 2 ó 3 gotas de acetona. Después de 24 h se les añadió una solución al 0.02% de lectina de cacahuete (Serrano y Díaz-Esparza, 1992) conjugada a isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chem, Co.). Se observaron las preparaciones al microscopio de fluorescencia, se evaluaron 100 espermatozoides en promedio por muestra y se determinó el porcentaje de reaccionados de acuerdo a las modificaciones observadas en el aspecto del acrosoma.

C).- FIV.

Los ovarios se obtuvieron de cerdas recién sacrificadas en el rastro ABC de Texcoco, México. Los ovocitos se obtuvieron por punción folicular y se maduraron en cajas de 4 pozos (NUNC) con medio 199 (MICROLAB) suplementado al 10% con suero fetal de ternera (MICROLAB), 1 mg/ml de glucosa (BAKER), piruvato de sodio 0.25 mM y 50 µg/ml de gentamicina (SCHERAMEX) por 48 h a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ escogiéndose solo aquellos que conservaron íntegramente sus células cúmulo y se coincubaron en presencia de 5×10^4 espermatozoides/pozo durante 24 h en las condiciones arriba mencionadas. Al cabo de este tiempo se colectaron los ovocitos y se fijaron con una solución de Carnoy (3 ml de metanol: 1 ml de ácido acético) por un tiempo mínimo de 1 h, se recuperaron de esta solución y se tiñeron con orceína acética al 2% y se examinaron al microscopio para evaluar la fertilización, determinando como ovocitos fertilizados a aquellos que presentaron los dos pronúcleos o un complemento diploide como producto de la singamia ocurrida, se comparó con muestras de semen fresco (Betancourt y col., 1993).

ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis de los datos se utilizaron las pruebas de χ^2 y la U de Mann-Withnney. La prueba de χ^2 se utilizó para analizar los resultados de la movilidad inmediata después del descongelado, la sobrevivencia y la capacitación de los espermatozoides (reacción acrosomal). La proporción de

ovocitos fertilizados se analizó utilizando la prueba estadística de U de Mann-Whitney, en donde se compararon todos los datos entre sí.

V.- RESULTADOS.

Las muestras de semen utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de cerdos de razas Duroc, Hampshire, Landrace, Spotted y de la cruce Duroc-Hampshire con una edad promedio de 2.5 años, y fertilidad probada. El eyaculado total promedio fue de 150 ml, con una concentración promedio de 300×10^6 espermatozoides por ml.

Solo se utilizaron los eyaculados que presentaron una movilidad de los espermatozoides del 80% inmediatamente después del eyaculado y 60% como mínimo antes del inicio del proceso de congelamiento, esta evaluación se realizó en cuatro campos y por 3 observadores experimentados. Después del descongelamiento se analizaron cinco indicadores de la función espermática, las cuales fueron valorandose de manera consecutiva: movilidad inmediata, sobrevivencia después de 3 horas, capacitación, reacción acrosomal y capacidad de fertilización in vitro.

En cuanto a los envases utilizados (maxi y minipajillas plásticas), no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Es por eso que en los resultados aquí mostrados ya no se mencionan.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de la movilidad obtenida inmediatamente después del descongelamiento en nueve diferentes ensayos, los cuales fueron realizados por duplicado y a un tiempo de almacenamiento en nitrógeno

líquido de 6 a 7 meses. Se obtuvo en promedio 50% de movilidad inmediata después del descongelamiento, comparado con la movilidad del 80% del semen fresco presentada inmediatamente después de la recolección, al comparar estos por medio de la prueba de X^2 presentaron diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$.

En el cuadro 2 se muestra la sobrevivencia obtenida de los espermatozoides en un tiempo de 2 a 3 horas después del descongelamiento y con un tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de 4 a 7 meses, en 10 ensayos diferentes, los cuales fueron realizados por duplicado. El promedio de movilidad obtenida fue de 60%, comparándolo con la movilidad del semen fresco (80%) a través de la prueba de X^2 , se encontró diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$.

En el cuadro 3 se muestra el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal después del descongelamiento. El promedio de la reacción acrosomal en los 16 ensayos realizados, fue de 50% comparado con el 48% obtenido con semen fresco. Al comparar estos por medio de la prueba de X^2 no presentaron diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$. Todas las muestras estuvieron congeladas por 4 meses, excepto las muestras 1 y 2 (6 meses).

