

11664



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN

***Comparación del enfriado tradicional a +5°C vs
el enfriado a 2°C y -2°C sobre la criosupervivencia
y la capacitación prematura del semen de
carnero.***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL
(OVINOS Y CAPRINOS)

PRESENTA:

ESPERANZA RÍOS GRANILLO

Asesor:

PhD. José Alfredo Medrano Hernández

Cuautitlán Izcalli, México 2005

m. 345244



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

".....Ulises, rey de Itaca, en griego era llamado "Odiseo" por eso el poema de Homero que cuenta el viaje de Ulises, desde Troya hasta Itaca, se llama "Odisea".

La guerra de Troya duró diez años y terminó gracias a que a Ulises se le ocurrió la idea de engañar a los troyanos haciéndoles creer que los griegos se marchaban, dejándoles de regalo un enorme caballo de madera (el famoso caballo de Troya) que estaba hueco por dentro.

Cuando terminó la guerra todos los reyes y guerreros griegos volvieron a sus casas. Ulises salió de Troya con sus hombres, en doce barcos, todos tenían muchas ganas de volver a su tierra. Ulises estaba deseando volver a ver a su esposa Penélope y a su hijo Telémaco, al que no veía desde que era muy pequeñito.

Pero los dioses habían preparado a Ulises un largo y accidentado viaje, desde Troya hasta Itaca, que duraría diez años más....."

Itaca

" Si vas a emprender el viaje hacia Itaca,
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencias, en conocimiento.

A Lestrigones y a Cíclopes,
al airado Poseidón nunca temas,
no hallarás tales seres en tu ruta
si alto es tu pensamiento y limpia
la emoción de tu espíritu y tu cuerpo.

A Lestrigones ni a Cíclopes,
ni a fiero Poseidón hallarás nunca,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no es tu alma quien ante ti los pone.

Pide que tu camino sea largo.
Que numerosas sean las mañanas de verano
en que con placer, felizmente
arribes a bahías nunca vistas;
detente en los emporios de Fenicia
y adquiere hermosas mercancías,
madreperla y coral, y ámbar y ébano,
perfumes deliciosos y diversos,
cuanto puedas invierte en voluptuosos y delicados perfumes;
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios.

Ten siempre a Itaca en la memoria.
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años;
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Itaca te enriquezca.
Itaca te regaló un hermoso viaje.
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte.

Aunque pobre la encuentres, no te engañará Itaca.
Rico en saber y en vida, como has vuelto,
comprendes ya qué significan las Itacas. "

Constantin Cavafis

Así como Ulises, durante el regreso a Ítaca, encontré saber y experiencias, agregándose a lo que soy, diez años pasaron para poder llegar....

GRACIAS

A mis padres, Rubelio Ríos Sánchez y Esperanza Granillo Ríos, tierra firme para ésta viajera....lugar de consuelo, casa de amor.

A mis hermanas, Lupe, Sara, Irma, Francis: por su inestimable apoyo y cariño para llegar a Ítaca.

A mis sobrinos: José (q.e.p.d), Rubelio, Emmanuel, Ivan, Berenice, Josué, Ma. Jose, Victor Fco, Nestor, por la confianza, el cariño y las porras, que aunque lejos o ausentes, forman parte de mi búsqueda en el mar.

A mi esposo, Dr. Alfredo Adán Pimentel, compañero de tormentas y aguas tranquilas, reparador de heridas, puerto seguro, mar de amor.

A mi hijo, Alfredo Adán Ríos, por quien todo lo haría...por tu tolerancia, por ese amor que ancla mi ser en este mar que es la vida... eres mi fortaleza para combatir las tempestades (impossible is nothing).

A mis suegros Sr. Raúl Adán y su esposa Sra. Rocío Pimentel, a mis cuñadas Monica, Laura y América, a mis cuñados Sigifredo (q.e.p.d.) y Raúl, por el apoyo brindado en este tiempo.

Al señor Marcelino Pérez, su esposa Amadita Ramírez, e hijas....por ser una isla segura en el mar, por albergarme como a una hija en esos años de soledad, por cuidarme y por ser una familia para mi...

GRACIAS

Al Ph. D. Alfredo Medrano Hernández: Por confiar en mí, por tomar el timón y dirigir el rumbo del barco para llegar al final del proyecto.

A la Doctora Angélica Terrazas: por su invaluable amistad verdadera y su apoyo en esta travesía.

Al Dr. Jorge Tórtora: Por su apoyo en todo el proceso.

A la M. en C. Rosalba Soto: Por ser amiga.

Al Dr. Arturo Trejo, a su esposa MVZ Yolanda

Al tec. Laboratorista Pedro Maya por esa disponibilidad y apoyo en el proceso del proyecto.

Al Dr. Jesús Guevara y al Dr. Francisco Morales, por la confianza en mí y en el proyecto.

Para mis maestros...infinito agradecimiento por los conocimientos otorgados.

A esos grandes amigos de siempre: MVZ Oscar Molina y MVZ Rodrigo Salinas por el apoyo cuando el cielo amenazaba tormenta.

A Marianita Gil Carrillo, navegante en ciernes de su propio mar.

A los amigos de siempre

A los nuevos amigos

A mis compañeros de viaje: MVZ. Patricia Palacios, M.C. Héctor Flores

Al jurado: Dra Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Salvador Romo García, Dr. Octavio Mejía Villanueva por sus opiniones, apoyo y comprensión.

Y por sobre todas las cosas...gracias a Dios.

SONETO

Si para recobrar lo recobrado
debí perder primero lo perdido,
si para conseguir lo conseguido
tuve que soportar lo soportado,

si para estar ahora enamorado
fue menester haber estado herido,
tengo por bien sufrido lo sufrido,
tengo por bien llorado lo llorado.

Porque después de todo he comprobado
que no se goza bien de lo gozado
sino después de haberlo padecido.

Porque después de todo he comprendido
que lo que el árbol tiene de florido
vive de lo que tiene sepultado.

Francisco Luis Bernárdez

ÍNDICE

Índice de Cuadros, figuras y gráficas.....	i
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Revisión de literatura.....	6
Objetivo.....	24
Hipótesis.....	25
Material y métodos.....	26
Resultados.....	36
Discusión.....	39
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	57

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Cuadros

Cuadro 1. Valores de semen fresco de cada macho.....	43
Cuadro 2. Variables del semen descongelado por tratamiento.....	44
Cuadro 3. Variables del semen descongelado de cada macho.....	45
Cuadro 4. Espermatozoides con capacitación prematura al descongelado.....	46

Figuras

Figura 1. Recipiente A.....	47
Figura 2. Sistema de enfriado de doble recipiente.....	48

Gráficas

Gráfica 1. Curva de enfriado en la etapa 1, desde temperatura de cuarto hasta 5°C.....	49
Gráfica 2. Curva de enfriado en la etapa 2, desde 5°C hasta -5°C.....	50
Gráfica 3. Espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrón B y AR) en semen fresco y descongelado.....	51
Gráfica 4. Espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrón B y AR) en el semen descongelado de cada macho.....	52
Patrones de CTC (foto).....	53
Gráfica 5. Espermatozoides móviles al descongelado por macho y tratamiento.....	54
Gráfica 6. Espermatozoides con membrana intacta al descongelado.....	55
Gráfica 7. Espermatozoides con acrosoma intacto al descongelado.....	56

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue probar que el enfriado lento a temperaturas de alrededor de 0°C, antes que la formación del hielo ocurra, puede mejorar la criosupervivencia de los espermatozoides y reducir la ocurrencia del fenómeno de capacitación prematura. Para esto, se evaluaron tres diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación de semen de carnero, sobre la motilidad, integridad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma, y el estado de capacitación de los espermatozoides al descongelado. Se utilizaron 20 eyaculados provenientes de 4 carneros (5 de cada macho) recolectados por el método de la vagina artificial; las muestras de semen se diluyeron en un diluyente convencional a base de Tris-yema de huevo con un porcentaje final de glicerol de 4%. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tratamiento 1. Enfriado pre-congelación a +5°C (grupo testigo)

Tratamiento 2. Enfriado pre-congelación a +2°C

Tratamiento 3. Enfriado pre-congelación a -2°C.

En cada muestra de semen se evaluó el volumen, la motilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta, el porcentaje de morfoanomalías, y la concentración espermática. Posteriormente, el semen fue diluido, almacenado en pajillas de 0.5 ml identificadas previamente para cada tratamiento y conteniendo 200×10^6 espermatozoides móviles; enseguida, se sometieron al enfriado precongelación colocando las pajillas de cada tratamiento en un recipiente plástico con agua salina dentro de un refrigerador. Cuando las pajillas alcanzaron la temperatura blanco de cada tratamiento se retiraron del refrigerador y fueron expuestas a vapores de nitrógeno por 15 minutos, después se sometieron a la congelación en nitrógeno líquido. Las pajillas se almacenaron congeladas 15 días, entonces se procedió al descongelado. Las variables a evaluar fueron: motilidad progresiva en solución salina fisiológica (0.9%), motilidad progresiva en BTS (solución descongeladora de Belstsville); para evaluar los espermatozoides con membrana plasmática intacta se utilizó la tinción de Eosina-Nigrosina, la integridad acrosomal se evaluó por medio de microscopía de contraste de fase y la evaluación del estado de capacitación de los espermatozoides se realizó por medio de la prueba de la Clortetraciclina (CTC) y microscopía de fluorescencia.

El porcentaje de espermatozoides móviles del tratamiento enfriado a -2°C (43.8%) fue significativamente diferente ($p < 0.001$) al de los otros dos tratamientos: +5°C (40.1%) y +2°C (39.8). Esta misma tendencia se observó en el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta. El tratamiento enfriado a -2°C (78.3%) fue diferente ($p < 0.004$) a los otros dos: +5°C (75.6%) y +2°C (76.2%). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, se observó que el tratamiento enfriado a -2°C tuvo una mejor respuesta (79.9%) que los tratamientos de enfriado a +5°C (77.9%) y +2°C (76.2), y esta diferencia fue significativa ($p < 0.01$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura (patrones B y AR), el tratamiento enfriado a -2°C mostró la menor proporción de éstos (79.8%) y fue diferente ($p < 0.007$) al obtenido del tratamiento enfriado a +2°C (89.3%), pero no al porcentaje obtenido del tratamiento enfriado a +5°C (83.8%).

En relación a los machos utilizados en este trabajo, se observó una variabilidad entre ellos en la susceptibilidad de su semen al proceso de congelado y descongelado, y esta susceptibilidad determinó la respuesta de cada individuo a los diferentes tratamientos.

INTRODUCCIÓN

En la década de los 90 la producción ovina en todo el mundo atravesó por un periodo de bajas en el mercado, el precio de la lana disminuyó de manera considerable; debido a ello, las existencias de ovinos disminuyeron significativamente en los principales países exportadores: Argentina -58%, Australia -40%, Sudáfrica -45%, Nueva Zelanda -18% y Uruguay -30% (Cardellino, 2002).

Esta disminución de la oferta de productos derivados del ovino provocó una importante recuperación de los precios de lana en el periodo del 2002 al 2003. Esta recuperación en dólares en el mercado australiano osciló entre 40 y 100% para la lana y para la carne el 15% (Cardellino 2002).

En las últimas décadas la oferta exportable de carne y lana a escala global se concentró en Australia y Nueva Zelanda. Esto se debe a que la mayoría de los países redujeron sus existencias por debajo de sus demandas locales y, por otra parte, se presentó un proceso de "especialización", lo que trajo consigo que solo permanecieran como mercados fuertes los países que decidieron organizarse (Cardellino, 2002).

Es necesario tener en cuenta que tanto la lana como la carne ovina son productos tradicionales y que deben competir en el mercado con otras fibras naturales y sintéticas o con otras carnes y fuentes de proteínas; esto último, principalmente, en los países en desarrollo, donde la lana aún no tiene mucha calidad e importancia económica. (Cardellino, 2002).

Según algunos datos, el inventario mundial máximo de ovinos vivos, es de 1,058 millones, de los cuales 385 millones están en los países desarrollados y 673 millones en países en desarrollo, mientras que la producción de carne de ovino a nivel mundial fue de 11.3 millones de toneladas en el 2000 (FAO, 2001).

La especie ovina en México al igual que en otros países en desarrollo, desempeña un papel importante como proveedora de alimentos, se trata, en la mayoría de los casos, de una especie productiva básica, tradicional y de subsistencia en diferentes zonas de la República Mexicana, caracterizadas éstas últimas en su mayoría por ser zonas con un nivel de pobreza significativo, por lo que la ganadería ovina ocupa uno de los últimos lugares dentro de los animales domésticos explotados en México (Arbiza y De Lucas, 1992).

La mayoría de los estados del país poseen ovinos, pero algunos en cantidades poco significativas, como es el caso de los estados del Pacífico y la península de Yucatán. Las concentraciones más importantes de ovinos del país se agrupan en los estados de la meseta central (Arbiza y De Lucas, 1992; SAGARPA, 2000).

El inventario registrado por las instituciones oficiales en México arrojó las siguientes cifras en los últimos 5 años del censo de ovinos a nivel nacional: 6.2 millones en el año de 1997, 4.5 millones de cabezas para el año de 1998, y de un aproximado de 6 millones de cabezas en el año 2000 según el Centro de Estadística Agropecuario de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGARPA, 2000).

Es importante, mencionar algunos de los factores que han influido en la situación actual de la producción ovina: **i)** la incipiente organización de los productores, **ii)** el bajo nivel tecnológico de la mayoría de las explotaciones, **iii)** la escasa asistencia técnica especializada y capacitada, **iv)** los altos niveles de intermediarismo, **v)** la competencia con fibras sintéticas y **vi)** la baja calidad genética del ganado (De Lucas, 1999).

Aunado a lo anterior, el aspecto reproductivo también afecta la rentabilidad de esta especie, destacando la baja fertilidad anual de los rebaños que generalmente es menor al 50%. Como opciones generales para la modificación del panorama productivo en el ganado ovino, desde el punto de vista reproductivo, se propone

por un lado aumentar la cantidad de crías que nacen por parto, y por el otro, acortar el intervalo entre partos, para incrementar la cantidad de corderos producidos en el rebaño (Trejo *et al.* 1986).

En la actualidad, en los estados de Hidalgo, Puebla, Estado de México, Tlaxcala, y Morelos principalmente, se ha dado un importante apoyo a ovinocultores para impulsar su actividad e incrementar en número su ganado, ello, acompañado de créditos blandos y apoyo para la venta de carne y productos derivados, dado que la zona es de gran potencial tanto para cría como para la comercialización. Por lo anterior, se ha dado énfasis a la asistencia técnica de dichos proyectos, en donde las prácticas de reproducción asistida cobran especial interés, debido a que permiten acortar los intervalos entre partos e introducir mejores elementos que conduzcan a una mayor eficiencia en la reproducción.

Una de las técnicas que se pretende utilizar cada vez con mayor frecuencia a través de la asistencia técnica especializada en las unidades de producción ovina, es la Inseminación Artificial (I.A.), técnica ampliamente utilizada en ganado vacuno, ya sea con semen fresco o con semen congelado, considerando las ventajas y desventajas de cada uno.

