

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN PORCINO  
SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS POST-DESCONGELAMIENTO**

**ANA MARÍA MEJÍA MEJÍA**

**Director**

**Guillermo Henao R**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLIN  
2010**

**Nota de aceptación**

**Firma del presidente del jurado**

**Firma del jurado**

**Firma del jurado**

Medellín, agosto de 2010

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento especial a mi director de tesis Guillermo Henao por su apoyo, dedicación y confianza.

Quiero agradecer a el laboratorio de procesamiento de semen San Pablo, especialmente Luz Adiela y a las personas que directa e indirectamente me colaboraron durante la investigación

A mi esposo Carlos, porque en el momento oportuno supo brindarme su ayuda.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pag</b>
i. Lista de tablas y figuras.....	6
1. Resumen.....	7
2. Introducción .....	9
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. Marco teórico.....	14
5. Metodología.....	21
6. Resultados.....	25
7. Discusión.....	28
8. Conclusiones.....	31
9. Bibliografía.....	32

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>pág</b>
1	Porcentajes obtenidos.....	25
2	Análisis de varianza para movilidad, vitalidad y morfología.....	26
3	Análisis de varianza para Integridad de membrana acrosómica y para funcionalidad de membrana espermática.....	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>pág</b>
1 Movilidad, Vitalidad y Morfología Vs tratamiento, Intervalos LSD.....	26
2 Integridad y Acrosoma Vs tratamiento, Intervalos LSD.....	27

## 1. RESUMEN

Con el fin de evaluar el efecto del empaquetamiento de espermatozoides porcinos sobre la movilidad, la vitalidad y la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática, se recolectó un eyaculado en tres concentraciones antes de su congelación, a cada uno de nueve reproductores porcinos de razas Landrace, Duroc, Pietrain y Belga, ubicados en tres granjas comerciales del municipio de Rionegro. A cada eyaculado se le efectuó un análisis de la movilidad individual, verificando que fuera mayor a 80% y que tuviera un 70% de espermatozoides normales; luego se congeló a concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  millones de espermatozoides por pajilla de 0.5. Al semen criopreservado se le evaluó la movilidad individual, la integridad acrosómica, la integridad de la membrana, la vitalidad y la morfología, para determinar su diferencia entre las concentraciones. Los datos fueron estudiados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y para la observación del acrosoma e integridad de la membrana plasmática, se empleó un análisis de varianza de una vía. No se presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) de las características espermáticas posdescongelación entre los tratamientos, lo que indica que es posible empacar espermatozoides en las pajillas y concentraciones antes mencionadas, sin que se alteren sus características.

Palabras claves:

concentración semen, espermatozoides porcinos, pajillas 0.5 ml, semen porcino.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study is to evaluate the effect of the packing of porcine sperm on the mobility, the vitality, the integrity of the acrosoma and the one of the plasmatic membrane. The ejaculated was gathered in three concentrations before its freezing, and it was taken from each of nine porcine breeding of races Landrace, Duroc, Pietrain, and Belgian, located in three commercial farms of Rionegro's municipality. It was made an analysis of the sperm samples in terms of the individual mobility, checking that it was bigger than 80 % and that it had 70 % of normal spermatozoon. After that, semen was frozen at a spermatozoon concentration of  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$ , and  $0.4 \times 10^9$  million for a 0.5 milliliter straw. The individual mobility, the integrity of the acrosome, the integrity of the membrane, the vitality, and the morphology, were evaluated in the criopreservated semen to determine the difference between those different concentrations. The information was studied by means of an analysis of variance (ANOVA) of two routes. The observation of both, the acrosome and the integrity of the plasmatic membrane, was made by an analysis of variance of one route. There was no after freezing significant difference ( $p > 0.05$ ) in the spermatozoon characteristics among the treatments, which means that it is possible to pack sperm in the mentioned straws, and concentrations, without changing its own characteristics.

Key words:

Boar semen, boar semen concentration, boar Spermatozoa, straws 0.5 ml,

## 2. INTRODUCCION

En Colombia, la producción porcícola ocupa una importante posición en la industria agropecuaria, sin embargo, reportes hechos por la FAO a través del “Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia” informó en junio de 2005 que Colombia tuvo una balanza comercial de menos US32.000 para el comercio de cerdos vivos y de menos US2.861.000 para el comercio de carne de cerdo y derivados, lo cual indica que aun se siguen importando considerables cantidades de este producto aunque han disminuido las importaciones desde el 2000, lo que demuestra la incapacidad de las empresas colombianas para satisfacer la demanda interna de carne de cerdo. Sin embargo el consumo de carne de cerdo en Colombia ha aumentado en los últimos tres años ya que se pasó de 3 kilos por persona al año, a 4,5 kilos al cierre del 2007, con la expectativa de seguir creciendo a razón de medio kilo por año en adelante (portafolio.com.co). Este indicador salió a relucir en el primer día del XIV Congreso de la Asociación Colombiana de Porcicultores (Asoporcicultores) que se realizó en el Centro de Convenciones de Cartagena. Recientemente el brote del virus de la gripe porcina, ha causado la disminución de su consumo pero gracias a las campañas en que se demuestra que la carne de cerdo no tiene ninguna relación con dicho virus, se ve conveniente denominar este virus bajo el nombre de A-H1N1. <http://co.globedia.com/ica-entrego-informe-influenza-ah1n1>

Tendiendo a la masificación de la producción de carne porcina se aplican técnicas biotecnológicas para lograr obtener reproductores de alto valor genético que por consiguiente darán mayor producción de carne de mejor calidad. Una de esas técnicas es la inseminación artificial (IA) que fue creada para el mejoramiento genético acelerado de los animales. En porcinos se comenzó a practicar en la ex Unión Soviética en la década del treinta. Las primeras experiencias fueron practicadas por Milovanov en 1932 y a partir de la década del 60 y 70 se incrementa de manera notable el uso práctico y comercial de la IA en toda Europa, paralelamente se desarrollan los nuevos y específicos

diluyentes, así como también las adecuadas técnicas para la extracción, procesamiento y manejo del semen. (Bailey et al. 2008)

La aplicación de Inseminación Artificial (IA) se ha extendido y ha contribuido al mejoramiento genético acelerado por la utilización intensiva de reproductores de alto valor genético, la reducción del número de verracos en las granjas, la reducción de las posibilidades de introducción de enfermedades en las explotaciones, la facilidad para el manejo reproductivo al reducir los tiempos y el trabajo necesario, así como un mejor control de la calidad del semen (González, M, 2004).

