



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Evaluación de un diluyente con Metilformamida como protector para la criopreservación de semen del perro domestico *Canis lupus familiaris*.

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Biología

PRESENTA

Carmen Celeste Valdez Uribe

Director de tesis:
M. M.V.Z. Rafael Eduardo Paz Benito



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.

Agradecimientos

Gracias a la UNAM que me acogió y siempre estuvo ahí para mí.
Por ofrecerme todo lo que pudo y abrirme las puertas siempre que fue necesario.

A mis padres:

Les agradezco tanta confianza, tanta paciencia y amor, a mi madre que siempre estuvo ahí, en cada paso y en cada caída ayudándome a ser fuerte para seguir.

A mi familia:

Por tanto, apoyo, amor y ser parte de cada paso que di, por estar siempre que lo necesité.

A mi pareja:

Por el apoyo día con día, por tu enorme paciencia y tolerancia en estos años, al no dejarme caer ante cada situación de estrés. Por tu amor y ayuda a lo largo de este camino.

A mis amigos:

Ale, Fer, Erik, Lalo, Memo, Ángel, Wendy, gracias por ser luz en mi vida y ayudarme en cada etapa, tanto con su presencia, sus palabras y sus actos.

A mi tutor:

Por creer en mí, abrirme las puertas y darme la oportunidad de entrar en esta área, por la paciencia y apoyo durante el proceso y el camino. Gracias por ser un gran docente y una excelente persona.

A mis revisores:

Por la paciencia y dedicación, el apoyo que me dieron durante los últimos meses.
En especial a usted Dra. Montse por ser mi guía, mi consejera y mi amiga.

Y a cada persona que entro en mi vida y me llevo al lugar correcto.

“Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo, y lo que parecía irremediabilmente un fracaso puede convertirse en un éxito glorioso”.

Elbert Hubbard

Contenido

Introducción	4
Marco teórico	6
Características del semen	7
Morfología espermática	10
Maduración epididimaria	14
Metabolismo espermático	14
Colección del semen	15
Congelación del semen	17
Diluyente	17
Agentes crioprotectores	17
Nutrientes	18
Amortiguadores	18
Agentes antimicrobianos	19
Daños que sufre el espermatozoide durante la criopreservación y descongelación	19
Estrés mecánico	19
Estrés osmótico	19
Estrés térmico.	19
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Material y Métodos	23
Sujeto de estudio	23
Procesamiento de la muestra	23
Parámetros evaluados del semen canino	23
Preparación del diluyente	26
Pruebas de resistencia	27
Evaluación de Viabilidad post-congelación	28
Análisis Estadístico	28
Resultados	29
Mortalidad y Anormalidades	30

Tinción rosa de bengala	33
Movilidad por pases	35
Movilidad post-descongelado	36
Discusión	37
Conclusiones	41
ANEXO 1	42
ANEXO 2	43
ANEXO 3	44
Referencias	45

Introducción

La criopreservación es una técnica que ayuda en la conservación de la viabilidad y funcionalidad celular del semen de todas las especies incluyendo al perro; con esta técnica puede mantener por largos periodos de tiempo el material genético de reproductores de alta calidad para así facilitar su posterior distribución y uso en técnicas de inseminación artificial.

Los diluyentes utilizados en la criopreservación de semen son soluciones compuestas por diferentes ingredientes cuyo fin es mantener vivo al espermatozoide, éstos dan estabilidad a la membrana plasmática durante el proceso de congelación y descongelación, mantienen el metabolismo celular e incrementan el volumen optimizando el uso del semen. Algunos componentes de estos diluyentes funcionan como: crioprotectores, los cuales pueden o no penetrar la membrana celular de la célula, nutrientes, que le aportarán energía durante el proceso de congelación, amortiguadores que mantendrán el pH neutro o similar al plasma seminal, así como antibióticos que evitan la presencia y proliferación de bacterias dentro de la muestra.

Se han realizado distintos estudios de diluyentes comparando la eficiencia de los crioprotectores en las diferentes especies domésticas y de fauna silvestre, entre los que destacan el glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), N-metilformamida, dimetilformamida, azúcares simples como glucosa, fructosa y lactosa entre otros.

Dentro del área de reproducción en perros domésticos se tienen pocos registros de la congelación de semen con amidas, algunos de ellos son: Restrepo y colaboradores en 2011 y Futino en 2010 quienes reportan un mejor rango en los parámetros de movilidad e integridad de la membrana espermática, con glicerol en comparación con metilformamida y/o dimetilformamida utilizando un diluyente con base en tris-citrato-yema o un diluyente comercial (Dog Semen Diluent, Minitube®) respectivamente.

Las amidas tienen gran potencial para mejorar la congelación de semen ya que reducen los daños en la célula espermática debido a que tiene un bajo peso molecular y una menor viscosidad.

Una amida reconocida como crioprotector de semen en algunas especies como equinos y porcinos es la N-Metilformamida (MF), compuesto polar que tiene una mayor capacidad de penetrar la membrana del espermatozoide en comparación del DMSO o el glicerol, debido a su peso molecular (Prien., 2016; Will et al., 2016).

Aun cuando en perros se ha estudiado la efectividad de MF como crioprotector, existen pocos reportes al respecto y su uso no ha sido estandarizado en esta especie. Futino en 2010 comparó la efectividad de las amidas y el glicerol en la criopreservación; sin embargo, el protocolo de congelación que se utilizó es distinto acorde a los protocolos individuales que se utilizan rutinariamente en esta especie, así mismo menciona que la MF es una alternativa prometedora para sustituir al glicerol en la congelación de semen canino y es recomendable realizar otros estudios comparando otros ingredientes y diferentes concentraciones de este compuesto.

La finalidad del presente estudio es comparar la eficiencia del glicerol y N-Metilformamida contra un diluyente base Lactosa - yema de huevo, evaluando los resultados en movilidad, vitalidad, anormalidades e integridad de acrosoma de semen post-descongelado en la Clínica de reproducción canina de la FMVZ de la UNAM para establecer un protocolo adecuado.

Marco teórico

En el perro la congelación de semen es un área de investigación que ha tenido grandes avances desde 1954 cuando Rowson reportó la primera congelación exitosa en ésta especie, siendo hasta 1969 que Seager reportó la primera gestación con semen congelado por medio de Inseminación artificial (IA).

La criopreservación tiene la finalidad de mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, para conservar el semen para su posterior uso por medio de técnicas de reproducción asistida, con el fin de almacenar el material genético de reproductores de alta calidad y distribuirlo a todo el mundo, controlar enfermedades venéreas para el macho y aumentar el número de gestaciones, lo que resultaría en mayor número de crías (Restrepo., 2009; Santos et al., 1999).

Durante el proceso, la presencia del diluyente es importante para mantener las células viables, evitando el daño por el frío, así como la formación de cristales de hielo que pueden romper las membranas celulares; ayudan a mantener el metabolismo celular aportando nutrientes y sustancias que mantienen las características necesarias para el funcionamiento de la célula espermática (Santos et al., 1999).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas celulares determinan los cambios o alteraciones que puede sufrir la célula durante los procesos de criopreservación, así como su comportamiento durante la congelación y descongelación. Entre los componentes de un diluyente se encuentran los crioprotectores cuya finalidad es proteger a la célula contra los cambios de temperatura, la formación de cristales de hielo y alteraciones en la membrana para poder mantener viva a la célula a temperaturas bajas como las del Nitrógeno a -196° C (Ávila-Portillo et al., 2006).

Características del semen

El semen de perro se compone de tres fracciones, la parte líquida del semen o plasma seminal, la primera y tercera fracciones del semen son líquidas de origen prostático, compuestas por albúmina, globulinas, lípidos, iones como sodio y cloro, los cuales son importantes para el equilibrio osmótico, calcio, magnesio, fósforo, zinc, ácido láctico, nitrógeno, y una menor proporción de fructosa a diferencia de otras especies el perro sólo presenta la próstata, la cual aporta el 100% de plasma al semen, y produce numerosas enzimas como arginina esterasa, fosfatasas ácida y alcalina, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos e inmunoglobulinas de la clase IgA (Covarrubias et al.,1988; Hafez y Hafez., 2000; Sandoval., 2005).

La segunda fracción del semen contiene a los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo. La composición química del semen canino se muestra en el cuadro 1 (Mann., 1964; Hafez y Hafez., 2000).

Cuadro 1. Componentes del semen en el perro			
	Primera fracción	Segunda fracción	Tercera fracción
Potasio (m-equiv./l)	4.8-6.9	13	7.7
Calcio (m-equiv./l)	0.3-2.2	0.4	0.2-0.6
Magnesio (m-equiv./l)	1.3-1.7	0.8	0.1-0.6
Cloro (m-equiv./l)	151-171	192	160
Bicarbonato (m-equiv./l)	1.7-2.5	2.3-5.4	1.7-2.7

Fósforo (mg/100ml)	11.2	36	1.5
Zinc (mg/100ml)	1.71-2.8	14.06-19.7	6.26-8.01
Fructosa (mg/100ml)	0.4-0.6	1.2-3.0	0.2-0.6
Ácido láctico (mg/100ml)	5.8-10.7	20.6-41.2	7.9-21
Proteínas %	1.46-2.01	3.99	2.38

Tomado de Mann 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Butler & Tanner Ltd Frome. Primera edición.

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos a partir de las espermatogonias; el epitelio seminífero que cubre a dichos túbulos está compuesto por las células de las células de Sertoli y las germinales en desarrollo (espermatogonias, espermatocitos I y II, espermátidas y espermatozoides). Las células germinales tienen su origen en el saco vitelino y migran hacia la cresta gonadal durante la vida embrionaria, para dar origen a los gonocitos o espermatogonias (Hafez y Hafez., 2000; Zarco., 2018). Al llegar a la pubertad, los túbulos seminíferos tienen un diámetro mayor, y en su interior se encuentran células de Sertoli y espermatogonias en diferentes estadios de división y en la luz se observan espermatozoides, mientras que en la periferia se encuentran las células mioides, las células de Leydig y tejido conjuntivo (Figura 1).

La espermatogénesis es el proceso por el cual las espermatogonias tras una serie de divisiones para dar lugar a los espermatozoides y espermatogonias de reserva, y se divide en tres fases:

Fase de mitosis (proliferativa) en la cual la espermatogonia que se encuentra en contacto con la membrana basal del túbulo seminífero sufre una sucesión de divisiones mitóticas, para dar origen a las espermatogonias A de reserva, intermedias y espermatogonias B, que pasan al compartimento luminal para transformarse en espermatocito primario.

Fase de meiosis: los espermatocitos primarios, inician la meiosis, dando origen a espermatocitos secundarios, que sufren una segunda división meiótica sin replicar el material genético y dan origen a las espermátidas con carga cromosómica haploide.

Espermiogénesis en la que para dar origen al espermatozoide, la célula sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales entre los que se encuentran la transformación del aparato de Golgi a un pro-acrosoma, el centriolo distal da origen al desarrollo del flagelo espermático, las mitocondrias migran a la pieza media y se lleva a cabo la condensación de la cromatina, además se presentan cambios metabólicos y la eliminación de organelos y citoplasma en la gota citoplasmática. El producto final son los espermatozoides, células altamente especializadas cuya función es la fertilización (Flores y Vilanova., 2015; Hafez y Hafez., 2000; Marina., 2003; Zarco., 2018).