En el cuadro 4 se muestra la proporción de ovocitos fertilizados con semen descongelado con un tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de 2 semanas a un año, en 6 ensayos diferentes, comparados con la proporción de FIV obtenida con semen fresco. La proporción de FIV obtenida con semen fresco fue de (0.85) y con semen descongelado de

(0.68). Al comparar estos resultados por medio de la prueba de U de Mann-Withnney presentaron diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0.05$, lo cual muestra que el proceso de congelamiento-descongelamiento sí afecta la capacidad fertilizante *in vitro* del espermatozoide porcino, pero sin embargo, la proporción de ovocitos fertilizados con semen descongelado es adecuada para utilizarse en estudios de FIV.

CUADRO 1		
MOVILIDAD PRESENTADA POR LOS ESPERMATOZOIDES INMEDIATAMENTE DESPUES DEL DESCONGELAMIENTO.		
RAZA	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN N2 LIQUIDO.	PORCENTAJE RELATIVO DE MOVILIDAD.
HAMPSHIRE 158-7	6 MESES	50
HAMPSHIRE 158-7	6 MESES	40
DUROC 89-1	4 MESES	50
DUROC 89-5	6 MESES	50
DUROC 89-5	6 MESES	50
DUROC 89-5	6 MESES	60
DUROC 89-5	6 MESES	50
DUROC 25-2	7 MESES	50
DUROC 25-2	7 MESES	60
		$\bar{X} = 50 \pm 5.6$

**CADA ENSAYO FUE POR DUPLICADO.
LA EVALUACION SE REALIZO POR MEDIANTE LA TECNICA DE OBSERVACION DIRECTA.**

CUADRO 2
SOBREVIVENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DESPUES DEL
DESCONGELAMIENTO.

RAZA	ALMACE. EN N ₂ LIQUIDO.	TIEMPO (HORAS)	PORCENTAJE RELATIVO DE MOVILIDAD
DUROC 25-2	7 MESES	3.0	50
DUROC 25-2	7 MESES	2.5	70
DUROC 89-5	6 MESES	3.0	50
DUROC 89-1	4 MESES	3.0	50
DUROC 89-1	4 MESES	2.0	70
DUROC 89-1	4 MESES	2.5	60
DUROC 89-1	4 MESES	2.5	60
DUROC 89-5	6 MESES	2.5	70
DUROC 89-5	6 MESES	2.0	70
DUROC 89-5	6 MESES	2.5	70
			$\bar{X}=60\pm 8.7$

LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR DUPLICADO. SE USO LA TECNICA DE OBSERVACION DIRECTA.

CUADRO 3
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON REACCION ACROSOMAL
DESPUES DE DESCONGELADOS.

RAZA	PORCENTAJE DE REACCION ACROSOMAL
DUROC 89-5	42
DUROC 89-5	62
DUROC 89-1	52
DUROC 89-1	61
DUROC 89-1	43
DUROC 89-1	51
DUROC 89-1	54
DUROC 89-1	50
DUROC 89-1	50
DUROC 89-1	54
DUROC 89-1	49
DUROC 89-1	47
DUROC 89-1	41
DUROC 89-1	53
DUROC 89-1	50
DUROC 89-1	41
$\bar{X}=50 \pm 6.1$	

TODAS LAS MUESTRAS ESTUVIERON CONGELADAS 4 MESES, EXCEPTO LAS MUESTRAS DEL DORC 89-1..
LAS MUESTRAS SE REALIZARON POR DUPLICADO.

CUADRO 4			
PROPORCION DE FIV CON SEMEN DESCONGELADO			
RAZA	TIEMPO ALMAC. EN N ₂ LÍQUIDO	SEMEN FRESCO	SEMEN CONGELADO
		PROPORCION DE OVOCITOS FERTILIZADOS	PROPORCION DE OVOCITOS FERTILIZADOS
DUROC 89-1	6 MESES	16/18 (0.89)	16/17 (0.94)
DUROC 69-3	9 MESES	8/9 (0.89)	12/21 (0.57)
DUROC 69-3	9 MESES	11/11 (1)	28/34 (0.80)
LANDRACE 8-5	11 MESES	10/14 (0.71)	17/28 (0.57)
DUROC-H 158-7	12 MESES	6/7 (0.86)	15/21 (0.65)
SPOTTED 66-5	2 SEMANAS	14/19 (0.74)	20/36 (0.56)
		$\bar{X}=0.85\pm0.09$	$\bar{X}=0.68\pm0.14$

LOS PARENTESIS REPRESENTAN LA PROPORCION DE OVOCITOS FERTILIZADOS, TANTO CON SEMEN FRESCO COMO DESCONGELADO.

VI.- DISCUSION.