En este sentido, se sabe que la crioconservación del semen es importante en el sector pecuario, y se ha reconocido como un importante factor que contribuye a preservar algunas especies en extinción, así como ha sido de gran ayuda en casos de infertilidad en los humanos (Watson, 2000).

Sin embargo, la fertilidad se reduce claramente con el proceso de crioconservación y se toma como una consecuencia aceptable de la técnica; como una generalización, que el 40 a 50% de los espermatozoides congelados no sobreviva (Watson, 2000).

Son muchos los problemas que enfrentan los espermatozoides cuando son sometidos al proceso de congelación y descongelación; el espermatozoide es una célula altamente especializada y no está preparada para sobrevivir en un ambiente desfavorable, pues ha perdido su capacidad de síntesis para reparar su membrana plasmática (Amann, 1989).

Una forma de compensar la baja fertilidad obtenida con semen congelado, es mediante el uso de la técnica de inseminación intrauterina por medio de laparoscopia. De esta manera, es superada la barrera del cervix, ya que el semen se deposita directamente en los cuernos uterinos, y las tasas de concepción son comparables a las obtenidas con la monta natural u otras formas de inseminación con semen fresco. La fertilidad obtenida con esta técnica va del 50 al 80 % (Evans, 1988; Evans y Maxwell, 1987).

Aunque esta técnica es de uso rutinario en algunos países como Australia y Nueva Zelanda; y que técnicamente puede ser posible su empleo en México, aún no resulta una opción viable, sobre todo por su costo elevado.

La baja fertilidad obtenida al utilizar la crioconservación del semen se acepta como una consecuencia de la crioconservación comparada con la fertilidad al utilizar semen fresco (Watson, 2000). Uno de los problemas que ocasiona esta baja fertilidad, es que los espermatozoides que han sufrido el proceso de crioconservación se encuentran en un estado de capacitación prematura, y en consecuencia su vida fértil se acorta (Green y Watson, 2001).

Por esto, es necesario realizar estudios enfocados a mejorar la criosupervivencia del semen congelado tratando de evitar en lo posible el estrés del enfriado, que involucra cambios en la fase de transición de los lípidos de la membrana plasmática y en consecuencia rigidez de la membrana y pérdida de sus propiedades de barrera semipermeable (Watson, 1981).

REVISIÓN DE LITERATURA

I.- Antecedentes

La investigación sobre la I.A. en ovejas se inició en el siglo XX por Ivanov (1907-1912), quien desarrolló estudios sobre medios de dilución y reproducción asistida, así como la aplicación de la IA en animales de granja (Salomón y Maxwell, 2000).

Después de la primera guerra mundial se hicieron estudios intensivos sobre semen fresco y diluido a gran escala en programas de cruzamiento en ovejas. La necesidad de fertilizar un gran número de ovejas requería transportar el semen desde puntos o centros de colección a los sitios de inseminación o a granjas distantes (Salomón y Maxwell, 2000).

En México, la I.A. en ovejas es poco utilizada en comparación a otras especies como los bovinos y porcinos; esto, puede deberse al desconocimiento de la técnica. Sin embargo, su empleo ofrece importantes ventajas en relación al empadre natural, como son la aceleración del mejoramiento genético del rebaño, los machos genéticamente superiores pueden utilizarse ampliamente en cuanto al número de servicios posibles en un área geográfica mayor, mejoramiento del control reproductivo y sanitario, y además permite un mejor establecimiento de medidas de manejo (Cuadra *et al.*, 1990; Bustamante *et al.*, 1990).

La inseminación con semen fresco, vía pericervical, es la más usada debido al menor costo económico y regulares resultados en las tasas de concepción obtenidas. Pese a lo anterior, la utilización de semen fresco presenta ciertos inconvenientes, principalmente el corto tiempo de viabilidad de los espermatozoides, por ello su empleo se limita a lugares cercanos al sitio de recolección (Bustamante *et al.*, 1990).

La conservación del semen no solo a corto, sino a largo plazo es fundamental para el óptimo aprovechamiento del potencial reproductivo de los sementales

seleccionados. Para romper con las limitantes de la crioconservación del semen a corto plazo, se ha recurrido a la congelación del semen, teniendo como ventajas mantener a los espermatozoides en condiciones viables durante varios años. (Evans, 1988).

Los primeros reportes del uso de semen congelado en ovejas fueron los de Bernstein y Petropavlovsky en 1937. Usando una solución de glicerol, se ha observado que la fertilidad del semen congelado puede ser la misma en una pajilla almacenada de 1 año hasta 27 años (Salomón y Maxwell, 2000).

El semen, después de recolectado, se puede congelar y almacenar durante la estación reproductiva, cuando éste se produce con mayor concentración y calidad y, puede ser aplicado en cualquier época del año y área geográfica (Pérez, 1984; Bustamante *et al.*, 1990).

Otras ventajas de la congelación del semen son el óptimo aprovechamiento del potencial reproductivo de los machos genéticamente superiores, el aumento sustancial del número de crías por macho, la facilidad en el transporte del germoplasma, el incremento en las posibilidades de mejoramiento tecnológico como la introducción de nuevos genotipos y la más rápida multiplicación de razas nuevas (Jheltobruch, 1979; Miller, 1980; Evans, 1988).

Sin embargo, la conservación del semen ovino ha tenido dificultades porque presenta bajos porcentajes de supervivencia después de congelado, que se refleja en los índices bajos de fertilidad. En la mayoría de los casos la fertilidad obtenida va de un 25% a un 45%, aunque en condiciones experimentales se ha logrado pasar el 55% (Gutiérrez *et al.*, 1990; Evans y Maxwell, 1987).

La baja fertilidad obtenida con el empleo de semen congelado, después de la inseminación cervical, está relacionada a una reducida viabilidad de los espermatozoides descongelados, por lo cual no logra establecerse una población

suficiente de ellos en el cervix, además existen fallas en el transporte espermático a través del cervix y útero, hacia el oviducto (tuba uterina). Al final, muy pocos espermatozoides viables y sin daños alcanzan el sitio de fertilización, y como resultado, la fertilidad del rebaño disminuye (Evans y Maxwell, 1987).

Hace pocos años, se desarrolló la técnica de inseminación intrauterina por medio de laparoscopia; de esta manera, la barrera del cervix es superada, ya que el semen se deposita directamente en los cuernos uterinos, y las tasas de concepción son comparables a las obtenidas con la monta natural u otras formas de inseminación con semen fresco (Evans y Maxwell, 1987).

Como se mencionó anteriormente, su empleo en México es muy limitado sobre todo por el costo económico que representa para la mayoría de los criadores y porque se requiere de personal técnico especializado en su manejo.

El mejoramiento genético requiere un balance entre la selección y la eficiencia reproductiva, una opción es la utilización de los métodos de conservación de gametos, para mejorar y potencializar sus efectos positivos. El desarrollo de éstos métodos se ha enfocado en la actualidad a reducir el metabolismo del espermatozoide y a prolongar su vida fértil, así como a estudiar el semen en estado líquido usando diferentes temperaturas u otros factores que deprimen el metabolismo del espermatozoide, así como el estado de congelación en el que se involucra la preservación a temperaturas bajo cero (Salomón y Maxwell, 2000).

II.- Crioconservación

Etimológicamente, crioconservación es la forma prefija de la voz griega *kryós*, que significa frío glacial y el latín *conservatio* que habla de mantener y cuidar algo en cierto estado. En criobiología, la crioconservación es la técnica de conservación de las células en nitrógeno líquido (-196°C) manteniéndolas vivas, deteniendo su crecimiento pero conservando la viabilidad y la estabilidad genética y fisiológica. El proceso debe ser reversible y debe mantener la integridad celular con el daño mínimo con temperaturas por debajo del punto de congelación.

Es una técnica reciente y con buenas perspectivas, pues permite almacenar, por periodos indefinidos, células de cualquier especie que tolere y sobreviva al congelamiento (Benson, 1999).

Hace más de cinco décadas, Polge *et al.* (1949) descubrieron accidentalmente las propiedades crioprotectoras del glicerol sobre los espermatozoides. Desde entonces, se inició la congelación de semen de algunos animales domésticos de forma rutinaria. La especie bovina fue la que recibió la mayor atención de los investigadores y el mayor beneficio con el uso del semen congelado en la I.A.. Actualmente, en algunos países, la industria de producción de leche bovina depende casi en su totalidad de la I.A. con semen congelado-descongelado.

El desarrollo de la tecnología de la crioconservación representa considerables progresos prácticos y económicos de la aplicación de la I.A. Sin embargo, algunos factores pueden afectar el mantenimiento de la función de los espermatozoides durante el proceso de congelado-descongelado; entre ellos se encuentran el método de congelación, la composición del diluyente y la tasa de dilución. Por esto, la motilidad y viabilidad del espermatozoide son muy variables al descongelado y una gran cantidad de dosis se tienen que descartar (Alessandro *et al.*, 2001).

En la época de los 50 se realizó una considerable cantidad de experimentos sobre el método de dilución y congelación en el semen de carnero, que inicialmente tratado como el semen de toro, dio muy pobres resultados de fertilidad: 5% de nacimientos (Salomón y Maxwell, 2000).

Anteriormente, se realizaban estudios con el enfoque metodológico tradicional, se basado en el ensayo acierto y error; lo que ciertamente produjo esto ha producido importantes avances en la conservación de semen. La investigación actual de la conservación de gametos se propone estudiar, entre otras cosas, los fenómenos físico-químicos básicos que intervienen en el proceso de congelado y descongelado, así como la conducta de los espermatozoides ante tales condiciones. Para ello se requiere aumentar la investigación en la línea de conservación de gametos que tienden a disminuir la pérdida de células vivas y viables a la descongelación de los mismos (Salomón y Maxwell, 2000).

Enfriado y Congelación de semen

El enfriado del semen a temperatura cercana a 0°C proporciona un periodo de adaptación del espermatozoide a través de la reducción de la función metabólica. La congelación puede ser lenta o rápida, bien en vapores de nitrógeno líquido o en bloques de hielo seco; cuando se utiliza el primer método, se congela generalmente en pajillas de plástico y, en pastillas (pellets) cuando se emplea el segundo. Sea de una forma u otra, siempre se introducen en nitrógeno líquido para su conservación final (Evans y Maxwell, 1987).

El semen se puede congelar en uno o dos pasos. En el método de dos pasos, el contacto con el glicerol se inicia a 5°C; en el método de un paso, se inicia el contacto con el glicerol a los 30°C. En ambos métodos, se somete a un periodo de enfriado de 1 a 3 horas, en donde los factores enfriado y equilibrio no son independientes y puede existir una interacción entre el tiempo de enfriado a 5°C y

dicho equilibrio; en el caso del semen enfriado sin glicerol, éste sufre daño a las 2 horas de enfriado (Salomón y Maxwell, 1995).

Patt y Nath (1969) observaron que un enfriado rápido, en un tiempo de 35 a 45 minutos produjo una calidad inferior post congelación del semen comparado con un enfriado lento en 2.5 horas. El enfriado rápido del semen diluido desde 30°C a 15 °C no tiene efecto sobre la supervivencia antes o después del congelamiento, pero el congelamiento rápido del semen desde 30°C, 15°C, 5°C ó 0°C afecta la motilidad del semen al descongelado (Fiser y Fairfull, 1986, citado por Salomón y Maxwell, 1995). Se ha observado que mientras más rápido sea el proceso de congelación existe mayor probabilidad de que ocurra el fenómeno de choque frío y en consecuencia la muerte celular (Watson, 1995; Byrne *et al.*, 2000).

El semen de carnero, sufre daños durante la congelación en el rango de temperatura de -10°C a -25°C, los daños primarios de la membrana del espermatozoide por la congelación y descongelación se dan a temperaturas de -15°C a -60°C y no durante la introducción al nitrógeno líquido (Mazur, 1965, citado por Byrne *et al.*, 2000). Por otra parte, el proceso de deshidratación celular que acompaña los fenómenos de congelación es potencialmente benéfico para la supervivencia de la célula.

Antes de la congelación, al momento de adicionar el glicerol al semen, se establece un equilibrio osmótico, éste depende del tiempo entre que el glicerol entre en la célula espermática para establecer un balance entre la concentración intracelular y extracelular de la célula espermática, y que también se ve influenciado por la acción de otros componentes osmóticamente activos del diluyente (Salomón y Maxwell, 1995).

La descongelación también es un paso importante para la viabilidad del espermatozoide, que ha logrado sobrevivir a una congelación de -196°C, y de pasar dos veces por una zona crítica de temperatura (-15°C a -60°C). Tanto en el

congelamiento como al descongelamiento, el espermatozoide sufre cambios intracelulares. La descongelación rápida, previene la recristalización de cualquier hielo intracelular presente en el espermatozoide (Mazur, 1977, citado por Salomon y Maxwell, 1995a) esto debido a que existe un menor tiempo de exposición del espermatozoide a la concentración de solutos y otros crioprotectores como el glicerol, también la restauración del equilibrio intra y extracelular es mas rápida que con el descongelado lento (Robins *et al*, 1976, citado por Salomon y Maxwell, 1995a). En el caso del espermatozoide de carnero, el mayor daño ocurre en el rango de temperatura de -10°C a -25°C , llamada la región de cristalización de hielo (Byrne *et al*, 2000).

Daños durante el proceso de congelación-descongelación

El proceso de crioconservación provoca diversos daños por diferentes causas: 1) por el cambio de temperatura; 2) por el estrés osmótico y tóxico ocasionado por la concentración molar y crioprotectores; y 3) por la formación y disolución del hielo en el medio extracelular (Watson, 2000).

La motilidad y la estructura del espermatozoide se ven afectadas por diferentes factores y no se sabe si los cambios ocurren simultáneamente o son causados en diferentes estados del proceso de congelación-descongelación (Salomon y Maxwell, 1995b).

Se ha observado que la membrana plasmática y la acrosomal son más sensibles que el núcleo y el sistema locomotor (pieza media) de la célula espermática. Del acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la parte interior (el propio acrosoma), y la membrana interna (Salomon y Maxwell, 1995b). Por lo tanto, un espermatozoide puede ser móvil pero a la vez estar dañado y en consecuencia es infértil. Un porcentaje relativamente alto de los espermatozoides de carnero (40-60%) conserva su motilidad después del proceso de congelación-descongelación,

y de ellos alrededor de 20 a 30% presenta cambios por daño (Salomon y Maxwell, 1995b)

Un fenómeno involucrado en el daño celular por la disminución de la temperatura es el llamado choque frío (Watson, 1981). Durante el choque frío, ocurren en el espermatozoide una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas que son las responsables del daño y muerte celular (De Leeuw *et al.*, 1991). Se ha observado que los espermatozoides de ungulados son muy sensibles a este fenómeno y los de conejo, perro, gato, hombre y gallo lo son menos. El rango de temperatura en que se presenta el choque frío va desde los 2°C a 12°C (Watson, 1981).