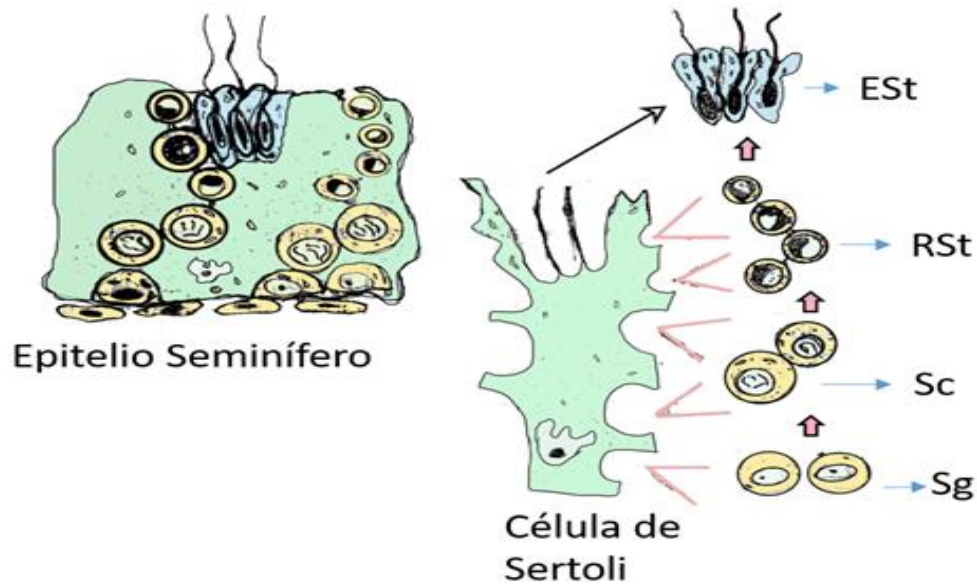


Figura 1. Epitelio seminífero. Las células germinales inician el proceso de desarrollo como espermatogonias (Sg), se transforman en espermatocitos (Sc), después en espermatidas redondas (RSt) y finalmente, en espermatidas alargadas (ESt). Modificado de Hafez y Hafez 2000.

Morfología espermática

- Cabeza

La membrana espermática tiene un arreglo de tipo mosaico fluido, con lípidos dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor y proteínas integrales que realizan diversas funciones, como el transporte de las moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula, y actúan como enzimas o catalizadores; la membrana también contiene carbohidratos, que en su mayoría son cadenas de azúcares simples o polisacáridos, un alto nivel de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, esteroles y lípidos neutros representando el 70-80%, así como un alto nivel de ácidos grasos y algunos glucolípidos (Hafez y Hafez., 2000; Parks y Graham., 1992).

La parte más importante de la cabeza es el núcleo, el cual contiene el material genético en forma de cromatina muy compacta. La cromatina condensada con el ADN es estabilizada por protaminas que sustituyen a las histonas presentes en otras células y mantienen el material genético súper plegado; el núcleo se encuentra rodeado por una teca perinuclear, elemento perteneciente del citoesqueleto y cuya función es la unión de las membranas espermáticas y la preservación de su integridad (Luño y Matas., 2012; Hafez y Hafez., 2000).

En esta región también se encuentra el acrosoma que recubre el polo anterior del núcleo, sobre la teca perinuclear y es un delgado saco membranoso formado por una membrana acrosomal interna; en contacto con el citoesqueleto y una membrana acrosomal externa en contacto con la membrana celular. Esta estructura contiene enzimas hidrolíticas como hialuronidasa y acrosina, entre otras, las cuales participan en el proceso de fecundación. La región ecuatorial y el segmento anterior de la región post acrosomal participan en la unión con la membrana del ovocito y es el sitio donde se localizan las fertilinas y adhesinas (Hafez y Hafez., 2000; Cerezo et al 2014).

Los componentes principales de la pieza de conexión son el capitulum, y las columnas segmentadas. La fosa de implantación se desarrolla con la posición de la envoltura nuclear y la placa basal, una densa placa que se adhiere a la membrana nuclear externa Figura 2 (Eddy., 2006).

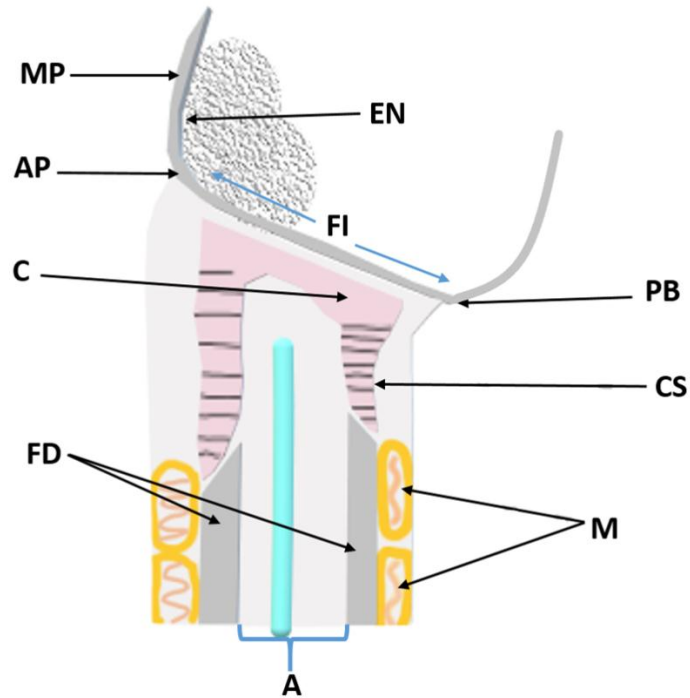


Figura 2. Estructura de cuello y pieza media. MP: membrana plasmática, EN: envoltura nuclear, AP: anillo posterior, FI: Fosas de implantación, PB: Placa basal, M: mitocondrias, FD: Fibras densas, C: capitulum, CS: columnas segmentadas, A: axonema.

- Cola

La cola espermática está formada por el cuello, la pieza media y los segmentos medio, principal y caudal del flagelo como se observa en la figura 3.

El cuello está compuesto por columnas segmentadas y una estructura densa y fibrosa denominada capitulum que brinda flexibilidad a la cola (Figura 2) (Luño y Matas., 2012).

La pieza media contiene a las mitocondrias dispuestas de forma helicoidal alrededor del axonema, son responsables de la producción de energía necesaria para el movimiento de la cola. El axonema se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales y se continúa dando origen a los diferentes segmentos del flagelo (Figura 3).

La pieza principal es el segmento más largo del flagelo y su función es proporcionar movilidad al espermatozoide, mientras que la pieza caudal es la porción corta y distal del flagelo que solo presenta el axonema rodeado por la membrana plasmática (Figura 3) (Hafez y Hafez., 2000; Luño y Matas., 2012; Flores y Vilanova., 2015).

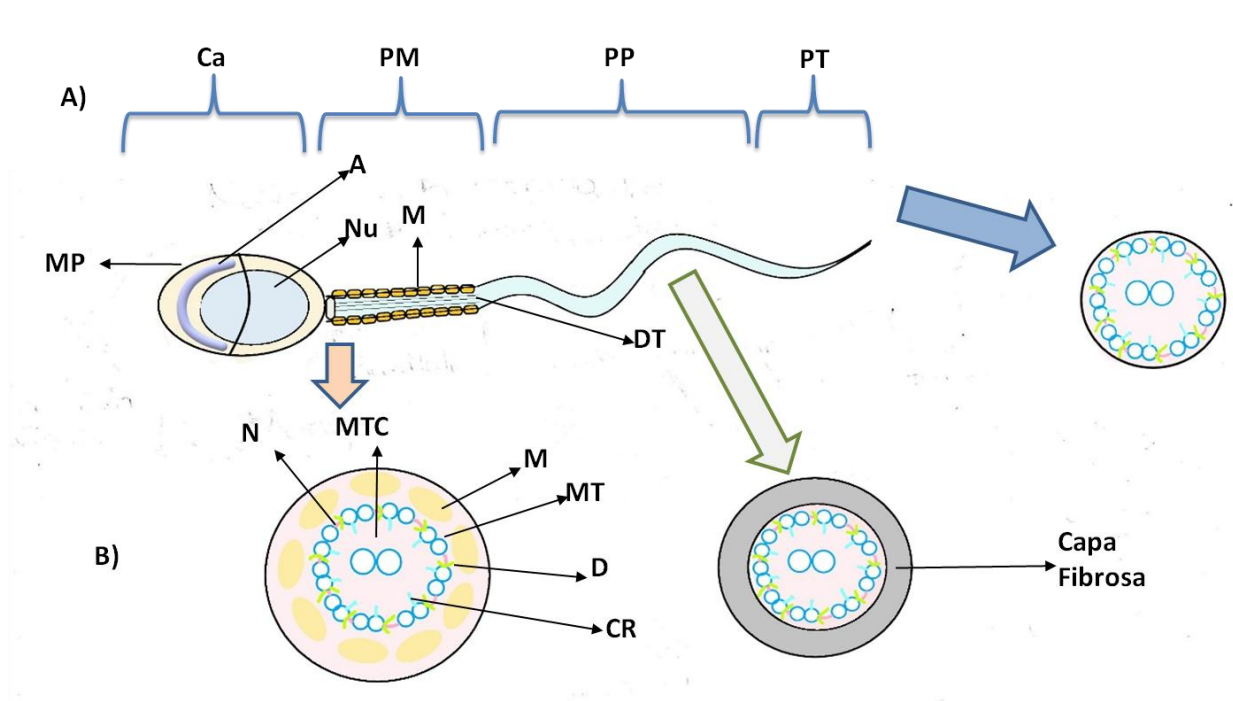


Figura 3. Estructura del espermatozoide. **A)** Ca: Cabeza, MP: membrana plasmática, A: acrosoma, Nu: núcleo, PM: Pieza media, M: mitocondrias, DT: disco terminal, PP: pieza principal, PT: pieza terminal; **B)** CR: conexiones radiales, N: nexina, MC: microtúbulos centrales, D: brazos de dineina, MTC: microtúbulos centrales, MT: microtúbulos, M: mitocondrias. Modificado de: Olivera et al., 2006.

Maduración epididimaria

Los espermatozoides son liberados del túbulo seminífero hacia la rete testis y de ahí se transportan por el epidídimo, estructura, que se divide en tres secciones (cabeza, cuerpo y cola) cuyas funciones son la maduración, transporte y almacenamiento de los espermatozoides. Durante su tránsito presenta cambios en los dominios de los esteroides de membrana y sirven como transportadores para acoplar proteínas que inducen diferentes rutas de señalización. Además, esta maduración implica el desarrollo del potencial para la movilidad, la pérdida de agua, la interacción con secreciones que contienen transferrina, ceruloplasmina y factores de crecimiento, la migración distal, y la pérdida de la gota citoplasmática así como cambios en la cromatina nuclear (Hafez y Hafez., 2000; Valencia., 2018).

El almacenamiento de los espermatozoides se lleva a cabo en la parte caudal del epidídimo, que contiene el 70% de la cantidad total de gametos presentes en el mismo. El conducto deferente solamente contiene un 2% de espermatozoides en comparación con la cola del epididimo (Hafez y Hafez., 2000).