La crioconservación de material biológico, especialmente de espermatozoides es de gran interés en los centros de reproducción animal, puesto que pueden ser conservados por tiempo prolongado sin modificaciones importantes en sus características fisiológicas originales, permitiendo de esta manera un aprovechamiento óptimo de los animales reproductores de mejor calidad, mediante la conservación de su material germinal para su uso y evaluación posterior, incluso cuando los animales van a ser desechados o sacrificados (Brackett y col., 1988; Hafez, 1989; Bwanga, 1990; Morshedi y col., 1990). Así mismo, la posibilidad de disponer de semen porcino mediante la crioconservación por un tiempo prolongado, sin perder sus características fertilizantes, permitirá mejorar las técnicas en la inseminación artificial porcina y en los estudios de

fertilización in vitro (Wilmot y Polge, 1977a,b,c; Nagai y col., 1988; Bwanga, 1990; Johnson y Rath, 1991).

Los factores que tienen efectos nocivos sobre el semen porcino sometidos a enfriamiento rápido han sido descritos en detalle (Watson y Plumer, 1985). Entre ellos se mencionan: la duración de los espermatozoides en el plasma seminal después del eyaculado, remoción del plasma seminal, la velocidad de enfriamiento, temperatura final antes de iniciar el congelamiento y la adición del agente crioprotector en el diluyente. Este último factor ha sido ampliamente discutido (Watson y Plumer, 1985; Paquignon, 1985).

En cuanto a la conservación de los espermatozoides en el plasma seminal, se ha reportado (Pursel y Park, 1985) que el tiempo óptimo de remoción del plasma seminal es de 2 horas antes de añadir el diluyente para el congelamiento; sin embargo, en el presente trabajo se ensayaron diferentes tiempos que van de 0 a 2 horas sin encontrar diferencia alguna. En cuanto a la velocidad de enfriamiento se ha estudiado en diversos trabajos (Johnson y Larsson, 1985; Bwanga, 1990; Johnson y Rath, 1991) utilizando congeladores programables, en los cuales al inicio del proceso, colocan los espermatozoides a 5°C como se hizo en este trabajo, dando un buen resultado.

Además se han investigado (Pursel y Park, 1985) diferentes períodos de enfriamiento a 5°C antes del congelamiento que van de 2 a 14 horas, en el presente trabajo se ensayaron diversos tiempos, desde 2 a 5 horas y el que se aplicó fue de el de 3.5 horas por ser el que mejores resultados nos proporcionó.

Para la realización de esta tesis se tomaron sólo las muestras de semen que presentaron espermatozoides con una movilidad del 80% inmediatamente después de la recolección, sin importar el tipo de cerdo, si no era así, la muestra era desechada. Todas las muestras se evaluaron antes del congelamiento con respecto a: volumen total del eyaculado, porcentaje de movilidad y cantidad de espermatozoides/ml. Después del descongelamiento se analizaron cuatro indicadores de la función espermática, las cuales se valoraron de manera consecutiva: movilidad, sobrevivencia, capacitación (reacción acrosomal) y FIV.

En este trabajo, el agente crioprotector utilizado fue el glicerol a una concentración del 5% en v/v de la solución final del diluyente que se añadió cuando éste alcanzó 5°C a las 1.5 horas de enfriamiento. En otros trabajos (Johnson y Larsson, 1985; Johnson y Rath, 1991) se han utilizado concentraciones de 2 a 10% de este mismo agente crioprotector, agregado a la misma temperatura, pues se ha observado (Bwanga y col., 1990) que concentraciones superiores afectan gravemente al espermatozoide porcino.

En otros trabajos (Healey, 1969; Visser y Salamon, 1974; Wilmut y Polge, 1977a,b,c; Murdoch y Jones, 1978; Maxwell y Salamon, 1979; Bwanga y col., 1990; Fiser, 1991) los tipos y concentraciones de los componentes del diluyente para el congelamiento entre los que se encuentran azúcares como: glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa y ribosa entre otros, destacando por su utilización los tres primeros, cuyas concentraciones van de desde 15 hasta 222 mM. La concentración que mejor resultado nos proporcionó, en cuanto

a la movilidad e integridad del acrosoma después del descongelamiento de los espermatozoides, fue la glucosa a una concentración de 55.5 mM.

Las concentraciones de Tris que se han reportado por los autores antes mencionados, presentan una gran variedad, las cuales oscilan entre 150 a 300 mM, en este trabajo los mejores resultados se obtuvieron utilizando una concentración de 200 mM.

