



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**“Efecto de la melatonina como antioxidante sobre la criosupervivencia de  
espermatozoides de cerdo”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

RAMÍREZ CAMPOS NORMA ANGÉLICA

ASESOR

DR. JOSE ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

COASESOR

M. en C. ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Al Dr. José Alfredo Medrano Hernández, gracias por darme la oportunidad de ser parte del equipo de Laboratorio de Reproducción (UIM), por su paciencia y confianza en este trabajo, valoro mucho su apoyo y por ser una gran persona.

A la M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez, gracias por haberme asesorado, estar conmigo durante jornadas largas de trabajo, sobre todo, tenerme paciencia, enseñarme, regañarme, por su amistad porque es una gran persona como profesora y como amiga.

Al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, Director Técnico del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina CEIEPP (FMVZ), por brindarme la oportunidad de practicar en las instalaciones del centro, por la disposición de obtención de muestras del semen de cerdo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 2 la cual estoy feliz y orgullosa de pertenecer y representar durante mucho tiempo.

### **Por su apoyo financiero a los siguientes proyectos UNAM:**

**Proyecto PAPIIT - IN220419:** Evaluación de la melatonina como antioxidante en la crío-conservación de semen de cerdo: efectos sobre la crío-supervivencia espermática y la fertilización in vitro.

**Proyecto PIAPI 1810:** Fisiopatología de la Reproducción: Fisiología y conservación de gametos y embriones; fisiopatología del útero.

**Proyecto PIAPI 2030:** Fisiopatología de la Reproducción.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Benito Ramírez Bautista y Norma Angélica Campos Sarabia, ya que gracias al esfuerzo que hicieron para que estudiara lo que siempre anhelé, esto es un logro de los tres, estoy eternamente agradecida, los amo por siempre y para siempre, les regalo estas alegrías y tristezas, todo mi esfuerzo, todo lo vivido, porque ustedes creyeron siempre en mí, sin pedir nada a cambio, solo me dejaron ser esta persona que ahora entiende mucho por lo que hemos pasado. Gracias muchas gracias.

A mis hermanos, Cinthya Ramírez Campos y Benito Ramírez Campos, por creer no solo en mí, sino en los tres, que a pesar de todo somos una vida, un amor en esta familia y por el simple hecho de ser parte de mí, un todo.

Principalmente a mis peludos, Jaky, Pumba, Katy, Natasha, Bisha, Kimba, Maya, Jack, Roni, Julieta, Mis cuyas Veshel y Lili, son mi más grande amor, por permitirme abrir mi corazón hacia ustedes, que son el amor más hermoso, puro e incondicional en este planeta, que sin pedir nada a cambio estuvieron y están conmigo, solo quiero ser alguien bueno para ustedes y aquellos que se unan a esta familia. Los amo en donde quiera que estén.

A mis amigos, muchos se han ido y otros han llegado, gracias por este recorrido que duró muchos años, de los cuales aprendí cosas buenas y malas, pero sobre todo a ser parte de esta experiencia, que no cambiaría nada, ni a nadie. Amigos que siguen en este recorrido, les agradezco ser el apoyo de mis locuras y por el simple hecho de estar juntos a pesar de los años.

## Índice

1. Resumen .....	4
2. Introducción .....	5
2.1 Historia de la inseminación artificial .....	6
2.2 Anatomía y fisiología reproductiva del cerdo .....	8
2.3 Criobiología .....	10
2.4 Fundamentos de criopreservación.....	13
2.5 Agentes crioprotectores.....	14
Crioprotectores penetrantes.....	14
2.6 Uso de antioxidantes en la crioconservación de semen .....	16
2.7 Tinciones para evaluar la viabilidad espermática.....	19
Eosina/Nigrosina .....	19
Tinciones fluorescentes .....	19
Evaluación de la viabilidad espermática con SYBR14 y Yoduro de Propidio (IP) .....	19
2.8 Evaluación de la fluidez de la membrana plasmática con la fluorescencia de Merocianina (MC540).....	20
2.9 Evaluación del estado de capacitación espermática con la fluorescencia de Clortetraciclina (CTC).....	21
Patrón Full (F).....	21
Patrón Banda (B).....	21
Patrón Reacción Acrosomal (RA).....	21
2.10 Evaluación de la integridad del acrosoma con fluorescencia de lectinas del chícharo <i>Pisum sativum</i> (PSA).....	22
2.11 Morfología externa y clasificación .....	22
3. Justificación .....	24
4. Objetivo general.....	24
Objetivos particulares.....	24
5. Materiales y métodos.....	25
5.1 Transporte de los eyaculados.....	25
5.2 Evaluación macroscópica de semen: .....	26
5.3 Evaluación microscópica: .....	26
5.4 Viabilidad espermática con la tinción Eosina/Nigrosina (vivos y muertos) .....	28
5.5 Morfoanomalías.....	28