Los cambios morfológicos más importantes ocasionados por el choque frío son la ruptura de la membrana plasmática, la degeneración del acrosoma y el daño a las mitocondrias. Los cambios bioquímicos más notables son la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, una disminución de la tasa respiratoria y de glicólisis, y la degeneración de ADN (Watson, 1981).

El daño del espermatozoide es más severo en carneros que en toros. Después del enfriado lento y rápido del semen de carnero, la motilidad se preserva mejor que la integridad morfológica del espermatozoide.

Se ha reportado, que la relación entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y la proporción de espermatozoides móviles antes y después del proceso de congelación-descongelación tiene correlación con la proporción de espermatozoides con acrosoma dañado en la inseminación (Fiser y Fairfull, 1984 citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

La membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos presenta una distribución de partículas intramembranas característica. A temperaturas fisiológicas, las partículas están distribuidas sobre la cabeza y cola del espermatozoide, pero cuando la temperatura disminuye esta distribución cambia.

En el espermatozoides de carnero, se da la formación de zonas libres de partículas en la región post acrosomal y en el límite entre las piezas media y principal del flagelo (Holt y North, 1984).

Uno de los organelos que sufre mayor daño por la congelación es la mitocondria del espermatozoide (Jones y Martin, 1973, citado por Salomon y Maxwell, 1995b). Con relación a lo anterior, se han observado algunos cambios morfológicos en la mitocondria con pérdidas de proteínas (Quinn *et al*, 1969, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

También se ha reportado que después del proceso de congelado-descongelado, del 40 a 50% de las mitocondrias de las células están dañadas y la estructura del axonema se ve distorsionada (Nath, 1972, citado por Salomon y Maxwell, 1995b). Las anomalías, probablemente sean causadas por una despolimerización o una deshidratación parcial y por un daño sustancial en la matriz de la mitocondria (Courtens y Paquignon, 1985).

Cambios Bioquímicos

Los daños ultraestructurales del espermatozoide durante la congelación-descongelación también son acompañados por cambios bioquímicos o por pérdida del contenido vital. En relación a lo anterior, se encontró una correlación negativa significativa entre la motilidad del espermatozoide postdescongelación y el nivel de la enzima transaminasa glutámico-oxaloacética (Pace y Graham, 1970, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

Nauk (1991), informa que la pérdida de proteínas y aminoácidos es mayor en espermatozoides de carnero (20%) que en el de toro (11%); además, que en el semen del carnero hay pérdida de residuos de aminoácidos neutros asociados con la membrana plasmática.

Después del proceso de congelación-descongelación existe una pérdida de fosfolípidos y de fracciones de éstos, una pérdida de colesterol (15-50%), incrementa el contenido de sodio y una baja en el contenido de potasio en el espermatozoide (Profirov *et al*, 1986, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

El proceso de congelación-descongelación causa la inactividad de las enzimas del acrosoma; hialuronidasa y acrosina; incrementa los derivados del diacilglicerol, de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina; y baja la actividad de la fosfolipasa A₂ de la membrana (Hinkovska-Galcheva *et al*, 1980, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

Durante el enfriado a temperaturas de 4 a 5°C, el contenido de ácidos grasos insaturados disminuye, y el de los ácidos grasos saturados aumenta, pero se duda que haya cambios sustanciales en los ácidos grasos después del proceso de congelado y descongelado en la célula espermática (Nauk, 1991). También, hay una disminución en los grupos sulfhidrilo de la membrana celular con la consecuente desestabilización de la estructura de las proteínas (Profirov *et al*, 1986, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

El semen de borrego, contiene un nivel considerable de prostaglandinas (PG), alrededor de 50 microgramos ml⁻¹ de PGE y 12 microgramos ml⁻¹ de PGF en semen fresco; después del proceso de congelado y descongelado hay una reducción de la PGF (Milovanov *et al*, 1978). Algunos reportes, afirman que la PGF₂ alfa es más resistente al proceso de congelado y descongelado que las PGE₁, PGE₂ o PGF (Varnavskij 1981; Marley *et al.*, 1976, citado por Salomon y Maxwell, 1995b).

Otros disturbios que existen después del proceso de congelación-descongelación en el espermatozoide son la reducción o desaparición de la síntesis de ATP (adenosín trifosfato) producto del daño a las mitocondrias además de una

disminución en la actividad proteolítica (Platov, 1973 y Marinov *et al.*, 1980, citados por Salomon y Maxwell, 1995b).

Todos estos daños criogénicos ultraestructurales y bioquímicos son los responsables de la disminución en la integridad funcional, supervivencia y capacidad de fertilización del espermatozoide (Salomon y Maxwell, 1995b).

Fenómenos físico-químicos que ocurren durante el congelado y descongelado

A pesar de que desde hace muchos años se han estudiado los daños en las células sometidas al congelado, aun no se han encontrado los medios para controlar todos los fenómenos que las afectan. Los fenómenos físico-químicos más importantes son:

Fase de transición de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide. Los cambios de temperatura ocasionan que los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide sufran un cambio en su estado físico; en condiciones fisiológicas, se encuentran en un estado líquido-cristalino, al disminuir la temperatura, cambian al estado de gel o cristalino-gel (Holt y North, 1994).

Formación extra e intracelular de hielo. El enfriado de los espermatozoides a una velocidad lenta permite la deshidratación celular y el hielo se forma en el compartimiento extracelular. En cambio, el enfriado rápido evita que la célula se deshidrate y el hielo se forma intracelularmente. Se considera que la formación intracelular de hielo es dañina para los espermatozoides. Desde este punto de vista, el enfriado lento parece ser el más adecuado; sin embargo el periodo de exposición a la elevada osmolaridad causada por la concentración de solutos es mayor que en el enfriado rápido (Parks y Graham, 1992).

Liberación de calor latente de cristalización. La formación de hielo ocasiona la liberación de calor, esto ocurre por un cambio en el estado de la materia. La temperatura subirá desde el punto en que ocurrió la formación de hielo, alrededor de los -5°C hasta cerca de 0°C , ésto de acuerdo a la concentración de solutos en el medio, y se mantendrá ahí hasta que el calor se disipe. Se cree que mientras más largo sea el periodo de disipación del calor mayor será el daño a las células (Parkinson y Whitfield, 1987).

Sobre-enfriamiento (supercooling). Este fenómeno ocurre cuando la suspensión celular es enfriada más allá de su punto de congelación sin que se forme el hielo. En condiciones experimentales, se ha logrado sobre-enfriar agua pura hasta los -20°C (Holt, 2000).

Estrés por concentración de solutos. Cuando ocurre la congelación, el agua pasa a formar cristales de hielo. A medida que este fenómeno se sucede, aumenta la concentración de solutos en el medio. El aumento en la osmolaridad provoca mayor deshidratación de las células y en consecuencia un mayor encogimiento de la membrana. La exposición de las células a tales condiciones de hiperosmolaridad es considerada perjudicial.

Además de los fenómenos físico-químicos arriba descritos, hay una serie de variables que también intervienen en el proceso de crioconservación del semen.

Susceptibilidad entre especies

La susceptibilidad de los espermatozoides de las diferentes especies al enfriado es un fenómeno que se ha observado desde el inicio de la crioconservación. La sensibilidad de los espermatozoides al enfriado rápido que ocurre en el rango de 0 a -20°C se le conoce como choque frío (Watson, 1979). Se ha observado que los espermatozoides de ungulados son más sensibles, los de conejo, perro, gato, hombre y gallo, son menos susceptibles (Holt, Watson, 2000).

Susceptibilidad entre individuos

Esta característica se observa constantemente a pesar de optimizar las variables técnicas del proceso de congelado-descongelado. Se ha observado que el semen de algunos individuos es más sensible a las modificaciones del proceso, esto ha llevado a que se piense que dichas diferencias pueden estar determinadas genéticamente. En apoyo a este punto de vista se ha observado una menor variabilidad en la criosupervivencia de los espermatozoides entre toros cuádruples que entre toros sin parentesco. También se han encontrado diferencias entre líneas genéticas de ratones, de gallos, de pavos, y existen evidencias de variación entre líneas genéticas de cerdos (Thurston *et al.*, 2002).

Heterogeneidad de los eyaculados

Los eyaculados son heterogéneos por naturaleza. Esta cualidad está determinada por una serie de condiciones fisiológicas que ocurren en el tracto genital de la hembra y del macho. Durante el estro, el momento entre la cópula y la ovulación, pueden variar, entonces los espermatozoides deben sobrevivir dentro del tracto femenino por largos periodos. Asimismo, la capacidad de los espermatozoides para fertilizar debe distribuirse a lo largo de ese periodo. En consecuencia, se da la existencia de subpoblaciones heterogéneas de espermatozoides dentro de un mismo eyaculado. Esto sucede, porque el eyaculado contiene subpoblaciones provenientes del epidídimo, con diferente grado de madurez y porque la capacidad de fertilizar es adquirida en estadios (oleadas) en el tracto reproductor femenino.

Este punto es importante porque la crioconservación afecta de forma diferente a las subpoblaciones de espermatozoides reduciendo la heterogeneidad y en consecuencia las posibilidades de que la fertilización ocurra exitosamente (Watson, 1995).

Selección indirecta de la característica de susceptibilidad al congelado

El semen de toro se ha logrado congelar con éxito y esto se debe parcialmente a la selección de los machos cuyo semen ha pasado la prueba de la congelación. Es un hecho que los machos que logran superar esta prueba son los que pasan a las pruebas de progenie. Esto, no ha ocurrido en otras especies ni es deseable que ocurra si no hacen las pruebas de progenie adecuadas y si la selección de animales está basada en otro tipo de características, como es el caso de los ovinos (Watson, 1995).

Cambios de volumen

Los cambios del volumen del espermatozoide se inician desde que éste es expuesto a los diluyentes conteniendo crioprotectores (glicerol el más común). Primero, hay aumento de volumen causado por la osmolaridad del diluyente, después el volumen original se restablece a medida que el glicerol penetra la célula. El enfriado y congelación ocasionan deshidratación y encogimiento de la célula. Al descongelado, la célula se hincha temporalmente hasta que el agua y los solutos del medio se equilibran. Se debe hacer hincapié en que la membrana plasmática del espermatozoide no tiene la capacidad para afrontar convenientemente tales flujos de líquidos (Rall, 1991).

Recristalización

En el descongelamiento, el hielo se funde formando cristales de diferentes tamaños. Un descongelamiento lento permite que los cristales más pequeños se unan entre sí formando cristales de mayor tamaño, los cuales dañan a las células; por el contrario, el descongelado rápido evita la cristalización (Watson, 1995).

Capacitación y crioconservación

El enfriado y la congelación del semen inducen cambios en los espermatozoides que simulan aquellos producidos por el proceso de capacitación y de reacción acrosomal (Watson, 1996). Esto significa que los espermatozoides han "envejecido" y que su oportunidad de poder fertilizar a algún ovocito ha disminuido significativamente. La capacitación de los espermatozoides es un proceso que involucra transformaciones metabólicas y morfológicas cuyo propósito es conferir al espermatozoide la capacidad de fertilizar (Yanagimachi, 1994). La capacitación es un prerequisite para que el espermatozoide sea capaz de fertilizar, se sabe que durante el proceso de capacitación se remueven componentes de la membrana plasmática y la captación de calcio a través de ella, antes de que ocurra la reacción acrosomal.

Prueba de Clortetraciclina (CTC)

Para estudiar los cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides debido a los procesos fisiológicos (capacitación y reacción acrosomal) y no fisiológicos (crioconservación) se han utilizado diferentes pruebas. Actualmente, se dispone de una prueba para medir la capacitación de células individuales, esta prueba es la Clortetraciclina (CTC) (DasGupta *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1995; Green y Watson, 2001)

Parece que los medios en que se incuban los espermatozoides juegan a un papel importante en los procesos de congelación y descongelación del semen. Yanagimachii (1994) ha sugerido que el Ca^{2+} y NaHCO_3 son necesarios para la inducción de la reacción acrosomal.

La CTC atraviesa la membrana del espermatozoide y entra a los compartimientos intracelulares libres de calcio. Los que están negativamente cargados y libres de calcio se vuelven fluorescentes, el complejo CTC-Calcio se encuentra preferentemente en las regiones hidrofóbicas de la membrana celular. De lo anterior, resulta un estado de patrones característicos de la etapa fisiológica exhibida por el espermatozoide. Estos patrones son:

El **patrón F** con fluorescencia uniforme en toda la cabeza del espermatozoide, considerado característico de los espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto; el **patrón B** con fluorescencia excepto en la región posacrosomal, considerado característico de los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; y el **patrón AR** mostrando una banda fluorescente en el segmento ecuatorial y el resto sin fluorescencia, considerado característico de los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal completa (Gillan *et al.*, 1997). En el semen fresco, la proporción del patrón F es la de mayor magnitud (alrededor de 60%), mientras que la de los patrones que indican capacitación está alrededor de 40%. En cambio, en el semen descongelado la proporción del patrón F es alrededor del 10% y el resto corresponde a los patrones B y AR (Gillan *et al.*, 1997). La caracterización y cuantificación de estos patrones involucra el uso de microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

- Prueba de Clortetraciclina (CTC)
- 3 patrones de fijación a la membrana:
 - F → no capacitado, acrosoma intacto
 - B → capacitado, acrosoma intacto
 - AR → capacitado, con reacción acrosomal

Recursos técnicos para superar los fenómenos físicos y químicos que ocurren durante el proceso de congelado-descongelado

El uso de máquinas para el congelamiento de semen, de manera controlada ha mejorado levemente la supervivencia de los espermatozoides, al proporcionar condiciones más uniformes para el proceso. Sin embargo, éste sistema sólo permite el control de la temperatura dentro de la cámara de congelado, sin considerar la temperatura dentro de las pajillas que contienen al semen, lo que conlleva a disparidades importantes entre las curvas de enfriado de la cámara de congelado y las pajillas (Holt, 2000).

Existen algunos prototipos de máquinas para congelar, no comerciales, contruidos para minimizar algunas variables del proceso. Por ejemplo, el calor latente de cristalización, o para optimizar otras, por ejemplo la velocidad de congelado (Medrano *et al.*, 2002).

Sin embargo, no en todos los laboratorios se dispone de estas máquinas, por lo que es preciso establecer un sistema para lograr congelar semen de tal forma que se alcancen los niveles de temperatura adecuados o cercanos a lo ideal para el enfriado y congelación.

Respecto a esto, el enfriado precongelación se torna relevante a partir de los resultados de varios estudios sobre la viabilidad espermática que abarcan desde el enfriado a temperatura cuarto hasta la formación del hielo. En ellos, se ha observado una pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de la función celular del espermatozoide (Watson, 1995; Gao *et al.*, 1993).

Esto se puede explicar debido a que los cambios de temperatura ocasionan que los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide sufran un cambio en su estado físico; en condiciones fisiológicas, se encuentran en un estado líquido-cristalino, al disminuir la temperatura, cambian (transición de fase) al estado de gel, cristalino-gel. La fluidez disminuye y este cambio hace que la membrana se vuelva rígida y pierda elasticidad, en la cual ya no puede manejar convenientemente los cambios osmóticos asociados. Se ha identificado un rango de temperatura a la cual ocurre este cambio en los espermatozoides de mamíferos: entre 10°C y 17°C (Holt y North, 1994).