En cuanto a las concentraciones de ácido cítrico, únicamente se reporta que se han utilizado cantidades suficientes, sin agregar más detalles. Por lo que en este trabajo se utilizó una concentración de 70.8 mM, basado en las concentraciones utilizadas en el diluyente para el congelamiento de semen bovino por parte de la Comisión Nacional para el Mejoramiento Genético y la Reproducción Animal, A.C. en Ajuchitlán, Querétaro, México (comunicación personal).

Por lo que respecta a la utilización de la yema de huevo para el congelamiento del semen porcino, coinciden en la concentración de 22.5% del total de los componentes, en el presente trabajo se utilizó este mismo porcentaje.

En cuanto al uso del antibiótico en el diluyente para el congelamiento del semen porcino todos los autores coinciden en el empleo de cualquiera de los siguientes: penicilina, gentamina, estreptomocina y dihidroestreptomocina (Larsson, 1978). En el presente trabajo se utilizó gentamicina en una concentración de 1 mg/ml de diluyente, dosis que se usa en el Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I para otros tipos de células.

En nuestro trabajo con espermatozoides eyaculados, el promedio de movilidad aumenta de 50% al momento de la descongelación, hasta el 60% después de 2.5 h, lo cual puede ayudar a obtener índices de FIV más altos. Esto podría explicarse por la remoción inmediata de los componentes del diluyente para el congelamiento de los espermatozoides y el restablecimiento de la temperatura a condiciones fisiológicas similares. Sin embargo, esta técnica de observación directa representa una medida subjetiva (Berger y col., 1985 y 1989), ya que las otras que se han reportado (Hafez, 1989; Woelders, 1991) implican el uso de aparatos, entre las que se encuentran la técnica de "Fotografía con tiempo de exposición" cuya característica principal es hacer una medición de la distancia recorrida por el espermatozoide, entre dos exposiciones; pero se debe contar con equipo fotográfico y cuarto oscuro y la otra es la de "Espectrofotometría", la cual realiza una medición del número de espermatozoides que cruzan una vía óptica en una unidad de tiempo, es simple y rápida sin embargo, no puede usarse para estudiar el patrón de movilidad o movimiento de células espermáticas individuales, ya que son sofisticadas y demasiado complicadas para la práctica rutinaria en el laboratorio.

Por lo expuesto anteriormente, diversos autores (Pursel y Johnson, 1975; Larsson y Einarsson, 1976; Moore y Hibbitt, 1977; Maxwell y Salamon, 1979; Hammitt y Martin, 1989a,b; Bwanga, 1990; Weitze y col., 1991) han utilizado y reportado porcentajes relativos para valorar la movilidad espermática, empleando para ello la técnica de "observación directa", la

cual es una medida subjetiva pero sin embargo, puede considerarse como confiable cuando es realizada por un observador experimentado, además, es una técnica simple, rápida y barata. Por otro lado, algunos autores (Rinehart y col., 1988; Woelders, 1991) han evaluado esta característica espermática utilizando una escala del 0 al 5, este método consiste en valorar la velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides, a través de la observación directa en donde en el 0 se consideran a los espermatozoides inmóviles, en el 1 a los que tienen un movimiento no progresivo, en el 2 a los que presentan un movimiento progresivo lento, en el 3 con buen movimiento progresivo, en el 4 a los que tienen un movimiento progresivo rápido y en el 5 a los que presentan una hiperactivación espermática. En este trabajo se utilizó la técnica de "observación directa" para valorar la movilidad antes y después del proceso de congelamiento-descongelamiento, empleando para ello la medida de porcentajes relativos.

Los resultados del presente trabajo muestran que los espermatozoides almacenados en congelación no pierden su poder fertilizante. En los diferentes ensayos efectuados (movilidad, sobrevivencia, reacción acrosomal y FIV) no se observó una variabilidad considerable entre las muestras de semen descongelado empleadas, lo cual sugiere que la técnica de congelamiento-descongelamiento empleada es altamente reproducible y fácil de aplicar en estudios de FIV. Esta baja variabilidad puede reportar grandes beneficios al utilizar semen porcino crioconservado, ya que se ha observado que en el caso de semen fresco se presenta una variabilidad muy

amplia entre los eyaculados de cerdos distintos, o incluso entre los eyaculados de un mismo cerdo (Berger y col., 1989), lo cual se observó durante el tiempo de realización de este trabajo con un eyaculado por semana, desde muestras excelentes hasta algunas que tenían que ser desechadas por no reunir el requisito de movilidad mínimo requerido (60%) antes de iniciar el proceso de congelamiento.

Se ha reportado (Hamano y col., 1989; Pursel, 1983; Bonilla y col., 1993) que los espermatozoides requieren de 2 a 6 horas para capacitarse en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo, el tiempo empleado en la capacitación fue de 2.5 horas, valorado mediante la reacción acrosomal.