El uso de semen porcino congelado se limita a la introducción de nuevo material genético de alto valor para inseminar cerdas puras en las granjas de selección, o bien asociados a labores de investigación. Sin embargo, el uso de semen congelado puede aportar ventajas sobre el semen refrigerado como son el transporte a largas distancias; la conservación durante un tiempo muy prolongado (años) con resultados productivos que mejoran progresivamente a medida que avanzan las investigaciones y se acercan a los obtenidos con semen refrigerado; el control sanitario, genético o productivo de los animales antes de su uso como reproductores (pruebas de progenie); el autoabastecimiento de dosis seminales en la propia granja sin necesidad de tener que disponer de verracos para recogida diaria de semen; la creación de bancos genéticos para razas en peligro de extinción o individuos de alto valor, o para propagación de líneas que se encuentren en circunstancias desfavorables, como por ejemplo, una posible prohibición en la movilidad de animales a causa de un brote infeccioso (Peste porcina clásica, fiebre aftosa, etc.) (Gadea, J. 2004.)

En la actualidad los resultados de la crioconservación de espermatozoides porcinos aún presentan una baja eficacia, a diferencia de lo que sucede con otras especies, debido a las limitaciones que todavía tiene esta técnica, su uso aún no se ha generalizado. El profesor Joaquín Gadea del Departamento Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia afirma que

si existiera una red adecuada de distribución de semen congelado, que produjera dosis seminales congeladas procedentes de animales de valor genético de excelencia y de calidad seminal suficiente, el ganadero únicamente debería mantener su dosis en un tanque de nitrógeno líquido (tal como hace el ganadero de vacuno lechero) y en el momento adecuado descongelar la muestra sobre un diluyente simple (por ejemplo BTS) y proceder a la inseminación en unas condiciones similares a las del semen refrigerado. El costo adicional de este proceso sería fácilmente contrarrestado por las mejoras productivas consecuencia de la introducción en la explotación de material genético mejor, y no directamente de la fertilidad obtenida en la utilización del semen congelado (Gadea, J. 2004.)

Un diagnóstico de la situación planteada lleva a identificar algunas dificultades; Uno de los problemas a solucionar es el mayor costo que presentan las muestras seminales congeladas principalmente debido al número de espermatozoides por dosis que es sensiblemente mayor en el caso de semen congelado frente al refrigerado para asegurar buenos resultados reproductivos usando dosis de  $3 \times 10^9$  espermatozoides cuando en refrigerado es de 0.2 a  $0.3 \times 10^9$ . De esta manera, de un eyaculado sólo se puede producir la mitad de dosis que en el uso común. Además, la producción de las dosis es más costosa en tiempo y materiales. Asimismo requiere un equipamiento sofisticado y costoso que sólo es rentable si la producción de dosis congeladas es elevada; por último el mantenimiento de las dosis en tanques de nitrógeno líquido de las muestras seminales es costoso ya que se necesitan varias pajuelas por inseminación, de manera que el consumo de nitrógeno líquido es importante.

Tratando de solucionar la dificultad derivado de la concentración de semen por pajillas, se han desarrollado trabajos de investigación en los que se plantea una inseminación profunda, utilizando una sonda que permite que los espermatozoides lleguen hasta la trompas uterinas, disminuyendo así la cantidad de espermatozoides requeridos para una inseminación (Saravia. et. Al, 2005).

Mucho tiempo antes de la constitución del grupo de Investigación en Biotecnología de la Universidad Nacional<sup>1</sup>, se ha venido trabajando en la congelación de semen porcino y el empaquetamiento de éste en pajillas, como las macropajillas según el método Beltsville (Hugo Gonzales, Luis Muñoz, 1984). Este mismo grupo ha continuado con sus investigaciones y se ha logrado congelar exitosamente espermatozoides porcinos en concentraciones de 400 millones por mililitro (datos sin publicar), en envases de 0.5 ml utilizando antioxidantes como aditivos protectores de membrana y ADN

Se plantea como hipótesis inicial que en dosis muy concentradas de espermatozoides los metabolitos y la cantidad disponible de sustancias protectoras de membrana hasta cierta concentración podría ser escasa para garantizar la supervivencia espermática, y éste exceso por unidad de volumen de diluyente interfiere con la distribución homogénea de sustancias crioprotectoras, permitiendo el deterioro y/o muerte de ellos. Por ello la propuesta investigativa planteada buscó mejorar el proceso de concentración de espermatozoides en pajillas de 0.5 ml, y continuar con el proceso investigativo del cual el grupo de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Nacional se ha ocupado, En éste trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de espermatozoides sobre las características espermáticas post-descongelamiento para intentar disminuir la cantidad de pajillas por dosis inseminante, y de ésta forma contribuir a disminuir los costos de almacenamiento del semen porcino congelado.

---

<sup>1</sup> La autora de ésta propuesta hace parte de dicho grupo desde 2004

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de espermatozoides porcinos empacados en pajillas de 0.5 ml sobre las características espermáticas post-descongelamiento.

#### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar la integridad acrosómica de espermatozoides porcinos congelados en pajillas de de 0,5ml a con concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla.
- Comparar la integridad de membrana de espermatozoides porcinos congelados en pajillas de de 0,5ml con concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla, mediante el test hiposmótico.
- Comparar movilidad individual de espermátosoides porcinos congelados en pajillas de 0.5 ml con concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ , 0.8 y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla.
- Comparar la vitalidad de espermatozoides porcinos congelados en pajillas de 0.5 ml con concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla

#### 4. MARCO TEORICO

La inseminación artificial (IA) se ha perfeccionado desde sus inicios en la década de los años 30 en la ex-URSS, después con las primeras publicaciones de Chris Polge en el año de 1956, seguido por el desarrollo del catéter en espiral por Melrose y Cameron hasta la mejora de los diluyentes, procesamiento y técnica (Polge 1970) y Solo en la década del 60 y 70 se incrementa de manera notable el uso práctico y comercial de la IA en toda Europa. La IA es una práctica corriente en los grandes países productores de cerdos, sustituyendo prácticamente la monta natural, de tal manera que del 100% de la hembras, un alto porcentaje es cubierta por IA, es el caso de España con 82%, Noruega 70%, Alemania y Francia 50%, Pero en nuestro país no es muy utilizado este método, y en países cómo en Argentina solo llega al 4% (González, M, 2004)

La criopreservación de semen es una técnica accesoria para la inseminación artificial y la fertilización *in vitro* y ha jugado un papel bastante importante en los últimos 50 años en el mejoramiento reproductivo en diferentes especies de animales. Con estas técnicas, se ha logrado realizar mejoramiento genético de hatos, prevenir y controlar enfermedades, hacer un control reproductivo del hato, mejor aprovechamiento de los sementales y obtener un mejor rendimiento económico. (Gadea,J. 2004 y Gadea J. *et al* 2001)