Con estos hallazgos, algunos investigadores han logrado mejorar la viabilidad de los espermatozoides de cerdo retrasando el enfriado de 15°C por 3 horas (Maxwell y Johnson, 1997). Medrano *et al.* (2001) observaron que al prolongar el tiempo de enfriado hasta -5°C favorecía la criosupervivencia del semen del macho cabrío. Por lo anterior, se puede suponer que si ampliamos el tiempo de enfriado precongelación, éste permitirá el reacomodo transversal y de dominios de la estructura tridimensional lipídica de la membrana plasmática, manteniendo su estabilidad y función, esperando así disminuir la capacitación espermática que puede inducir a una reacción acrosomal, favoreciendo así, la capacidad de fertilización con semen congelado.

OBJETIVOS

General

El objetivo de este trabajo fue examinar el efecto sobre la criosupervivencia de los espermatozoides de carnero con enfriado lento precongelación a dos temperaturas blanco cercanas a cero y su comparación contra el enfriado tradicional.

Específicos

1. Estandarizar un método de enfriado de espermatozoides de carnero a temperaturas bajo cero grados empleando un sistema de recipientes con solución salina hipertónica, líquida y congelada.
2. Examinar la integridad morfológica (integridad de la membrana plasmática y acrosomal) y funcional (motilidad progresiva) de los espermatozoides de carnero sometidos a los tratamientos de enfriado precongelación.
3. Examinar el estado de capacitación de los espermatozoides de carnero sometidos a los tratamientos de enfriado precongelación.
4. Examinar las diferencias entre individuos (machos) en relación a la susceptibilidad de su semen a la crioconservación.

HIPÓTESIS

El enfriado lento pre congelación de los espermatozoides alrededor de 0°C permite que los lípidos de la membrana plasmática tengan tiempo de reorganizarse, una vez que ha ocurrido la fase de transición, para evitar la ruptura de la membrana cuando ésta se enfrenta a los cambios de volumen ocasionados por la formación de hielo; de esta forma, se favorecerá la criosupervivencia espermática y se reducirá la proporción de espermatozoides con capacitación prematura.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Módulo de Ovinos y en el Laboratorio de Reproducción e I.A. de la Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán de la UNAM, ubicados en el km. 2.5 de la Carretera Cuautitlán - Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

Animales

Se utilizó el semen de 4 carneros de fertilidad probada: 3 de la raza Columbia, con una edad de 2, 2.5, y 6 años de edad, y un macho de la raza Suffolk de 4 años, los animales presentaban buena condición corporal al momento de hacerse la colección del semen.

Alojamiento de los animales

Los carneros se mantuvieron separados en corrales individuales, construidos con rejillas de hierro con una área de 10 m², de los cuales el espacio de techo corresponde a 6 metros y un espacio de sol de 4 metros.

Alimentación de los carneros

Los carneros fueron alimentados con alfalfa recién cortada y pasto orchard, avena henificada y ensilado de maíz, proporcionando el 3% del peso de los animales en base seca por día por animal.

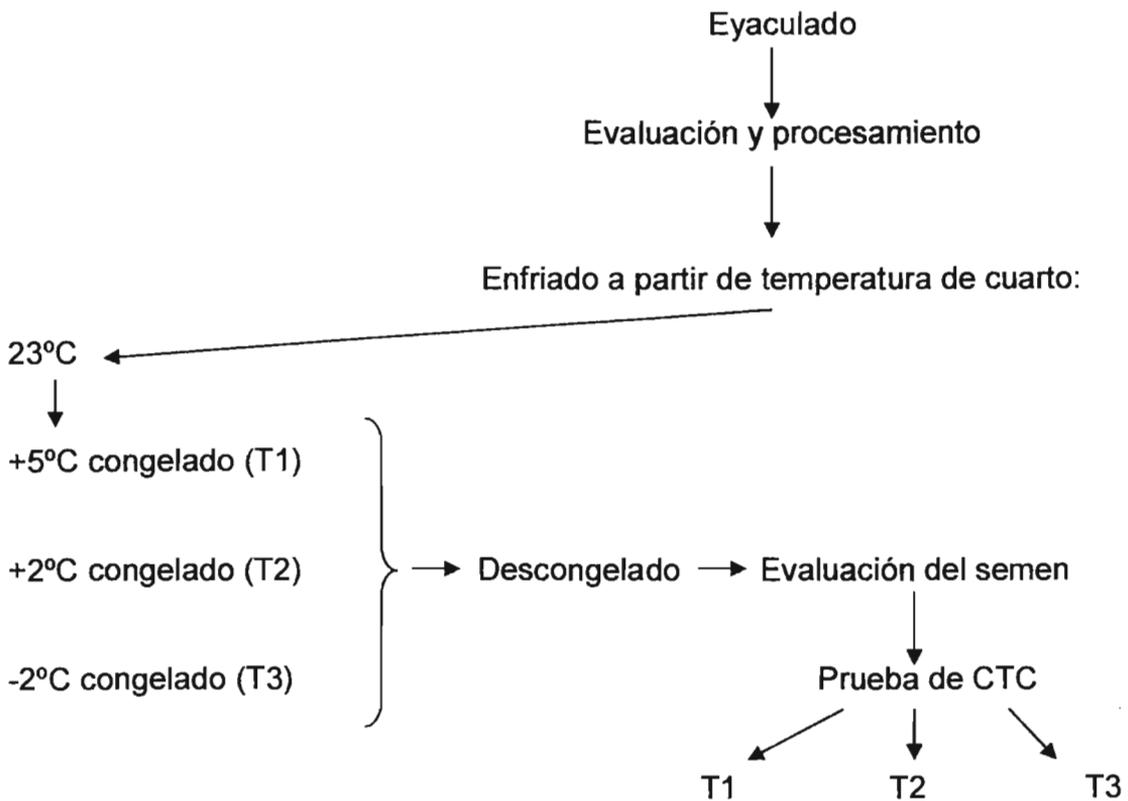
Obtención de las muestras de semen

La colección de las muestras se realizó por medio del método de la vagina artificial. Una vez colectadas, las muestras fueron colocadas en un baño maría a 32°C.

En los días de colección se trabajó el eyaculado de un solo macho. La recolección del semen se realizó 3 veces a la semana durante el período de Marzo a Junio del año 2003 hasta completar 20 muestras (5 por macho).

DISEÑO EXPERIMENTAL

- 4 machos
- 5 eyaculados/macho (n = 20)
- 3 tratamientos:
 - T1 enfriado a +5°C
 - T2 enfriado a +2°C
 - T3 enfriado a -2°C
- 3 pajillas/ tratamiento



Manejo y valoración del semen fresco

Las características que se evaluaron fueron:

- 1) Motilidad masal
- 2) Motilidad progresiva
- 3) Concentración
- 4) Viabilidad
- 5) Anormalidades morfológicas (morfoanomalías)

1) Motilidad masal. El movimiento de los espermatozoides se examinó en el semen sin diluir y a bajo aumento (10x); esto proporcionó una visión del movimiento en conjunto de todos los espermatozoides. Para ello, una gota de semen sin diluir fue colocado en un portaobjetos limpio y templado y se examinó bajo el microscopio. El valor asignado a las ondas de movimiento del semen fue de 0 a 3 puntos, de acuerdo a la siguiente descripción:

Evaluación de la motilidad masal

Marca	Clase	Descripción
3	muy buena	Ondas densas y muy rápidas
2	buena	Movimiento vigoroso, ondas rápidas
1	regular	Ondas pequeñas y lentas
0	pobre	No hay ondas, movimiento débil

Modificado de Evans y Maxwell (1987).

2) Motilidad progresiva. La motilidad progresiva se evaluó a partir de una dilución 1:100 (v/v) de semen en solución salina fisiológica (0.9% p/v). Se tomó 0.1 ml de semen y se mezcló con 9.9 ml de cloruro de sodio; posteriormente, se realizó la evaluación de la motilidad progresiva colocando una gota en un portaobjetos limpio y templado, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo de 10x, dando un valor de 0 a 100 % a la proporción de los espermatozoides con movimiento progresivo.

3) Concentración. El método usado para su determinación fue la cuenta directa en el hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se empleó para tal fin la dilución 1:200 en solución de Hancock (v/v). Se contaron los espermatozoides contenidos en cinco de los 25 Cuadros de la cuadrícula central de la cámara, que están divididos a su vez en 16 Cuadros pequeños. De la dilución 1:100 (v/v) se tomó 1.0 ml y se mezcló con 1.0 ml de solución de Hancock para obtener una dilución 1:200 (v/v).

4) Viabilidad. La viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta) se evaluó examinando frotis teñidos con Eosina-Nigrosina (Barth y Oko 1989). Sobre un portaobjetos templado en una platina térmica a 37°C, se colocó una gota de semen de la dilución 1:100 (v/v) y una gota de tinción a la misma temperatura, se mezclaron ambas gotas y se hizo el frotis. Inmediatamente, se le seco rápidamente con aire. Se evaluaron 100 células espermáticas por frotis.

5) Morfoanomalías. El porcentaje de espermatozoides normales y anormales se estimó contando 100 células en diferentes campos de los frotis preparados para evaluar la viabilidad, pero esta vez sin considerar los colores que diferencian a los espermatozoides con membrana plasmática intacta o dañada.

Dilución del semen

Una vez estimada la concentración espermática, la muestra se diluyó con un diluyente a base de Tris-yema de huevo (Evans y Maxwell, 1987). Dicha dilución se realizó en el baño maría a 32°C, el diluyente se agregó a la misma temperatura del semen por la pared del tubo y se aplicó lentamente dividiendo el volumen total en tres fracciones, mezclando al agregar cada una de ellas.

Envasado de las muestras

Las muestras de semen diluído se envasaron en pajillas de 0.5 ml, a temperatura de cuarto, previamente identificadas anotando el tratamiento, número de macho y la fecha; las pajillas se sellaron con plastilina de uso escolar utilizando el color amarillo para el tratamiento de +5 °C, el color azul para las de +2°C y el color rosa para las de -2°C. Se congelaron cinco pajillas por tratamiento. El número de células móviles envasadas por dosis fue de 180×10^6 .

Enfriado de las muestras

El sistema de recipientes de enfriado fue el siguiente:

- 1) Recipiente de enfriado con solución salina hipertónica (7.85% p/v) de 1.4 litros de capacidad y tapa con 5 orificios (Recipiente A, Figura 1).
- 2) Tubos de vidrio contenedores de pajillas; uno para cada tratamiento de 17 cm de largo y 1 cm de ancho. Estos tubos estaban colocados en los orificios del recipiente A.
- 3) Recipiente térmico con hielo salino a -10°C , para el enfriado hasta -2°C , de 2.5 litros de capacidad (Recipiente B, Figura 2).

La cantidad de sal que se empleó para preparar la solución hipertónica, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta T_f = K_f \cdot m$$

Donde:

ΔT_f = incremento de la temperatura de fusión

K_f = constante crioscópica molar (1.86 para el agua)

M = molaridad (moles de soluto/Kg de disolvente)

Peso molecular del NaCl = 58.44

78.5 g de NaCl/Litro = 1.343258 moles

$$\Delta T_f = 1.86 \times \frac{1.343258 \text{ (moles de soluto)}}{0.8448 \text{ (Kg agua)}} = 3$$

El punto de congelación teórico, de la solución salina hipertónica (7.85%) es a -3°C .

Procedimiento del enfriado lento precongelación

El enfriado se realizó en dos etapas: la primera desde temperatura de cuarto ($+23^\circ\text{C}$) hasta $+5^\circ\text{C}$, y la segunda desde $+5^\circ\text{C}$ hasta -2°C .

Primera etapa

1. Se llenó el recipiente A con solución salina hipertónica a temperatura ambiente.
2. Se le colocó la tapa con orificios marcados para cada tubo y se colocaron los 5 tubos en los orificios:
 - 3 tubos contenedores de pajillas (1 para cada tratamiento)

- 1 tubo llamado monitor: Contenía 3 ml del diluyente utilizado donde se sumergió la sonda de un termómetro digital y que se usó como monitor para tomar lecturas de temperatura
- 1 tubo conteniendo semen diluido sin empajillar, que se empleó para monitorear la motilidad masal al alcanzar los -2°C .

3. Se colocó el recipiente A en un refrigerador calibrado a $+5^{\circ}\text{C}$ para iniciar el proceso de enfriado, se registraron los siguientes datos:

- a) hora de inicio del enfriado
- b) temperatura del tubo monitor
- c) temperatura ambiente o de cuarto

El tiempo promedio para que las pajillas alcanzaran la temperatura de $+5^{\circ}\text{C}$ fue de 3 horas aproximadamente (Gráfica 1).

Segunda etapa

1. Una vez que las pajillas alcanzaron la temperatura de $+5^{\circ}\text{C}$, las correspondientes al tratamiento 1 (enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$) fueron retiradas del recipiente A y se colocaron horizontalmente sobre una rejilla colocada a 4 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, en una caja de poliestireno, durante 15 minutos para posteriormente sumergirlas en el nitrógeno contenido en el mismo recipiente en que se expusieron a los vapores.
2. Antes de llegar a la primera temperatura blanco, se preparó el recipiente B con hielo salino a -10°C (frappe).
3. Cuando se alcanzó la temperatura de $+5^{\circ}\text{C}$, se colocó el recipiente A dentro del recipiente B (dentro del refrigerador) para que las pajillas del segundo y tercer tratamiento alcanzaran la temperatura de enfriado a 2°C (8 a 12 minutos aproximadamente) y -2°C (25 a 30 minutos aproximadamente).
4. Una vez que las pajillas alcanzaron las temperaturas blanco: $+2^{\circ}\text{C}$ y -2°C , se retiraron del recipiente A y se congelaron como en el punto 1.

Posteriormente, las pajillas congeladas se colocaron en gobelets previamente identificados, se depositaron en el tanque de nitrógeno y se anotó la fecha de procesamiento de la muestra, el número del macho, el número de pajillas procesadas, el número de canastilla del termo de nitrógeno y el gobelet interno en que fue colocada la muestra.

Descongelado de las pajillas

El semen congelado permaneció en el tanque de nitrógeno por un periodo mínimo de 15 días. Para el descongelado, las pajillas fueron sumergidas en baño maría a 37°C durante 30 segundos. Enseguida, las pajillas se secaron y el contenido se depositó en tubos vacíos colocados en el mismo baño maría. Se descongelaron tres pajillas de cada tratamiento de cada muestra. Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- 1.- Motilidad progresiva en solución salina fisiológica (0.9% p/v) a una dilución de 1:10 (v/v).
- 2.- Motilidad progresiva en BTS (Pursel y Johnson, 1975) a una dilución de 1:10 (v/v).
- 3.- Evaluación de la viabilidad (Tinción eosina - nigrosina)
- 4.- Evaluación de la integridad del acrosoma (microscopía de contraste de fases).

