



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Caracterización de los carbohidratos presentes en el sobrenadante de las vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

NAVARRETE RAYAS RAFAEL ALEJANDRO

ASESORES:

MVZ ADRIANA CORREA BENÍTEZ

MC JUAN ALBERTO BALCÁZAR SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres Rafael y Graciela, que con su amor, confianza y apoyo me fortalecen cada día para alcanzar mis metas.

A mis hermanas Dulce y Angie, que a pesar de las diferencias que tengamos, siempre hemos permanecido unidos para apoyarnos en cada paso que damos.

A mi sobrina preciosa Lizzie, que con su sonrisa y su cariño llena mi vida de alegría y felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a esas personas importantes en mi vida, principalmente a mi familia que siempre estuvo dispuesta a brindarme todo su apoyo, quienes me han enseñado a ser perseverante al perseguir mis sueños y encontrar fortaleza incluso en los momentos más difíciles de mi vida. Ahora deseo reponer un poco de todo aquello que me han otorgado.

A mis hermanos Adrián, Gabo, Josh y Rod que siempre están a mi lado apoyándome y aconsejándome.

A mis asesores por brindarme su apoyo en cada paso de esta investigación, a ellos les agradezco mucho pues en momentos difíciles supieron ser grandes amigos además de excelentes profesores, quienes nunca dudaron de mí.

A cada miembro del jurado que enriqueció este trabajo con sus valiosos comentarios.

Y a todas y cada una de las maravillosas personas que conocí del Departamento de Abejas.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 OBJETIVO GENERAL.....	4
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4 HIPÓTESIS	5
5 REVISION DE LITERATURA	5
5.1 Biología reproductiva de las abejas.....	5
5.2 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del zángano.....	7
5.3 Producción de espermatozoides.....	10
5.4 Morfología del espermatozoide	11
5.5 Composición del semen.....	14
5.6 Función de los carbohidratos.....	15
5.7 Métodos de colección de semen	18
5.7.1 Estimulación del zángano	18
5.7.2 Disección de vesículas seminales.....	20
5.7.3 Lavado del semen	20
5.8 Principios de la cromatografía y aplicaciones	21
5.9 Técnicas cromatográficas.....	22
5.10 Derivatización	24

5.11 Tipos de derivatización	25
5.12 Principio de la espectrometría de masas y aplicaciones	26
6 MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 Localización del área de estudio	27
6.2 Manejo en campo y obtención de las vesículas seminales	28
6.3 Preparación del liofilizado	30
6.4 Preparación de los sililados	31
6.5 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	33
6.6 Identificación y cuantificación de los compuestos presentes en las mezclas sililadas.....	36
7 RESULTADOS.....	37
8 DISCUSIÓN	43
9 CONCLUSIONES	48
10 REFERENCIAS.....	49
11 LISTA DE FIGURAS.....	53
12 LISTA DE CUADROS.....	55
13 ANEXO.....	56

NAVARRETE RAYAS RAFAEL ALEJANDRO. Caracterización de los carbohidratos presentes en el sobrenadante de las vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (bajo la supervisión de MVZ Adriana Correa Benítez y MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez).

RESUMEN

Los azúcares son biomoléculas compuestas muy importantes, ya que son la fuente primordial de energía de cualquier célula. Además de proporcionar energía, son usados en los procesos de preservación del semen, ya que permiten el mantenimiento de la presión osmótica y cumplen una acción crioprotectora al promover la deshidratación celular e impedir la formación de cristales de hielo dentro de la célula. La fructosa es un azúcar relevante en el semen puesto que proporciona la energía necesaria al espermatozoide post-eyaculación. La trehalosa es la principal azúcar en hemolinfa y semen de algunos insectos, formada por dos moléculas de glucosa y posee una gran capacidad como protector de membranas.

El objetivo del presente estudio fue determinar los carbohidratos presentes en el sobrenadante de las vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para saber que azúcares están presentes de acuerdo a esta técnica.

Las vesículas seminales se obtuvieron en agua desionizada mediante la disección de zánganos sexualmente maduros de colonias de abejas del Centro de Educación Ambiental "Acuexcomatl". Las muestras se diluyeron y centrifugaron para obtener el sobrenadante, luego éste se colocó en hielo seco con acetona a -70°C para su congelación y posteriormente se liofilizó la muestra. En la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la FQ-UNAM^A se realizó la sililación de la muestra y subsecuente caracterización del semen mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Una vez inyectada y analizada la muestra en el cromatógrafo de gases-masas se compararon los tiempos de retención de los componentes de la muestra con los de los estándares de los azúcares. De igual forma, los demás compuestos presentes en la muestra se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del instrumento y la base de datos electrónica NIST^B. La concentración de los diferentes compuestos se calculó con base en la altura y el área representativa en sus espectros de masa. Los resultados mostraron que los principales azúcares fueron: glucosa ($627.5 \mu\text{g/g}$), fructuosa ($788.75 \mu\text{g/g}$) y xilosa ($1011.72\mu\text{g/g}$). La trehalosa no pudo ser determinada con las condiciones específicas de esta técnica. Se encontraron aminoácidos, ácidos grasos y compuestos de la familia de los eicosanoides.

Palabras clave: *Zángano, semen, vesículas seminales, carbohidratos.*

^A Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

^B Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, versión 2.0.

1 INTRODUCCIÓN

Los zánganos son individuos macho haploides, que forman parte de la colonia y que tienen como función principal, la reproducción. El semen de zángano tiene grandiosas cualidades de resistencia al medio ambiente (descritas más adelante) en comparación con el de mamíferos, pero son pocos los estudios que se han dado lugar a investigar los compuestos que le confiere esta propiedad.^{1,2,3}

Existen informes (Alumont)⁴, en los cuales se mencionan la presencia de carbohidratos como glucosa, fructosa y trehalosa, en el semen de los zánganos, pero dichas investigaciones no profundizan en la metodología empleada para su identificación. Se conoce también que el origen de estos azúcares es alimenticio, ya que al consumir el néctar de las flores están obteniendo una dieta rica en carbohidratos, mismos que en parte, servirán para generar energía para sus diversas actividades.¹

Dichos azúcares además de proporcionar energía, al igual que en el semen de los mamíferos, también aportan cualidades de resistencia en los espermatozoides. Esto es gracias a que permiten el mantenimiento de la presión osmótica, promueven la deshidratación celular preservando la movilidad espermática, mantienen la viabilidad e integridad del acrosoma y de la membrana espermática.⁵⁻⁷

El semen de zángano, una vez que se obtiene, tiene la capacidad de resistir y mantenerse viable a temperatura ambiente por más de 72 horas, de manera

natural, es decir, sin la necesidad de agregarle ninguna sustancia. Asimismo, en la espermateca de la reina puede vivir años (3 a 5) con una adecuada viabilidad. Lo que no se conoce aún, son los compuestos que le proporcionan al semen esa cualidad. En muchas ocasiones en los protocolos de preservación de semen de zángano, la glucosa forma parte importante del crioprotector.⁸ Sin embargo, sería adecuado generar investigaciones que traten de igualar las condiciones que tienen el semen tanto en el zángano, como en la espermateca de la reina para mejorar dichos protocolos de preservación de semen de éste insecto, así como de otras especies animales.

2 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los carbohidratos presentes en el sobrenadante de las vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar y evaluar la presencia de glucosa y fructosa, así como de cualquier otro carbohidrato presente en el sobrenadante de las vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

4 HIPÓTESIS

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitirá determinar y cuantificar los carbohidratos presentes en las vesículas seminales del zángano (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduro.

5 REVISION DE LITERATURA

5.1 Biología reproductiva de las abejas

Las abejas, al ser insectos eusociales, viven en colonias que se encuentran formadas por tres tipos de individuos: reina, obreras y zánganos. Cada uno tiene una función relevante que cumplir para mantener el equilibrio de la colonia. Las obreras realizan labores que van desde limpieza de celdas y alimentación de larvas hasta pecoreo y defensa de la colonia. Sin embargo, no tienen ningún papel en la reproducción, ya que su aparato reproductor no está desarrollado.^{1,2,3}

La reina se desarrolla de un huevo fecundado, cuya larva debe ser alimentada con jalea real por las abejas nodrizas. El proceso de desarrollo de una reina dura en promedio 16 días, y una vez emergida, lo primero que hace es matar a cualquier otra reina que haya emergido o que se encuentre en desarrollo. Después de cinco o seis días de haber emergido y de alcanzar su madurez sexual, realiza los vuelos de apareamiento.^{1,8}

Los zánganos, a diferencia de la reina y las obreras, son individuos haploides, es decir, solamente cuentan con un juego del material genético proveniente de la madre.^{9,10} Después de la postura de un huevo haploide, la metamorfosis tiene una duración de 24 días y una vez que emerge, el zángano realiza vuelos de orientación entre el día 6 y 8, alcanzando su madurez sexual aproximadamente a los 12 días.¹ Esto se puede comprobar al observar la coloración anaranjada que presentan las cornículas después de realizar la eversión parcial del endófalo.^{3,8,11} Al emerger un zángano de su celda, la coloración de las cornículas es blanca e irá tornándose amarillenta, hasta alcanzar un tono anaranjado intenso, lo que indica una capacidad reproductiva óptima.⁸

La reina y el zángano son los únicos que comparten la función reproductora, una vez que ambos alcanzan su madurez sexual. El apareamiento se lleva a cabo en el aire, en sitios llamados zonas de congregación. Estos lugares deben cumplir con ciertas condiciones climáticas para que se efectúe exitosamente el apareamiento. Estas condiciones son: cielo despejado, temperatura mayor a los 20°C y vientos con una velocidad menor a los 20-28 km/h.^{1,8} Los vuelos de apareamiento tienen una duración promedio de 25 a 30 min y se llevan a cabo alrededor de las 14 y 16 horas.⁸

El zángano localiza a las reinas gracias a las feromonas que ellas producen. Después de un cortejo, el macho logra posarse sobre el dorso de la reina, se engancha, con el primer y segundo par de patas, sobre su tórax y el tercero sobre su abdomen. El zángano curva el abdomen, evierte el endófalo y

penetra por la abertura vaginal en el aparato reproductor de la reina, eyaculando en el oviducto medio. Al separarse de la reina deja una parte del endófalo dentro del aparato reproductor de ésta, lo que se conoce como signo de apareamiento.