Al comparar las características de las muestras de semen descongeladas con las muestras frescas, las cuales mostraron una movilidad del 80% antes de iniciar el proceso de congelamiento; se encontró que los espermatozoides criopreservados presentaron porcentajes de viabilidad y movilidad menores a los que presentan los espermatozoides de las muestras frescas en un 60%; sin embargo, los porcentajes de reacción acrosomal son semejantes. Esto es de gran importancia, ya que demuestra que durante el proceso de congelamiento y descongelamiento del semen porcino, los espermatozoides son afectados en su movilidad no así en cuanto a su capacidad la reacción acrosomal y FIV. Por otro lado, es de suma importancia observar que aunque el porcentaje de movilidad es menor en los espermatozoides crioconservados, su capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal es similar a la presentada por los espermatozoides frescos, lo cual demuestra que la técnica utilizada en este

trabajo es altamente eficiente para emplearse en estudios de FIV.

La técnica de congelamiento de semen bovino (Hafez, 1989) ha sido empleada con éxito, principalmente para utilizarse en la inseminación artificial. En humanos (Morshedi y col., 1990), ha permitido el uso de semen de individuos con problemas de fertilidad, lo cual se ha aplicado en los programas de reproducción asistida por medio de la FIV. En ambos casos, las técnicas de criopreservación establecidas han mostrado ser altamente reproducibles; manteniendo las características funcionales en el semen criopreservado.

Sin embargo, en cerdos (Nagai y col., 1988; Hammit y Martin, 1989a,b,c; Bwanga, 1990; Johnson y Rath, 1991) los resultados obtenidos después de la criopreservación, han sido muy diversos, esto ha llevado a los investigadores a ensayar una gran cantidad de variables incluyendo el uso de diversos diluyentes, crioprotectores, recipientes para el congelamiento y descongelamiento, etc. En el presente trabajo se realizó una adaptación de diversas metodologías, hasta lograr una recuperación de las características funcionales antes mencionadas que fueran reproducibles y de fácil aplicación, con el objeto de emplearse posteriormente en técnicas de FIV.

Uno de los trabajos relacionados con el uso del semen porcino criopreservado para fertilización in vitro (Nagai y col., 1988), hace una comparación entre la capacidad fertilizante del semen descongelado de origen epididimario y eyaculado, estos investigadores encontraron que los porcentajes de ovocitos fertilizados por espermatozoides epididimarios fue

de 0 a 40%, mientras que ninguna muestra del semen obtenido por eyaculación produjo fertilización.

Lo anterior contrasta drásticamente con nuestros resultados en donde se obtuvo en promedio el 68% de FIV empleando espermatozoides eyaculados, esta diferencia parece ser debida a la técnica empleada por ellos, en la que la movilidad después de la capacitación se encontraba muy disminuida (0-20%), resultados semejantes al obtenido por Clarke y Johnson en 1987, quienes reportaron que los espermatozoides de origen epididimario mantienen la movilidad alrededor del 50% hasta el momento de la fertilización. Quizá esto pueda deberse al tratamiento al cual fueron sometidos después de la recuperación del descongelamiento, consistente en centrifugar dos veces a 500g X 10 min., mientras que en el presente trabajo se utilizaron los espermatozoides recuperados del swim-up, los cuales se incubaron durante 2.5 horas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂, con los resultados de movilidad, reacción acrosomal y FIV que se reportan en este trabajo. Los cuales están de acuerdo con los reportados en 1994 por Techakumphu y col. quienes concluyen que el usar espermatozoides diluidos procedentes de swim-up aumenta el éxito en la FIV de ovocitos madurados in vitro.

Nosotros encontramos que el promedio de ovocitos fertilizados fue menor en los espermatozoides recuperados de la descongelación (68%) contra un 92.5% con las muestras de semen fresco; sin embargo, estos resultados encontrados con semen descongelado se consideran suficientemente adecuados para llevar con éxito estudios de FIV (Bavister, 1990).

Por otro lado. Es importante resaltar que se ha reportado (Hunter, 1991; Nagai, 1994) que en muchos ensayos, bajo diferentes condiciones del estro de la cerda, sobre todo cuando el número de espermatozoides se aumenta artificialmente, la polispermia es de 30-40%, mientras que en nuestras condiciones de trabajo in vitro con una concentración baja de espermatozoides 5×10^4 no se encontró en ninguno de los ensayos realizados; datos que concuerdan con los reportados por Betancourt y col. en 1993, al obtener una FIV del 50 al 70% y ningún caso de poliespermia.