5.6 Viabilidad espermática empleando tinciones fluorescentes: SYBR14 y Yoduro de Propidio (IP) .....	28
5.7 Fluidez de la membrana plasmática por la fluorescencia de Merocianina 540 (MC540) .....	29
5.8 Prueba de la evaluación del estado de capacitación espermática mediante la Clortetraciclina (CTC) .....	30
5.9 Evaluación de integridad del acrosoma con la prueba de lectinas .....	32
5.10 Procedimiento experimental .....	33
Primera etapa. ....	33
Evaluación de semen fresco .....	33
Enfriado pre-congelación .....	34
Congelación.....	35
Descongelación .....	36
Análisis estadístico .....	37
6. Resultados.....	38
7. Discusión .....	42
8. Conclusión .....	44
9. Bibliografía.....	45
10. Anexos.....	50
Anexo 1 Diagrama de flujo para congelación y adición de melatonina en las pajillas de semen de cerdo .....	50
Anexo 2 Diagrama de flujo de descongelación a 39°C en pajillas de semen de cerdo .	51
Anexo 3. Curvas de precongelado y congelación.....	52
Anexo 4. Preparación de la solución Beltsville Thawing Solution (BTS) .....	53
Anexo 5. Preparación de la solución Beltsville F5 (BF5).....	53
Anexo 6. Preparación de SYBR14/IP .....	54
Anexo 7. Buffer CTC .....	54
Anexo 8. Preparación de solución BL1 (por cada 500 ml) .....	55
Anexo 9. Preparación de Glutaraldehído 0.4%.....	55
Anexo 10. Preparación de glutaraldehído 0.2%.....	55
Anexo 11. Preparación de la solución salina formolada 3% (SSF) .....	56
Anexo 12. Preparación de solución stock de Merocianina en DMSO 5 mM (MC540) ...	56
Anexo 13. Preparación de medio Tyrodes.....	56
Anexo 14. Preparación de melatonina M - 5250.....	57