Numerosos estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en la fertilidad. Están involucrados en las funciones fisiológicas espermáticas incluyendo la hiperactivación, capacitación, reacción acrosómica y la zona de unión. Consecuentemente, cuando el equilibrio entre la producción de ROS y la desintoxicación de los antioxidantes se interrumpe, un exceso de ROS crea un estrés oxidativo, que se sabe detienen la motilidad y bloquean el metabolismo oxidativo en espermatozoides. (Großfeld *et al* 2008)

Se ha demostrado en humanos, toros y espermatozoides de ratón que la criopreservación se asocia con el estrés oxidativo sobretodo en los

espermatozoides porcinos ya que son muy sensibles a los daños peroxidativos debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática y la relativa baja capacidad antioxidante del plasma seminal. Por otra parte, la congelación y descongelación sus espermatozoides pueden aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo daños en el ADN, alteraciones del citoesqueleto, inhibición en la fusión espermato-óvulo y que afectan el axonema espermático que se asocia con la pérdida de la motilidad (Breininger, E. *et al.* 2005 y Peña *et al.* 2003).

El daño espermático debido a especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante el proceso de criopreservación puede con éxito minimizarse con la adición de antioxidantes durante la refrigeración y la congelación. Buenos resultados se han obtenido con la adición de vitamina E o su análogo Trolox. (Großfeld R. *et al.* 2008 y Peña *et al.* 2003)

Además del daño oxidativo, los espermatozoides sufren otros daños producidos por los cristales de hielo que se forman durante la criopreservación, los cuales producen daño de membranas y su deshidratación. Por ello, es importante mantener un buen control, no solo de los antioxidantes sino también de crioprotectores como la glicerina, y otros factores claves como: los diluyentes, las velocidades de enfriamiento, la concentración espermática y el tipo de envase en los cuales serán almacenados los espermatozoides. Esto, sin contar otros elementos no controlables y que son intrínsecos como la calidad del semen que depende de cada cerdo, de su alimentación, su genética, uso, entre otros que afectan de manera positiva o negativa la criopreservación. (Hernández, M. *et al.* 2007)

El crioprotector permite a las células sobrevivir a las tasas de enfriamiento lo suficientemente lentas como para permitir la salida de agua intracelular y así evitar la formación de hielo intracelular. La fracción de agua no cristalizada y la formación de hielo alcanzan un equilibrio cuando la fracción de agua no congelada es muy baja y la concentración de solutos es muy alta. De esta manera, el crioprotector hace que el punto de equilibrio se alcance antes de forma que la concentración de solutos no llegue a ser demasiado alta. Otra

acción del crioprotector es la formación de puentes de hidrógeno con los grupos polares de la cabeza de los lípidos de membrana, logrando reemplazar el agua bajo condiciones de deshidratación. El crioprotector previene la cristalización eutéctica al aumentar la viscosidad de los solutos del medio. Por lo tanto, tenemos dos funciones importantes del crioprotector: minimizar el efecto solución y aumentar la viscosidad de las soluciones intra y extracelulares produciendo una salida de agua más lenta (Bwanga, 1991)

Con respecto a los diluyentes, un punto clave durante el proceso de enfriamiento y congelación son sus lípidos. Los lípidos desempeñan un papel clave durante la criopreservación de semen porcino. Algunas fracciones lipídicas han sido identificadas de gran importancia en la protección de los espermatozoides. Sin embargo, ningún componente lipídico ha sido capaz de imitar y sustituir la yema de huevo en los procedimientos de congelación, lo que puede sugerir que la sinergia de varios componentes que figuran en la yema de huevo como son los antioxidantes, y micro elementos, pueden ser claves en el proceso (Maldjiana et al 2005).

La yema de huevo se ha identificado con efectos positivos en la refrigeración y la congelación de los gametos masculinos. Es posible que permita intercambios de componentes lipídicos con los espermatozoides durante la criopreservación (Maldjiana et al 2005).

Cabe anotar que la supervivencia post-descongelación de espermatozoides también puede depender de la concentración espermática en la muestra congelada, aunque este efecto parecía depender de el medio de congelación elegido. El sobre enfriamiento no puede prevenirse eficazmente mediante la concentración en un dispositivo de congelación convencional ya que no hay un control preciso de la velocidad de enfriamiento.( Woelders *et al* 2005)

Es importante tener en cuenta también con respecto a la concentración la cantidad o aumento de solutos, ya que en el interior celular es tóxico para las membranas celulares y para los componentes intracelulares. Por otro lado, el aumento de la concentración de solutos extracelular también provoca que

puedan entrar en el interior celular y alterar la composición de la misma (Gilmore et al.1998).

Esto se relaciona a su vez con el movimiento de agua y crioprotectores a través de la membrana plasmática del espermatozoide que condicionan la deshidratación celular y ésta a su vez, se relaciona directamente con los daños observados tras la descongelación (Calvete et. Al 1995). Durante la congelación, el agua pasa de estado líquido a sólido. La compactación o nucleación ocurre cuando la solución es super enfriada a una temperatura entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ . Los pequeños cristales derivados de la cristalización del agua tienen una gran tensión superficial, que los hace más inestables. Luego la unión de los cristales se produce en todas direcciones y la fusión de éstos produce una liberación de calor que permanece un tiempo hasta que el agua no congelada alcanza la temperatura de congelación (Mazur 1997).

Durante la criopreservación, los distintos lípidos que forman parte de la composición de las membranas espermáticas van a tener diferentes temperaturas de fase de transición. Algunos lípidos pasan a estado de gel y otros permanecen en estado líquido-cristalino. Las proteínas de la membrana están excluidas de ese estado de gel y acaban encontrándose en un ambiente lipídico no fisiológico lo que origina un cambio en su funcionalidad que conlleva a una alteración en la integridad estructural o en el metabolismo iónico (Gadella et al., 1994; Woelders 1997). Muchos daños se ha comprobado son minimizados con el uso se antioxidantes, pero también hay un elemento intrínseco en los espermatozoides y es el complejo proteico PSP I-PSP II, que representa más del 50% de la fracción proteica del plasma seminal y contribuye a mantener la calidad espermática (Calvete et al 1995)

La eliminación del plasma seminal por centrifugación es crítica para asegurar la máxima vitalidad pos descongelación en la mayoría de los protocolos de crioconservación seminal. Sin embargo, en ciertas especies como el cerdo, la incubación a temperatura ambiente de espermatozoides en su propio plasma seminal es capaz de aumentar la resistencia de éstos al choque de frío,

proceso que ocurre cuando los espermatozoides recientemente eyaculados son enfriados (Pursel et al., 1973; Tamuli y Watson, 1994). La sensibilidad de los espermatozoides al frío disminuye cuando la fracción rica del eyaculado se incuba un tiempo de 3 horas a 15°C (Bianchi, et al 2008) antes del proceso de enfriamiento, aunque el tiempo de incubación parece ser más importante que la propia temperatura de incubación (Weitze et al.1999). Todo esto es debido a que el plasma seminal contiene proteínas específicas que se asocian periféricamente a la membrana del espermatozoide y que son capaces de inhibir la desestabilización prematura de la membrana fluida del espermatozoide, que acontece en la criopreservación, a consecuencia de la eliminación de parte del plasma seminal (Maxwell y Johnson, 1999).