La evaluación de la integridad de la membrana externa del acrosoma se hizo de la siguiente forma. Los espermatozoides se fijaron empleando una solución de glutaraldehído al 0.4% (v/v) en una proporción de 2:1 solución fijadora: semen diluido. Posteriormente, se colocó 1 gota del semen en glutaraldehído en un portaobjetos a temperatura ambiente, se le colocó un cubreobjetos, y encima una gota de aceite de inmersión. La preparación se observó al microscopio con el objetivo de 100x, se evaluó un total de 100 espermatozoides por muestra, clasificándolos como intactos o dañados.

5. Evaluación del estado de capacitación mediante la prueba la Clortetraciclina (CTC) y microscopía de fluorescencia. El procedimiento fue el siguiente:

Este protocolo es igual para el semen fresco y descongelado. Primero, se examina la movilidad del semen; enseguida, se filtra el semen a través de columnas de sephadex (6.25% p/v en Citrato de Sodio al 2.9% p/v) para seleccionar una población en que predominan los espermatozoides vivos y móviles; posteriormente, se examina la movilidad del semen para contrastar lo anterior. Después, se toma 100 μ l del semen filtrado y se le agrega 100 μ l de solución CTC, a esta mezcla, se le agrega 20 μ l de glutaraldehído al 0.2%. Enseguida, se toma 10 μ l de la suspensión de espermatozoides teñidos y fijados y se coloca sobre un portaobjetos; inmediatamente después, se le agrega una gota de DABCO (220 mM en glicerol) para retardar la pérdida de fluorescencia, y se le coloca el cubreobjetos presionándolo suavemente para expulsar el exceso de líquido. Estas preparaciones se hacen en duplicado. Las preparaciones se examinan al microscopio de fluorescencia en el lapso de una hora, como máximo, después de su preparación. Los patrones de fluorescencia que se cuantifican de cada preparación, son los mismos de Kaneto *et al.* (2002). La solución de CTC tiene que ser preparada fresca antes de cada experimento.

Tinción de CTC

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

Amortiguador CTC:

NaCl 130 mM

Tris 20 mM

Solución CTC:

CTC 805 μ M

Cisteína 5 mM

pH 7.8

Procedimiento:

- Colocar 100 μ l de semen + 100 μ l de solución de CTC en un tubo protegido de la luz.
- Mezclar durante 30 segundos
- Agregar 22 μ l de solución fijadora
- Preparar laminilla:
 - a) Colocar 10 μ l de los espermatozoides teñidos y fijados en un portaobjetos
 - b) Una gota de DABCO (Se utilizó diluído en glicerol:PBS [9:1] según la fórmula de Kaneto *et al.* (2002).
 - c) Colocar un cubreobjetos, comprimir y retirar el exceso de líquido.
- Examen al microscopio de fluorescencia.

Análisis estadístico

El análisis de la información se realizó mediante un análisis de varianza para comparar las medias de las variables obtenidas de los tres tratamientos. Primero se analizaron las posibles diferencias entre soluciones empleadas para observar la motilidad al descongelado, las diferencias entre replicas de cada macho (eyaculados) y entre repeticiones (pajillas). Enseguida, se analizaron las diferencias entre tratamientos y posteriormente se analizaron las diferencias entre machos y su interacción con el tratamiento. Los datos expresados en porcentaje se transformaron al arcoseno antes de realizar el análisis de varianza respectivo. Para realizar el análisis de varianza se empleó el paquete estadístico Stats Versión 5 (Stats Soft, Reino Unido).

RESULTADOS

I. Estandarización del sistema de enfriado

El sistema de enfriado a temperaturas bajo cero grados se logró mediante el uso de un sistema de doble recipiente y solución salina hipertónica (7.85%): el recipiente interno contenía solución salina líquida y el externo solución salina en forma de hielo a -10°C (Figura 2). Las curvas tiempo-temperatura obtenidas de este sistema de enfriado fueron repetibles y tuvieron una variación mínima entre cada día de prueba (Gráficas 1 y 2).

II. Criosupervivencia de los espermatozoides después del enfriado precongelación a tres diferentes temperaturas

En el Cuadro 1 se presentan los valores del semen fresco de cada macho. Como se puede ver, se partió de muestras que tenían valores superiores a 70% de motilidad progresiva, además queda manifiesto que uno de los machos presentó consistentemente valores de motilidad inferiores a los otros tres.

Los resultados de las variables obtenidas de los diferentes tratamientos se presentan en el Cuadro 2. El porcentaje de espermatozoides mótils del tratamiento enfriado a -2°C (43.8%) fue significativamente diferente ($p < 0.001$) al de los otros dos tratamientos: $+5^{\circ}\text{C}$ (40.1%) y $+2^{\circ}\text{C}$ (39.8%).

Esta misma tendencia se observó en el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (espermatozoides vivos). El tratamiento enfriado a -2°C (78.3%) fue diferente ($p < 0.004$) a los otros dos: $+5^{\circ}\text{C}$ (75.6%) y $+2^{\circ}\text{C}$ (76.2%).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, se observó que el tratamiento enfriado a -2°C tuvo una mejor respuesta (79.9%) que los

tratamientos de enfriado a +5°C (77.9%) y +2°C (76.2%), y esta diferencia fue significativa ($p < 0.01$).

Los resultados de las variables obtenidas del semen descongelado por macho se pueden observar en el Cuadro 3. El porcentaje de espermatozoides mótiles para el macho número 1 (41.0%) fue similar al macho 3 (40.6%), y ambos fueron diferentes ($p < 0.001$) al los machos 4 y 2; éstos últimos fueron diferentes entre sí (46.2% y 37.1% respectivamente).

En relación al porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta, se observó que el macho 3 y 4 fueron similares (75.5% y 77% respectivamente), y difieren ($p < 0.003$) de los machos 1 (81.1%) y 2 (72.5%).

Para el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal, los machos 1 y 4 no tuvieron diferencias significativas, 81.3% y 81.1 respectivamente, pero ambos si difieren significativamente de los machos 2 y 3, 75,3% y 75.45 respectivamente; éstos últimos son similares entre sí.

III. Efecto del enfriado precongelación a tres diferentes temperaturas sobre la capacitación prematura de los espermatozoides

Los patrones fluorescentes que se observaron en este trabajo fueron los mismos que se han reportado en otras especies (Figura 3).

Los porcentajes de espermatozoides con capacitación prematura se presentan en el Cuadro 4 y en las Gráficas 3 y 4. El tratamiento de enfriado a -2°C mostró la menor proporción de espermatozoides capacitados (76.9%) que fue diferente ($p < 0.004$) a la obtenida del tratamiento enfriado a +2°C (84.1%) y a la obtenida del tratamiento enfriado a +5°C (83.8%).

IV. Diferencia entre individuos

En relación a los machos utilizados en este trabajo, se observó una variabilidad entre ellos en el proceso de congelado y descongelado, y esta susceptibilidad determinó la respuesta de cada individuo a los diferentes tratamientos (Gráficas 5, 6 y 7).

DISCUSIÓN

El espermatozoide es una célula terminalmente diferenciada, cuyo papel principal es el transporte de un paquete, constituido por el genoma nuclear y el centriolo, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con una batería de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, el acrosoma y una estructura móvil, el flagelo) y el los que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito con sus envolturas (Currie, 1987)

La viabilidad de la célula espermática decrece rápido y substancialmente luego de la eyaculación. La crioconservación, cuyo propósito es garantizar su sobrevivencia, ocasiona sin embargo un daño irreversible a la membrana plasmática causando ya sea la muerte celular (Hammerstedt *et al.*, 1990) o cambios parecidos a los que se ven durante la capacitación espermática (Watson, 1996; Cormier *et al.*, 1997) Éstos últimos dificultan o previenen su capacidad para interactuar con el ovocito durante la fertilización.

A diferencia de los animales inferiores, los espermatozoides de los mamíferos eyaculados deben sufrir el proceso capacitación para poder fertilizar el ovocito. La capacitación *in vivo* se lleva a cabo en el tracto reproductivo de la hembra, durante este proceso el espermatozoide sufre una serie de cambios fisiológicos que lo hacen "competentes para la fertilización" (Visconti *et al.*, 1995).

También la capacitación es conocida como los cambios que habilitan al espermatozoide para sufrir la reacción acrosomal y la hiperactivación. La capacitación ha sido relacionada con cambios espermáticos en la concentración de iones intracelulares, en la fluidez de la membrana plasmática, en la motilidad,

en el metabolismo y en la concentración de nucleótidos cíclicos y en la fosforilación de proteínas (Visconti *et al.*, 1995).

La membrana plasmática de los espermatozoides que han sido sometidos al enfriado y congelación esta desestabilizada (aumento de fluidez) y es susceptible a que ocurra la reacción acrosomal prematuramente. De esta manera, la vida de los espermatozoides se acorta considerablemente (Watson, 1996).

Diversos estudios señalan que un enfriado lento retarda la aparición de estos cambios y favorece la supervivencia de los espermatozoides. En trabajos similares con caprinos, han observado que los resultados en ambos concuerdan (Medrano *et al.*, 2001).

Los datos analizados en este trabajo muestran que el enfriado a temperaturas cercanas a la formación del hielo es más favorable para la criosupervivencia de los espermatozoides de carnero en comparación con la temperatura del enfriado tradicional a +5°C. El efecto del tratamiento de enfriado precongelación a -2°C fue positivo en cuanto a los resultados de las variables estudiadas: motilidad progresiva, espermatozoides con membrana plasmática intacta y espermatozoides con acrosoma intacto. Además, el cambio de espermatozoides no capacitados a capacitados fue menor en comparación con los otros dos tratamientos (+2°C y +5°C).

Lo anterior pudo deberse a dos factores principales. En primer lugar, el enfriado lento de los espermatozoides hasta llegar a la temperatura en que se forma el hielo permitió la deshidratación celular; de esta manera, el hielo se formó mayormente en el compartimiento extracelular. En cambio, el enfriado rápido evitó que la célula se deshidratara y el hielo se formó intracelularmente. Se considera que la formación intracelular de hielo es dañina para los espermatozoides (De Leeuw *et al.*, 1991).

En segundo lugar, el enfriado lento permite que la membrana plasmática tenga tiempo suficiente para reorganizarse, es decir que los cambios de transición de fase de los lípidos de la membrana (del estado líquido cristalino al estado de gel) se den lentamente y así se evite que existan fallas de continuidad en su estructura (Hazel, 1995).

Estos resultados sugieren que podría existir otro rango de temperatura en el que también ocurre la fase de transición de los lípidos de la membrana, a semejanza de la que ocurre en una especie de invertebrados acuáticos (Crowe *et al.*, 1989).

La prueba de la CTC se ha empleado para evaluar el estado de capacitación de los espermatozoides sometidos al proceso de crioconservación. En este trabajo la prueba se utilizó para comparar el efecto de tres tratamientos empleando alícuotas del mismo eyaculado. Esto significa que se partió del mismo valor de espermatozoides capacitados y que la respuesta observada al descongelado se debió al efecto del tratamiento. Esta es una aportación original de este trabajo, que hasta donde sabemos, no se ha reportado previamente. Las proporciones de espermatozoides no capacitados y capacitados en el semen fresco, obtenidas en el presente trabajo son similares a las reportadas por Gillan *et al.* (1997) en semen de carnero, así como las obtenidas en el semen descongelado.

El tercer factor involucrado es el individuo, es decir, la variación entre machos cuyo semen se empleó para congelar. Diversos estudios reportan en otras especies una variación importante de la susceptibilidad entre individuos para la crioconservación de su semen (Medrano y Holt, 1998; Holt, 2000). En éste trabajo algunos machos tuvieron una mejor respuesta al tratamiento que otros, a pesar de que las características del semen fresco fueron similares en todos ellos. La explicación que se ha argumentado, es que hay un componente genético que se manifiesta probablemente en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide así como en el componente protéico de la misma, y que esto es una característica racial (Thurston *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

La estandarización y utilización del sistema de enfriado con solución salina al 7.8% en el proceso de enfriado lento precongelación es una técnica que ayuda a prescindir de sistemas especializados, sofisticados y de alto costo para la congelación de semen.

El tratamiento de enfriado precongelación a -2°C mejoró significativamente la criosupervivencia de los espermatozoides al descongelado en comparación con el tratamiento control, enfriado a 5°C .

Se observó que algunos sementales fueron más sensibles a las modificaciones del proceso por lo que algunos presentaron una mejor viabilidad espermática que otros, de acuerdo a las variables estudiadas: motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma.

La capacitación prematura fue menor en los espermatozoides enfriados a -2°C .

La respuesta al tratamiento se modificó por la variación entre individuos, sugiriendo que hay una variación importante en la susceptibilidad del semen entre machos al proceso de congelado y descongelado.

Los resultados de este trabajo estimulan a continuar esta línea de investigación ampliando el número de machos donadores, aplicar temperaturas bajo 0°C que favorezcan la viabilidad de los espermatozoides y estudiando las propiedades de la membrana plasmática de los individuos menos susceptibles a la crioconservación para generar el conocimiento necesario que nos conduzca a la optimización del proceso.

Cuadro 1. Valores del semen fresco de cada macho

Macho No.	Motilidad Progresiva (MP%)	Concentración (X10⁶/ml)	Volumen (ml)	Espermatozoides vivos (%)	Espermatozoides Normales (%)
1	82 ± 6.71	2185 ± 42.13	2.6 ± 0.62	84 ± 4.22	84 ± 8.62
2	81 ± 8.94	2529 ± 634.24	1.7 ± 0.56	87 ± 6.54	93 ± 1.52
3	74 ± 4.18	2359 ± 652.97	1.8 ± 0.42	74 ± 3.57	90 ± 6.47
4	78 ± 8.37	2171 ± 156.62	1.7 ± 0.6	83 ± 4.15	66 ± 14.88

Los valores representan la media ± DE n=5 eyaculados por macho

Cuadro 2. Variables del semen descongelado por tratamiento

Tratamiento	Motilidad Progresiva (%)	Espermatozoides vivos (%)	Acrosomas Normales (%)
1 (+5)	40.1 ± 9.0 a	75.6 ± 9.15 a	77.9 ± 8.00 a
2 (+2)	39.8 ± 9.90 a	76.2 ± 9.37 a	77.6 ± 8.68 a
3 (-2)	43.8 ± 7.52 b*	78.3 ± 8.76 b**	79.9 ± 8.13 b***

Los valores son media ± DE n=5 eyaculados por macho. Letras diferentes en columnas difieren estadísticamente (*p<0.001, **p<0.004, *** p<0.008).