Finalmente se puede concluir que el empleo de muestras de semen porcino congelado, y a futuro de ovocitos criopreservados, puede conducir a un mayor uso de la técnica de FIV y ser de utilidad para estudiar la fertilización en mamíferos, lo cual podría emplearse para aumentar la producción de cerdos y por otro lado, usar este modelo para estudiar el efecto de agentes tóxicos en la reproducción y desarrollo embrionario temprano.

VII.-BIBLIOGRAFIA.

Aalbers, J.G; Johnson, L.A.; Rademaker, J.H.M. y Tebrakej, H.A. 1985. Motility acrosome morphology, and capacity fertilizing capacity of boar spermatozoa frozen in pellets and straws. Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden. pp 277-181.

✓ Almlid, T. y Johnson, L.A. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thawed viability of boar spermatozoa frozen in straws. J. Anim. Sci. 66: 2899-2905.

✓ Amann, R.P y Pickett B.W: 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Equine Vet. Sci. 7: 145-173.

Anchordoguy, T.J.; Rudolph, A.S.; Carpenter, J.F. y Crowe, J.H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.

Anchordoguy, T.J.; Cecchine, C.A.; Crowe, J.H. y Crowe, L.M. 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* 28: 467-473.

Ambriz, D.A. 1993. Fertilización in vitro de ovocitos de cerdo madurados in vitro. Tesis de Maestría. UAM-I. CBS. México, D.F.

Austin, C R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-596.

Austin, C.R. 1990. Dilemmas in human IVF practice. En: **Fertilization in mammals**. Bavister, B.; Cummins, J.Roldan, E. (ed). Plenum Press. N.Y. USA. pp 373-374.

Bamba, K. y Cran, D.G. 1988a. Efecto of rapid warming of bull and rabbit semen. *J. Reprod. Fert.* 82: 501-507. Bamba, K. y Cran D.G. 1988b. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. *J. Reprod. Fert.* 82: 509-518.

Bamba, K. y Adams, L.C.E. 1990. Freezing rabbit semen by the use of BF5 diluent. *Laboratory Animals* 24: 172-175.

Bavister, B. 1990. Aplicaciones of IVF technology. En: **Fertilization in mammals**. Bavister; cummins, J.; Roldan, E. (ed). Plenum Press. N.Y. USA. pp 331-334.

Becerril, A.J. 1985. Avances en las técnicas para la preservación de semen porcino. **XX Reunión Nacional AMVEC** pp: 25-28.

Berger, T.; Marrs, R.P. y Moyer, D.L. 1985. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertility and Sterility* 43: 268-273.

Berger, T; Turner, K.O.; Meizel, S. y Hedrick, J.L. 1989. Zona pellucida induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.* 40: 525-530.

Betancourt, M.; Fierro, R. y Ambriz, D. 1993. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 40: 11155-1160.

Bonilla, E.; Amador, A. y Betancourt, M. 1993. Capacitación de espermatozoides de cerdo in vitro en un medio libre de albúmina. **XVII Reunión Anual. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Memorias.** pp 109-116.

Buhr, M.M. 1991. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics. *Proc. 2nd. Int. Conf. on Boar Semen Preservation, Beltsville, MD.* pp 95-104.

Brackett, G.B.; Seidel, G.E. y Seidel, M.S.1988. **Avances en zootecnia.Nuevas técnicas de reproducción animal.** España. Acribia. pp 143-181.

Bwanga, C.O. 1990. Cryopreservation of boar semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity.**Thesis.** Swedish University of Agricultural Sciencies.Faculty of Veterinary Medicine. Uppsala, Sweden pp 13-113.

Bwanga, C.O.; Braganca, M.M.; Einarsson, S. y Rodriguez-Martinez, H. 1990. Cryopreservation of boar semen in mini-and maxi-straws. En: Cryopreservation of Boar Semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Bwanga. **Thesis.** Uppsala, Sweden. pp 53-66.

Clarke, R.N. y Johnson, L.A. 1987. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa of acrosomal integrity and penetration of zona-free hamster ova in vitro. **Gam. Res. 16:193-204.**

Courtens, J.L. y Paquignon, M. 1985. Ultraestructure of fresh, frozen, and frozen-thawed spermatozoa of the boar. **Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen.** Uppsala, Sweden. pp 61-87.

Courtens, J.L.; Ekwall, H.; Paquignon, M. y Ploen, L.1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. **J.Reprod. Fert. 87: 613-626.**

Chan, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. **Nature 168: 997-998.**

Crabo, B.G. 1985. Post-testicular sperm maturation and its importance to deep freezing of boar semen. **Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen.** Uppsala Sweden pp 17-36.