Se debe tener en cuenta también que cuando se hace criopreservación las velocidades de enfriamiento y descongelación a las que se someten las células espermáticas ya que si es muy rápida se producen cristales de hielo dentro de las células y si es muy lenta éstos cristales se producen exteriormente, produciendo la salida de agua del interior de la célula. Esta deshidratación provoca daños 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 cual depende también del envase y el método de congelación utilizado (Hernández. *et,al*/2006) (Hypor en <http://spain.hypor.com/dbdocs//3fe19dce61ddc.pdf>).

Los envases utilizados tienen mucho que ver con el éxito de supervivencia de los espermatozoides. En los estudios pioneros en esta área, los espermatozoides del cerdo se congelaban en ampollas de vidrio (Polge 1970) o en tubos de vidrio, usando bajas tasas de congelamiento junto con concentraciones del glicerol relativamente altas. Después, las técnicas de congelación de semen de toro, se adaptaron al semen del cerdo, disminuyendo las cantidades de glicerol de 1-3%, para conseguir congelamientos rápidos (Purse y Johnson 1975). Los espermatozoides del cerdo también han sido congelados en Maxi-pajillas de 5 ml, pajillas de aluminio de 4-5 ml, pajillas del 0.5 ml, y también Mini-pajillas de 0.25 ml (Eriksson 2000). Ésta variedad de envases busca albergar una cantidad

suficiente de espermatozoides que permitan una distribución homogénea de la temperatura.

A continuación hay una breve descripción de los diferentes tipos de envases y las principales ventajas y desventajas.

**Píldoras:** 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 IA (Pursel V.G 1975)

**Maxi pajuela:** Solo 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 vean sometidas a un tiempo más prolongado de exposición a temperaturas extremas de congelación y descongelación (Selles 2001)

**Pajuelas de 0.5 ml.:** son de tipo francés o alemán, su pequeño volumen dificulta la consecución de una dosis adecuada para una inseminación artificial exitosa (Fiser, *et, al*, 1993) sin embargo éste tamaño de pajillas proporciona un sistema de envasado eficaz para cerdos en todo el mundo que permiten la cristalización uniforme de hielo (Hernández. M, *et, al*. 2007).

**Mini pajuelas:** buena transmisión de la temperatura del exterior al interior, pero su pequeño volumen dificulta la consecución de una dosis adecuada para una inseminación artificial exitosa ( Sellés 2001).

**Bolsas planas:** Contienen una dosis entera y su geometría facilita la rápida y homogénea congelación y descongelación. Presenta dificultades para su almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido (Sellés 2001)

Los controles para medir finalmente la tasa de fertilidad de los espermatozoides se logra con análisis seminales de rutina que generalmente incluyen la medida

de pocos parámetros como la concentración y movilidad, pero no siempre proveen una información exacta sobre la capacidad fertilizadora de los espermatozoides.

La integridad del acrosoma junto con la funcionalidad de la membrana son unos de los principales parámetros en la evaluación espermática (Johnson et al 2000). La calidad de el espermatozoide de porcino se estima principalmente por el porcentaje de espermatozoides móviles realizada subjetivamente por un observador. La evaluación de las membranas plasmáticas y acrosómicas son buenos indicadores del éxito de la criopreservación ya que son extremadamente susceptibles a criolesión. (Peña, *et al* 2003)

## **5.0 METODOLOGIA**

### **5.1 UBICACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

A 9 reproductores porcinos pertenecientes a tres granjas del municipio de Rionegro, con edades entre 1 y 2 años a los cuales se les comprobó su fertilidad, verificando que tuvieran un mínimo de espermatozoides del 80% de movilidad individual y un 70% de espermatozoides normales, se colectó su eyaculado total según Pursel et al.1973; Tamuli y Watson, 1994, por el método manual y se filtró durante su recolección usando un filtro de celulosa, llevándolo a temperatura ambiente (20 -22°C) en un recipiente termo aislado en un tiempo aproximado de una hora al Laboratorio de Procesamiento de Semen de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín en donde se estimó su concentración utilizando un espermodensímetro de Karras (Köning 1979) la movilidad individual se estimó en porcentaje por un mismo observador utilizando un microscopio de luz dotado de platina térmica.

### **5.2 PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN**

El protocolo utilizado fue el propuesto por Peña *et al.* (2003) y Bianchi *et al* 2008 con algunas modificaciones como la adición del antioxidante  $\alpha$ -tocoferol introducidas por el grupo de investigación de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional, según el cual el semen se diluyó en una proporción 1:1 con BTS (diluyente I) (206mM Glucosa, 20.4mM citrato Na<sub>3</sub>, 14.9mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.4mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10Mm, KCl, penicilina G Na 0.6 g/l, dihydroestreptomycin 1.0 g/l, de Minitüb) y se incubó en una centrifuga refrigerada a 15°C por 3 horas, al cabo de las cuales se centrifugó a 400XG por 7 min, se retiró el sobrenadante por aspiración y se midió su volumen y concentración espermática (cámara Neubauer). El precipitado se dividió en tres alícuotas cada una con una concentración espermática diferente fracción 1:  $1.2 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla, fracción 2:  $0.8 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla y fracción 3:  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla, cada fracción se diluyó con un extensor a base de 80 ml de  $\beta$ -lactosa 310 mM (Sigma) más 20 ml de yema de

huevo (diluyente II) en una proporción de 1:1 ó 2:1 partes semen a diluyente dependiendo de la concentración espermática. Además se suplementó con 200  $\mu$ M de vitamina E (Peña et al, 2003).