Cuadro 3. Variables del semen descongelado de cada macho

Macho No.	Motilidad Progresiva (%)	Espermatozoides Vivos (%)	Acrosomas Normales (%)
1	41.0 ± 7.82 a	81.1 ± 5.51 a	81.3 ± 7.52 a
2	37.1 ± 5.51 b	72.5 ± 8.42 b	75.3 ± 7.49 b
3	40.6 ± 8.01 a	75.7 ± 10.01 c	75.4 ± 9.08 b
4	46.2 ± 8.44 c*	77.0 ± 10.18 c**	81.1 ± 7.25 a***

Los valores son media ± DE n=5 eyaculados por macho. Letras diferentes en columnas difieren estadísticamente (*p<0.001, **p<0.003, ***p<0.0001)

Cuadro 4. Espermatozoides con capacitación prematura al descongelado

Tratamiento	Espermatozoides Capacitados (%)
1 (+5°C)	83.8 a
2 (+2°C)	84.1 a
3 (-2°C)	76.9 b

Letras diferentes en columnas difieren estadísticamente (p<0.01)

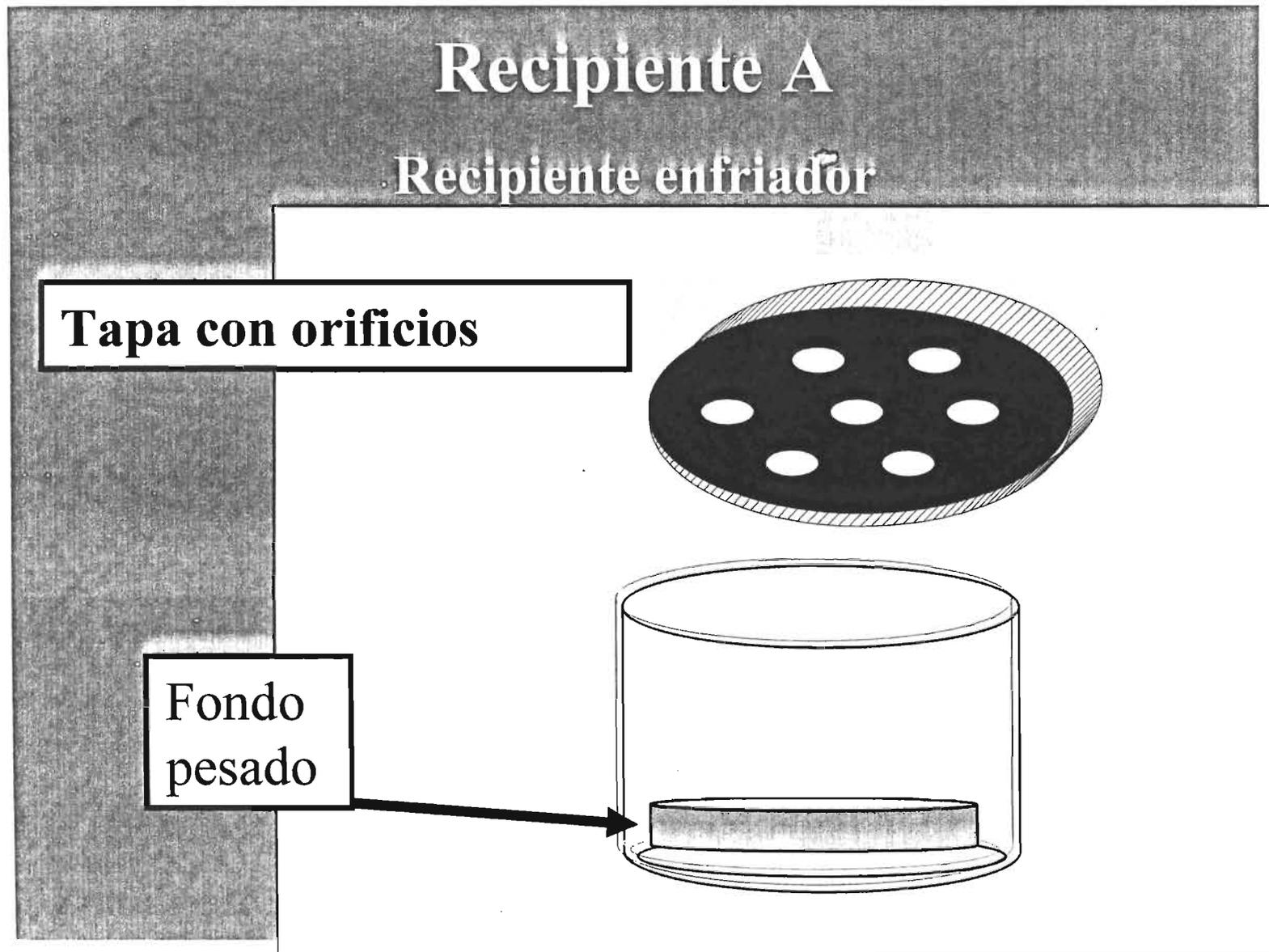


Figura 1. Recipiente A (enfriador) de 1.4 litros de capacidad.

Fondo pesado de 490 g, Tapa con 7 orificios (1 al centro y seis alrededor), Dimensiones: Diámetro: 14 cms. Altura: 12 cms. Grosor: 1 mm., Orificios: 2 cms. Diámetro Capa de fondo: 2 cm. grosor

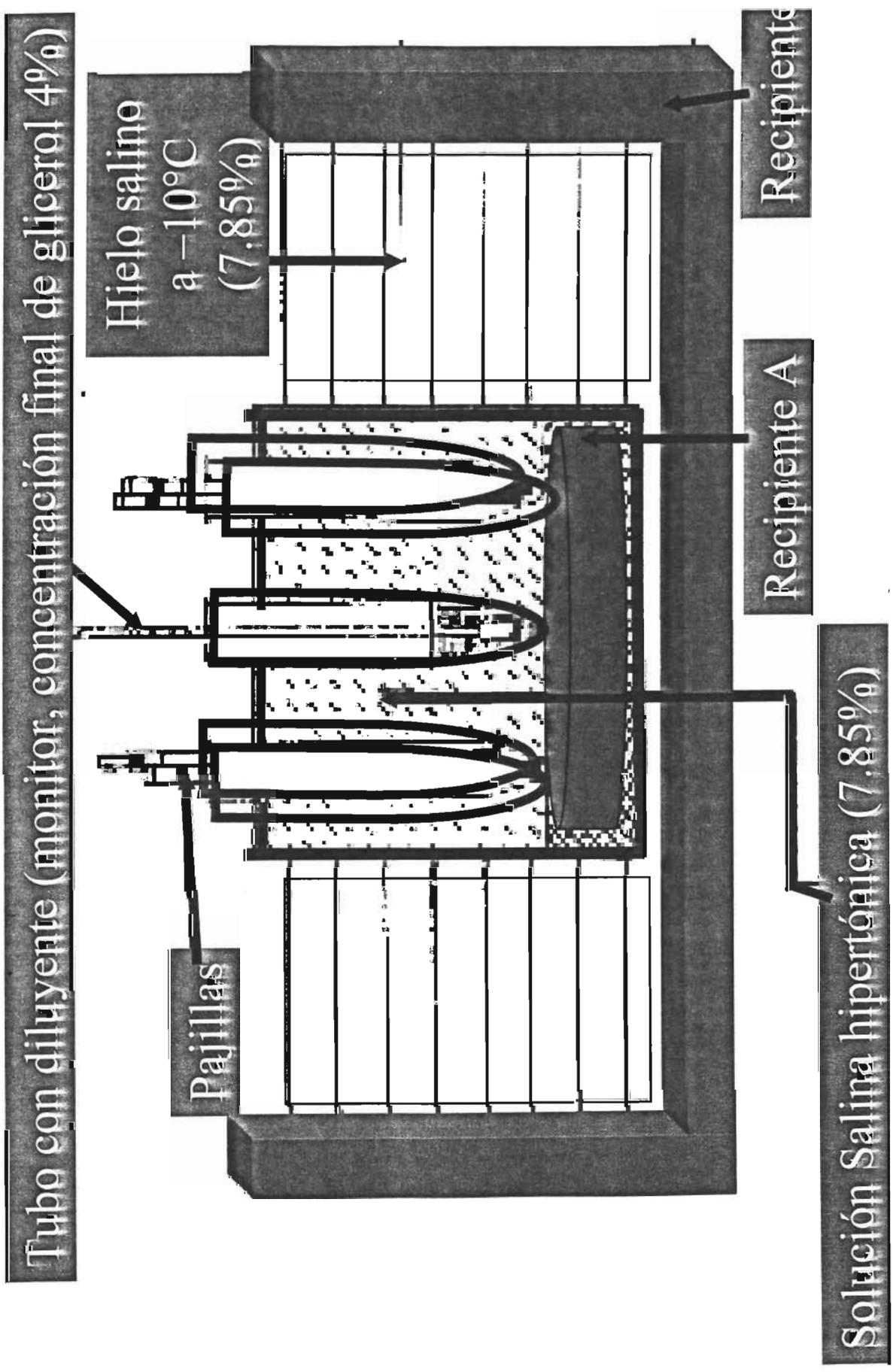
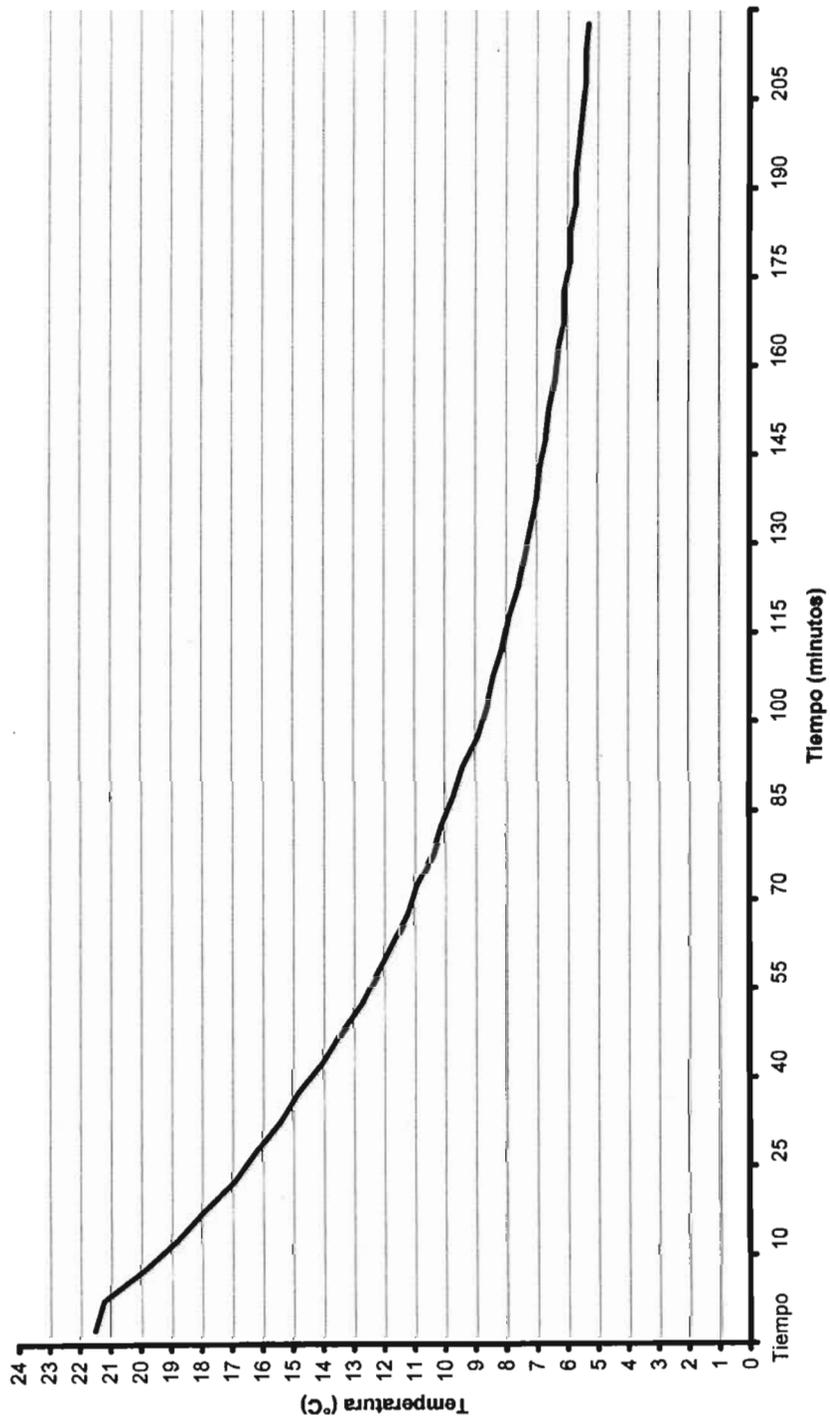
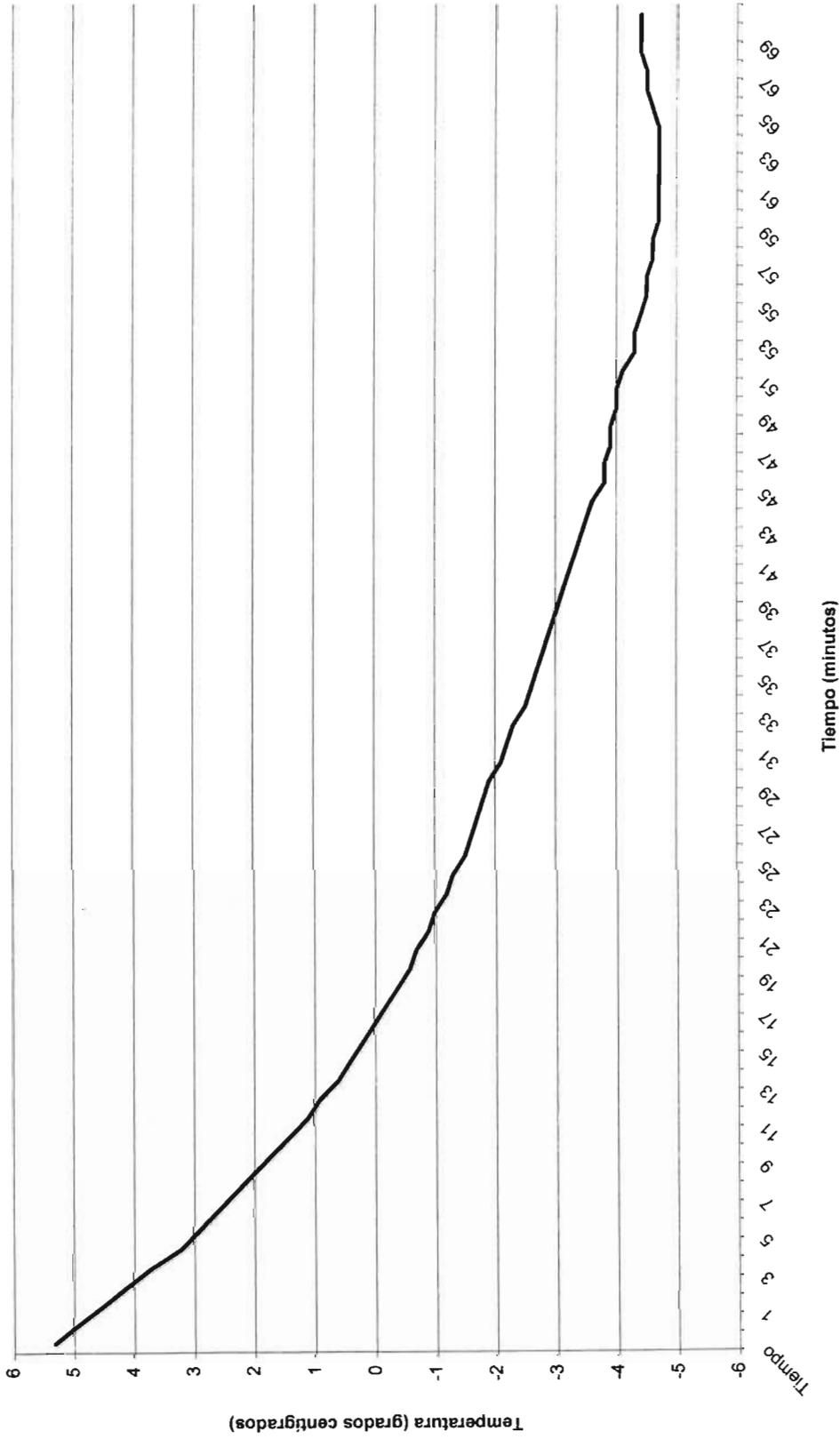