## **Abreviaturas**

ANOVA: Análisis de varianza

BF5: Solución de congelación de Beltsville

BTS: Solución de descongelación de Beltsville

CTC: Clortetraciclina

E/N: Eosina/Nigrosina

IA: Inseminación artificial

IP: Yoduro de Propidio

MC540: Merocianina

MLT: Melatonina

M: Molar

mM: Milimolar

MM: Motilidad Masal

MP: Motilidad Progresiva

PIB: Producto interno bruto

PVA Alcohol Polivinilico

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

$\mu$ M: Micromolar

$\mu$ l: Microlitros

nM: Nanomolar

## 1. RESUMEN

La criopreservación de semen tiene un papel central en la producción ganadera con el uso de la Inseminación Artificial (IA); sin embargo, en porcinos el uso de la IA con semen congelado-descongelado está muy limitado debido a la reducción de la fertilidad. Dicha reducción de la fertilidad, y del tamaño de camada, se debe a una serie de factores físicos y químicos que sufren los espermatozoides durante el proceso; uno de tales factores es el estrés oxidativo. El uso de la melatonina (MLT) ayuda a preservar y regular la funcionalidad de los espermatozoides debido a sus propiedades antioxidantes. En este trabajo se evaluó el efecto de la MLT añadiéndola a un diluyente de congelación. Para esto, se recolectó semen de 6 verracos (24 eyaculados), el semen fue diluido con un diluyente comercial para ser transportado a 32° C, en 60 minutos, aproximadamente. Al llegar al laboratorio se dejó atemperar el semen por 30 minutos, enseguida se evaluó la motilidad masal, la motilidad progresiva y la concentración espermática. Posteriormente, el semen se centrifugó, eliminando el sobrenadante y se resuspendió el botón con un medio de congelación (BF5) sin glicerol. Las pruebas de evaluación fueron: viabilidad y morfología espermática (Eosina/Nigrosina), viabilidad espermática (SYBR14/PI), fluidez de la membrana (Merocianina 540), integridad del acrosoma (PSA/FITC) y estado de capacitación (prueba CTC). El enfriamiento del semen se inició a una temperatura de 23°C, al llegar a 5°C se agregó el medio BF5 con glicerol (200 x 10<sup>6</sup> células/ml, 1% de glicerol), enseguida se añadió MLT a los espermatozoides: i) 0, ii) 3.0 y iii) 5.0 mM. Quince minutos después, los espermatozoides de cada tratamiento se envasaron en pajillas de plástico de 0.25 ml. Las pajillas se enfriaron hasta -5°C en hielo salino a -13°C y enseguida se congelaron sobre vapores de nitrógeno y se sumergieron en nitrógeno líquido. Las pajillas se descongelaron a 39°C durante 30 segundos. Los datos se analizaron mediante ANOVA. No hubo diferencias significativas entre tratamientos de MLT al descongelado en ninguna de las variables estudiadas. Sin embargo, hubo diferencia significativa (P<0.05) en la viabilidad espermática (eosina/nigrosina), entre algunos machos al descongelado; además, no hubo diferencia significativa entre tratamientos de melatonina dentro de cada macho al descongelado.

## 2. Introducción

La porcicultura es una de las áreas ganaderas más dinámicas que existe en el país, además de ser la actividad pecuaria que posee diferentes sistemas de producción enfocados a la generación de diversos productos para el mercado. En México existen distintos estratos de producción, desde las empresas integradas verticalmente hasta los pequeños productores artesanales, familiares o rurales (Montero *et al.*, 2015).

### Características de la porcicultura contemporánea

El incremento de la población y la mejora en el nivel de ingreso ha estimulado el crecimiento en el consumo de carnes. La carne de cerdo es la más consumida en el mundo, a pesar de las restricciones religiosas y culturales que existen en algunos países. Aunque los pronósticos indican que el consumo de carne de pollo superará al de la carne de cerdo durante los próximos años, este último continuará su expansión, probablemente a una tasa alrededor de 2.5% anual (OCDE, 2019).

Hay una alta concentración de la industria PORCICOLA en unos cuantos países: 75% de la producción se obtiene en China, la Unión Europea y los EE. UU. México es un productor mediano, que representa el 1.1% de la producción mundial y es deficitario; es el segundo importador más importante, pues sus compras representan 9% del total del comercio internacional del producto (OCDE, 2019).

En México, el cerdo representa (en volumen) la quinta parte de la producción de carnes; en los últimos años la industria ha tenido un desempeño positivo, con un crecimiento promedio de 2.1% anual. Debido a que el consumo ha aumentado, ha habido un aumento considerable de las importaciones, las cuales representan alrededor del 45% del consumo nacional aparente. La producción nacional se

concentra en 6 entidades: Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán, Veracruz y Guanajuato, que representan casi 76.3% del total. Alrededor del 90% de la producción, se ubica en tan solo 13 entidades (OCDE, 2019).

A nivel mundial, dentro de la porcicultura intensiva (desde las décadas de los 60 y 70 del siglo XX), se trabaja fundamentalmente con animales cruzados (híbridos) en los esquemas de cruzamiento que tienen como objetivo aprovechar el vigor híbrido (Sañudo, 2011). Según este autor, las 6 razas más importantes en los esquemas de selección y cruzamiento son:

- a) Razas exclusivamente paternas (paternas - conformación) como la Blanco Belga y Pietrain.
- b) Razas fundamentalmente paternas (paternas - calidad) como la Duroc y la Hampshire.
- c) Razas fundamentalmente maternas como la Large White y Landrace.