### **5.3 TAZA DE ENFRIAMIENTO**

Se realizó la disminución de la temperatura de 15°C a 5°C a razón de 0.2 °C/minuto. A las muestras de semen con las diferentes concentraciones 1.2x10<sup>9</sup>, 0.8 y 0.4 x10<sup>9</sup> espermatozoides por pajilla y se les agregó un tercer diluyente que consistía en 89,5 ml del diluyente II, 9 ml de glicerol y de 1,5 ml Equex STM (Nova Chemicals Sales Inc.) que es equivalente a Orvus Es Paste (diluyente III). La proporción es de dos partes de la dilución II a una parte de ésta dilución III para dar una concentración final de glicerol 3% (Peña *et al* 2003). Los espermatozoides se envasaron en pajillas francesas de 0.5 ml, y se sellaron con polivinilo antes de iniciar el proceso de congelación. Se sometieron a enfriamiento entre 5 y -120°C a una tasa de disminución de temperatura aproximada de 30°C/minuto, poniendo las pajillas en vapores de nitrógeno líquido mediante la colocación de una plataforma previamente calibrada a 5 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido durante 15 minutos, para luego ser almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de la descongelación (Bianchi, *et al* 2008).

### **5.4 PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN**

La descongelación se realizó en un baño maría a 38°C por 20 segundos (Roca et al 2006). Después del proceso de descongelación, las muestras se prepararon para las evaluaciones de movilidad individual, vitalidad, integridad acrosómica e integridad de membrana como se describe a continuación.

### **5.5 EVALUACION DE LA MOVILIDAD**

Las evaluaciones de movilidad individual pre y poscongelación se realizaron al microscopio de luz (400X) dotado de platina térmica a 39°C. En una gota de

semen de aproximadamente 3 mm de diámetro colocada en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos, ambos precalentados a 38°C; la movilidad se calificó en forma subjetiva por un mismo evaluador en un mínimo de cinco campos considerando como porcentaje de espermatozoides con movilidad normal, los que mostraron un patrón de movimiento vigoroso, progresivo y homogéneo (Rodríguez Martínez, Eriksson, 2000) ( Barth y Oko, 1989). La evaluación postcogelación se realizó a partir de una muestra de cada tratamiento, después de una semana de permanencia del semen dentro del contenedor a -196°C.

## **5.6 INTEGRIDAD ACROSÓMICA**

En una muestra de cada tratamiento se evaluó la integridad acrosómica a espermatozoides post-descongelación por el método de Coloración Diferencial Spermak (MiniTüb Germani), en el que las placas recién fijadas de espermatozoides descongelados se sumergieron en diferentes colorantes de el kit,. Se hizo un frotis delgado de la muestra de espermatozoides a evaluar, diluida 1:1 en citrato de sodio al 3% en un porta objetos libre de grasa y se dejó secar por 3 minutos, luego se sumergió la placa en la solución fijadora del kit por espacio de 5 minutos, se lavó con agua destilada, se dejó secar en platina térmica 15 minutos y se sumergió luego en los colorantes A, B y C del kit por espacio de 1 minuto en cada uno previo lavado con agua destilada. Las placas se almacenaron durante una semana y se evaluaron los espermatozoides según la coloración y los parámetros morfológicos considerando como espermatozoides con acrosoma íntegro los que presentaron un acrosoma de color verde oscuro, intacto en forma de media luna, con apariencia total e integridad de la membrana y como anormales los que presentaron un acrosoma en forma irregular o ausente. (Gonzales, Muñoz 1984), (manual de tinción MiniTüb)

## **5.7. INTEGRIDAD DE MEMBRANA**

Se evaluaron los espermatozoides postdescongelación por el método del test hipoosmótico. A un tubo eppendorf, se adicionaron 100 µl de la solución

hiposmótica [100 mOsmol/L] compuesta por fructosa y citrato de sodio en agua grado reactivo y 20  $\mu$ l de la solución que contiene los espermatozoides descongelados. La solución se llevó a incubar a 37°C por media hora. (Correa *et al.* 1997; Correa & Zavos 1994). Para medir hinchamiento espermático, se puso una gota de la muestra bien mezclada sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos 22 x 40mm para observar en el microscopio de contraste de fase a 400X. Se contaron 200 espermatozoides en cada muestra de cada tratamiento. Se consideró como espermatozoides con membrana intacta los que presentaron alguna de las siguientes características: cola enrollada, pieza intermedia hinchada, cabeza hinchada. (Revell and Mrode (1994)

## **5.8 VITALIDAD**

Se evaluó en espermatozoides pre y posdescongelación de una muestra de cada tratamiento por medio de coloración con eosina nigrosina modificado (Barth and Oko. 1989). Sobre un portaobjetos temperado a 36°C se colocó una gota de colorante de 5 mm de diámetro temperado a 36°C y una gota de semen de 2 mm de diámetro, que se mezclaron y se dejaron sobre una platina térmica a 36°C durante dos minutos antes de realizar un extendido sobre otro portaobjetos. Se fijó en la platina térmica durante 5 minutos y se evaluaron 200 células en microscopio de contraste de fases con objetivo de 100X, considerando como vivos a los espermatozoides que no aceptaron el colorante y como muertos a los coloreados.

## **5.9 ANALISIS ESTADÍSTICO**

Para el estudio de los datos se empleó el programa Statgraphics Plus y el método utilizado para el análisis de los datos fue un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tratamientos: concentración de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla) y (movilidad, vitalidad y morfología con dos niveles cada una, pre y post). Para el análisis del acrosoma e integridad de membrana espermática se empleó un análisis de varianza de una vía. El nivel de nivel de confianza fue del 95%, y una potencia para detectar diferencias significativas del 90% analizando un total de 216 pajillas para dichas pruebas.

## 6.0 RESULTADOS

Luego del proceso de crioconservación y habiendo evaluado el semen mediante diferentes pruebas como la movilidad, la integridad acrosómica, integridad de membrana, vitalidad, morfología y calculando el porcentaje de daño sufrido por los espermatozoides, se observa que no hay diferencia significativa de la movilidad individual, la vitalidad, la integridad acrosómica y la integridad de la membrana plasmática entre los tratamientos (Tabla 1)

En la tabla 1 se observan los resultados de los porcentajes de la movilidad, vitalidad y morfología precongiamiento y se verifica que el semen cumple con los estándares requeridos para llevar a cabo el proceso de congelación. Luego para cada prueba se muestran los resultados postdescongiamiento y se observa la supervivencia de los espermatozoides. Para las pruebas de integridad de membrana e integridad acrosomica no se realizó análisis antes de su congelación ya que se parte del supuesto de que los espermatozoides con buena movildad, morfología y vitalidad, tienen una buena integriadad, tanto de membrana como acrosómica,

Tabla 1. Movilidad, vitalidad, morfología, integridad de membrana e integridad acrosómica después de la descongelación de espermatozoides porcinos empacados en pajillas de 0.5 ml con concentraciones de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla).