Metabolismo espermático

El fluido epididimario a nivel de la cola es rico en aminoácidos, glicerilfosforilcolina, glicoproteínas y carnitina. El espermatozoide tiene mecanismos de autorregulación como baja tensión de oxígeno, baja presión osmótica y reducida concentración extracelular de hidrógeno, calcio, sodio y bicarbonato que tienen un efecto supresor y lo mantienen en un estado de reposo durante el almacenamiento en la cola del epidídimo (Levine y Marsh., 1971).

En el epidídimo se pierde la gota citoplasmática la cual se considera un organelo transitorio y contiene proteínas implicadas en el metabolismo energético y su función es activar las mitocondrias y ubicar las enzimas en la vaina fibrosa del flagelo, el espermatozoide necesita energía libre para el movimiento flagelar, la cual se obtiene de forma eficiente en condiciones aerobias por medio de la

fosforilación oxidativa a nivel de las mitocondrias presentes en la pieza media del flagelo, y es la principal fuente de ATP que se genera a partir de la glicolisis (Flores y Vilanova., 2015).

Colección del semen

Para la obtención de semen en perros es necesario un vaso de precipitado, o un embudo con tubo de vidrio, guantes de exploración no estériles y lubricante. (Páramo y Porras., 2009).

En el perro la recolección del semen se lleva a cabo por estimulación manual o masturbación, en algunos casos es necesaria la estimulación del perro visual y olfativamente por medio de la presencia de una hembra en celo o un hisopo impregnado de las secreciones de la vagina de una hembra en estro.

Posteriormente, debe colocarse al perro en un lugar tranquilo, sobre una superficie antiderrapante, se sujeta por la cabeza y la persona encargada de la colección de semen manipula el prepucio con movimientos hacia adelante y atrás, masajeando el pene rápida y vigorosamente desde el glande hasta el bulbo, cuando inicia la erección se desenvaina el pene, y se dirige hacia el recipiente colector atemperado a 37°C y se continúa el masaje hasta que comienza a eyacular. Se debe rotar el pene 180° simulando el abotonamiento (mecanismo fisiológico por el cual quedan unidos durante la eyaculación), se continúa la estimulación con la mano oprimiendo el bulbo y jalando ligeramente hacia atrás hasta obtener el semen (Páramo y Porras., 2009).

La eyaculación es emitida en tres partes, la primera fracción es de origen prostático, de color transparente, la segunda fracción proviene del epidídimo y se mezcla con las secreciones prostáticas, su color es blanco debido a la presencia de los espermatozoides y por último la tercera fracción es de origen prostático y tiene un color transparente (Cuadro 2). En la colección se obtienen la primera y segunda fracción, se retira el recipiente colector, cuando se presenta el cambio de

color que indica que se está eyaculando la tercera fracción (Páramo y Porras., 2009; Wanke y Gobello.,2006).

Cuadro 2. Parámetros normales del semen de perro (Paramo y Porras., 2009).				
	Fracción I	Fracción II	Fracción III	Eyaculado Completo
Volumen (ml)	0.5- 2	0.5-2	1-30	2-30
Color	Transparente	Blanco	Transparente	Blanco
Concentración (10 ⁶ / ml)	-	>100 mill/ml	-	>100 mill/ml
Motilidad progresiva %	-	>70	-	>70
Anormalidades %	-	<20	-	<20 (Anormalidades primarias 5 % Anormalidades secundarias 15 % % Descritas en el cuadro 3)
Mortalidad %	-	<5		<5
pH	-	-	-	6.5-7

Congelación del semen

En los diferentes protocolos de criopreservación se mencionan los diluyentes con glicerol como crioprotector penetrante, cuya función es evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, ya que modifica o elimina el líquido intracelular, este compuesto presenta muchas ventajas para la preservación espermática, pero tiene como limitante su toxicidad, debido al estrés osmótico que genera a causa de una lenta velocidad de difusión través de la membrana (Gilmore et al.,1995; Restrepo et al 2011), razón por la cual se han evaluado diversas alternativas de crioprotectores como el etilenglicol, Dimetilsulfóxido (DMSO) u otras moléculas que por su bajo peso molecular penetran con mayor facilidad las membranas como algunas amidas (Restrepo et al.,2014; Giraldo et al., 2012).

Diluyente

Son soluciones compuestas por diferentes ingredientes que tienen como fin proteger al espermatozoide, mantener estable los lípidos de la membrana plasmática durante el proceso de congelación y descongelación, aportan nutrientes y energía para mantener el metabolismo celular e incrementan el volumen permitiendo la optimización del semen.

Entre las sustancias que componen a los diferentes diluyentes se encuentran las siguientes:

Agentes crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles, de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico (punto de congelación), lo cual implica que se alcanzará una concentración determinada de solutos a una temperatura menor, deshidratando a la célula y someténdola a un gradiente osmótico menor, modificando la formación de cristales de hielo intra y extracelulares (Ávila-Portillo et al., 2006).

Se dividen en:

- 1) Penetrantes: Son sustancias de bajo peso molecular que traspasan con facilidad la membrana celular, reemplazando el agua intracelular por medio de la interacción con radical hidroxilo. Son esencialmente alcoholes como glicerol, etilenglicol, 1-2 propanodiol, propilenglicol, dimetilsulfóxido, entre otros (Neira et al., 2007).
- 2) No penetrantes: Son compuestos que no pueden penetrar la membrana y ejercen su efecto protegiendo el exterior de la membrana celular evitando lesiones en la misma por efecto de las altas concentraciones iónicas (Whittingham, 1971). Estos pueden ser de bajo peso molecular como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, trehalosa y rafinosa ya que aumentan la presión osmótica extracelular provocando así la deshidratación de la célula (MacGann., 1978).

Nutrientes

Sustancias que aportan componentes necesarios para obtener energía, pueden ser leche descremada, agua de coco, suero de leche deshidratado, yema de huevo o monosacáridos como lactosa, glucosa y trehalosa que también son importantes como crioprotectores (Sorensen., 1979).

Amortiguadores

Elementos que neutralizan los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides conocidos como especies reactivas al oxígeno. Algunos de los más comunes son el citrato de sodio, fosfato de sodio, Tris (Tris (hidroximetilaminometano), HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1 piperazineethanesulfónico), MOPS (Ácido 3-(-N-morpholino) propanesulfónico), por mencionar solo algunos (Sorensen., 1979).

Agentes antimicrobianos

Compuestos cuya función es inhibir el crecimiento de organismos patógenos y reducir el metabolismo del espermatozoide, los más comúnmente utilizados son penicilina y estreptomycin (Sorensen., 1979; Sandoval., 2005).

Daños que sufre el espermatozoide durante la criopreservación y descongelación

Estrés mecánico

Es el daño que se da cuando los espermatozoides se enfrían por debajo del punto de congelación del diluyente donde se encuentran, debido a la formación de cristales de hielo en el medio extracelular (Blanch 2007). Para evitar dicho daño es importante que el diluyente contenga crioprotectores que pueden o no penetrar la membrana y tengan la capacidad de interactuar con las moléculas de agua presente en la célula evitando la formación de cristales y así mantener la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide.

Estrés osmótico

Las células sufren cambios de volumen durante la congelación y descongelación, los crioprotectores penetrantes son capaces de atravesar la membrana plasmática, sacando el agua de la célula debido al ambiente ligeramente hiperosmótico al que es sometida, una vez que se estabiliza osmóticamente (Blanch., 2007). Si el medio se torna hiposmótico la célula se hincha dañando así la membrana plasmática y se vuelve susceptible a ruptura por la formación de cristales de hielo intracelular, de igual manera la célula puede sufrir daños al estar en contacto con un medio hiperosmótico, por una deshidratación excesiva.

Estrés térmico.

Sucede durante el enfriamiento, ya que algunas familias de fosfolípidos presentan una transición de líquido a gel al ser sometidos a cierta temperatura; mientras que las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y

paralelas. Estos cambios dan como resultado el rompimiento de enlaces entre fosfolípidos de la membrana. Una vez que el espermatozoide regresa a la temperatura inicial los fosfolípidos y las proteínas vuelven al estado líquido, pero no vuelven a su localización original, ocasionando alteraciones en las funciones de la membrana (Blanch., 2007). El glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), metilformamida (MF) entre otros se han probado como crioprotectores, los cuales expulsan el agua de la célula o la modifican con el fin de que no se formen cristales y cause algún daño en la membrana celular o al núcleo. El glicerol contiene tres grupos hidroxilo funcionales, que pueden aceptar un hidrogeno de la molécula de agua en seis sitios diferentes, aunque los radicales hidroxil-glicerol pueden unirse entre sí, disminuyendo la probabilidad de unión con moléculas de agua (Bianchi., 2008). Por otra parte, las amidas contienen grupos funcionales con nitrógeno-hidrogeno, mediante el cual se unen a las moléculas de agua, de igual manera el grupo CH₃ y su bajo peso molecular aumenta su permeabilidad a la membrana (Bianchi et al., 2008).

Las amidas tienen un incremento en el punto eutéctico (el punto en el cual una solución se congela) y al mismo tiempo reducen los daños en la célula espermática que causa el glicerol ya que tienen un peso molecular y una viscosidad menor. Una amida reconocida como crioprotector de semen es la N-Metilformamida, compuesto bipolar que tiene una mayor capacidad de penetrar la membrana del espermatozoide a comparación de DMSO o el glicerol, por su peso molecular (Prien., 2016; Will et al., 2016).

Dentro de los reportes de congelación utilizando como crioprotector metilformamida se encuentran Alvarenga en 2005 donde cita a Graham quien evaluó el semen de sementales congelando con Dimetilformamida (DMF), metilformamida (MF), dimetilformamida (DMF) o etilenglicol (EG) donde se observó un 52%, 48%, 49% y 40% respectivamente en la movilidad espermática después de la descongelación (Alvarenga et al., 2005).

Squires y colaboradores en 2004 evaluaron la concentración molar de varias amidas para determinar si podían preservar la movilidad del espermatozoide de caballo, obteniendo un porcentaje de movilidad de 61% con glicerol (GL), 40% con metilformamida (MF), 38% con dimetilformamida (DMF) a concentraciones de 0.5 M, mientras que al incrementar la concentración a 0.6 y 0.9 M 48-54%, similar a la de glicerol 52%.

Futino en 2010 comparó el glicerol (GL), metilformamida (MF) y dimetilformamida (DMF) a una concentración de 3% en la criopreservación de semen canino y los resultados obtenidos mostraron que la MF tenía un efecto crioprotector similar al GL.

La criopreservación de semen es una técnica de gran importancia en el área de reproducción canina que permite mantener el material genético viable por periodos largos de tiempo de una especie de alta estima, los criopreservadores utilizados hasta ahora han mostrado buenos resultados, pero por la alta mortalidad reportada durante el procesamiento del semen es necesario investigar nuevas alternativas en crioprotectores como la metilformamida en diferentes estudios, por lo que se intentará demostrar la efectividad de metilformamida cuyo uso ha sido exitoso en otras especies, en comparación con respecto al glicerol que es tóxico para el espermatozoide.