## **2.1 Historia de la inseminación artificial**

Los espermatozoides de los mamíferos estuvieron entre las primeras células en ser criopreservadas con éxito (Curry, 2007). La historia de la inseminación artificial (IA), comienza en el año 1678 cuando Leewenhoek observó por primera vez espermatozoides, a los que llamo animálculos (Hidalgo *et al.*, 2011). Las primeras observaciones sobre la preservación de espermatozoides a baja temperatura se remontan a 1776, cuando el fisiólogo italiano Spallazani señaló que los espermatozoides enfriados en la nieve se volvieron inactivos, pero podrían revertirse con el calentamiento (Curry, 2007). Fue precisamente Spallanzani quien llevó a cabo la primera inseminación con éxito en una perra; transcurrieron otros

100 años hasta que Heape (1897) y otros investigadores empezaron a realizar estudios en conejos, perros y caballos (Hidalgo *et al.*, 2011).

Los primeros esfuerzos para establecer la IA en cerdas como un procedimiento práctico y rutinario fueron llevados a cabo en Rusia por Ivanow en los años setenta. Investigaciones más extensas fueron llevadas a cabo a partir de los años treinta por Milanow en 1938, Maule en 1962, y Nishikawa en 1964 (citados por Hidalgo *et al.*, 2011). Los verracos fueron entrenados a montar sobre maniqués y para la recolección de semen se diseñaron vaginas artificiales o bien se usó la técnica de la mano enguantada directamente (Hidalgo *et al.*, 2011).

Investigadores rusos diseñaron diluyentes para semen de verraco basados en soluciones de glucosa con tartrato de potasio y sodio o sulfato de sodio y peptona, manteniendo una corriente de electrolitos baja y una temperatura de almacenamiento de 7 a 12°C. Cuando se incorporó yema de huevo y leche en la composición de diluyentes diseñados para semen de toro, estos diluyentes fueron modificados para ser usados con semen de verraco enfriado (Hidalgo *et al.*, 2011). Para los centros de inseminación artificial, así como para la mayoría de las explotaciones de selección y multiplicación (en las que la IA por las ventajas que ofrece respecto a la monta natural, es una práctica cada vez más extendida), es fundamental la evaluación correcta de todos los parámetros del análisis seminal. De todos estos parámetros que se deben evaluar, un minucioso análisis de la morfología espermática nos puede sugerir, en algunos casos, cuál ha sido la causa que ha podido originar una disminución de la calidad espermática y fertilidad (Bonet *et al.*, 2000).

## 2.2 Anatomía y fisiología reproductiva del cerdo

En un eyaculado normal de cerdo, se puede encontrar entre 80 y el 95% de espermatozoides maduros. El espermatozoide maduro del cerdo es un gameto de 45  $\mu\text{m}$  de longitud en el que se distinguen tres partes: la cabeza, la pieza de conexión o cuello, y la cola. La cola está formada por tres piezas: la intermedia o mitocondrial, la principal y la terminal. La cabeza es oval y plana; las dos caras de la cabeza no son iguales: mientras que una es llana, la otra presenta una protuberancia apical en forma de semiluna (Bonet *et al.*, 2000).

En la cabeza del espermatozoide se distinguen las estructuras siguientes: el acrosoma, la lámina densa post-acrosomal, el espacio sub-acrosomal, la teca perinuclear y el núcleo (Bonet *et al.*, 2000). El acrosoma es una vesícula que se dispone sobre el núcleo en forma de capuchón y cubre el 80% de la longitud nuclear. Esta parte de la cabeza que contiene el acrosoma es conocida como la región acrosomal, en la que se distinguen tres segmentos: apical, principal, y ecuatorial (Bonet *et al.*, 2000). La lámina densa post-acrosomal se dispone paralela por debajo de la membrana plasmática, cubre el 20% de la longitud del núcleo y coincide con la región del núcleo no cubierta por la vesícula acrosómica. Esta región de la cabeza, donde se desarrolla la lámina densa, es conocida como la región post acrosómica (Bonet *et al.*, 2000). Figura 1.