Prueba	Concentración (millones de espermatozoides por pajilla)			
	% Pre- congiamiento	400	800	1200
Movilidad (%)	85±0.1	40± 0.1	37±0.1	36±0.2
Vitalidad (%)	70±0.2	56±0.3	56±0.2	54±0.2
Morfología (%)	78±0.3	67±0.2	68±0.1	68±0.3
Integridad de membrana (%)	N.E	43±0.3	44±0.2	45±0.1
Integridad acrosómica (%)	N.E	59±0.2	57±0.3	59±0.2

N.E no evaluado

En la Tabla 2, se observa la movilidad (pre y postdescongelación), la vitalidad (pre y postdescongelación) y la Morfología (pre y postdescongelación) mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para cada una de las variables respuestas evaluadas y se observa que no hay diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos.

Tabla 2. Análisis de Varianza de dos vías entre variables movilidad, vitalidad y morfología pre y post vs tratamientos.

Variable respuesta	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
<b>Respuesta Movilidad</b>	A: Tratamiento	11,2593	2	5,62963	0,07	<b>0,9355</b>
	B: Movilidad	30721,2	1	30721,2	364,52	<b>0,0000</b>
	A*B	11,2593	2	5,62963	0,07	<b>0,9355</b>
	Residuo	4045,33	48	84,2778		
	Total	34789,0	53			
<b>Respuesta Vitalidad</b>	A: Tratamiento	21,3333	2	10,6667	0,55	<b>0,5833</b>
	B: Movilidad	2521,5	1	2521,5	128,85	<b>0,0000</b>
	A*B	21,3333	2	10,6667	0,55	<b>0,5833</b>
	Residuo	939,333	48	19,5694		
	Total	3503,5	53			
<b>Respuesta Morfología</b>	A: Tratamiento	1,03704	2	0,518519	0,03	<b>0,9725</b>
	B: Movilidad	1340,02	1	1340,02	72,14	<b>0,0000</b>
	A*B	1,03704	2	0,518519	0,03	<b>0,9725</b>
	Residuo	891,556	48	18,5741		
	Total	2233,65	53			

En las figura 1 se observan las diferencias en las pruebas pre y postdescongelamiento, notándose que previo al congelamiento no hay variación en el porcentaje de las diferentes concentraciones mientras que postdescongelamiento sí se observa variación.

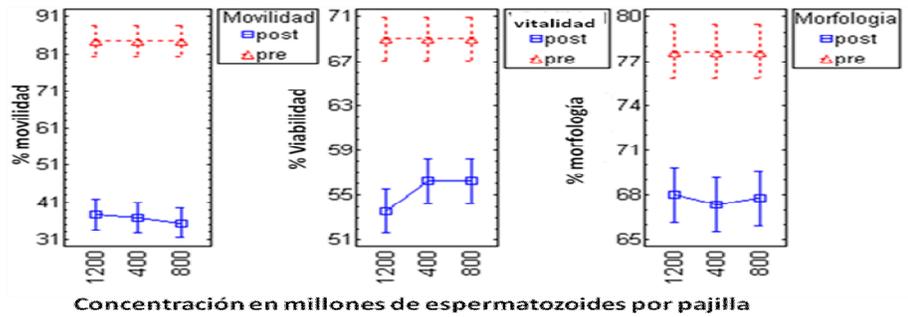


Figura 1. Movilidad, Vitalidad y Morfología Vs tratamiento, Intervalos LSD.

En la tabla 3 se observan los resultados postdescongelamiento para integridad acrosómica e integridad de membrana, no mostrando diferencia significativa en ambas pruebas para los tres tratamientos.

Tabla 3. Análisis de Varianza entre las variables integridad de membrana acrosómica y funcionalidad de membrana espermática vs tratamientos de los espermatozoides post-descongelación.

Variable respuesta	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Integridad de la membrana acrosómica	Tratamiento	20.2222	2	10.1111	1.24	0.3086
	Residuo	196.444	24	8.18519		
	Total	216.667	26			
funcionalidad de membrana	Tratamiento	12.963	2	6.48148	0.06	0.9450
	Residuo	2745.11	24	114.38		
	Total	2758.07	26			

En la figura 2 se aprecian las diferencias que muestran los tratamientos en las pruebas de integridad de membrana y acrosómica.

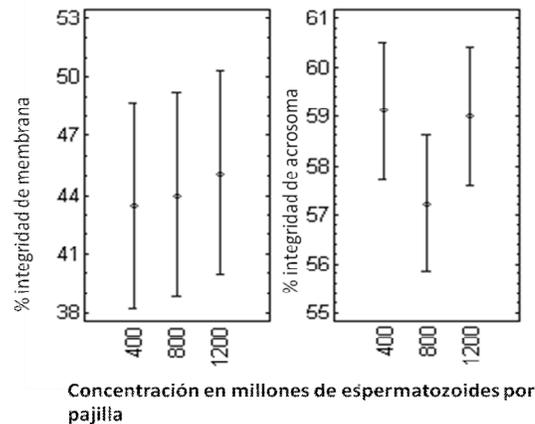


Figura 2. Integridad y Acrosoma Vs tratamiento, Intervalos LSD.

## 7.0 DISCUSIÓN

Las dificultades en la preservación del semen fresco para inseminación artificial han promovido las investigaciones en criopreservación de semen congelado, proceso que en la actualidad ha logrado avances significativos para la industria porcina (Bailey et al. 2008). El proceso de congelación de semen afecta las características espermáticas relacionadas con la fertilidad y por esta razón se disminuye la tasa de concepción y el tamaño de las camadas en granjas que utilizan semen criopreservado (Medrano y Watson 2002) los espermatozoides de porcino congelados aún no tiene la calidad necesaria para lograr resultados adecuados en virtud de la amplia gama de condiciones en la aplicación práctica de rutina. Por otra parte, la variación interindividual sigue siendo un problema significativo.(Woelders et al. 2005). por ello la búsqueda de mejores cualidades de los espermatozoides después del proceso de descongelación requiere de la utilización de eyaculados que presenten características sobresalientes dentro de las que se destacan la movilidad individual, la vitalidad, la integridad de la membrana celular y la integridad del acrosoma (Peña et al 2007).

En el presente trabajo se observa una disminución de la movilidad individual casi del 50% con respecto a los datos precongelamiento, mientras que en vitalidad y morfología la disminución es de un 20% y 10% con respecto a los datos iniciales. Para integridad de membrana, integridad acrosómica y motilidad después de la descongelación se observan datos muy similares a resultados publicados en otros artículos como los de Hernández (2008), quien trabajó evaluando la diferencia intergénicas de cerdos a los cuales clasificó su semen como buenos, regulares o malos crioconservables y para los buenos obtuvo los siguientes porcentajes 47.7 % para movilidad, 52.6 % para integridad de membrana plasmática y de 52.7% para integridad acrosómica

La movilidad individual, la vitalidad y la Morfología de los espermatozoides frescos presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los espermatozoides posdescongelación, Esta diferencia se explica por los daños ocasionado durante el proceso del enfriamiento, que también genera diferencias interindividuales debidas a la variación intergénica de los cerdos

(Hernández M 2008), que tienen una mayor o menor cantidad de proteínas como PSP I y PSP II en sus membranas (Calvete et al 1995).