Justificación

Existen pocos reportes al relacionados con las amidas como crioprotectores para semen de perro doméstico, por lo que su uso no ha sido estandarizado en esta especie; por ello en este estudio se compara la eficiencia del glicerol y N-Metilformamida con un diluyente base Lactosa - yema de huevo, utilizado cotidianamente para la congelación de semen en la Clínica de Reproducción Canina de la FMVZ de la UNAM, para establecer un protocolo donde la movilidad y la vitalidad espermática sean eficientes para su posterior utilización por inseminación artificial.

Hipótesis

La criopreservación de espermatozoides en canino tiene mejores efectos con un diluyente que contiene N-metilformamida como crioprotector en comparación con otro que contiene glicerol.

Objetivo general

Evaluar los efectos de N-metilformamida (MF) en los espermatozoides congelados-descongelados de *Canis lupus familiaris*.

Objetivos particulares

- Evaluar los efectos que tiene la criopreservación con MF en la calidad espermática.
- Evaluar la viabilidad y la mortalidad de espermatozoides congelados-descongelados con un diluyente que contiene MF.
- Evaluar la integridad acrosomal mediante la tinción de Rosa de Bengala.

Material y Métodos

La investigación se llevó a cabo en la Clínica de Reproducción Canina, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicada en Av. Universidad 3000, Delegación Coyoacán, Col. Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, CDMX.

Sujeto de estudio

Se llevó a cabo las obtenciones de semen de 20 perros clínicamente sanos, de entre 1 y 7 años de edad, provenientes de las prácticas de la materia de profundización en reproducción canina, el semen fue colectado por medio de estimulación manual utilizando un cono de plástico para colección, por medio de la técnica descrita por Porras y Páramo en 2009.

Procesamiento de la muestra

Una vez obtenida la muestra se realizó la evaluación macroscópica y microscópica del semen para obtener los parámetros de cada muestra antes de la congelación. Los parámetros de inclusión de las muestras en el presente estudio fueron I: concentración mayor a 100 millones de espermatozoides por mililitro, pH de 6.5 a 7, color blanco, movilidad progresiva mayor al 70%, una mortalidad del 5% y una morfología anormal que no sea mayor del 20 % (Cuadro 2).

Parámetros evaluados del semen canino

Se dividen en características macroscópicas y microscópicas como se muestra en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Parámetros macroscópicos evaluados descritos por Páramo y Porras., 2009.

Volumen

El volumen fue medido mediante una jeringa de insulina sin embolo.

Color

Se observó directamente en el recipiente colector, con el fin de conservar los eyaculados de color blanco, ya que las coloraciones anormales como el rojo que indica patologías o contaminaciones, o el color amarillo que indica la presencia de orina, la cual es espermicida por sus contenidos ureicos y pH ácido (Restrepo et al., 2009).

pH

Se colocó una gota del eyaculado sobre una tira de papel tornasol y posteriormente se comparó con el patrón de color del fabricante.

Cuadro 4. Procedimiento para la evaluación de las características microscópicas descritas por Páramo y Porras., 2009.

Movilidad.

Se colocó una gota sobre un portaobjetos atemperado en la termoplatina a 37°C, se cubrió con un cubreobjetos de 22x22 mm con un espesor de 0.13-0.17 mm y se observó el movimiento progresivo lineal a 100X en un microscopio de campo claro.

Morfología espermática

Se colocaron 5 µL de semen y 10 µL de tinción de eosina-nigrosina en un portaobjetos se homogenizó y se realizó un frotis, el cual se observó en un microscopio de campo claro a 400X contando 100 espermatozoides.

Las anomalías que se pueden observar se dividieron en primarias y secundarias de acuerdo a los criterios descritos por Sorensen 1979; Kolster., 2018).

Primarias: De origen testicular y se dan durante la espermatogénesis: Cabeza: Piriformes, redondo, alargados o estrechos, microcefalia, macrocefalia, dobles cabezas, y en algunos casos acrosoma anormal. Segmento intermedio: doblado en ángulo recto, doble, pieza media engrosada, punto de inserción descentrado o abaxial, gota proximal. Cola: doble, cola enroscada

Secundarias: Se generan durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos durante la eyaculación. Cabeza: desprendida, gota citoplasmática distal, Cola: cola enrollada, doblada o cola en gancho, colas desprendidas. Otras: formaciones semejantes a medusas por aglutinación, células epiteliales, leucocitos, eritrocitos. (Sorensen 1979).

Las anomalías fueron representadas de manera esquemática en el Anexo 1; Imagen 1 y 2.

Concentración espermática

Se realizó una dilución de 1 μL de semen en 200 μL de Fucsina medio de contraste para la contabilización en cámara de Neubauer.

Concentración= Promedio de espermatozoides contados/ (Dilución) (Profundidad de la cámara) (Superficie de los cuadrantes), el resultado fue multiplicado por 1000 para obtener la concentración por ml.

Con este valor se puede obtener la cantidad de células presentes en un eyaculado multiplicando este valor por el volumen total de la muestra.

Viabilidad (Vivos y Muertos)

Se colocaron 5 μL de semen y 10 μL de tinción de eosina-nigrosina en un portaobjetos para hacer un frotis y se observó al microscopio de campo claro a 400X contando 100 espermatozoides (los espermatozoides muertos se tiñen de color rosa o rojo)

Preparación del diluyente

Los diluyentes se prepararon de acuerdo a lo descrito en el cuadro 5, se disolvieron los ingredientes y posteriormente se agregó la yema de huevo, esto se mantuvo en un baño maría a 37°C. La preparación del diluyente se muestra en el Anexo 2 Cuadro 10.

Cuadro 5. Diluyente lactosa + Yema de huevo + glicerol (Porras y Páramo., 2009).	
Lactosa monohidratada	11%
Glicerol	6%
H2O destilada	50 ml.
Yema de huevo	20%
Estreptomicina	0.01 %

Cuadro 6. Diluyente Lactosa + Yema de huevo + MF	
Lactosa monohidratada	11%
MF	6%
H2O destilada	50 ml.
Yema de huevo	20%
Estreptomicina	0.01 %

Pruebas de resistencia

El volumen total de cada eyaculado obtenido se dividió en dos partes iguales, ya que fue comparado con dos criopreservadores, se llevó a cabo la dilución 1:1 de semen con diluyente, se colocó en baño maría inverso en el refrigerador, para disminuir gradualmente la temperatura iniciando con una temperatura de 37°C hasta llegar a los 4°C.

Se obtuvo el volumen de diluyente que fue colocado en cada pase y el número de pajillas que serían congeladas ocupando la siguiente fórmula

$$\# \text{ Pajillas} = \frac{(\% \text{movilidad})(\text{concentración})(\% \text{normales})(\% \text{vivos})(\text{volumen eyaculado})}{50 \text{ millones}}$$

Volumen total del diluyente = (número de pajillas) (Volumen pajilla) - (volumen de botón)

$$\text{mL por pase} = \frac{\text{Volumen total del diluyente}}{4}$$

Una vez pasado el tiempo de estabilización en el refrigerador el semen fue centrifugado a 1500 rpm durante 7 minutos se quitó sobrenadante conservando el botón de espermatozoides, posteriormente se llevaron a cabo 4 pases con el diluyente Lactosa-Yema de huevo- glicerol y MF+Lactosa -Yema de huevo en diferentes gradientes de concentración (cada uno de ellos fue de 30 minutos) de forma gradual para evitar daños al espermatozoide, como se muestra en el cuadro 7. Entre cada pase se revisará la movilidad del semen por el método descrito por Porras y Páramo en 2009 representado en el cuadro 1 y 2.

Las muestras fueron empajilladas en pajillas francesas de 0.5 ml y se sellaron con alcohol polivinílico. Una vez listas las pajillas, se sometieron a vapores de nitrógeno a una altura de de 5 cm del fondo por 10 minutos para después ser sumergidas y guardadas en canastillas dentro del tanque de nitrógeno (Anexo 3; cuadro 11).

Evaluación de Viabilidad post-congelación

Se descongelaron las pajillas después de una semana, se introdujeron en agua a una temperatura de 37°C durante 30 segundos. Posteriormente se realizó la evaluación de movilidad, así como la tinción de eosina-nigrosina, con la cual se evaluó la vitalidad de los espermatozoides y el estado de la membrana, los datos se compararon con los tomados antes de la congelación.

De igual manera se ocupó la tinción de rosa de bengala con la cual se conoció el estado del acrosoma.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de un factor comparando los dos tratamientos y el control con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) realizando posteriormente una prueba Post hoc (Tukey).

Resultados

- Estadísticos

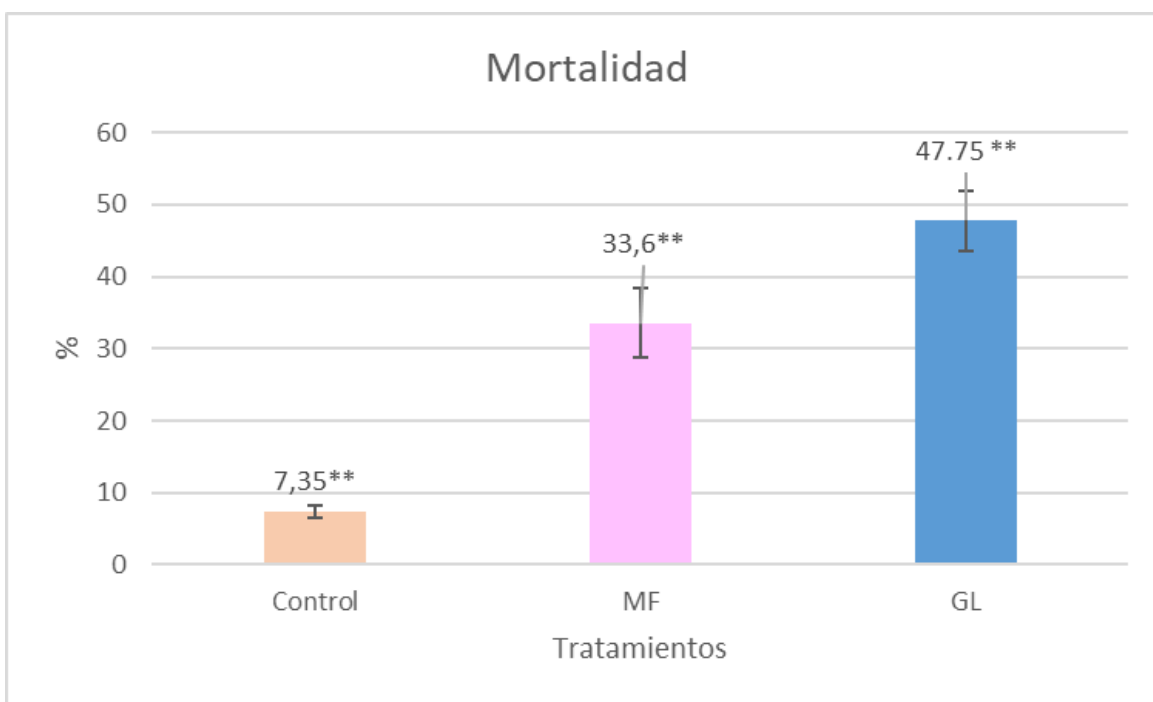
Se realizó una prueba ANOVA de un factor para saber si se encontraban diferencias significativas entre los tratamientos. Se realizó una prueba post hoc (Tukey) con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) encontrando diferencias significativas entre los tratamientos (**) (cuadro 7).