Las reina cuenta con una espermateca cuya capacidad de almacenamiento es en promedio de 5.3 a 5.7 millones de espermatozoides, apareándose en promedio con 6 a 17 zánganos, solo durante este corto periodo de apareamiento.^{1,8,11} Además, es importante resaltar que cada zángano (*Apis mellifera* L.) produce un promedio de entre 7.7×10^6 y 11×10^6 espermatozoides en un eyaculado de 1 μ l.¹² Esto proporcionará a la reina espermatozoides necesarios y viables para fecundar huevos que darán origen a obreras u otras reinas durante su tiempo de producción, y huevos sin fecundar que darán origen a individuos machos. La postura, promedio aproximada por día, es de 1500 a 2500 huevos.^{3,8,10,11,13}

5.2 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del zángano

El aparato reproductor del zángano (Figura 1) se encuentra localizado en abdomen. Presenta una forma de “S”; está formado por el endófalo, localizado en la parte inferior; el conducto eyaculador, en la parte media y los testículos, conductos deferentes, vesículas seminales y glándulas del moco en la parte superior del abdomen.¹⁴

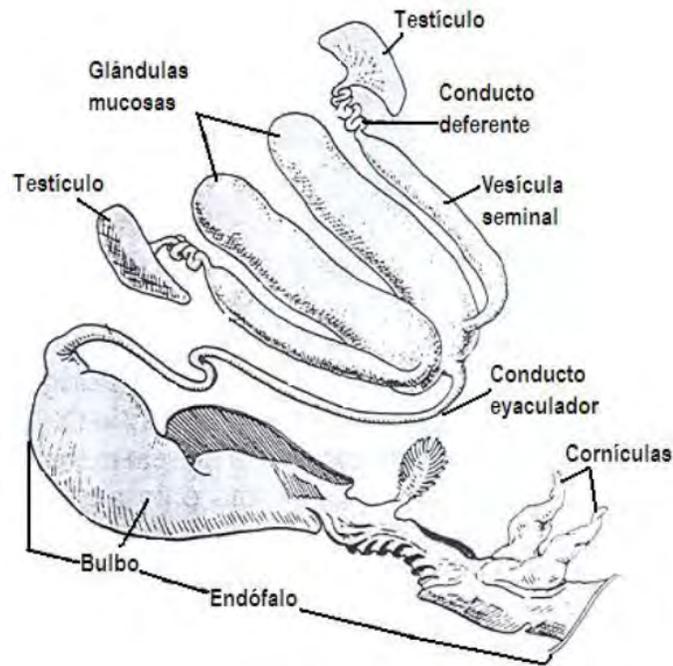


Figura 1. Anatomía del aparato reproductor del zángano.¹⁴

Endófalo

Es un saco blando, membranoso que se encuentra invaginado en el abdomen del zángano. El extremo proximal está ampliado y tiene una placa quitinosa en forma de coma, conocida como bulbo. Inmediatamente, se presenta un ensanchamiento, del cual sobresalen dos especies de cuernos o cornículas; estas estructuras van cambiando de color a medida que el macho alcanza la madurez sexual, siendo el color anaranjado el indicativo de este proceso. El endófalo, cuando es evertido, es transparente y está lleno de aire y hemolinfa.⁸

Conducto eyaculador

Son unos túbulos que tienen como objetivo conectar las vesículas seminales con el exterior, en el extremo distal del endófalo. Es la salida del semen y el moco.⁸

Testículos

Son de una consistencia muy blanda y esponjosa, de forma ovalada y color cremoso. Cuando el zángano se encuentra en estado de pupa (14 ½ días), se desarrollan las espermatogonias y los espermatocitos, que darán origen a los espermatozoides, y una vez alcanzada la producción total (hasta 10 millones de espermatozoides), los testículos dejan de producir espermatozoides.⁸

Vesículas seminales

Las vesículas seminales, son sacos alargados que sirven de almacenamiento de los espermatozoides; una vez producidos en los testículos éstos permanecen aquí; se les adiciona secreciones de tejido glandular que les proporcionan los nutrimentos adecuados hasta el momento del apareamiento (aproximadamente a los doce días o más de haber emergido, que es la edad a la que alcanzan su madurez sexual).¹⁴

Glándulas mucosas

Son órganos accesorios que producen una sustancia mucosa; la cual se solidifica al entrar en contacto con el aire y su función es la de empujar al semen

a través del conducto eyaculador.⁸ El conducto de esta glándula se une en el mismo sitio que desembocan los conductos de las vesículas seminales y son la parte más evidente del aparato reproductor del macho. También suelen ser indicativo de madurez sexual, ya que en individuos inmaduros suelen verse transparentes con puntos de color blanco y de un color blanco uniforme cuando el zángano es maduro.⁸

5.3 Producción de espermatozoides

La producción de espermatozoides (espermatogénesis), se lleva a cabo en la etapa de pupa en el *germarium* (parte distal de los testículos). El proceso comienza cuando las células germinales haploides ($16n$) se dividen generando espermatogonias, luego éstas por medio de mitosis producen espermatocitos, estas células se dividen por meiosis dando origen a las espermatides, los cuales son transformados a espermatozoides (Figura 2).^{2,8,9}

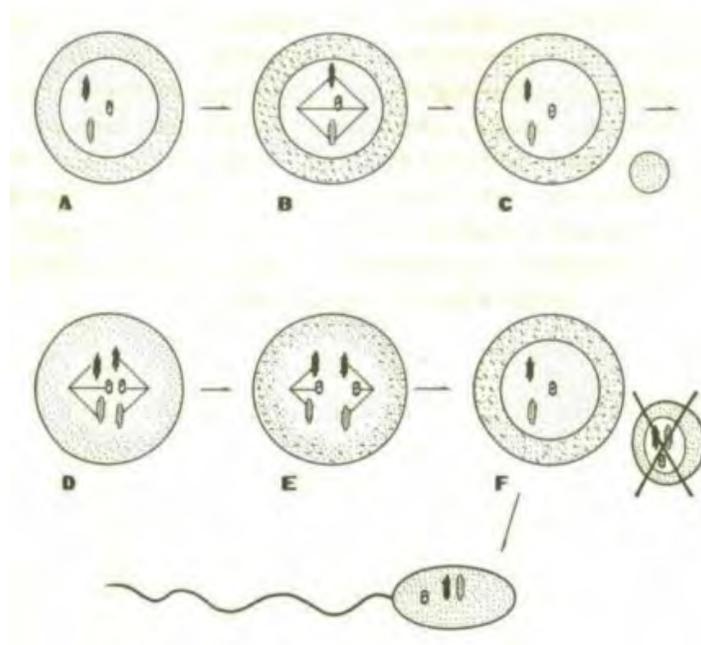


Figura 2. Formación de espermatozoides en zángano. A. Célula germinal haploide. B. División mitótica. C. Meiosis I abortiva. D. Pérdida de la membrana nuclear. E y F. Meiosis II anómala.¹⁵

5.4 Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides de zángano son filamentosos y se ha determinado que son excepcionalmente largos y delgados en comparación a los espermatozoides de los mamíferos.^{1,8,16}

Cada espermatozoide mide aproximadamente entre 250-270 μm de largo por 0.7 μm de ancho. La región de la cabeza cuenta con solo 10-12 μm de largo.^{8,10,11,16}

Las estructuras que comprenden al espermatozoide son:

Cabeza

Es una estructura elongada y asimétrica con 12.2 μm de largo y 0.5 μm de ancho, compuesta de un *acrosoma* o “perforatum” y el núcleo. El acrosoma forma el complejo acrosomal (Figura 3), que comienza a diferenciarse en una región esférica y elongada, posterior al apéndice acicular, la cual es una estructura en forma de túbulo que se encuentra en el extremo apical del acrosoma. Éste mide 1 μm de longitud por 0.25 μm de ancho y se amplía en su parte posterior formando la galea. El núcleo es una estructura elíptica que mide 5 μm de longitud y 0.3 μm de espesor. En la parte final del núcleo se forma una región entre la cabeza y el flagelo a la cual se le llama cuello (Figura 4).^{8,10,11,16}

El complejo acrosomal, está conformado por las siguientes estructuras:^{9,16}

- Apéndice acicular anterior
- Región esférica, que contiene material extra acrosomal
- Vesícula acrosomal
- Corpúsculo central interno
- Barra interna acrosomal
- Cavity subacrosomal

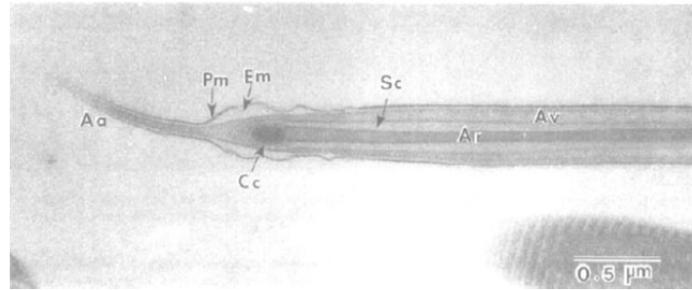


Figura 3. Complejo acrosomal (Aa), membrana plasmática (Pm), capa extra-acrosomal (Em), corpúsculo interno central (Cc), cavidad subacrosomal (Sc), inmediatamente sobre la varilla acrosomal (Ar) y vesícula acrosomal (Av).¹⁶