La concentración espermática no afectó ( $p > 0.05$ ) la movilidad individual, la morfología y la vitalidad de espermatozoides porcinos después de la descongelación. Es posible que desde la concentración menor  $4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla hasta la mayor  $1.2 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla, la cantidad de ROS producida sea equilibrada con la ayuda del antioxidante (vitamina E) en la concentración utilizada ( $200 \mu\text{M}$ ) y los diluyentes II y III, (Großfeld R. et al. 2008 y Peña et al 2003) que permitieron la salida del agua intracelular (Bwanga, 1991) y el intercambio de componentes lipídicos (Maldjiana et al 2005) evitando la concentración de solutos al interior o exterior de las células que alteraran las membranas espermáticas (Gilmore et al. 1998).

En la Tabla 3, se observa como los tratamientos (400, 800 y 1200 millones de espermatozoides por pajilla) no presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para cada una de las variables respuestas evaluadas integridad acrosómica y de integridad de membrana, por lo cual la concentración no afectó éstas variables después de la descongelación. En la Figura 2, se verifica como la integridad de las membranas celulares y del acrosoma, después de la congelación no son afectados por la concentración de espermatozoides aunque se presentaron variaciones que tienden a aumentar los porcentajes en la menor y mayor concentración.

La concentración de espermatozoides porcinos congelados en las dosis inseminantes constituye una limitación para los porcicultores debido al gran espacio que ocupan en los contenedores de nitrógeno líquido, lo que impide acopiar un gran número de dosis y aumenta los costos de almacenamiento. Aunque en los últimos años se han realizado muchas investigaciones que buscan mejora la eficiencia del proceso de criopreservación de espermatozoides porcinos (Peña et al., 2003; Breininger et al., 2005; Maldjian et al., 2005; Hernandez et al., 2007; Bailey et al., 2008), se han desarrollado escasas investigaciones en las que se pretenden identificar los efectos de concentración de espermatozoides por dosis sobre las características

espermáticas. Saravia et al.2005 evaluaron la posibilidad de congelar muestras de esperma muy concentrado en volúmenes muy bajos, con el potencial para su uso en la inseminación intrauterina profunda (DIU). El objetivo era congelar dosis de espermatozoides altamente concentradas ( $2 \times 10^9$ /mL) en FlatPacks y como control analizó la movilidad de los espermatozoides y la integridad de la membrana plasmática, llegando a la conclusión de que los espermatozoides se pueden congelar con éxito en un pequeño volumen y como vemos en nuestro trabajo no sólo en pequeños volúmenes sino que a concentraciones altas como de hasta  $1.2 \times 10^6$  millones de espermatozoides por pajilla es posible empacar semen que tenga muy buena calidad.

Para disminuir los efectos de la concentración en el presente se utilizó  $\beta$ -lactosa- yema de huevo que en otros trabajos ha permitido criopreservar espermatozoides en concentraciones menores con buenos resultados (Hernández et al .2007), menores a las obtenidas en el presente trabajo.

Por lo tanto los resultados muestran que es posible crioconservar semen porcino en concentraciones de  $1.2 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla de 0.5 mililitros, con alteraciones espermáticas similares a las obtenidas cuando son empacados en concentraciones más bajas como 0.8 y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla de 0.5 mililitros, abriendo la posibilidad de mejorar de la técnica de almacenamiento de los espermatozoides porcinos congelados.

## 8.0 CONCLUSIONES

La concentración de  $1.2 \times 10^9$ ,  $0.8 \times 10^9$  y  $0.4 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla de 0.5 ml no afectó la movilidad individual, la vitalidad, la integridad de la membrana plasmática ni la integridad del acrosomica.

La movilidad, la vitalidad y la morfología iniciales, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al postdescongelamiento.

Se puede criopreservar semen porcino a concentraciones más altas de los convencionales, sin afectar las características seminales postdescongelamiento. Lo anterior permite un avance en el mejoramiento de los protocolos de criopreservación y posiblemente abren una puerta al mejoramiento de la aplicación de ésta biotecnología con fines productivos.

Se recomienda continuar con el trabajo en campo, evaluando la tasa de concepción y el tamaño de las camadas generadas con la inseminación, utilizando la concentración mayor  $1.2 \times 10^9$  espermatozoides por pajilla de 0.5 ml.

## 9.0 BIBLIOGRAFIA

Bailey, J.L; Lessard, C ; Jacques ,J; Breque, C ; Dobrinski I; Zeng, W; Galantino-Homer H. 2008. cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry Theriogenology 70: 1251–1259

Barth, A. Oko, R. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa. Iowa State University Press. 285p.

Bianchi, I; Calderam , K; Maschio , E´.F; Madeira , E.M ; da Rosa Ulguim ,R.; Corcini , C.D ; Bongalhardo , D.C ; Correa, E.K.; Lucia Jr. T.; Deschamps , J.C.; Correa; M.N. (2008) Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. Theriogenology 69, 632–638

Breininger, E; Beorlegui,, N; O'Flaherty,C; Beconi, M. 2005 Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen Theriogenology 63: 2126–2135,

Bwanga Co. Cryopreservation Of Boar Semen. Acta Vet Scand 1991; 32: 431-453.

Calvete J J, Mann K, Schafer W, Raida M, Sanz L, 1995. Topfer-Petersen E. Boar Spermadhesin PSP-I: Location Of Posttranslational Modifications, Heterodimer Formation With psp-I Glycoforms And Effect Of Dimerization On The Ligand-Binding Capabilities Of The Subunits. FEBS Letters 365: 179-182

Correa, J.R. Heersche, G. & Zavos, P.M. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation of varying temperatures. Theriogenology, 47: 715-721.

Correa, J.R. & Zavos, P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen –thawed bovine sperm membrane. Theriogenology, 42: 361-370

Eriksson, B.M. 2000. cryopreservation of boar semen, studies on sperm viability in vitro and fertility. Tesis Doctoral, Department of Obstetrics and Gynaecology, universidad de ciencias agricolas de Swedish, Uppsala. 47p

Erikson, B.M. ; Rodríguez, H., 2000. Effect of freezing and thawing rates On the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen In flatpacks And Maxi-Straws An. Rep. Sci.;63: 205-220.

Fiser, P.S; Fairful, R, W; Hansen, C; Panich, P.L.; Shrestha Underhill, L, 1993. The effect Of warming velocity On motility And acrosomal Integrity of boar sperm as Influenced of the rate of freezing and glycerol level. Mol. Reprod. Dev.; 34: 190-195.