Cuadro 7. Promedios de los parámetros evaluados con su respectivo Error Estándar (ES).
**Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) N=20

Parámetro/Tratamiento	Control	MF	GL
Mortalidad	7.35 \pm 0.84**	33.6 \pm 4.87**	47.75 \pm 4.21**
Anormalidades	11.4 \pm 1.08	9.25 \pm 0.60**	13.5 \pm 0.76**
Acrosomas íntegros		27.19 \pm 1.95**	42.38 \pm 2.76**
Movilidad	86.25 \pm 1.39**	37.15 \pm 5.02**	22.25 \pm 5.11**
Movilidad por pase		71.1 \pm 1.07	67.7 \pm 1.15

Mortalidad y Anormalidades

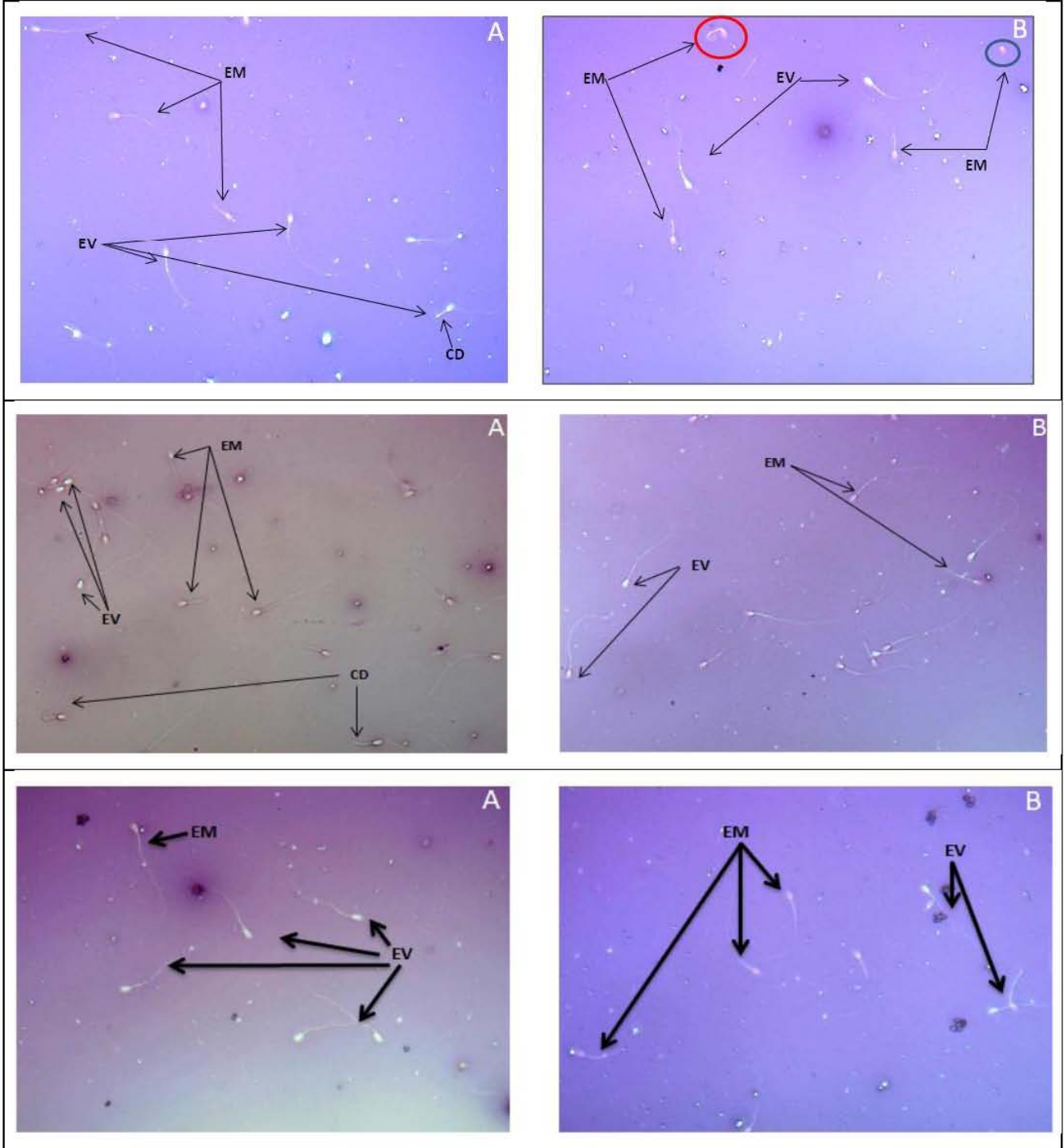
El promedio de mortalidad observado fue de 7.65 ± 0.8 para la muestra control, 33.15 ± 4.9 en la muestra con MF y 46.3 ± 4.4 en la que contenía GL (grafica 1). Es claro un aumento de espermatozoides muertos en las muestras con glicerol como crioprotector, de igual manera se encontraron diferencias por medio de una prueba Post hoc (Tukey) entre los tratamientos Glicerol-Metilformamida y control-MF/GL respectivamente un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$)



Gráfica 1. Promedio de mortalidad observado con eosina-nigrosin en semen fresco (control), post descongelado con metilformamida (MF) y glicerol (GL) (**Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) N=20)

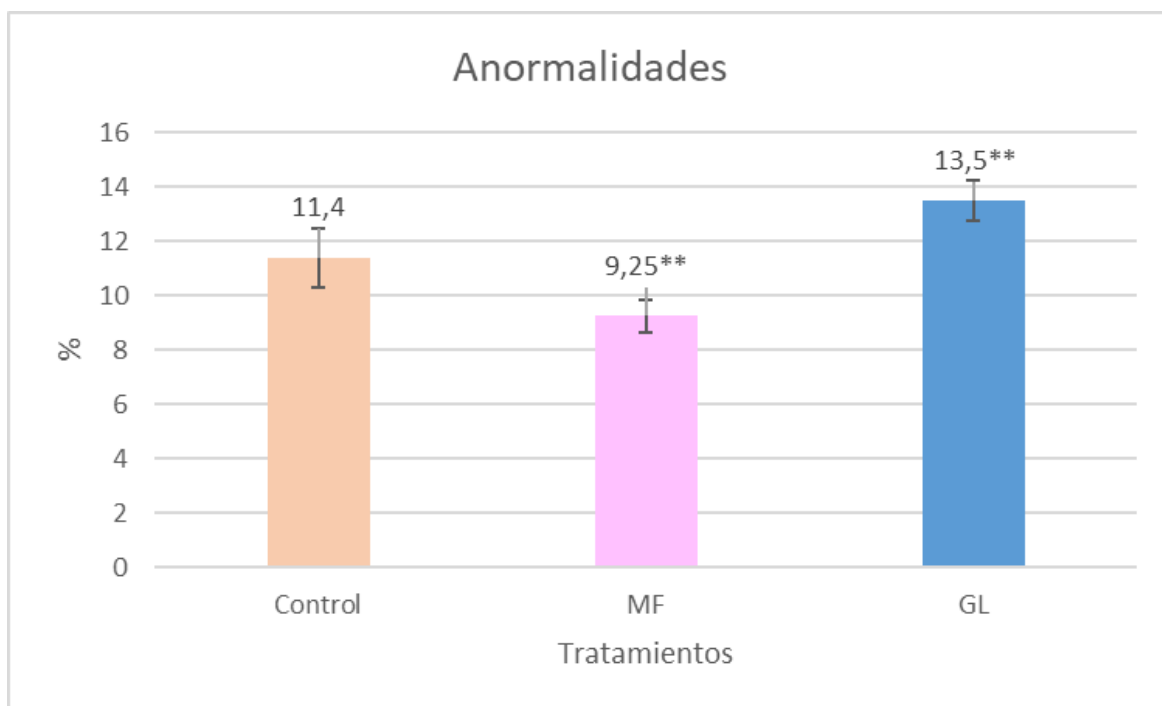
Se realizó un frotis de semen descongelado con cada una de las muestras de ambos grupos y fue teñido con Eosina-nigrosina, con el fin de comparar la vitalidad y anormalidades pre y post descongelado (Cuadro 8).

Cuadro 8. Imágenes de semen teñido con eosina-nigrosina a 400X. A) espermatozoides tratados con MF: EM espermatozoides muertos, EV espermatozoides vivos CD cola doblada. B) espermatozoides tratados con GL: EM espermatozoides muertos, EV espermatozoides vivos, círculo rojo: cola enrollada, círculo azul cabeza suelta.



El promedio de anomalías observado fue de 11.4 ± 1.08 para la muestra control, 9.25 ± 0.6 en la muestra con MF y 13.5 ± 0.7 en la que contenía GL (gráfica 2). Se encontraron diferencias por medio de una prueba Post hoc (Tukey) entre los tratamientos Glicerol-Metilformamida, por otra parte, en los tratamientos control-MF/GL no se observaron diferencias con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$).

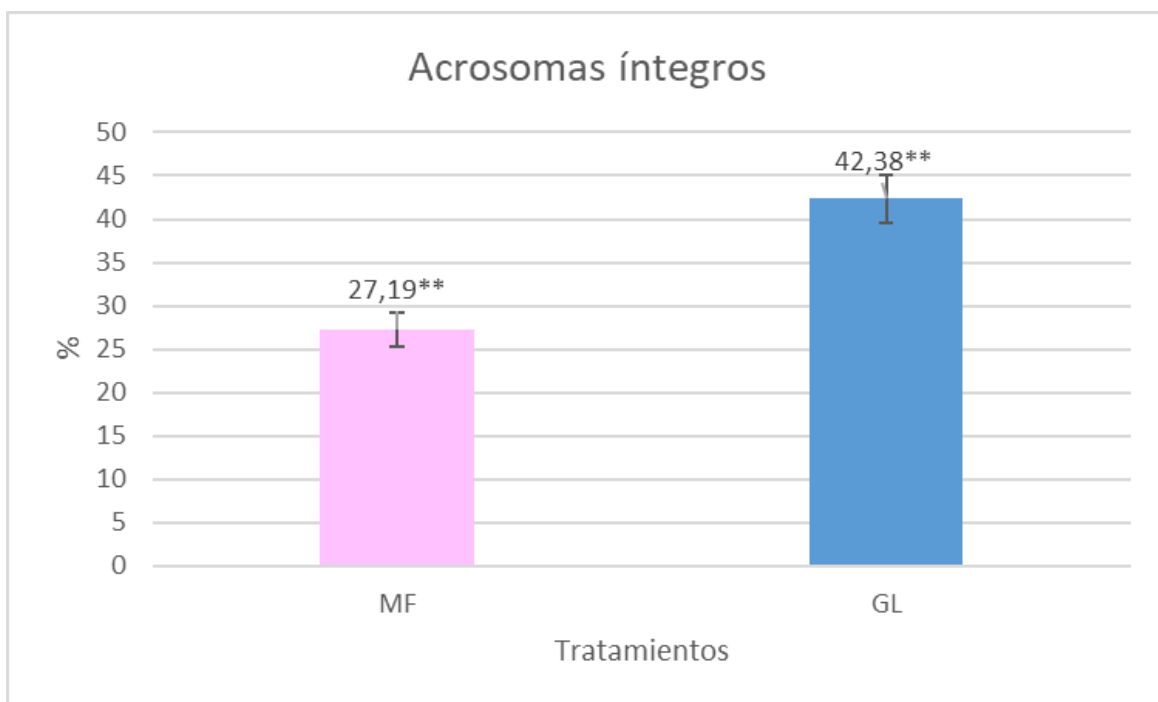
Se observa un mayor número de anomalías en las muestras que contenían GL, entre las cuales se observaron con mayor frecuencia colas enrolladas y piezas centrales arqueadas, esto posiblemente por el manejo de la muestra ya que son en la mayoría anomalías secundarias (Tabla 8).