Cuello

Es una estructura que une al núcleo con el axonema y los derivados mitocondriales de la cola. En el extremo anterior de los derivados mitocondriales se encuentra el cuerpo triangular, que probablemente funciona como el centriolo descrito en los espermatozoides de otros insectos.^{1,8,10,11,13}

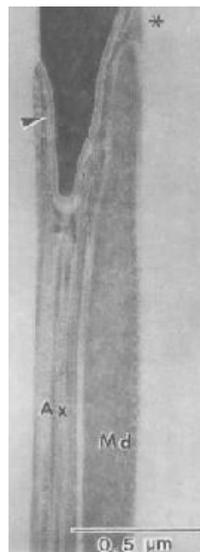


Figura 4. Cuello de espermatozoide de zángano. Axonema (Ax) y derivado mitocondrial (Md).¹⁶

Flagelo

El flagelo consiste en dos derivados mitocondriales, un axonema y dos cuerpos accesorios en forma triangular. Los derivados mitocondriales son de diferente tamaño y se encuentran paralelos al axonema.^{8,10,11}

5.5 Composición del semen

Un zángano sexualmente maduro puede producir de 1 a 1.5 μ l de semen conteniendo de 6 a 10 millones de espermatozoides en promedio.

El semen se encuentra compuesto por el paquete espermático y el plasma seminal en una proporción 1:1 o 1:2. El pH es neutro con un rango de 6.8 a 7.9 y una osmolaridad de 467 ± 13 mOsm/ml. Además, contiene aminoácidos (como cistina, metionina, tirosina, entre otros), fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos libres y enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa).^{8,9,10,12}

También contiene minerales (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{3+} y Cu^{2+})^C, los cuales contribuyen al mantenimiento de la presión osmótica, el equilibrio ácido base, permeabilidad tisular y movilidad espermática. En un estudio realizado por Gutiérrez¹⁷ se determinaron las siguientes concentraciones de minerales en vesículas seminales de zánganos sexualmente maduros: potasio (4277.95 μ g/g),

^C Magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso y cobre.

sodio (3297.89 µg/g), magnesio (686.8 µg/g), calcio (1009.58 µg/g), cobre (237.67 µg/g), zinc (65.72 µg/g) y fósforo (967.83 µg/g).

En la actualidad se ha encontrado glucosa, fructosa y trehalosa en el plasma seminal; sin embargo, no se mencionan las cantidades en las que están presentes, ni las variaciones de estos en las diferentes épocas del año y en regiones disimiles en el semen de zánganos sexualmente maduros; tampoco se menciona el procedimiento de cómo fueron determinados.⁴

5.6 Función de los carbohidratos

Los carbohidratos están constituidos por tres tipos de átomos, carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), los cuales guardan entre sí la proporción 1:2:1, siendo su fórmula general $C_n (H_2O)_n$, donde “n” es un número mayor o igual a 3.¹⁸

Existen dos grandes familias de azúcares o carbohidratos de acuerdo a la localización del grupo carbonilo (-C=O) en la molécula. Si se localiza en la parte terminal, se denominan aldosas, o cetosas, si se encuentra en un carbono secundario.¹⁸

La glucosa (una aldosa) y la fructosa (una cetosa) poseen la misma fórmula condensada $C_6H_{12}O_6$, pero la disposición de los grupos -OH y la posición del grupo carbonilo son diferentes, es decir, son isómeros¹⁸ (Figura 5).

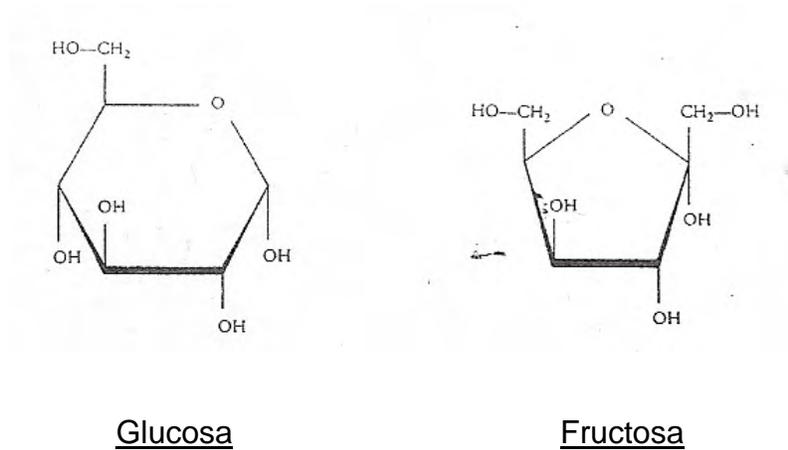


Figura 5. Estructura química de la glucosa y la fructosa.¹⁹

La función principal de los carbohidratos radica en su valor energético, aunque tienen también un papel importante como componentes estructurales de la célula. Por su estructura, los carbohidratos se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.¹⁸

Los monosacáridos están constituidos por una sola molécula de azúcar. La ribosa, fructosa, galactosa y la glucosa son unos de los más importantes, y tienen un papel muy importante en el metabolismo celular.¹⁸

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y es la fuente primaria para la síntesis de energía en las células. En los humanos existen algunos tejidos, como el cristalino del ojo y el tejido nervioso, que obtienen su energía casi exclusivamente de la glucosa; y sin ella, las células sufren apoptosis (muerte celular) en poco tiempo.¹⁸

La glucosa resulta más difícil de sintetizar, que adquirirla de fuentes exógenas. Este azúcar se libera durante la hidrólisis de los disacáridos y los polisacáridos.¹⁸

El néctar que las abejas pecorean contiene del 40 al 80% de agua, y del 7 al 60 % de azúcares, aceites esenciales, sales minerales y ácidos orgánicos (cítrico, fórmico, acético, butírico, entre otros). Las proporciones de estos compuestos varían dependiendo de la especie vegetal, de las condiciones del suelo y del ambiente en general.^{1,3,20-22}

Entre los azúcares que contiene el néctar se puede encontrar principalmente sacarosa que está compuesta por una molécula de glucosa y una de fructosa, también se ha determinado que estos dos azúcares pueden estar presentes de forma libre en el néctar.^{1,3,20-22}

La trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, este azúcar está presente en los champiñones, setas y en la hemolinfa y semen de insectos, donde es considerada como el principal azúcar, puesto que a partir de ésta se obtiene glucosa mediante la acción de la enzima trehalasa (Figura 6).⁴

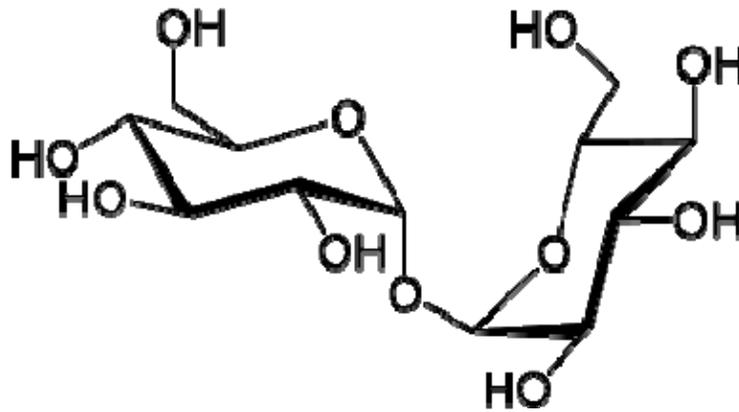


Figura 6. Estructura química de la trehalosa.²³

Sin embargo, los azúcares además de servir como fuente de energía para la célula espermática, han sido usados en los procesos de criopreservación del semen, ya que permiten el mantenimiento de la presión osmótica y cumplen una acción crioprotectora al promover la deshidratación celular e impedir la formación de grandes cristales de hielo dentro de la célula. Con base en esto, la inclusión de azúcares en los diluyentes puede servir para la preservación de la movilidad espermática, mantenimiento de la viabilidad, integridad del acrosoma y de la membrana espermática.⁴⁻⁶

5.7 Métodos de colección de semen

5.7.1 Estimulación del zángano

Se logra rotando la cabeza del zángano sexualmente maduro y presionando el tórax entre los dedos índice y pulgar para generar la eversión parcial del

endófalo. Posteriormente se ejerce presión a los lados del abdomen desde la base hasta la punta del mismo, rotando los dedos y aplicando presión para conseguir la eversión total del endófalo y poder colectar el semen directamente del mismo por medio de una jeringa. Para este fin se utilizan diversos aparatos y accesorios, mismos que a continuación se describen.^{1,24,25}

A) Aparato de Inseminación Mackensen

Este aparato es la base de todos los demás equipos que se han desarrollado; cuenta con una microjeringa de plástico, con una capacidad de almacenamiento de 10 μ l de semen y con ganchos de sujeción. Ambos componentes se operan de forma manual, todos los componentes giran sobre su base lo que les permite una gran capacidad de movilidad.^{1,24,25}

B) Jeringa Harbo

Harbo (1979), mejoró la versión del aparato de inseminación Mackensen adicionándole un nuevo tubo de almacenamiento, el cual es removible y puede ser utilizado tanto para la colección de semen como para la inseminación instrumental de abejas reinas.