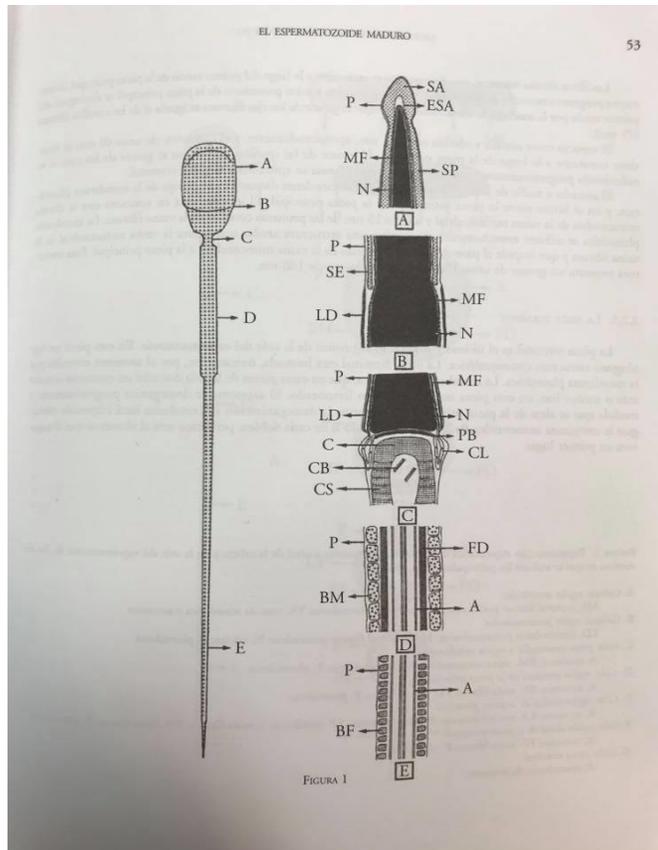


FIGURA 1

Tomado de Bonet *et al.*, 2000

**Figura 1. Representación esquemática de secciones longitudinales a nivel de la cabeza, del cuello y de la cola del espermatozoide de cerdo:**

**Cabeza:** segmento apical y principal de la región acrosómica. ESA, espacio subacrosómico; MF, material fibroso perinuclear; N, núcleo; P, plasmalema; SA, segmento apical de la vesícula acrosómica; SP, segmento principal de la vesícula acrosómica.

**Cabeza: segmento ecuatorial de la región acrosómica y región postacrosómica.** LD, lamina densa postacrosómica; MF, material fibroso perinuclear; N, núcleo; P, plasmalema; SE, segmento ecuatorial de la vesícula acrosómica.

**Cabeza: región postacrosómica.** Pieza de conexión o cuello C, *capitulum*; CB, cuerpo basal; CL, cuerpos laminares; CS, columnas segmentadas; LD, lamina densa portacrosómica; MF, material fibroso perinuclear; N, núcleo; P, plasmalema; PB, placa basal.

**Cola: pieza intermedia o mitocondrial.** A, axonema; BM, vaina mitocondrial; FD, Fibras densas; P, plasmalema. A, axonema, BF, costillas de la vaina fibrosa; P, plasmalema.

### **2.3 Criobiología**

Los protocolos exitosos de crioconservación de semen datan tan solo de la década de 1950; la criopreservación es el almacenamiento de células, tejidos y órganos vivos a temperatura ultra baja (generalmente en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ), capaces de reanudar las funciones normales después de la recuperación de un banco criogénico (Curry, 2007).

Las bajas temperaturas ralentizan el metabolismo y, en condiciones apropiadas, mejoran la longevidad y confieren estabilidad a las células vivas. La manipulación de los estados líquido, vítreo y sólido (hielo) del agua es el principal objetivo de la crioconservación cuyo objetivo es diseñar protocolos que eviten la formación de hielo intracelular letal (Curry, 2007).