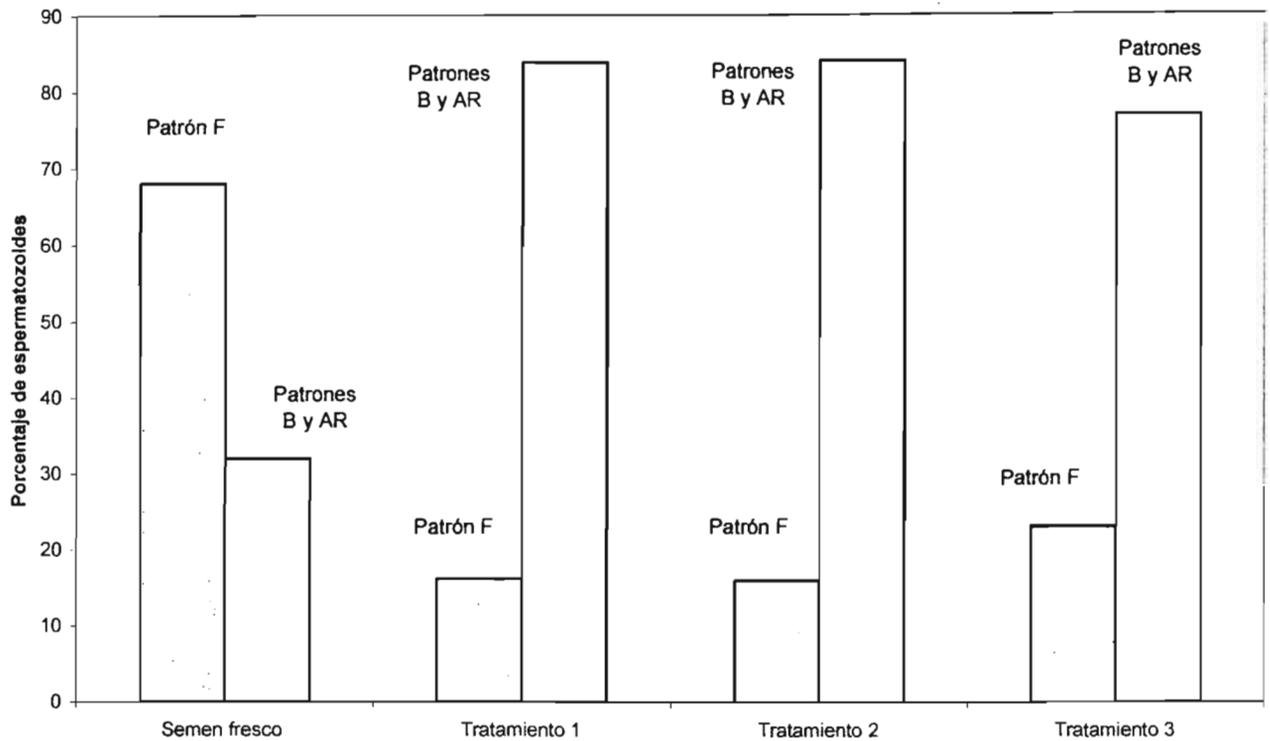
Figura 2. recipiente térmico con hielo salino a -10°C con 2.5 litros de capacidad



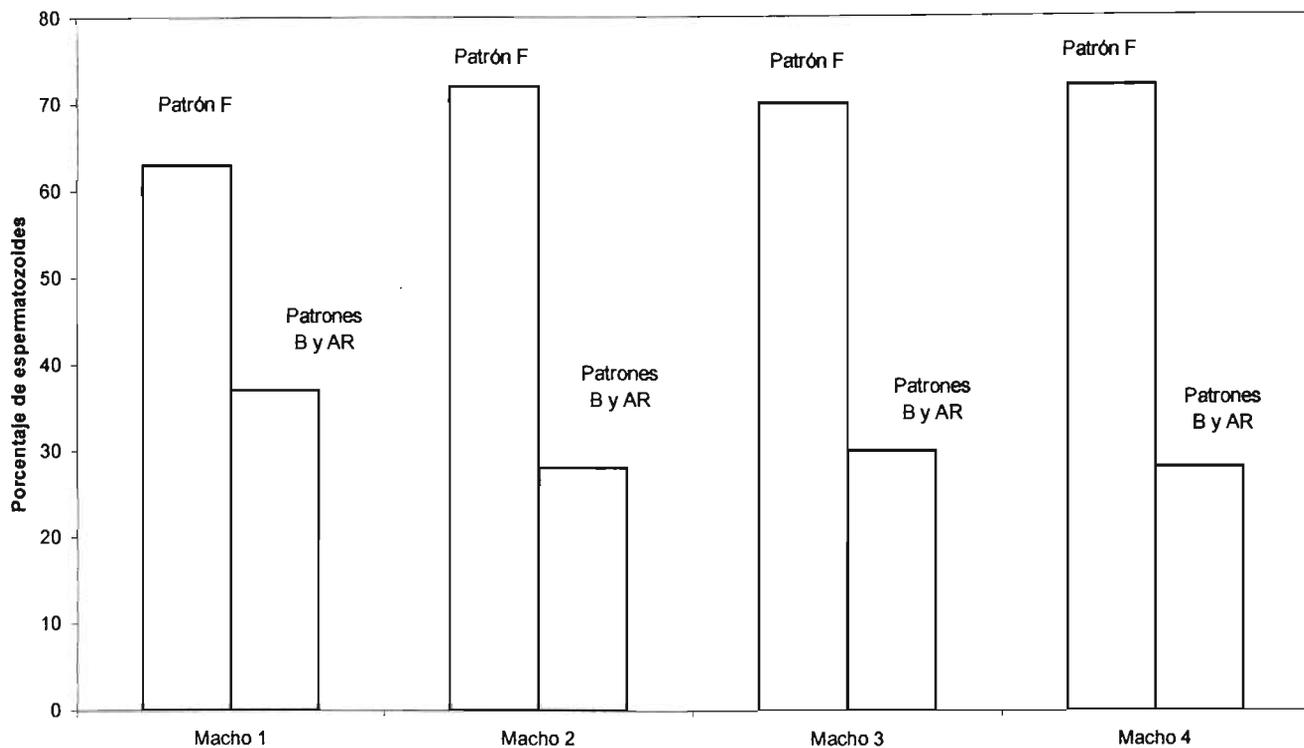
Gráfica 1. Curva de enfriado en la etapa 1, desde temperatura de cuarto hasta 5°C



Gráfica 2. Curva de enfriado en la etapa 2, desde 5°C hasta -5°C

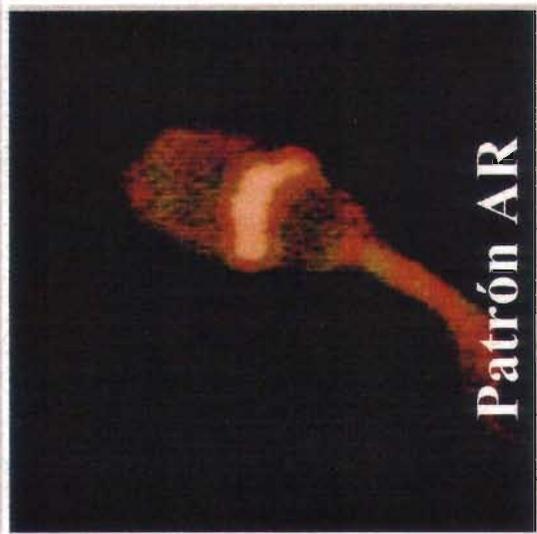
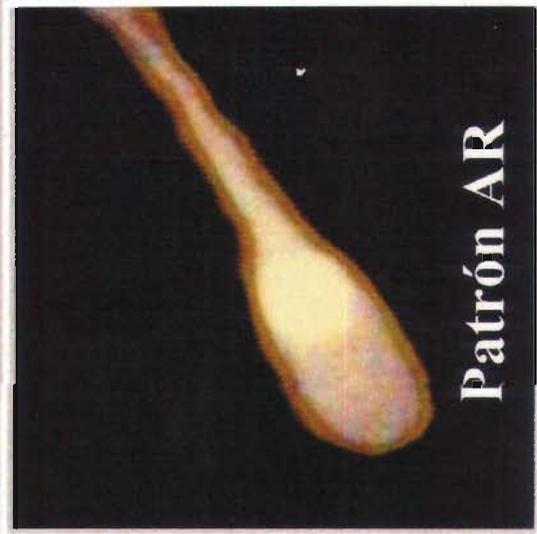


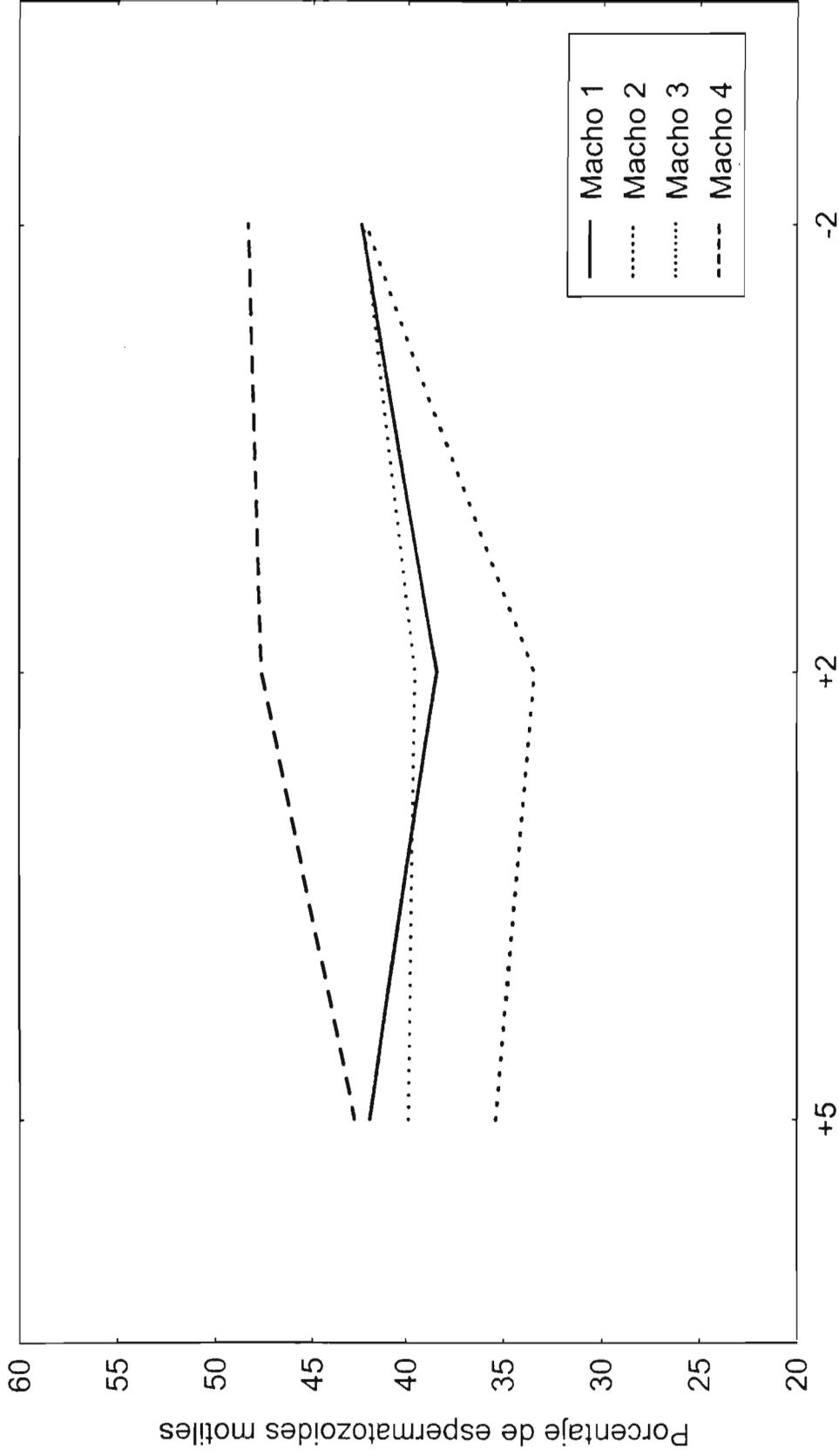
Gráfica 3. Espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrones B y AR) en el semen fresco y descongelado



Gráfica 4. Espermatozoides no capacitados (Patrón F) y capacitados (Patrones B y AR) en el semen descongelado de cada macho