Por lo general, este aparato utiliza una jeringa micrométrica *Gilmont*^D, conectada a una punta fina de vidrio que presenta la misma longitud que la del tubo para colectar fluido. No obstante, el sistema permite la inserción de la jeringa Harbo que cuenta con un tubo capilar estéril, el cual funciona como un depósito

^D *Gilmont Instruments, Barrington, IL.*

adyacente a la punta de la jeringa. La ventaja es que el sistema se controla con un micromanipulador, lo que permite realizar ajustes muy finos, y con el uso del micrómetro, se puede medir la cantidad exacta del semen que se utiliza. Sumado a esto, la jeringa Harbo también tiene la ventaja de que se adapta a cualquier aparato de inseminación instrumental.^{1,9,26}

5.7.2 Disección de vesículas seminales

De acuerdo con Rinderer², Mackensen y Ruttner describieron la disección como una técnica de colección de semen, en la que una vez retiradas las vesículas seminales, se presionan con unas pinzas entomológicas en su parte proximal de los testículos, con ello, se logra simular los movimientos peristálticos que fuerzan a los espermatozoides a salir, para posteriormente coleccionar el semen con una jeringa. Collins realizó un estudio en el que comparó esta técnica con la utilización de la jeringa Harbo, y descubrió que por medio de disección se obtiene una alta cantidad de espermatozoides viables aunque poca cantidad de semen, con la problemática de que se incrementa el tiempo para su recolección y se podría generar contaminación, del mismo, por el contacto con los tejidos, por lo que no se recomienda su uso para inseminación instrumental.

5.7.3 Lavado del semen

De acuerdo con Chavacan⁸ y Morfin¹¹, Kaftanoglu y Peng describieron esta técnica en 1989. Es una operación rápida y fácil, ya que no es necesario el uso de

microscopio y se obtiene una gran cantidad de semen en un tiempo corto, además de que permite mezclar el semen de diferentes zánganos de forma homogénea a diferentes proporciones. La técnica consiste en diluir el semen y moco, obtenido del mismo modo que las técnicas descritas por Harbo y Mackensen, con el extender Kiev estéril y homogeneizarlos. Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 2,500 rpm por 10 min, obteniendo de esta forma los tres componentes por separado.

5.8 Principios de la cromatografía y aplicaciones

Según Sherma²⁷, Tswett describe la cromatografía como un método en el cual los componentes de una mezcla, son separados en una columna adsorbente (fase estacionaria o fija) dentro de un sistema fluyente (fase móvil).

Las separaciones cromatográficas se consiguen mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase fija y la fase móvil. La división entre estas dos sustancias comienza cuando una es retenida más fuertemente por la fase estacionaria que la otra que tiende a desplazarse más rápidamente en la fase móvil. Las retenciones mencionadas, pueden tener su origen en dos fenómenos de interacción que se dan entre las dos fases y que pueden ser:

Adsorción- Es la separación de una sustancia soluble en un líquido por medio de la unión de los átomos, iones o moléculas de la sustancia, ya sea un gas o líquido (adsorbato) a la superficie de un sólido.²⁷

Absorción- Es el fenómeno que se verifica cuando un sólido o un líquido atrapan, en su estructura interna, partículas de una sustancia ajena a si misma, aumentando su volumen y formando una solución.²⁷

Aplicaciones

Es una técnica analítica, efectiva para la separación de mezclas y el análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras procesadas.²⁷

La cromatografía proporciona pistas en cuanto a la estructura de sustancias orgánicas, permitiendo su comparación. También se utiliza en la detección de cambios estructurales producidos por varios agentes químicos o nucleares y en procesos biológicos.²⁷

5.9 Técnicas cromatográficas

Existen una gran variedad de métodos cromatográficos que se han originado a partir del método original descrito por Tswett.²⁷

Las dos mayores clasificaciones de la cromatografía son, en solución o cromatografía de líquidos (CL) y cromatografía de gases (CG). En el primero, un líquido lleva los solutos disueltos a través de la fase estacionaria (adsorbente), ya sea una columna, papel o capa fina. En el segundo, un gas inerte arrastra la mezcla gaseosa a través de la columna de adsorción.²⁷

A) Cromatografía de líquidos

La cromatografía líquida se divide en cromatografía líquido-sólido o cromatografía líquido-líquido. Si la fase estacionaria sólida es un adsorbente, el proceso es llamado cromatografía de adsorción de líquidos. Si se trata de un intercambio de material iónico, ya sea orgánico o inorgánico, se denomina cromatografía de intercambio iónico. Si se trata de un gel polimérico no iónico, el término de cromatografía de permeación en gel, cromatografía de filtración en gel o cromatografía de exclusión molecular es usado.²⁷

Otras subdivisiones de cromatografía de líquidos, sin columna, son papel cromatográfico y cromatografía en capa fina. Estas subdivisiones incluyen todos los tipos de papel y capa fina si el mecanismo es de adsorción, partición o intercambio de iones.²⁷

B) Cromatografía de gases

Dentro de esta gran clasificación, las subdivisiones están basadas en la fase estacionaria. Así la cromatografía gas-sólido implica una columna rellena con un adsorbente, y la cromatografía gas-líquido implica un recubrimiento sólido con un líquido como adsorbente, en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de la columna que contiene el líquido, que cumple la función de fase estacionaria. Los componentes de la muestra son empujados por un gas (fase móvil) a través de la columna, lo que permitirá separar los componentes de la muestra de acuerdo a la afinidad de estos por la fase estacionaria (Figura 7). La CG tiene dos principales aplicaciones: la separación de mezclas orgánicas

complejas y la determinación cuantitativa y cualitativa de los componentes de una muestra.²⁷

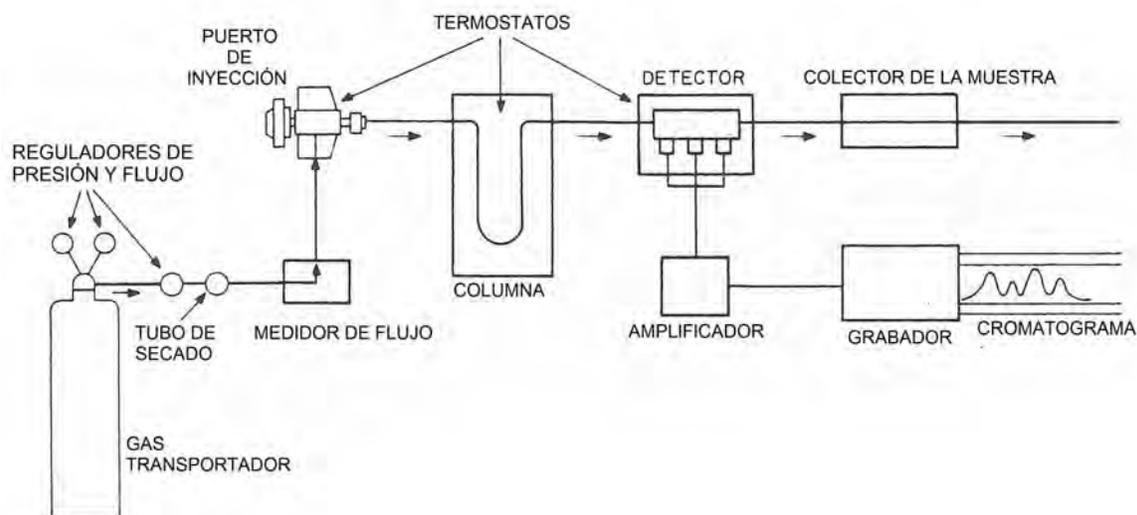


Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de gases.²⁷

5.10 Derivatización

En cromatografía de gases es común emplear una técnica llamada derivatización, la cual consiste en modificar, químicamente, un compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis. Además, esto permite mejorar la volatilidad, estabilidad térmica y la sensibilidad de detección del analito. En este tipo de reacciones no se conoce la estructura de los productos, es la reacción en sí misma la que da la estructura de los derivados.²⁷

5.11 Tipos de derivatización

A) Sililización

Es el reemplazo de un hidrógeno ácido con un grupo alquilsililo. Reactivos más habituales para ésta reacción.²⁷

- BSA N,O-Bis = (Trimetilsilil) Acetamida CG
- BSTFA N,O-Bis = (Trimetilsilil) Trifluoroacetamida CG
- HMDS = Hexametildisilazano CG
- MSTFA = N-Metil-N-(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida CG
- TMCS = Clorotrimetilsilano CG
- TMSDEA = N-(Trimetilsilil) Dietilamina CG
- TMSI = N-(Trimetilsilil) Imidazol CG

B) Metilación (alquilación)

Reemplazo de un hidrógeno activo en R-COOH, R-SH, R-NH₂ con un grupo alquilo o arilo. Reactivos más empleados:

- DMF-DMA= N,N-Dimetilformamida-Dimetilacetal CG
- TMSH = Trimetilsulfonio Hidróxido 0,2 mol/l en metanol CG

C) Acilación

Conversión de compuestos con hidrógenos activos como –OH, -SH, y –NH en ésteres, tioésteres y aminas, respectivamente. Reactivos:

- HFBA = Anhídrido Heptafluorobutírico CG
- MBTFA = N-Metil-bis-(Trifluoroacetamida) CG
- TFAA = Anhídrido Trifluoroacético CG

5.12 Principio de la espectrometría de masas y aplicaciones

La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis basada en la separación de las partículas moleculares o atómicas de la muestra de acuerdo a su masa. Las etapas que comprende esta técnica son las siguientes: ionización de la muestra, aceleración de los iones por un campo magnético eléctrico, dispersión de los iones según su masa/carga, y detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica. Se trata de una técnica extremadamente sensible y de gran versatilidad que suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular.²⁷

Es importante destacar que al acoplar la CG con la EM se obtiene una poderosa herramienta para la separación e identificación de componentes a partir de mezclas complejas. En el caso particular del semen de zángano, no se han realizado estudios conducentes a determinar sus componentes utilizando el

acoplamiento de estas técnicas. Por lo tanto, en el presente estudio se desarrolló un protocolo para la determinación de azúcares presentes en el sobrenadante de vesículas seminales utilizando la técnica acoplada de CG-EM.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Localización del área de estudio

Las muestras de las vesículas seminales se obtuvieron a partir de colonias de abejas pertenecientes al Centro de Educación Ambiental (CEA) "Acuexcomatl", ubicado en Avenida Año de Juárez No. 1900, Colonia Quirino Mendoza, San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, D.F., México.