La tolerancia a la criopreservación depende de la capacidad de superar o evitar la lesión criogénica, por lo que Mazur (1984) propuso que estaban involucrados dos factores. El hielo promueve daño estructural y osmótico, y causa lesiones mecánicas a las estructuras celulares frágiles. La lesión coligativa es la concentración excesiva de solutos, que es perjudicial para la función celular. En resumen, la lesión celular crio inducida se explica en definición de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación.

Los protocolos de crioconservación exitosos dependen de la optimización de la velocidad de enfriamiento junto con las estrategias crioprotectoras. Hay dos tipos principales de crioprotectores químicos: i) penetrantes/coligativos y ii) no penetrantes/osmóticos. Los protocolos tradicionales de enfriamiento de velocidad controlada utilizan crioprotectores penetrantes como dimetilsulfoxido (DMSO) o

glicerol. A medida que las células se exponen en un enfriamiento controlado, se forma hielo extracelularmente, lo que provoca la extracción de agua intracelular. Esto es deseable ya que reduce la cantidad de moléculas de H<sub>2</sub>O disponibles para iniciar cristales de hielo letales (Curry, 2007).

En 1949, el desarrollo más importante se produjo con el descubrimiento de Polge, Smith y Parkes de que el glicerol podría actuar como un crioprotector de los espermatozoides. La criopreservación de los espermatozoides también ha desempeñado un papel de conservación cada vez más importante con el establecimiento de bancos de recursos genéticos para especies domesticas en peligro de extinción y, más recientemente, para muchas especies silvestres en riesgo (Curry, 2007).

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico, puesto que enlentece estas reacciones. Puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula - célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Avila *et al.*, 2006).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y la descongelación definirá los índices de supervivencia en la célula congelada. Los periodos críticos

para la supervivencia celular son la fase inicial de congelación y periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Watson, 1995).

Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) como componentes más abundantes de la membrana plasmática, determinan la fluidez y resistencia durante los procesos de criopreservación. El transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post descongelación (Mazur, 1984).

El empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de Van de Waals. Cuanto más difícil sea este empaquetamiento, más fluida será la membrana. Cuanto más larga es la cadena de ácido graso, más fácilmente se forman estas uniones y más rígida es la membrana, la existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos de la membrana introduce cambios de orientación en las cadenas y hace que estas moléculas no interaccionen tan fácilmente entre sí y por tanto que la membrana sea más fluida (Hipakka y Hammerstedt, 1978).

La presencia de moléculas de colesterol en la bicapa lipídica proporciona rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos, pero impide por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalice) al disminuir la temperatura, aumentando en ese momento la fluidez de las membranas (Watson, 1995).

Las membranas celulares son estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación, en general, debido a los procesos de congelación, la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de entre 10°C y 16°C alterando la funciones de la membrana, durante la hidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede

presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Hammerstedt y Hipakka, 1978; Watson, 1995).

#### **2.4 Fundamentos de criopreservación**

Las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperaturas desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada, en consecuencia, los procesos de difusión y osmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Mazur, 1984).

Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas de entre -133°C (vapores de nitrógeno no líquido) a -196°C (nitrógeno líquido); a estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por lo tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación (Watson, 1995).

Merryman (citado por Mazur, 1984) propuso la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónico después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de osmolaridad extracelular, a medida

que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad.

## **2.5 Agentes crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Watson, 1995).

Existen tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol, etilenglicol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y el dimetil sulfoxido (DMSO); los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo con la permeabilidad celular (Watson, 1995).

### **Crioprotectores penetrantes**

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular; los más utilizados son el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO), propanediol (PROH) y etilenglicol.

Para preservar los espermatozoides durante periodos prolongados su actividad metabólica debe reducirse mediante una dilución en un medio apropiado y bajando la temperatura. Actualmente se encuentran disponibles varios diluyentes

comerciales de semen de cerdo, que se han propuesto para uso a largo plazo, es decir, para uso durante 5 días de almacenamiento (Hidalgo *et al.*, 2011).