Gráfica 2. Promedio de anomalías observadas en la muestra control y post descongelación con Metilformamida (MF) y Glicerol (GL) (**Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) N=20).

Tinción rosa de bengala

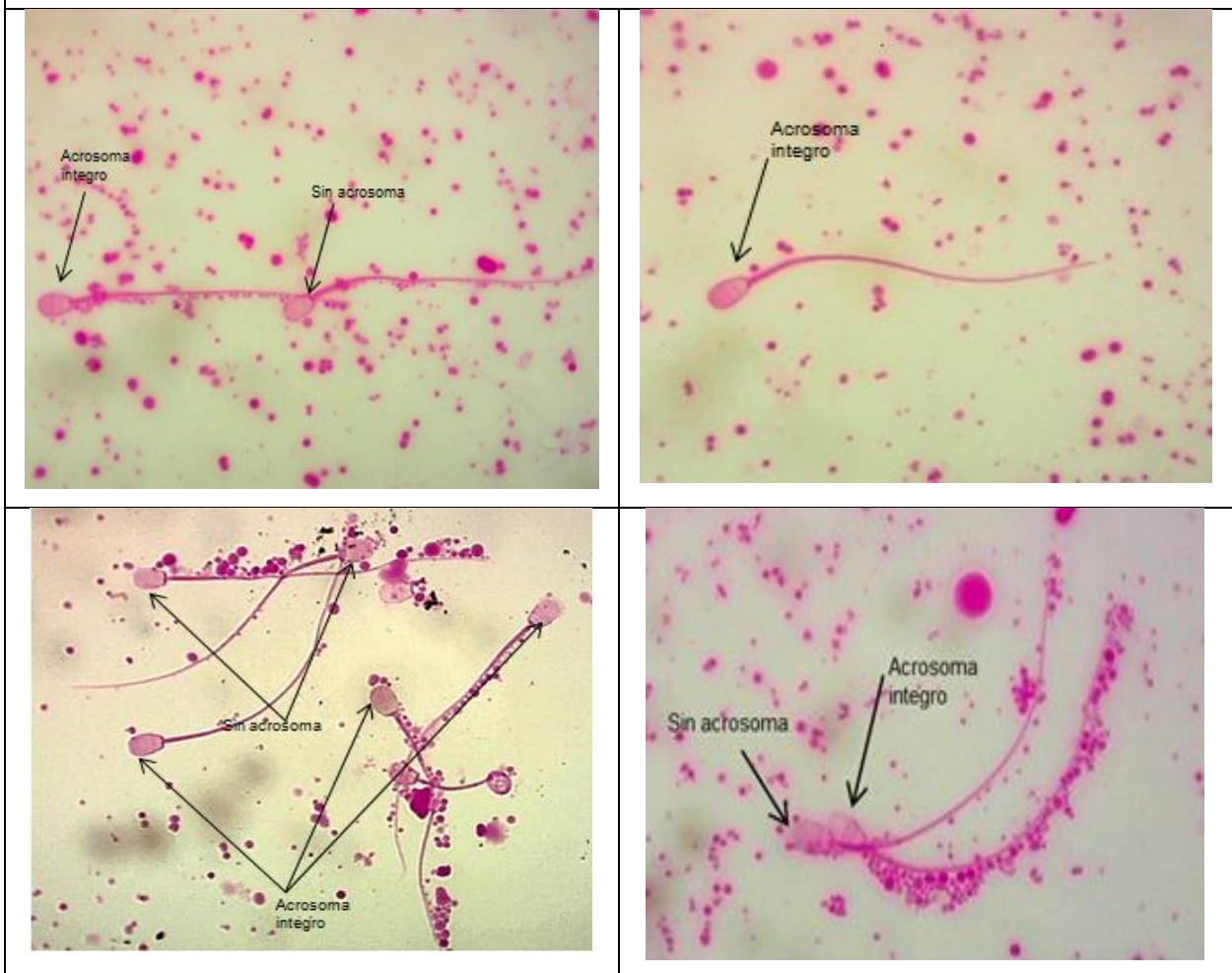
El promedio de acrosomas íntegros observado fue de 27.1 ± 1.9 en la muestra con MF y 42.3 ± 2.7 en la que contenía GL (grafica 3). Se encontraron diferencias significativas por medio de la prueba Post hoc (Tukey) entre el diluyente que contenía glicerol con respecto al que contenía metilformamida con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$), siendo éste último menos eficiente debido a que se encontró en mayor cantidad espermatozoides con reacción acrosomal,, lo cual puede relacionarse con una criocapacitacion, debido a que el glicerol muestra ventajas para conservar la integridad del acrosoma, pero se demostró que hay una baja en la movilidad y un aumento en el número de espermatozoides muertos.



Gráfica 3. Promedio de acrosomas íntegros post descongelación con Metilformamida (MF) y Glicerol (GL) (**Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) N=20)

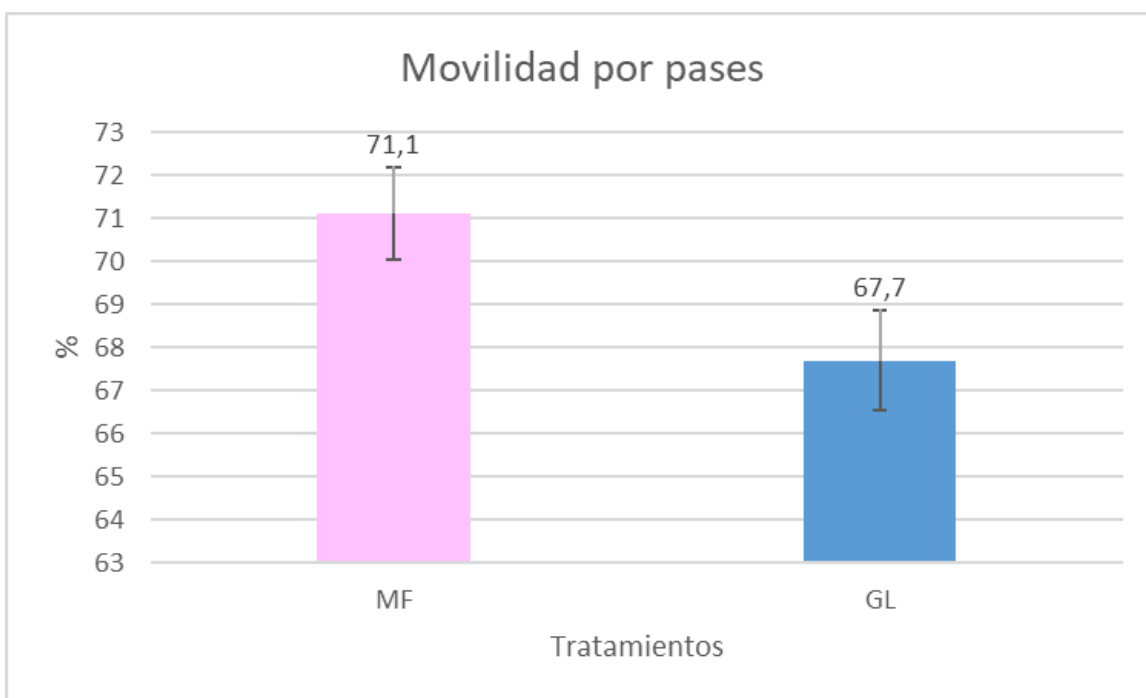
Se evaluó la integridad del acrosoma entre las muestras sometidas a glicerol y metilformamida (Cuadro 9). Se observó que la mayoría de las muestras sufrió una capacitación, posiblemente por el cambio de temperatura o una criócapacitación, esto se presentó con mayor frecuencia en las muestras con MF en comparación con las de GL que mostraron resultados favorables en cuanto a la integridad del acrosoma (Gráfica 3).

Cuadro 9. Imágenes frotis de semen teñido con rosa de bengala 1000X. A) espermatozoides tratados con MF como crioprotector. B) espermatozoides tratados con GL como crioprotector.



Movilidad por pases

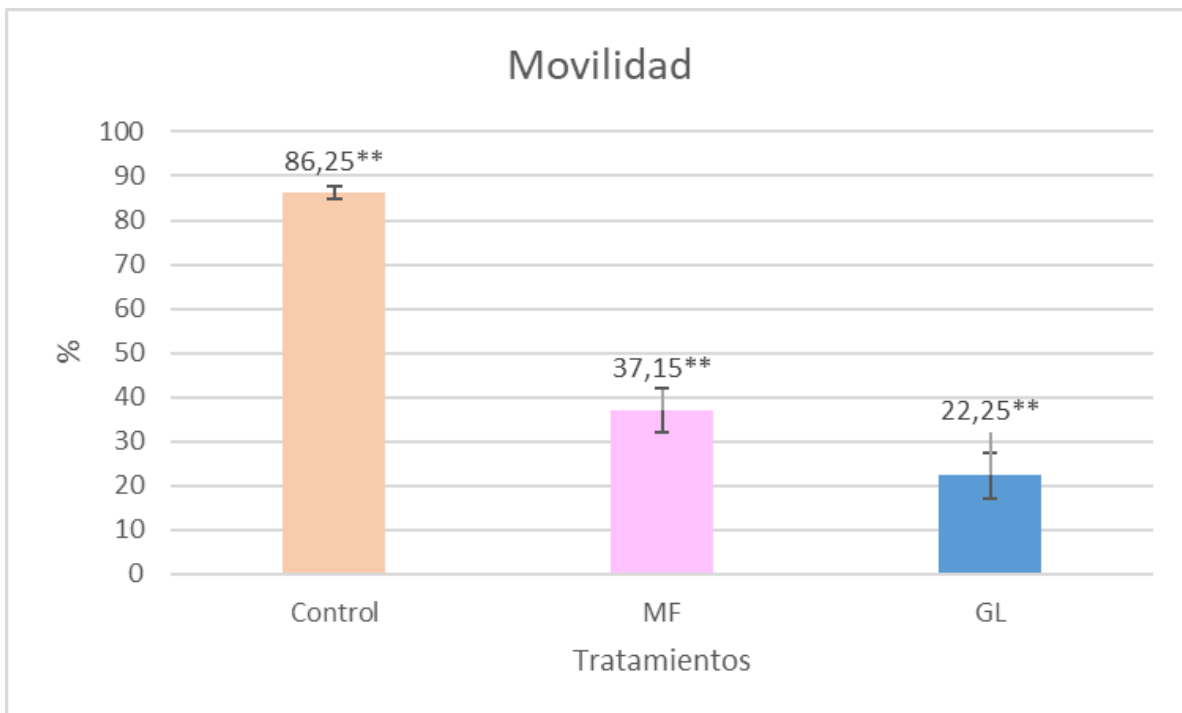
La movilidad obtenida por pase fue disminuyendo entre cada uno de estos; el promedio observado en las muestras con glicerol corresponde a $67.7\% \pm 1.7$, mientras que con metilformamida $71.1\% \pm 1$, no se encontraron diferencias significativas por medio de la prueba Post hoc (Tukey) con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) (Grafica 4).