Gadea, J. 2004. El uso del semen porcino congelado, Departamento Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, revisión disponible en [jgadea@um.es](mailto:jgadea@um.es), [www.um.es/grupo-fisiovet](http://www.um.es/grupo-fisiovet), [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Gilmore Ja, Liu J, Peter At Y Critser Jk. 1998. Determination Of Plasma Membrane Characteristics Of Boar Spermatozoa And Their Relevance To Cryopreservation. Biol Reprod; 58: 28-36.

Gadella Bm, Gadella Twj, Colenbrander B, Van Goldo Lmg Y, Lopes-Cardozo M. Visualization And Quantification Of Glycolipid Polarity Dynamics In The Plasma Membrane. J Cell Sci 1994; 107: 2151-2163.

Gonzalez, M., Acosta ,Miguel., Williams, S., Crudeli, G. 2004. Inseminación artificial en porcinos: variación en el tiempo y método de entrenamiento en verracos de diferentes edades en el Noroeste Chaqueño. Informe Preliminar. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste

Gonzalez H., Muñoz L. 1984. Congelacion de semen porcino según el método Beltsville, Facultad De Agronomía. Universidad Nacional De Colombia. Medellín, 60p

Großfeld, R; . Sieg, B A, C. Struckmann A; Frenzel A; . Maxwell W.M; . Rath D.A. 2008 New aspects of boar semen freezing strategies Theriogenology 70: 1225–1233

Hernandez M; Roca, J; Gil, M.A; Vázquez, J.A; Martínez, E.A. 2007 Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability Theriogenology 67: 1436–1445

Hernandez, M; Roca, J; Calvete, J.J; Sanz L, Muñoz T, B, Cebrian P, Vazquez and Martinez, E. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity after thaw is improved

when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. . journal of andrology vol 28 no 5, september/october

Hypor materia 07, tema 003 Disponible en <http://spain.hypor.com/dbdocs//3fe19dce61ddc.pdf>

Martinez, H. Saravia, F. Wallgrena, M.C. Tienthai, P. Johannisson, A.. Vázquez J M. Martínez E. Roca, J. Sanz, L.. Calvete, JJ. 2005. Boar spermatozoa In the oviduct, Theriogenology 63 : 514–535

Maldijana A; Pizzic, F;. Gliozzic, T; Cerolinib, S;. Penny, P;. Noblea,R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen Theriogenology 63, 411–421

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci. Aug 18;62(1-3):143-72. Review.

Köning, I. Inseminación De La Cerda. 1ª Edición. 1979;. Acribia Zaragoza 181 P

Mazur, P. 1997. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology; 14: 251-272.

Medrano A, Watson PF, Holt WV, 2002. .Importance Of Cooling Rate And Animal Variability For Boar Sperm Cryopreservation: Insights From The Cryomicroscope. Reproduction feb;123:315-22.

Maxwell Wmc Y Jonhson La. Physiology Of Spermatozoa At High Dilution Rates: The Influence Of Seminal Plasma. Theriogenology 1999; 52: 1353-1362.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez M H. 2003 Antioxidant Supplementation In Vitro Improves Boar Sperm Motility And Mitochondrial Membrane Potential After Cryopreservation Of Different Fractions Of The Ejaculate. Anim Reprod Sci. Sep 15;78(1-2):85-98.

Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen Following Surgical Insemination.1970.. Vet Rec; 87: 424-428.

Pursel V.G.; Jonson, L.A. Freezing of boar spermatozoa. fertilizing capacity and concentrated semen and new thawing procedura.1975. J. Anim. Sci.; 40:99-102.

Pursel Vg Y Jonhson La. Procedure For The Preservation Of Boar Spermatozoa By Freezing. Usda Ars Bull 1971; 44-227: 1-5.

Pursel Vg, Jonhson La Y Schulman LI. 1973. Effect Of Dilution, Seminal Plasma, And Incubation Period On Cold Shock Susceptibility Of Boar Spermatozoa. J Anim Sci; 37: 528- 531.

Pursel Vg Y Jonhson La. Freezing Of Boar Spermatozoa. Fertilizing Capacity With Concentrated Semen And New Thawing Procedure. J Anim Sci 1975; 40: 99-102.

Revell, S., R. Mrode. 1994. An Osmotic Resistance Test For Bovine Semen. Animal. Reproduction. Sciens. 36: 77-86.

Roca J, Hernandez. M, Carvajal G, Vazquez J.M, And E.A Martinez. 2006, Factors Influencing Boar Sperm Cryosurvival. Journal Animal Sciens 84: 2692-2699

Rodríguez,M. Eriksson, B. evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. Inseminação Artificial En Suínos. 2000. EN: III Simpósio Internacional MINITUB. Flores Da Cunha – RS – Brasil; P. 11 – 33.

Saravia,F. Wallgren,M. Szabolcs, N. Ohannisson A. Rodríguez, M. 2005 .deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. Theriogenology 63:1320–1333

Sellés S., M.E. Estudio de diferentes factores que afectan la capacidad fecundante de los espermatozoides Criopreservados En La Especie Porcina. 2001. Universidad De Murcia. Departamento De Biología Animal; 23p,110 P.

Tamuli Mk Y Watson Pf. Cold Resistance On Live Boar Spermatozoa During Incubation After Ejaculation. Vet Rec 1994; 135: 160-162.

Weitze Kf, Weber H Y Waberski D. 1999. Influence Of Incubation Time And Cooling Rate On Chilling Sensitivity Of Diluted Boar Semen. Iv Boar Semen Preservation (Beltsville, Usa); 29.

Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975;deep freezing of boar semen: Laboratory Findings And Insemination Results With The Hu"lsenberger Pailleten Technique. Dtsch Tiera"Rztl Wschr 82:261–300.

Woelders H. 1997. Fundamentals And Recent Development In Cryopreservation Of Bull And Boar Semen. Vet Quart; 19: 135-138

Woelders, H; Matthijs, A ; Zuidberg, C.A ; Chaveiro A.E. 2005 Cryopreservation Of Boar Semen: Equilibrium Freezing In The Cryomicroscope And In Straws Theriogenology 63, 383–395

Cybergrafía

[Http://Www.Portafolio.Com.Co/Economia/Economiahoy/2008-05-06/Articulo-Web-Nota\\_Interior\\_Porta-4145404.Html](http://Www.Portafolio.Com.Co/Economia/Economiahoy/2008-05-06/Articulo-Web-Nota_Interior_Porta-4145404.Html).

[Http://Co.Globedia.Com/lca-Entrego-Informe-Influenza-Ah1n1](http://Co.Globedia.Com/lca-Entrego-Informe-Influenza-Ah1n1)