De Abreu, R.M.; Berndtson, W.E.; Smith, R.L. y Pickett, B.W. 1979. Effect of post-thawing warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in french straws. **J. Dairy Sci. 62: 1449-1454.**

De Leeuw, F.E.; Colenbrander, B. y Verkleij, A.J. 1991. The role membrane damage plays in cold shock freezing injury. **Proc. Second Int. Conf. on Boar Semen Preservation**Beltsville, MD, USA. pp 95-104.

Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology 23: 1-13.**

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 pp 123-137.

Fraser, A.F. 1971. Boar semen sampling by electro-ejaculation. **Vet. Rec. 88: 20-210.**

Graczykowski, J.W. y Siegel, M.S. 1991. Motile sperm recovery from fresh and frozen-thawed ejaculates using a swim-up procedure. **Fertil. Steril.** 55: 481-843.

Graham, E.F.; Crabo B.G. y Brown, K.I. 1972. Effects of some zwitterion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. **J. Dairy Sci.** 55: 372-378.

Hafez, E.S.E. 1989. **Reproducción e inseminación en animales.** México. Interamericana. pp 632-644.

Hamano, S.; Naito, K.; Fukuda, Y. y Tyoda, Y. 1989. In vitro capacitation of boar ejaculated spermatozoa: effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. **Gamet. Res.** 24: 483-489.

Hammit, D.G. y Martin, P.A. 1989a. Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. **Theriogenology** 32: 359-367.

Hammit, D.G. y Martin, P.A. 1989b. Correlations among assays of porcine semen quality following cryopreservation **Theriogenology** 32: 369-383.

Hammit, D.G.; Martin, P.A. y Callanan, T. 1989c. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine semen quality before and after cryopreservation. **Theriogenology** 32: 385-399.

Harrison, R. y White, I. 1972. Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets for bull, boar and ram and their leakage after cold shock. **J. Reprod. Fert.** 30: 105-115.

Healey, P. 1969. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of semen domestic animals. **J. Reprod. Fert.** 18: 21-27.

Hofmo, P.O. y Almlid, T. 1991. Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. **Proc. Second Int. Conf. on Boar Semen Preservation.** Beltsville, MD. USA. pp 111-122.

Hunter, R.H.F. 1972. Ovulation in the pig: Timing of response to injection of human chorionic gonadotrophin. **Res. Vet. Sci.** 13: 356-361.

Hunter, R.H.F. 1991. Fertilization in the pig and horse. **A Comparative Overview of mammalian fertilization.** Plenum Press, N. y. pp 329-249.

Johnson, L.A. y Larsson, K. 1985. Future prospects for deep freezing of boar semen. **Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen.** Uppsala, Sweden. pp 245-253.

Johnson, L.A. y Rath, D. (ed) 1991. **Boar semen preservation II.** Paul Parey Scientific Pub., Berlin.

- King, G.J. y Macpherson, J.W. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. *J. Anim. Sci.* 36: 563-565.
- Koehler, J.K. 1985. Mammalian sperm membranes: Their mosaic form and differential sensitivities. *Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden.* pp 37-60.
- Kolon, T. F.; Philips K.A. y Buch, J.P. 1992. Custom cryopreservation of human semen. *Fertil. Steril.* 58:1020-1023.
- Knobil, E. y Neill, J.D. 1988. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press. N.Y. USA. pp 135-185.
- Larsson, K. 1978. Current research on the deep freezing of boar semen. *World Review of Animal Production Vol.XIVNo. 4.* pp 59-64.
- Larsson, K. y Einarsson, S. 1976. Influence of boars on the relationship between fertility and post thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet.Scand.* 17: 74-82.
- Matlioli, M.; Bacci, M.L.; Galeati, G. y Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31: 1201-1207.
- Mazur, P. 1977. The role intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell physiol. 16): C-125-142.
- Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. *Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala Sweden* pp 91-111.
- Maxwell, W.M.C. y Salamon, S. 1979. Fertility of frozen-thawed boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 32: 243-249.
- Moore, H.D.M.; Dall, G.A. y Hibbitt, K.G. 1976. Seminal plasma proteins in the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *J. Reprod. Fert.* 47: 39-45.
- Moore, H.D.M., y Hibbitt, K.G. 1977. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. *J. Reprod. Fert.* 50: 349-352.
- Morshedi, M.; Dehinger, S.; Veer, L.L.; Hakan, E. y Acosta, AA. 1990. Cryopreserved/thawed for in vitro fertilization: Results from fertile donors and infertile patients *Fertil. Steril.* 54: 1093-1099.
- Murdoch, R.N. y Jones, R.C. 1978. The effects of glycerol of the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 54: 419-422.