Gráfica 4. Promedio de movilidad por pase con Metilformamida (MF) y Glicerol (GL). (**Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) $N=20$)

Movilidad post-descongelado

Se observó una disminución en la movilidad espermática entre el grupo control y el post-descongelado con MF 37.1 ± 5 y GL 22.2 ± 5.1 , de igual manera se obtuvo una mejor respuesta en la movilidad del semen post-descongelado con metilformamida que aquella que tenía glicerol como crioprotector encontrando diferencias significativas por medio de la prueba Post hoc (Tukey) con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) (Grafica 5).



Gráfica 5. Promedio de movilidad control, MF y GL. (** Diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia del 5%, ($P \leq 0.05$) N=20)

Discusión

Se tienen pocos registros del uso de metilformamida como crioprotector en semen de perro, uno de ellos es el de Futino y colaboradores en 2010, quienes encontraron resultados similares entre MF y GL al ocupar la misma concentración, con base en los objetivos planteados, en el presente trabajo es posible observar diferencias entre los tratamientos en el semen post-descongelado, puesto que se obtuvieron muestras con mejor movilidad y menor mortalidad al ser tratadas con metilformamida, la presión osmótica se induce cuando la permeabilidad de la membrana es mucho más lenta que la del agua que es expulsada, lo cual está relacionado con la viscosidad del glicerol (Futino et al., 2010).

En la criopreservación es importante mantener la movilidad y vitalidad, así como la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, ya que dentro de ella se encuentra el material genético y el acrosoma, componentes importantes para que se pueda llevar a cabo la fecundación (Ozkavukcu et al., 2008).

En este trabajo se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas con glicerol y metilformamida, en la movilidad espermática y la mortalidad, lo cual posiblemente se debe al efecto de las amidas sobre la célula espermática; se tienen registros en la disminución de los efectos perjudiciales, producto de una menor viscosidad y peso molecular, que le permiten a estas sustancias penetrar la membrana espermática con mayor eficiencia que el glicerol, acelerando el intercambio de líquido celular por crioprotector durante el proceso de congelación, así como salir rápidamente durante la descongelación lo que produce la expansión y contracción de la membrana, intolerable para algunos organelos (Ozkavukeu et al., 2008; Prien y Lacovides., 2016).

La acción crioprotectora de las amidas podría estar relacionada con una menor actividad osmótica dentro de la célula, debido a que el estrés osmótico es considerado una de las principales causas del daño celular durante la congelación y descongelación, lo cual confirma las diferencias entre los resultados obtenidos

en la mortalidad y movilidad entre las muestras con MF o GL analizadas en el presente estudio (Peña et al., 2011)

Se observó la pérdida total de movilidad en 3 muestras de semen al ser descongeladas, en promedio se obtuvo una movilidad disminuida en las que contenían glicerol como crioprotector, se ha reportado que existen variaciones entre cada individuo con un mismo protocolo de congelación, debido a que hay muestras termosensibles y/o sensibles al glicerol, lo cual estaría relacionado con la baja de movilidad. Por otra parte, las muestras tratadas con metilformamida mostraron un promedio mayor que el glicerol, lo cual está relacionado con la efectividad de esta amida como crioprotector.

Los promedios obtenidos para la movilidad fueron MF 37.1 ± 5 y GL 22.2 ± 5.1 , Futino en 2010 reporto una movilidad observada en semen de perros de 69 ± 5.4 GL y 59 ± 8.9 MF, mientras que Bianchi y colaboradores en 2008 reportaron una movilidad en el semen de cabra de $43.2 \pm 2.4\%$ MF y $38.1 \pm 2.3\%$ GL, los promedios reportados en este estudio se encuentran por debajo de las movilidades registradas por estos autores, esto posiblemente a la interacción del semen con el diluyente y la concentración diferente a la que fueron sometidas las muestras 3% GL y MF con el diluyente Tris-Yema de huevo ocupado en el trabajo de Futino et al en 2010; Bianchi et al en 2008, 5% MF y 3% GL con el diluyente Lactosa-Yema de huevo en semen de cabra.

Entre ambos tratamientos se obtuvo un promedio de movilidad post-descongelado en las muestras tratadas con MF 37.15% y un 22.25% en las muestras tratadas con GL. Lo que estaría relacionado con los efectos osmóticos negativos del glicerol, además de que al unirse a los fosfolípidos de la membrana espermática reduce su fluidez (Macedo et al., 2017), lo cual se relaciona con los resultados encontrados en este trabajo. La movilidad decrece entre cada pase durante la curva de frío, observando en promedio mejor movilidad en las muestras tratadas con MF $71.1 \pm 1\%$ con respecto al glicerol $67.7 \pm 1.7\%$.

De igual manera se tuvieron datos donde las muestras no presentan resultados favorables posterior a la descongelación debido a que ninguno de los dos crioprotectores a los cuales se sometieron las muestras fueron eficientes al mantener la movilidad y vitalidad deseada en las muestras de semen, puesto que existen variaciones entre los individuos.

Osuga en 2018 menciona que hay dos factores que influyen en la mortalidad de los espermatozoides; el daño debido a la formación de cristales de hielo al interior de la célula, en el proceso de congelación y durante la descongelación al exponerse a temperatura ambiente. Al estar sometida la célula espermática a los diversos tipos de estrés como los mencionados anteriormente, existe una pérdida de hasta el 50% de espermatozoides viables (Yoon et al., 2015). El daño a las membranas termosensibles y con ello la estructura del citoesqueleto, resulta en una mortalidad y movilidad reducida, como fue el caso de las muestras tratadas con glicerol, las cuales fueron mayores en ambos parámetros post-descongelación (Yoon et al., 2015).

En cuanto a mortalidad se obtuvo un resultado para metilformamida de $33.6 \pm 4.87\%$ de espermatozoides muertos, mientras que los tratados con glicerol presentaron un $47.75 \pm 4.21\%$, lo cual muestra una diferencia significativa entre ambos tratamientos, de igual manera se obtuvo con una confianza de 95% que existe diferencia entre los tratamientos con la prueba ANOVA, mediante la prueba de Tukey se observó que la mayoría de los parámetros evaluados tenía diferencias significativas entre los tratamientos a los que fueron sometidos, en otros trabajos se reporta una mortalidad de $56.7 \pm 2.5\%$ MF y de $65.5 \pm 2.8\%$ GL o 35.8 ± 18.7 MF y 57.8 ± 12.4 GL (Bianchi et al., 2008; Futino et al., 2010).

Por otra parte se encontró en las muestras con metilformamida un mayor número de espermatozoides sin acrosoma (cuadro 8), evento relacionado con una criocapacitación; Prien y Lacovides en 2016 mencionan que esto se asocia al aumento en la peroxidación, por la desestabilización de la membrana al formarse especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden desencadenar la activación de la apoptosis y se relacionan con el aumento de permeabilidad de la membrana espermática, lo cual pudo deberse al manejo de la muestra durante el traslado o el procesamiento (Peña et al., 2009).

Se ha propuesto que durante y después del enfriamiento y en la fase de descongelamiento se da una reorganización de los lípidos dando como resultado un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática con ello un aumento de Ca^{++} que produce la activación de las proteínas-kinasas responsables de desencadenar la cascada de procesos similares a la capacitación (Green y Watson 2001; Peña et al., 2009; Juárez., 2009). Este fenómeno de capacitación y las lesiones por estrés osmótico, podría alterar la fertilidad de la muestra debido a que el estrés se ve reflejado en las alteraciones en las membranas plasmáticas de los espermatozoides como se puede observar en las muestras sometidas a glicerol, las cuales tuvieron mayor porcentaje de mortalidad (Aspland et al., 2014).

Las anomalías observadas en este trabajo fueron 11.4 ± 1.08 en el grupo control, 9.25 ± 0.60 MF y 13.5 ± 0.76 GL respectivamente, mientras que en otros trabajos se encontró que las normalidades reportadas son de 42.9 ± 5 GL y 33.1 ± 7.7 MF respectivamente (Futino et al., 2010), lo cual está relacionado con la técnica realizada y los campos evaluados en las laminillas.

Conclusiones

Existen diferencias significativas entre los crioprotectores comparados debido a su naturaleza química, por lo cual se recomienda el uso de metilformamida como crioprotector al mostrar efectos positivos en la movilidad, anormalidades y vitalidad espermática. El porcentaje de acrosomas íntegros es mayor con glicerol como crioprotector, aunque la baja movilidad y aumento en la mortalidad resulta alta, parámetros que al ser evaluados con metilformamida son favorables, no se debe descartar por ello el uso de metilformamida puesto que se deben valorar varios parámetros para determinar la viabilidad del espermatozoide, por todo lo expuesto anteriormente se recomienda la utilización de éste como crioprotector penetrante en los protocolos de criopreservación de semen, considerando las variaciones individuales y recomendando estandarizar protocolos que permitan eficientizar la técnica de preservación espermática en esta especie.

ANEXO 1

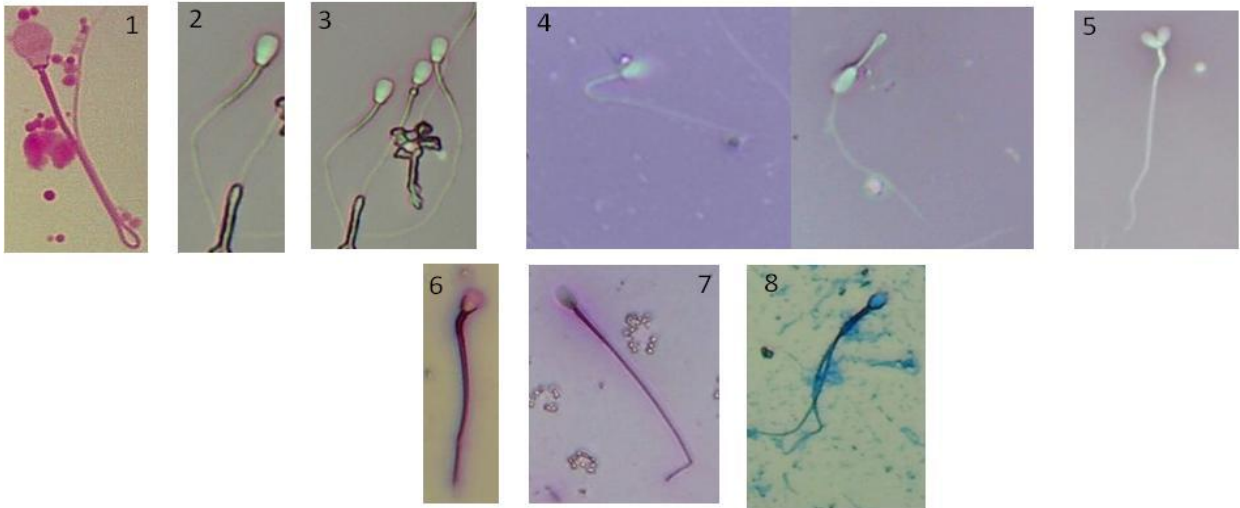


Imagen 1. Anormalidades primarias en el espermatozoide. 1 Macrocefalia Rosa de bengala, 2 Cabeza piriforme E-N, 3 gota citoplasmática proximal E-N, 4, pieza media doblada en ángulo E-N, 5 doble cabeza E-N, 6 Pieza media engrosada Azul tripan, 7 microcefalia Azul tripano, 8 doble flagelo Azul tripano. 1000X Tomado de clínica de reproducción canina FMVZ.