La preparación del liofilizado a partir de las muestras se realizó en el laboratorio del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) en Ciudad Universitaria, Distrito Federal.

La preparación de los derivados sililados^E de los compuestos presentes en el sobrenadante de las vesículas obtenidas a partir de los zánganos y de los estándares de los azúcares glucosa, fructosa, trehalosa, se realizó en el Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

^E Adición de silicio para ser detectados mediante cromatografía de gases.

La realización de los análisis de las muestras sililadas y los estándares de las azúcares sililadas fueron realizados utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

6.2 Manejo en campo y obtención de las vesículas seminales

Cría de zánganos

Se utilizaron cuatro colonias de abejas del Centro de Educación Ambiental “Acuexcomatl”, de las cuales se conoce su origen “africanizado”, de acuerdo a un análisis de PCR^F (técnica que amplificó el ADN mitocondrial) previamente realizado en la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

La presencia de zánganos se mantuvo durante gran parte del año gracias a la existencia de invernaderos y floración nativa de la zona cercana al apiario. Debido a esto, sólo se aumentó su producción administrando a las colonias cada ocho días, durante dos meses, alimento de estimulación que consistió en dos litros de jarabe de azúcar (1:1 de agua y azúcar morena) y 200 g de pasta compuesta por dos partes de polen, una de azúcar glass y una de miel.²²

Se obtuvieron 50 zánganos por cada una de las colonias (aproximadamente 200) y en cuanto éstos emergieron, se identificaron en el dorso del tórax con un

^F Reacción en cadena de la polimerasa.

marcador comercial. Se utilizó un color diferente por día y por colmena, y una vez marcados los zánganos, se liberaron (Figura 8 y 9).²⁸



Figura 8. Marcaje de zánganos recién emergidos.



Figura 9. Zánganos sexualmente maduros marcados con un punto azul.

Captura de zánganos

Fueron capturados 60 zánganos (15 por día), una vez que alcanzaron la madurez sexual, después de por lo menos 15 días del marcaje.²⁸ Para esto, se cortó un segmento de un excluidor de reina al tamaño de la piquera de la colmena y se colocó durante cuatro días a partir de las 14 a las 17 h; impidiendo la entrada de los zánganos a la colmena, y permitiendo realizar la captura y colocarlos en cajas transportadoras de madera de 15 cm x 15 cm, las cuales cuentan con orificios cubiertos con malla criba para evitar la salida de los zánganos, además de permitir proporcionarles agua y miel.

Disección de zánganos para la obtención de las vesículas seminales

Para sacrificar a los zánganos capturados, primero se les indujo a un estado de diapausa, colocándolos durante 5 min en congelación (de 0 a -4°C), y posteriormente se introdujeron en un frasco con acetato de etilo, impregnado en papel absorbente, durante 3 min, lo que causó su muerte por asfixia.

Para realizar la disección, se sujetó el zángano en posición dorso ventral, sobre una caja de Petri conteniendo parafina sólida, usando alfileres entomológicos. Con ayuda de un microscopio estereoscópico^G y dos pinzas entomológicas, se abrió el exoesqueleto y se separaron los músculos abdominales exponiendo la cavidad y localizando las vesículas seminales.²² Se realizó la disección de las vesículas y fueron colocadas (30 pares) en dos microtubos Eppendorf con 300 µl de agua desionizada. Después se rotuló la muestra, anotando la fecha y el color con el que se marcaron los zánganos de la muestra, y por último se congeló a -4 °C hasta su procesamiento.

6.3 Preparación del liofilizado

Obtención del sobrenadante^H de las vesículas seminales.

Las vesículas seminales fueron descongeladas y se diluyeron con 700 µl de agua desionizada, se rompieron y mezclaron con ayuda de un homogeneizador de

^G Leica® EZ 4.

^H Fase líquida que aparece después de someter una muestra a centrifugación.

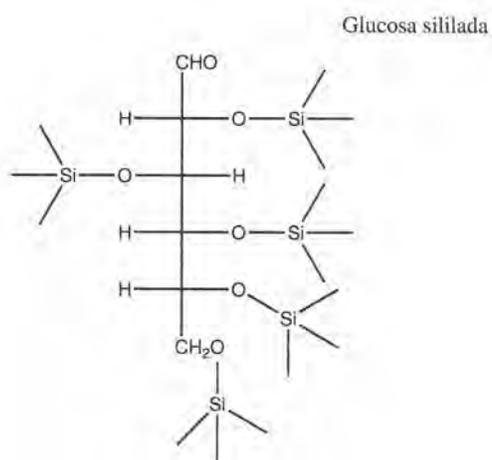
tejidos. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 9, 000 g por 30 min para obtener el sobrenadante, ya que para preparar la muestra antes de introducirla al cromatógrafo de gases necesita estar libre de sólidos.

Preparación del liofilizado.

El sobrenadante obtenido en el paso anterior se traspasó con una micropipeta a un vial de vidrio, luego se colocó en medio kilogramo de hielo seco con 200 a 300 ml de acetona para su congelación a -70 °C aproximadamente. Posteriormente, se colocó el vial en el liofilizador para deshidratar la muestra.

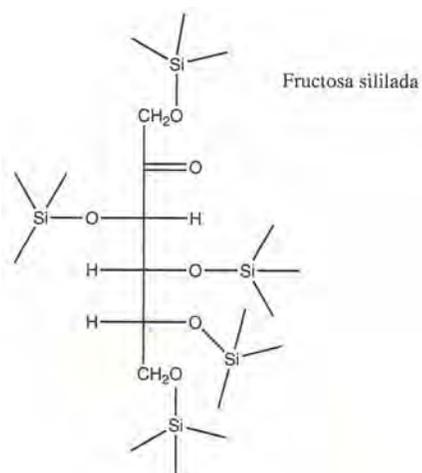
6.4 Preparación de los sililados

Para la preparación de los sililados, tanto de los estándares como de la muestra (Figuras 10, 11 y 12), se utilizaron cinco frascos ámbar de 10 ml, previamente lavados y flameados para eliminar la humedad. Se usó un frasco para cada uno de los siguientes compuestos (8 mg aproximadamente): D-glucosa anhidrada, D-(-)-fructosa, trehalosa dihidratada, una mezcla a partes iguales de las tres azúcares y el liofilizado del sobrenadante de las vesículas seminales de los zánganos. Posteriormente, se agregaron 0.3 ml de piridina y 0.3 ml de reactivo sililante [N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilclorosilano (TMCS)]. La mezcla de reacción se agitó en el frasco ámbar cerrado en condiciones inertes (evitar la presencia de un gas reactivo) mediante la adición de nitrógeno y se incubó durante 4 horas a 60°C.^{26, 27}



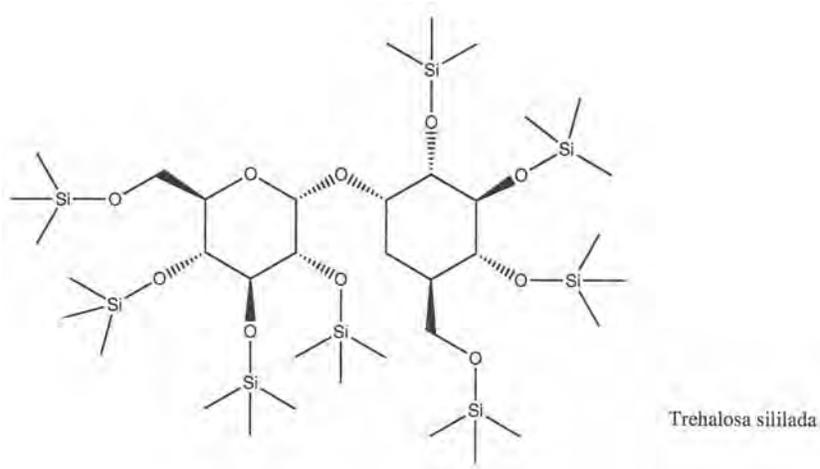
Formula química: $C_{12}H_{52}O_6Si_5$
 Masa exacta: 540.2610
 Peso molecular: 541.0615

Figura 10. Formula desarrollada de la glucosa sililada con masa y peso molecular.



Formula química: $C_{21}H_{52}O_6Si_5$
 Masa exacta: 540.2610
 Peso molecular: 541.0615

Figura 11. Formula desarrollada de la fructosa sililada con masa y peso molecular.



Formula química: $C_{37}H_{88}O_{10}Si_8$
 Masa exacta: 916.4532
 Peso molecular: 917.7726

Figura 12. Formula desarrollada de trehalosa sililada con masa y peso molecular.