Nagai, T.; Takahashi, T.; Masuda, H.; Shioyo, Y.; Kumayama, M.; Fukushima, M.; Iwasaki, S. y Hanada, A. 1988. In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J.Reprod. Fert.* 84: 585-591.

Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* 41: 73-78.

Obando C, H.; Serrano O., A. y Aguirre M., M. 1979. Procedimientos para congelar y descongelar semen porcino. *Revista ICA (Bogotá, Colombia) Vol. XIII No. pp 107-112.*

Osinowo, O. y Salamon, S. 1976. Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust. J. Biol.Sci.* 29: 325-333.

Paquignon, M. 1985. Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa. *Proc. First Int. Con. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden. pp 129-145.*

Pickett, B.W. 1983. A short course on techniques for freezing mammalian embryos. *Animal Reprod. Lab.Colorado,State University. Fort Collins, Colorado 80523,USA pp 1-5*

Polge, C.; Smith, A.U. y Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

Polge, C.; Salamon, S.; y Wilmut, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87: 424-428.

Pursel, V.G. 1979. Effect of cold shock on boar sperm treated with butylated hidroxytoluene. *Bol. Reprod.* 21:319-324.

Pursel, V.G. 1983. Effect of processing of semen on capacitation time of fresh and frozen-thawed boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 56: 1161-1166.

Pursel, V.G. y Johnson, L.A. 1971. Frozen boar spermatozoa: Methods of thawing pellets. *J. Anim. Sci.* 42:927-931.

Pursel, V.G. y Johnson, L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99-102

Puser, V.G. y Park, C.S. 1985. Freezing and procedures for boar spermatozoa. *Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden. pp 147-166.*

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. y Rampacek, G.B. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34: 278-283.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. y Schulman, L.L. 1973. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 37: 528-531.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. y Schulman, L.L. 1973. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15C. *J. Anim. Sci.* 37: 532-535.

Pursel, V.G.; Schulman, L.L. y Johnson, L.A. 1978a. Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. *Biol. Reprod.* 19: 69-76.

Pursel, V.G.; Schulman, L.L. y Johnson, L.A. 1978b. effect of glycerol concentration on frozen boar sperm. *Theriogenology* 9: 305-312.

Rath, D. 1991. In vitro fertilization (IVF) in pigs. *Proc 2nd. Int. Conf. on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD.* pp 199-211.

Rinehart, J.S.; Bavister, B.D. y Gerrity, M. 1988. Quality control in the in vitro fertilization laboratory: comparison of bioassay systems for water quality. *J. of InVitro Fertilization and Embryo Transfer* 5: 335-342.

Rodriguez-Martinez, H. 1991. Aspects of the electrolytic of boar epididymal fluid with reference to sperm maturation and storage. *Proc. Second Int. Conf. on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD. USA.* pp 13-27.

Salamon, S.; Wilmut, I. y Polge, C. 1973. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 219-230.

Serrano, H y Díaz-Esparza, L. 1992. Determination of the pig acrosome reaction by lectin labelling. *Mol. Biol. Cell.* 3:13.

Techakumphu, M.; Srianan, W.; Singlor, J. y Tanatasuparak, W. 1994. Improvement of in vitro fertilization in pig by using diluted sperm. *Theriogenology* 41: 314.

Visser, D. y Salamon, S. 1974. Effect of composition of tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. *Aust. J. Biol.* 27: 485-597.

Watson, P.F. y Plumer, J.M. 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, Sweden.* pp 113-127.

Weitze, K.F.; Stampa, E.; Richter, L.; Willmen, T. y Waderski, D. 1991. Fertility of frozen boar semen: influence of packaging, number of inseminations, and seminal plasma. *Proc. Second Int. Conf. on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD, USA.* pp 139-142.

Wilmut, I. y Polge, C. 1977a. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1.-The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology* 14: 471-478.

Wilmut, I. y Polge, C. 1977b. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2.-The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology* 14: 479-482.

Wilmut, I. y Polge, C. 1977c. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 3.-The fertilizing capacity of frozen and thawed boar semen. *Cryobiology* 14: 483-491.

Woelders, H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Proc. Second Int. Conf. on Boar Semen Preservation*. Beltsville. MD. USA. pp 145-164.

Yoshida, M. 1987. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 711-718.

Yoshida, M.; Ishizaki, Y. y Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 88:1-8.