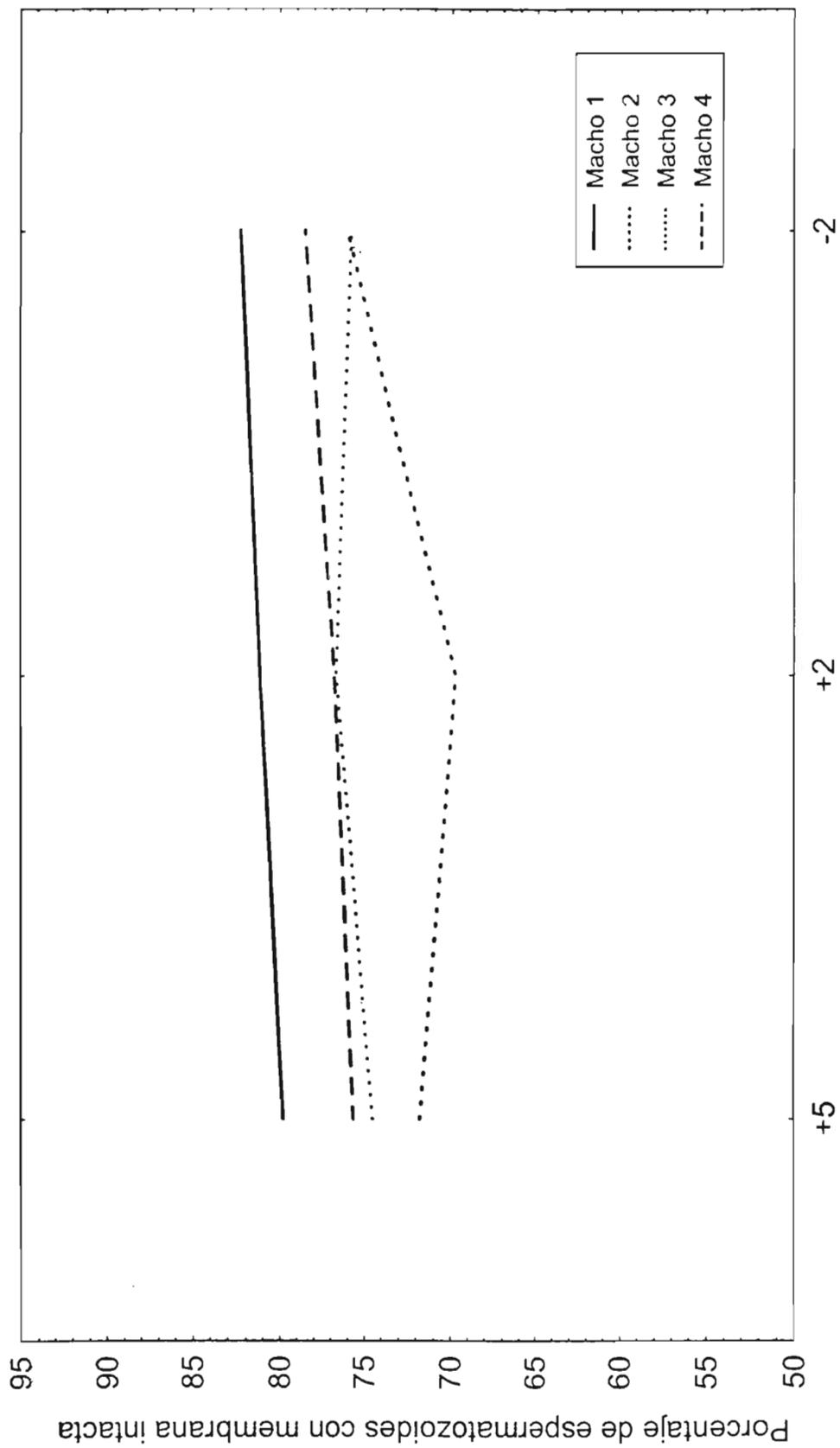
Patrones de CTC





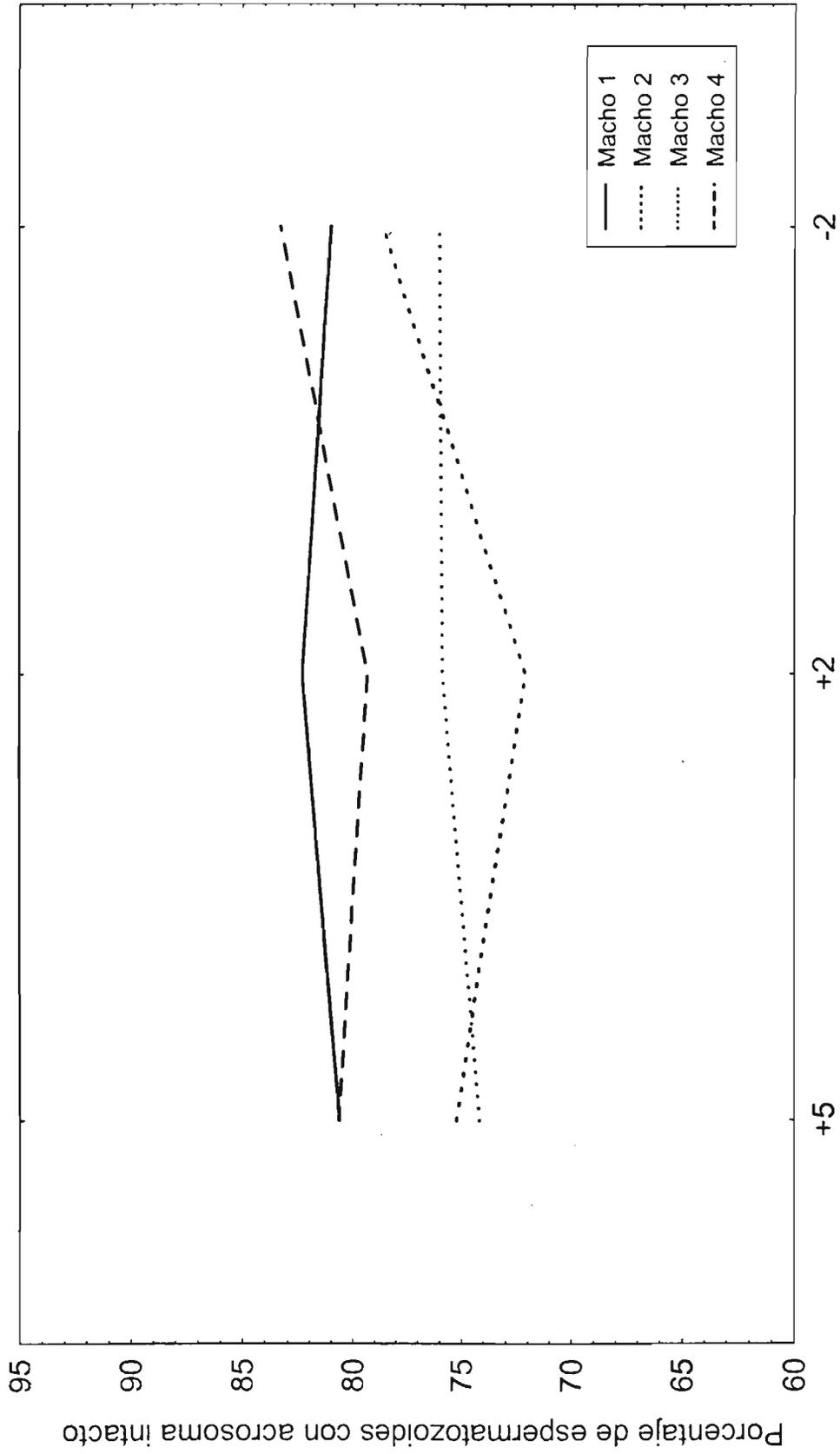
Temperatura blanco del enfriado precongelación (°C)

Gráfica 5. Espermatozoides móviles al descongelado por macho y tratamiento



Temperatura blanco del enfriado precongelación (°C)

Gráfica 6. Espermatozoides con membrana intacta al descongelado



Temperatura blanco del enfriado precongelación (°C)

Gráfica 7. Espermatozoides con acrosoma intacto al descongelado

BIBLIOGRAFÍA

1. Alessandro, A. G.; Martemucci, G.; Colonna, M. A. ; Belliti, A. 2001. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 55:1159-1170.
2. Amann, R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-98. Pub. Med
3. Arbiza, S.I.; De Lucas, J. 1992. Situación de la ovinocultura en México. *Memorias del Seminario Internacional de Producción Ovina. Colegio de Postgraduados.* 5-25
4. Bangham, A. D. y Hancock J. L. 1955. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. *Nature* 176, 656.
5. Barth A.D.; Oko R.J. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*, Iowa State University Press, USA, pp 8-16.
6. Benson, E.E. (ed.). 1999. *Plant conservation biotechnology*. Taylor and Francis Ltd., Reino Unido. 309p.
7. Bustamante, G.; García, D.; Sánchez, L. G. 1990. Evaluación de la fertilidad de semen ovino descongelado y depositado intrauterinamente por laparoscopia. *Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. AMTEO. Tlaxcala, México.* 153-155.
8. Byrne, G.P.; Lonergan, P.; Wade, M.; Duffy, P.; Donovan, A.; Hanrahan, J. P.; Boland, M. P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro.. *Animal reproduction science* 62, 265-275.

9. Cardellino, R. 2002 ¿Qué va a pasar con la lana? Análisis SUL. Secretariado Uruguayo de la Lana, 4 de Abril de 2002. Comisión Nacional de Carne Ovina. Estrategia Nacional - SAGPyA.
10. Cormier N, Sirard, M, Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl*; 18:461-468
11. Courtens, J.L.; Paquignon, M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen, and frozen-thawed spermatozoa of the boar. *Proc. 1st. Int. Conf. Deep Freez. Boar Semen. Uppsala*, pp.977-980
12. Crowe, J.H. Hoekstra, F.A.; Crowe, L.M.; Anchordoguy, T.J. Drobnis, E. 1989. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26, 76-84.
13. Cuadra, S.C.; Chang, G.J.; Aponte, B.M.; Pérez, P.H.; Toral, S.J. 1990. Resultados de dos años con I.A. utilizando semen fresco en ovinos. *Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. AMTEO. Tlaxcala, México*. 149-152.
14. DasGupta, S., Mills, C.L.; Fraser, L.R. 1993. Ca^{2+} -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99, 135-143.
15. De Leeuw, F. E.; Colenbrander, B., Verkleij, A.J. 1991. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals Supplement* 1, 95-104.
16. De Lucas, J. 1999. Sistemas de Producción Ovina en el Altiplano Central Mexicano. *Memorias del Curso de Actualización de Ovinos. Universidad Autónoma del Estado de México*. 35-51.

17. Evans, G. 1988. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. Australian Journal Biological Science 41 (1): 103-116
18. Evans, G. y Maxwell, WMC. 1987. Salamon's Artificial Inseminación of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney, Australia. 194pp.
19. FAO. 2001. Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Dirección de Producción y Sanidad Animal. Estadísticas Ganaderos Estadísticas de población pecuaria. News room.
20. Fraser, L. R.; Abeydeera, L. R.; Niwa, K. 1995. Ca^{2+} - Regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exoytosis as determinated by chlortetracycline analysis. Molecular Reproduction and Development; 40:233-241.
21. Gao D. Y.; Ashworth E.; Watson, P. F.; Keinhans F. W.; Mazur, P.; Crister, J. K. 1993. Hiperosmotic tolerance of human spermatozoa- separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. Biology of Reproduction, 49:112-123.
22. Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reproduction Fertility Development; 9. 481-7
23. Green, C.E.; Watson, P. L. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. Reproduction; 122, 889-898.
24. Gutiérrez, A.J.R. 1992. Efecto del tratamiento hormonal con GnRH, HCG y Testosterona en corderos púberes sobre la calidad espermática y el área de los túbulos seminíferos y del epidídimo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. UNAM. México.

25. Gutiérrez, T. P. ; Vallejo, O. E. Trejo, G. A. 1990. Comparación entre sementales de la fertilidad del semen congelado en ovinos. Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. AMTEO. Tlaxcala, México. 156-158.
26. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*; 11:73-88.
27. Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Reviews of Physiology*.57,19-42.
28. Holt, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
29. Holt, W.V.; North, R.D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 230, 473-483.
30. Holt, W.V.; North, R.D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology Reproduction* 51, 414-424.
31. Jheltrobusch, N.A. 1979. Artificial insemination of sheep in the Soviet Union. En sheep breeding. G.L. Thomes., D.E. Robertson y J.R. Lightfoot. (Eds). Butterworths. Londres, Reino Unido.565-569.
32. Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato S. 2002. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoo: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal Reproduction Science* 73 197-209.

33. Marinov, P; Torniov, A.; Dokov, B; Corvalan, P. 1980. Acrosomal proteolytic activity as a method for evaluation of the cryoprotective action of diluents for freezing of ram semen. *Animal Reproduction*. 5: 521-525
34. Mattioli, M; Barboni, B.; Lucidi, P.; Seren, E. 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*; 45: 373-381.
35. Maxwell, W. M.C.; Johnson, L. A. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Molecular Reproduction and development*. 46,408-418.
36. Maxwell, W.M.C.; Landers, A.J.; Evans, G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*. 43:1201-1210.
37. Medrano, A.; Anderson W.J.; Millar, J.D.; Holt, W.V.; Watson, P.F. 2002a. A custom- built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *Cryoletters* 23, 397-404.
38. Medrano, A.; Cabrera, F.; González, F.; Batista, M.; Calero, P.; Quesada, E.; Gracia, A. 2001. Cryopreservation of spermatozoa. Poster presentation. *Cryobiology* 43, 316-389.
39. Medrano, A. y Holt, WV. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Archivos de Zootecnia* 47:319-327
40. Medrano, A.; Watson, P.F.; Holt, W.V. 2002b. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*. 123, 315-322.

41. Milovanov, V. K.; Koljcova, E.A.; Kundyshev, P.P.; Bojarskij, V.M., Varnavskaja, V.A.; Shajdullin, I.N. 1978. Long-term storage and long distance transport of ram semen. *Zhivotnovodstvo*. No. 3:42-43.
42. Miller, S.J. 1980. Artificial breeding techniques in sheep. Current therapy in theriogenology. D. A. Morrow (Ed) Saunders Co. EUA. 950-954.
43. Nauk, V.A. 1991. Structure and function of spermatozoa of farm animal during cryopreservation. *Moldavia*. pp. 199.
44. Parks, J.E.; Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
45. Parkinson, T.J., Whitfield, C.H. 1987. Optimization of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 27,781-797.
46. Patt, Jr., J.A.; Nath, J. 1969. Effects of diluents, equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, 5: 385-392.
47. Pérez, E. D. A. 1984. Elaboración de un Cuadro básico de anomalías espermáticas en ovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. UNAM. México. 51pp.
48. Platov, E.M. 1973. The theoretical and practical basis of freezing the semen of farm animals. *D. Biol. Sci.* pp42.
49. Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:666.
50. Pursel, V.G.; Johnson, L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* Vol. 40, No.1.

51. SAGARPA, 2000. Centro de Estadística Agropecuaria (CEA).
52. Salomon, S.; Maxwell, W.M.C. 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37, 185-249.
53. Salomon, S.; Maxwell, W.M.C. 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 38, 1-36
54. Salomon, S.; Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram Semen. *Animal Reproduction Science*; 62, 77-111.
55. Thurston, LM., Siggins, K., Mileham, AJ., Watson, PF. y Holt, WV. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction* 66, 545-554.
56. Trejo, G.A. ; Esquivel, C. A.; Rodríguez, M.A.; Martínez, C.A. 1986. Algunas técnicas para facilitar el manejo, la evaluación o mejorar la calidad del semen caprino. Memorias de la segunda reunión nacional sobre caprinocultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. A1-A7.
57. Varnavskij, A.N. 1981. The effect of synthetic prostaglandosn in frozen semen on conception rate of ewes. *Zhivotnovodstvo*. No.9:51-53.
58. Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G.S. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139-1150.

59. Watson, P. F. 1979. The preservation of semen in mammals. In *Effects of low temperature on biological membranes*, edited by G.J. Morris and A. Clarke. London; Academic Press. Pag. 189-218.
60. Watson, P.F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes in *effects of low temperature on biological membranes*, edited by G.J. Morris and A. Clarke. London: Academic Press. Pp 189-218.
61. Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7, 871-891.
62. Watson, P. F. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 31, 135-140.
63. Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*; 60-61, 481-492.
64. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In *the physiology of reproduction*, edited by E. Knobil and J.D. Neill. New York: Raven Press. 189-317.