Eliminación del exceso de reactivo al vacío

Para eliminar la piridina (disolvente de reacción) y el exceso de reactivo sililante, el vial fue colocado en un rotaevaporador conectado a una bomba de alto vacío a una temperatura de 60°C.^{26,27}

6.5 Análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5%fenil-polimetilsiloxano) con dimensiones de 10 m × 0.18 mm x 0.18µm (Figura 13). La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a una velocidad lineal de 1 ml/min (medido a 250°C). La temperatura del horno se programó a 40°C (durante 1 min) y se incrementó a 20°C/min hasta los 300°C durante 5 minutos (Cuadro 1). Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección "Split" (1:20).

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200°C y de la línea de transferencia, 250°C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/seg. El barrido de masas fue de 33-400 u (unidad de masa atómica).



Figura 13. Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM).

La separación de los componentes de las muestras sililadas y los estándares fue realizado utilizando un cromatógrafo de gases^l, empleando una columna capilar DB-5 (10 m de longitud \times 0.18 mm de diámetro interno \times 0.18 μ m grosor de película), y helio de alta pureza como gas acarreador. Los análisis de los compuestos separados se realizaron utilizando un espectrómetro de masas^j (Figura 13).

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas y del detector de masas para el análisis de azúcares.

Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Técnica analítica	CG-EM-TOF
Temperatura del inyector	300°C

^l Agilent 6890N.

^j LECO Pegasus 4D TOF.

Cromatógrafo de gases	Agilent 6890N
Columna capilar (fase)	DB5 10m x 0.18mm di x 0.18µm
Programación de la temperatura del horno	40°C (1munuto), 20°C/minuto hasta 300°C (5minutos)
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
Temperatura de la línea de transferencia	250°C
Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
Adquisición espectral	20 espectros/segundo
Retraso/encendido del filamento	0 minutos
Intervalo masas	33-400u
Temperatura de la cámara de ionización	200°C
Compuestos de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)

6.6 Identificación y cuantificación de los compuestos presentes en las mezclas sililadas.

Para la cuantificación de los compuestos, primero se identificó el peso de la muestra de vesículas seminales (8mg), luego se hizo una extracción para separar los componentes del líquido. El extracto se llevó a un aforo conocido (10 ml) y, posteriormente a una cantidad para poder ser inyectada al cromatógrafo (1 µl). Los compuestos presentes en las mezclas se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del instrumento y la base de datos electrónica NIST^K. En el caso particular de las azúcares de las cuales se cuenta con un estándar, la identificación en el sobrenadante de vesículas seminales de zánganos se realizó, primero, por la comparación de su tiempo de retención con el de sus estándares y, en segundo lugar, por los patrones de fragmentación de las moléculas obtenidos en el detector de masas. Esta superficie de área identificada en el integrador del cromatógrafo de gases se transformó en concentración a través de la curva con los estándares conocidos. En dicha curva, la concentración de los compuestos encontrados en un microlitro del aforo, se convirtió, sumando el punto de intersección más la pendiente y multiplicando por el área de la muestra inyectada. Finalmente, se multiplicó por 1,000 y se dividió entre los 8 mg de la muestra para reportar la concentración del azúcar en microgramos por gramo de muestra.

^K Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, versión 2.0.

7 RESULTADOS

A partir de las 60 pares de vesículas seminales procedentes de la disección, se obtuvieron 0.008 g de liofilizado.

Se determinaron 16 compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los cuales se muestran en el Cuadro 2. Los azúcares encontrados con un porcentaje de área mayor en la muestra fueron tres: glucosa con 14.99%, fructuosa con 16.57% y xilosa con 24.2% (representados por los números 1 al 3 del Cuadro 2) de área. Sin embargo, también se observaron otros compuestos importantes dentro de los que se encuentran los eicosanoides, los cuales representan de 0.86 a 7.07% del área de la muestra (representados por los números 11 al 16 del Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de los diferentes compuestos de vesículas seminales de zángano (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduro; resaltando en una franja azul claro el porcentaje de azúcares y en una franja gris claro los eicosanoides.

#	Nombre	Área %
1	D-Glucosa, 2, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	14.99
2	D-Fructuosa, 1, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	16.57
3	D-Xilosa, tetrakis(trimetilsilil)-	24.2
4	L-Prolina, 5-oxo-1-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	3.69
5	2-Ácido piperidincarboxílico, trimetilsilil ester	4.6
6	L-Prolina, 1-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	4.36
7	á-DL-Arabinopiranososa, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	2.23
8	Ácido eritro-pentonico, 2-deoxi-3,4,5-tris-O-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	6.61
9	d-Eritrotetrofuranosa, tris-O-(trimetilsilil)-	0.67
10	D-Arabinosa, tetrakis(trimetilsilil)-	1.42
11	Ácido tetradecanoico, trimetilsilil ester	7.07
12	Ácido octadecanoico, trimetilsilil ester	2.05
13	Eicosano	0.86
14	Heptadecano, 2,6-dimetil-	2.45
15	Ciclohexano, 3-etil-5-metil-1-propil-	3.97
16	Eicosano, 7-hexil-	4.13

En el Cuadro 3 se muestra la estimación de la concentración de los diferentes azúcares identificados en la muestra y de los cuales los tres azúcares más representativos (franja sombreada con color azul claro) son la glucosa con 627.5 µg/ g de muestra, la fructuosa con 788.75 µg y la xilosa con 1011.72 µg.

Cuadro 3. Estimación de la concentración (µg/g de muestra) de azúcares en vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros.

Nombre	µg/g muestra
D-Glucosa, 2, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	627.5
D-Fructosa, 1, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	788.75
D-Xilosa, tetrakis(trimetilsilil)-	1011.72
α-DL-Arabinopiranososa, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	93.22
Ácido eritro-Pentónico, 2-deoxi-3,4,5-tris-O-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	276.34
d-Eritrotetrofuranosa, tris-O-(trimetilsilil)-	28.01
D-Arabinosa, tetrakis(trimetilsilil)-	59.36

En el Cuadro 4 se muestran los tiempos de retención y peso molecular de los compuestos presentes en la muestra liofilizada de vesículas seminales de zánganos sexualmente maduros, los cuales fueron comparados con los de la biblioteca del instrumento para determinar la presencia de dichos compuestos.

Cuadro 4. Tiempos de retención de los azúcares y eicosanoides en vesículas seminales de zángano (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduro.

Nombre	Peso	T.R. (s)
D-Glucosa,2, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	438	373.647
D-Fructuosa, 1, 3, 4, 5, 6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	438	401.297
D-Xylose, tetrakis(trimethylsilyl)-	438	428.347
á-DL-Arabinopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-	438	386.747
Erythro-Pentonic acid, 2-deoxy-3,4,5-tris-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	438	413.497
d-Erythrotetrofuranose, tris-O-(trimethylsilyl)-	336	418.597
D-Arabinose, tetrakis(trimethylsilyl)-	438	457.697
Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	300	448.597
Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	356	502.497
Eicosane	282	517.797
Heptadecane, 2,6-dimethyl-	268	567.097
Cyclohexane, 3-ethyl-5-methyl-1-propyl-	168	578.197
Eicosane, 7-hexyl-	366	590.197

En las Figuras 14 y 15 se muestran los espectros de los estándares de los azúcares en estudio. De acuerdo al tiempo de retención de la glucosa (cuadro 4), que es de 373.647 segundos, se puede confirmar la presencia de la misma en el espectro del estándar de la glucosa (Figura 14) como el segundo pico más grande, tal como se esperaba.

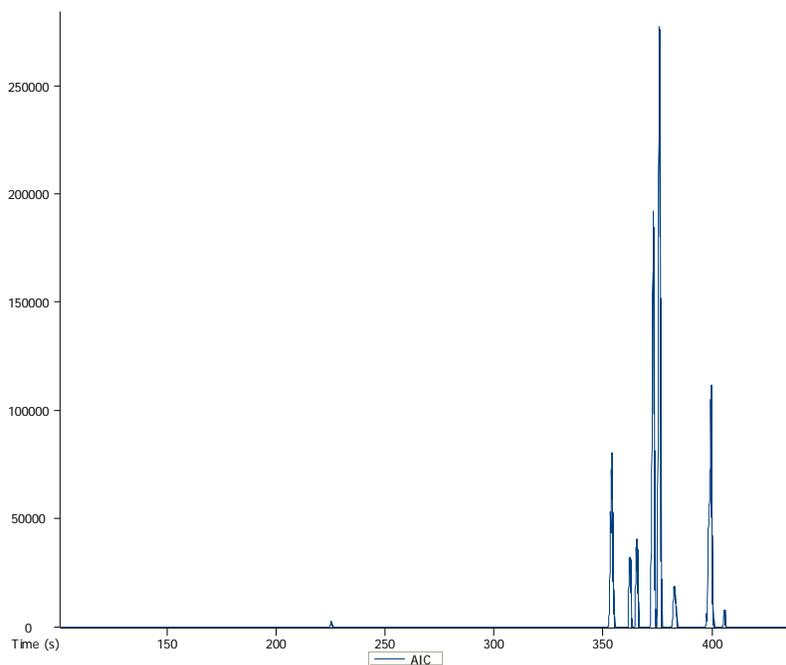


Figura 14. Espectro del estándar de glucosa en el detector de masas acoplado al cromatógrafo de gases.

De igual forma, al comparar el tiempo de retención de la fructuosa (Cuadro 4) con el de la Figura 15, se puede identificar este azúcar como el pico más alto del espectro.