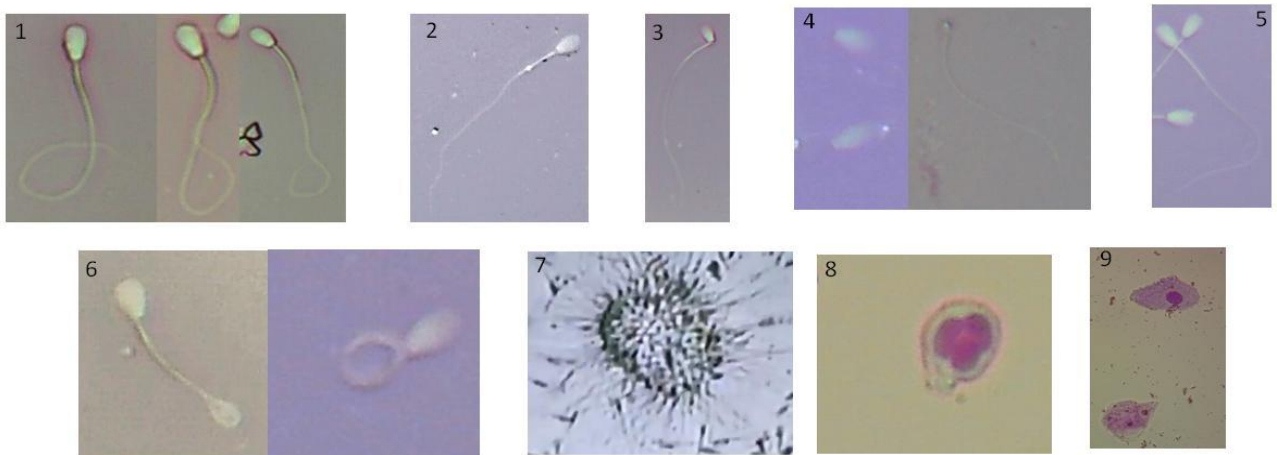


Imagen 2. Anormalidades secundarias presentes en el espermatozoide; 1 cola doblada E-N, 2 gota citoplasmática distal E-N, 3 segmento medio arqueado E-N, 4 cabeza/cola desprendida E-N, 5 cola doblada ángulo recto E-N, 6 cola enrollada E-N, 7 aglutinaciones E-N, 8 eritrocitos Diff quick, 9 células epiteliales. Diff-quick 1000X. Tomado de clínica de reproducción canina FMVZ.

ANEXO 2

Cuadro 10. Preparación del diluyente.



Imagen 3. Colocar el volumen de agua bidestilada para la preparación del diluyente.



Imagen 4. Se coloca el volumen de agua en un matraz para posteriormente mezclarla.



Imagen 5. Pesar lactosa, antibiótico y se agrega al matraz.



Imagen 6. Romper la membrana que contiene la yema de huevo y extraer el volumen requerido.

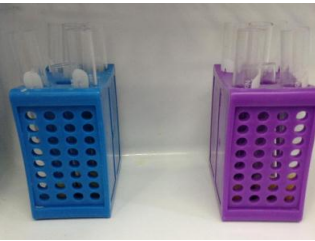

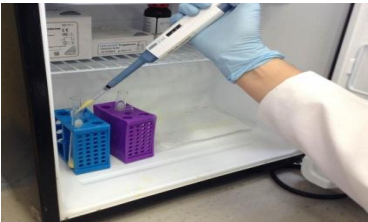


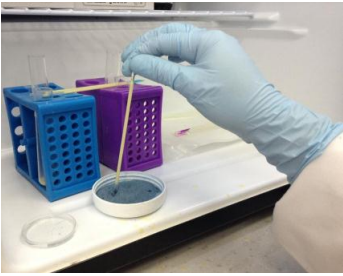





Imagen 7. Colocar en el matraz y mezclar hasta ser homogénea la solución.



Imagen 8. Distribuir el diluyente en los tubos con las 4 concentraciones de GL o MF.

ANEXO 3

Cuadro 11. Procesamiento de la muestra de semen.		
		
<p>Imagen 9. Tubos con pases de GL y MF</p>	<p>Imagen 10. Botón obtenido después de la centrifugación del semen con diluyente</p>	<p>Imagen 11. Pases de GL y MF</p>
		
<p>Imagen 12. Observación de la movilidad de las muestras.</p>	<p>Imagen 13. Empajillado de las muestras (0.5)</p>	<p>Imagen 14. Sellado de las pajillas con alcohol polivinílico.</p>
		
<p>Imagen 15. Llenado de 3 cm de la hielera con Nitrógeno líquido.</p>	<p>Imagen 16. Exposición de las pajillas a vapores nitrógeno líquido (5 cm de distancia).</p>	<p>Imagen 17. Almacenamiento de las pajillas en las canastillas del tanque de nitrógeno.</p>

Referencias

- Alvarenga M, F. P.-A. (2005). Amides cryoprotectants for freezing stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 89, 105-113.
- Apland A, S. C. C. (2014). Assessing novel, plant-based cryopreservation extenders for Freezing stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34, 54-55.
- Ávila-Portillo L, J Madero, C López, M León, L Acosta, C Gómez, L Delgado (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291:300.
- Bianchi I, K. C. (2008). Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69, 632-638.
- Blanch, E. (2007). *Modificación de la membrana de los espermatozoides de verraco para mejorar su supervivencia a la crioconservación*. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Cerezo G, J. C. (2014). *Manual para el análisis básico de semen: una guía práctica* (Primera edición ed.). México: Prado.
- Covarrubias A, A. P. (1988). *Endocrinología* (Primera edición ed.). México: Francisco Méndez Cervantes.
- Eddy E. (2006). The Spermatozoon. En *Konobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (Tercera edición, págs. 3-54). USA: Elsevier.
- Flores C, L. V. (2015). Metabolismo espermático. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 1(20), 23-32.
- Futino D, M. M. (2010). Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Dom Anim*, 45, 214-220.
- Green C, W. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 112(6), 889-898.
- Gilmore J, L. M. (1995). Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 53, 985-995.
- Giraldo J, J. G. (2012). Efecto de la Dimetilformamida sobre la viabilidad posvitricación de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Lasallista de investigacion*, 9(1), 13-20.

- Juárez J. (2009). *Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcino*. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Hafez E, B. H. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Séptima edición ed.). México: Mc Graw Hill.
- Huarte M, M. M. (2014). Efectos de la yema de huevo sus fracciones sobre los espermatozoides de cerdo durante el proceso de criopreservación. *Memorias del XII congreso Nacional de Producción Porcina*. . Argentina: Mar Plata.
- Kolster K. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Vet. Clin. North Am Small Anim Pract.* 45,533-545.
- Levine N, D. M. (1971). Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens un rato. *Levine N and D Marsh., 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte J Physiol, 213, 557-570.*
- López, O. (2015). *Evaluación de dos diluyentes de congelación utilizados en la criopreservación de espermatozoides equinos obtenidos de epididimo*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Luño V, C. M. (2012). Cambios en el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación. *CYSP, 42, 38-49.*
- Mac Gann, L. (1978). Differing action if penetrating and non- penetrating cryoprotectiva agents. *Cryobiology, 15, 382-390.*
- Macedo S, B. C. C. R. R. (2017). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reprod Dom Anim 53, 519-524.*
- Mann, T. (1964). *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. *Butler & Tanner Ltd Frome* (Primera edición ed.). London: Methuen & Co Ltd.

- Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogenesis. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 20(4), 213-224.
- Medina V, Y. V. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34-48.
- Montoya J, B. R. (2017). Efecto de la suplementación del diluyente sobre la calidad del semen de asno a la descongelación. *Archivos de Zootecnia*, 66(255), 333-340.
- Neira J, G. R. (2007). Efecto de la asociación L-glutamina-Etilenglicol en la criopreservación de semen equino. *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 93-105.
- Olivera M, T. R. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Pec*, 19(4), 426-436.
- Ozkavukcu S, E. I. O. K. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 25, 403-411.
- Osuga T, A. F. N. A. (2018). Efficiencies of the Cryoprotectants N-Methylacetamide, N-Methylformamide and Dimethyl Sulfoxide, and the Cell Protectants Trehalose and Hydroxyethyl Starch in Cryopreservation of Swine Sperm. *Nanomedicine & Nanotechnology Open Access* 3 (2), 1-8.
- Parks J. G. (1997). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38, 209-222.
- Peña F, R. T. O. G. M. (2009). Mitochondria in Mammalian Sperm Physiology and Pathology: A Review. *Reprod Dom Anim* 44, 345-349.
- Peña F, M. S. A. T. O. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols?. *Theriogenology* 76, 1177-1186.
- Porrás A, R. P. (2009). *Manual de prácticas de reproducción animal* (Primera edición ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

- Prien S, L. S. (2016). Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 3(1):1-8, 3(1), 1-8.
- Restrepo G, A. U. (2014). Evaluación de dos diluyentes para criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de investigación*, 11(2), 63-70.
- Restrepo G, J. G. (2011). Criopreservación rápida con glicerol y Dimetilformamida. *Revista Lasallista de investigación*, 8(2), 9-17.
- Restrepo G, N. V. (2009). Cryopreservation of canine semen and its application in artificial insemination. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 119-129.
- Rowson, L. (1954). Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Vet. J*, 8, 216-221.
- Sandoval, R. (2005). *Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. España: Universidad Nacional Mayor de san Marcos.
- Santos S, C. V. (1999). Comparison of five extenders for canine semen freezing. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(5), 472-473.
- Seager, S. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest*, 17, 6-7.
- Sorensen, A. (1979). *Reproducción animal principios y prácticas* (Primera edición ed.). Mexico: Mc Graw Hill.
- Squires E, S. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 1056-1065.
- Tortolero I, G. A.-B. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Revista Venez Endocrinol Metab*, 3, 12-19.
- Valencia, J. (2018). Transporte de gametos, fertilización y segmentación. En L. Rangel, & H. Hernández, *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (Primera edición ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

- Wanke M, G. C. (2006). *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Intermedica.
- Whittingham, D. (1971). Culture of mouse ova. *Reproduction et fertilité.*, 14, 7-21.
- Will W, T. G. (2016). N-Methylformamide and N-methylacetamide in urine. *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*, 1(1), 536-553.
- Yoon, S, K,L,P. (2015). A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa. *PLoS ONE*, 10(5), 1-12.
- Zarco, L. (2018). Diferenciación sexual. En H. H. Rangel L, *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (Primera edición ed., págs. 30-37). México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Zarco, L. (2018). Gametogenesis. En H. H. Rangel L, *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (págs. 44-59). México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.