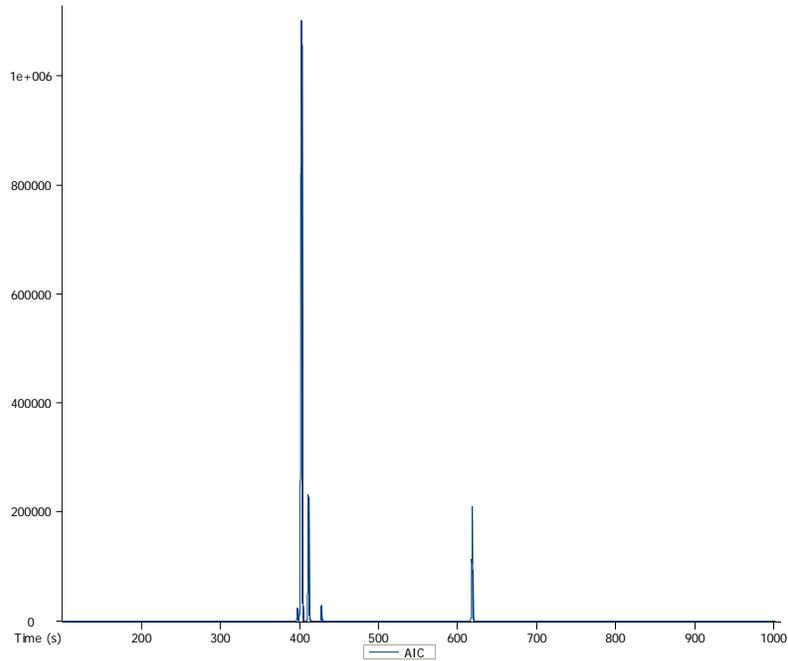


Figura 15. Espectro del estándar de fructosa en el detector de masas acoplado al cromatógrafo de gases.

La Figura 16, muestra el espectro de cada uno de los componentes de la muestra y al comparar sus tiempos de retención (eje horizontal) con el de los espectros de los estándares (Figuras 14 y 15) y con el Cuadro 4, se confirma la presencia de glucosa y fructuosa en la muestra.

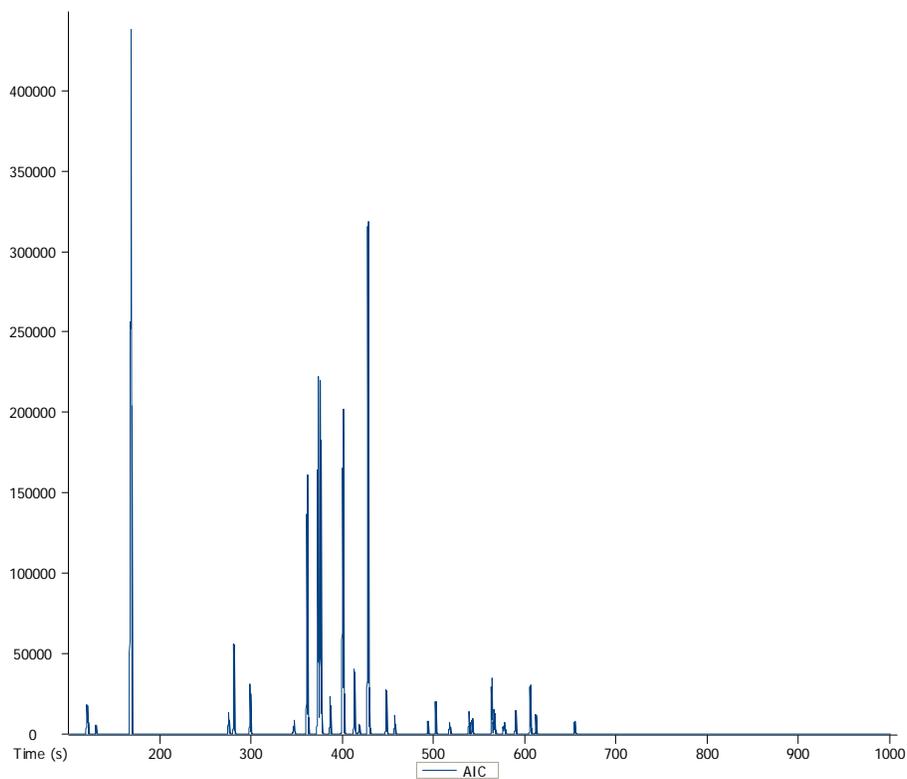


Figura 16. Espectro del liofilizado de la muestra de vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) para el análisis de azúcares por el cromatógrafo de gases acoplado al detector de masas.

8 DISCUSIÓN

Hoy en día existe poca información donde se determinen y evalúen los azúcares presentes en el semen o la hemolinfa de zánganos sexualmente maduros (*Apis mellifera* L.). En este trabajo, el acoplamiento de las técnicas de CG-EM permitió la separación e identificación de 16 compuestos en las vesículas seminales de esta especie (ver Cuadro 2). Los resultados mostraron que la xilosa fue el azúcar que se encontraba en mayor abundancia en la muestra, seguida de la fructosa y la glucosa. En otros estudios donde se ha hecho dicha evaluación, las técnicas de obtención del semen, como la estimulación del zángano con la posterior utilización del aparato Mackensen o de la jeringa Harbo, o la técnica de disección de vesículas seminales descrita por Mackensen y Ruttner (1976),² tienen el inconveniente de un cierto margen de contaminación con otros tejidos u otras secreciones como lo es el moco.^{2, 24-26} Por ésta razón en el presente estudio se decidió obtener las muestras directamente a partir de las vesículas seminales de zánganos africanizados sexualmente maduros, los cuales fueron alimentados con néctar y polen recolectado por las obreras en el mes de junio (verano), que de acuerdo a la región de Xochimilco se considera época de baja floración.

Es novedoso que en este estudio la xilosa resultara ser el azúcar más abundante, pues como es sabido este compuesto se encuentra más ampliamente distribuida en el reino vegetal¹⁹, no existiendo informes, hasta nuestro conocimiento, sobre el reporte de su presencia en el semen de zángano o hemolinfa, por lo que es posible especular que pudiera tener origen de las

vesículas seminales, ya que la muestra se obtuvo de ahí y no se separó del semen.

En las abejas, para conocer el procesamiento de absorción de los carbohidratos y su subsecuente metabolismo, es común comparar el contenido del tracto digestivo y la hemolinfa con los azúcares presentes en el néctar. Ello, tomando en consideración que el aporte de energía que un individuo presenta está íntimamente relacionado con el consumo de azúcares contenidos en el alimento.¹⁵ Sin embargo, para el análisis cuantitativo de los azúcares en la hemolinfa o del semen se emplean otros métodos.²⁹ Generalmente, los carbohidratos en hemolinfa y semen son analizados por separación de los compuestos usando cromatografía de capa fina acoplado a espectrometría o por derivatización con cromatografía gas-liquido.^{7, 30}

Es importante señalar que con estos últimos métodos, el análisis de los azúcares puede ser considerablemente rápido, si las determinaciones espectrométricas son directas, pero esto requiere el desarrollo de reacciones específicas para los azúcares presentes en la muestra. Por tal motivo, para la realización del presente estudio se determinaron primeramente las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis de las muestras utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Por otra parte, existe poca información sobre el metabolismo de los carbohidratos en insectos, por lo que la presencia de la xilosa en este estudio también podría estar relacionado con el metabolismo de los azúcares provenientes

de la alimentación (glucosa o fructuosa), ya que en otras especies esta se puede sintetizar por medio de la vía colateral de las pentosas donde la ribosa 5-fosfato puede ser transformada por una epimerasa en xilulosa 5-fosfato, la que finalmente es un isómero funcional de la xilosa. En el humano, la xilosa es uno de los ocho azúcares esenciales en la nutrición, junto con la galactosa, la glucosa, la manosa, la N-acetilglucosamína, N-acetilgalactosamína, la fructosa y el ácido siálico. Por lo que sería importante determinar la función de este azúcar en las abejas.

Al igual que en este estudio, Alumont y col.⁴ reportan la presencia de fructosa y glucosa, siendo mayor la concentración de glucosa que de fructosa; es necesario señalar que dicho estudio fue hecho a partir de hemolinfa y espermateca de reinas vírgenes y que la valoración se realizó por medio de cromatografía de capa fina, lo cual puede ser la causa de estas variaciones (ver Anexo). Por otra parte, Blum y col.²⁵ demostraron que la mayor parte de la fructosa contenida en el semen de zángano es utilizada por los espermatozoides dentro de los 40 minutos post eyaculación, lo que indica una mayor necesidad de fructosa en el semen, tal como fue observado con las concentraciones de éste azúcar en el presente estudio, lo cual les proporcionará a los espermatozoides energía de fácil acceso, necesaria para el transporte de éstos hacia la espermateca.

De igual forma, Alumont y col.⁴ determinaron la presencia de trehalosa en semen, hemolinfa y espermateca mediante cromatografía de capa fina. Además por una técnica indirecta, la cual consistió en agregar la enzima trehalasa al

contenido de la espermateca, hemolinfa y vesículas seminales se observó un aumento en la glucosa, lo que evidenció la presencia de trehalosa.⁷ Se sabe que la trehalosa es un azúcar formada por dos moléculas de glucosa y que está presente en la hemolinfa y semen de los insectos. Sin embargo, en el presente estudio no se determinó su presencia debido quizá al peso molecular al estar sililada (917.77 g/mol)²⁹, lo que muy probablemente altero sus propiedades de volatilidad y por ende su determinación por el cromatógrafo de gases. Por lo tanto, se podría especular que la concentración de glucosa fuera menor a la fructuosa, debido a que ésta se encontraba en forma de trehalosa.

Cabe mencionar que en este estudio, la identificación de los componentes de las muestras analizadas se realizó por comparación de los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de los espectros de masas registrados para estándares sililados con aquellos obtenidos para los compuestos separados a partir de la muestra sililada de las vesículas seminales del zánganos, lo que le confiere a los resultados obtenidos en este estudio un valor de 93.3%, según el cromatógrafo empleado, con lo cual se puede confirmar la presencia de los componentes en la muestra.

Otros compuestos encontrados en este estudio provienen de la familia de los eicosanoides. Estos compuestos tienen un origen en los ácidos grasos esenciales tales como los omega 3 y omega 6, de los cuales los más relevantes

son el ácido araquidónico, el ácido linoleico y el ácido linolénico.³¹ La importancia de estos compuestos, radica en que son precursores de prostaglandinas, las cuales tienen una importancia significativa en la reproducción. En mamíferos se sabe que las prostaglandinas promueven la contracción muscular durante la eyaculación y posteriormente mejorando el transporte de los espermatozoides por el aparato reproductor de la hembra. También, tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio lo cual aporta gran protección al tejido.^{32,33} Por su parte, Blum y col.³¹ encontraron que la mayor parte de los lípidos presentes en el semen del zángano son fosfolípidos, los cuales son precursores de ácidos grasos esenciales que darán origen a eicosanoides como las prostaglandinas. Se desconocen muchos de los efectos que tienen los eicosanoides en insectos, sin embargo estudios como el de Loher³⁴ han descubierto que las prostaglandinas ayudan al comportamiento de ovoposición en el grillo de campo (*Teleogryllus commodus*). Por lo tanto es de suponerse que estos compuestos encontrados en el presente estudio estén relacionados con el proceso reproductivo, ya que están presentes en las vesículas seminales y en el semen, por lo que posiblemente puedan tener alguna participación al momento de la eyaculación y su posterior efecto en la espermateca de la reina.

9 CONCLUSIONES

El presente estudio es el primero en determinar la presencia de azúcares como la glucosa y la fructosa por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en las vesículas seminales del zángano. De acuerdo a los resultados obtenidos, la xilosa podría ser unos de los azúcares principales en dichas estructuras reproductivas.

De igual forma, este estudio es el primero en determinar también la presencia de eicosanoides a través de esta técnica, lo cual resulta de suma importancia para la realización de futuras investigaciones.

10 REFERENCIAS

1. WINSTON ML. The biology of the honey bee. Cambridge, Massachusetts, London, England: Harvard University Press, 1991.
2. RINDERER ET. Bee genetics and breeding. Orlando, Florida: Academic Press, 1986.
3. DADANT AND SONS. The hive and the honey bee. 4^a ed. Carthage, Illinois, USA: Journal Printing Co., 1975.
4. ALUMONT E, LENSKY Y, HOLSTEIN P. Sugars and trehalase in the reproductive organs and hemolymph of the queen and drone honey bees (*Apis mellifera* L. Var. *ligustica* spin). *Comp Biochem Physiol* 1969;28:1419-1425.
5. FLORES AJ, FERNANDEZ AV, HUAMAN UH, RUIZ GL, SANTIANI AA. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Revista de investigaciones veterinarias de Perú* 2010;21(1):26-34.
6. YILDIZ C, KAYA A, AKSOY M, TEKELI T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2000;54:549-585.
7. RIGAU T, FARRE M, BALLESTER J, MOGAS T, PEÑA A, RODRIGUEZ JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 2001;56:801-815.
8. CHAVACÁN AM. Avances en la criopreservación de semen de zánganos (*Apis mellifera* L.) (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
9. COLLINS AM, WILLIAMS V, EVANS JD. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 2004;13 Suppl 2:141-146.
10. GUZMAN NE, TAYLOR MA, MORFIN M, BUHR MM. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology* 2009;72:149-159.

11. MORFIN RN. Efecto de diferentes extenders y crioprotectores sobre la viabilidad, evaluada con tinciones nucleares (SYBR-14 e IP) de espermatozoides de *Apis mellifera* L. durante el proceso de criopreservación de semen (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
12. TAYLOR MA. The cryopreservation of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa (tesis de maestría). Guelph (Ontario) Canadá: University of Guelph, 2008.
13. LAIDLAW HH, PAGE RE. Queen rearing and bee breeding. Chesire, USA: Wicwas Press, 1997.
14. DADE HA. Anatomy and dissection of the honeybee. Oxfröd, US: The Alden Press, 1994.
15. NATES-PARRA G., GONCALVES LS, STORT AC. Mejoramiento genético apícola. Programa regional para el manejo y el control de la abeja Africana. OIRSA. El Salvador, El Salvador. 1989
16. PENG CY, YIN L. Ultraestructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high pressure freezing fixation. *Physiol Entomol* 1993;18:93-101.
17. GUTIÉRREZ GE. Determinación y evaluación de la concentración de elementos minerales de vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante espectrometría de absorción, emisión atómica y colorimetría (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
18. MUÑOZ MJ, GARCÍA GX. Fisiología: Células, órganos y sistemas. Tomo IV. 1ª ed. México, Distrito Federal: Fondo de Cultura Económica, 1997.
19. ALBERTS B, LEWIS J, JOHNSON A, RAFD M, ROBERTS K, WALTER P. Biología molecular de la célula. 4ª ed. Barcelona. Omega, 2004.
20. JEAN-PROST P, MÉDORI P. Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. 7ª ed. Madrid, España. Mundi-Prensa, 2007.
21. CARON MD. Honey bee biology and beekeeping. 2ª ed. Connecticut, United States of America. Wicwas Press, 2008.

22. CRANE E. Bees and beekeeping: Science, practice and world resources. Ithaca, New York. Cornell University Press, 1990.
23. HERNÁNDEZ JI y ARANDA JS. La biosíntesis de trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae*: Aspectos generales y modelación metabólica. BioTecnología, 2011; 15: 29-34.
24. COLLINS AM. Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. J Econ Entomol 2000;93:568-571.
25. BLUM MS, GLOWSKA Z, TABER S. Chemistry of the drone honeybee reproductive system. II Carbohydrates in the reproductive organs and semen. Ann Entomol Soc Am 1962;55:135-139.
26. ROJAS EE, ALARCÓN JA, ELIZALDE GP, ROJO CF. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. J Chromatogr A 2004;1027:117-120.
27. SHERMA J. Chromatography: Principles and techniques. New York, NY., Marcel Dekker, 1999.
28. ESPINOSA ML. Heredabilidades y correlaciones fenotípicas para algunas características que influyen en la resistencia de las abejas (*Apis mellifera*) al crecimiento poblacional del ácaro *Varroa destructor* en México (tesis de doctorado). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
29. MEDEIROS PM, SIMONEIT BR. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 2007;1141:271-278.
30. ARSLAN A, STANDIFER LN, DON H. Carbohydrates in honey bee hemolymph. Comp Biochem Physiol 1986;84:363-367.
31. BLUM MS, BUMGARNER JE, TABER S. Composition and possible significance of fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. Insect Physiol 1967;13:1301-1308.
32. SARDESAI VM. Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids. J Nutr Biochem 1992;3:562-579.

33. STANLEY-SAMUELSON DW, PEDIBHOTLA VK. What can we learn from prostaglandins and related eicosanoids in insects?. *Insect Biochem* 1996;26:223-234.
34. LOHER W, GANJIAN I, KUBO I, STANLEY-SAMUELSON D, TOBE SS. Prostaglandins: Their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*. *J Physiol Sci* 1981;78:78355-7838.

11 LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía del aparato reproductor del zángano.....	8
Figura 2. Formación de espermatozoides en zángano.....	11
Figura 3. Complejo acrosomal.....	13
Figura 4. Cuello de espermatozoide de zángano.....	13
Figura 5. Estructura química de la glucosa y la fructosa.....	16
Figura 6. Estructura química de la trehalosa.....	18
Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de gases.....	24
Figura 8. Marcaje de zánganos recién emergidos de su celda.....	29
Figura 9. Zánganos sexualmente maduros marcados con un punto azul.....	29
Figuras 10. Fórmula desarrollada de la glucosa sililada con masa y peso molecular.....	32
Figura 11. Fórmula desarrollada de la fructuosa sililada con masa y peso molecular.....	32
Figura 12. Fórmula desarrollada de la trehalosa sililada con masa y peso molecular.....	32
Figura 13. Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM).....	34
Figura 14. Espectro del estándar de glucosa en el detector de masas acoplado al cromatógrafo de gases	40
Figura 15. Espectro del estándar de fructosa en el detector de masas acoplado al cromatógrafo de gases	41

Figura 16. Espectro del liofilizado de la muestra de vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) para el análisis de azúcares por el cromatógrafo de gases acoplado al detector de masas 42

12 LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.....	34
Cuadro 2. Porcentaje de los diferentes compuestos de vesículas seminales de zángano (<i>Apis mellifera</i> L.) sexualmente maduro.....	37
Cuadro 3. Tiempos de retención de los azúcares en vesículas seminales de zángano (<i>Apis mellifera</i> L.) sexualmente maduro.....	38
Cuadro 4. Concentración ($\mu\text{g/g}$ de muestra) de hidratos de carbono en vesículas seminales de zánganos (<i>Apis mellifera</i> L.) sexualmente maduros.....	39
Cuadro 5. Concentración de azúcares en hemolinfa y espermateca de reina Virgen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).....	56

13 ANEXO

Cuadro 5. Concentración de azúcares en hemolinfa y espermateca de reina virgen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Azúcar	Hemolinfa		Espermateca	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Glucosa	8.6	5	5.5	4
Fructosa	8	2.2	1.5	2
Sucrosa	3.4	1.5	4	1.5
Trehalosa	12	5.6	0.4	0.7