Dentro de las acciones potenciales del glicerol, destaca el estrés osmótico asociado con la introducción y eliminación de las concentraciones molares del interior de la célula, la modificación de la bicapa lipídica por su capacidad de inserción entre los fosfolípidos y su potencial para involucrarse en vías metabólicas. La concentración óptima del glicerol para la crioconservación espermática está por debajo de 1-2 M recomendado por los criobiólogos (Watson, 1995). El glicerol protege la motilidad de los espermatozoides durante la congelación para proteger la capacidad de fertilización o la morfología del acrosoma (Pursel *et al.*, 1977).

La yema de huevo, el agente más efectivo para proteger a los espermatozoides contra el choque frío, se incluye comúnmente en los diluyentes para crioconservación pero no es igual de eficaz para todas las especies. Se ha reportado que los espermatozoides del cerdo del epidídimo caudal se encuentran protegidos por fosfatidilcolina (Watson, 1995).

Durante el almacenamiento, los espermatozoides de cerdo experimentan varios cambios, incluida la disminución de la movilidad y viabilidad y las alteraciones en la permeabilidad de la membrana. Además, los espermatozoides de cerdo son muy susceptibles al choque frío. Esto puede estar relacionado con la composición lipídica de la membrana de espermatozoides de cerdo, que contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (Hidalgo *et al.*, 2011).

Los cambios de estrés en la temperatura (choque frío) y los antibióticos pueden proteger a los espermatozoides durante el procesamiento y almacenamiento. Los carbohidratos, especialmente la fructosa, se usan más ampliamente como fuente

de nutrición porque los espermatozoides los utilizan con mayor facilidad y como protectores contra el choque frío, mientras que la solución de descongelación de Beltsville (BTS) contiene glucosa como componente principal de los carbohidratos (Pursel y Johnson, 1975).

Garner y Hafez (2000) afirmaron que los espermatozoides utilizan la fructosa en diluyentes de semen como fuente de energía tanto en condiciones anaerobias (durante el almacenamiento) como en condiciones aeróbicas (tracto reproductor femenino). La descomposición de la fructosa en energía ocurre más rápido porque puede ser convertida a fructosa 6- fosfato (6P), mientras que la glucosa antes de convertirse en fructosa 6P puede cambiarse primero a glucosa 6P, luego a fructosa 6P y finalmente a fructosa difosfato para producir ATP (energía para los espermatozoides) y ácido láctico como desecho metabólico, para acelerar la disminución de la viabilidad de los espermatozoides.

## **2.6 Uso de antioxidantes en la crioconservación de semen**

La melatonina es un derivado del aminoácido triptófano, que se produce en la glándula pineal. Su función es eliminar radicales libres, es capaz de neutralizar radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, también estimula varias enzimas antioxidantes que aumentan su eficacia como antioxidante. Tiene la capacidad de desintoxicar especies altamente reactivas derivadas del oxígeno (O<sub>2</sub>) y es soluble tanto en agua como en lípidos y, por lo tanto, actúa como antioxidante hidrofílico e hidrofóbico (Reiter *et al.*, 2000).

Parte de la reducción en la fertilidad de los espermatozoides pueden deberse al daño oxidativo por la formación inapropiada de especies reactivas de oxígeno

(ROS) o de especies reactivas de nitrógeno (RNS), lo que conduce a la posterior peroxidación de lípidos de la membrana (Hidalgo *et al.*, 2011).

Las pequeñas fluctuaciones en la concentración de ROS/RNS pueden desempeñar un papel en la señalización intracelular, los aumentos incontrolados de estos metabolitos pueden inducir directamente la peroxidación lipídica, detener irreversiblemente la motilidad de los espermatozoides y dañar las proteínas y el ADN, lo que puede conducir a la apoptosis y muerte celular (Hidalgo *et al.*, 2011).

La suplementación con varios antioxidantes en los diluyentes, como Crocina, Trolox, Vitamina C, N-acetilcisteína, Taurina, Glutación, Rafinosa, Trehalosa, Cisteamina e Hidroxitolueno Butilado durante el almacenamiento líquido o la crioconservación de espermatozoides de mamíferos ha producido efectos beneficiosos (Hidalgo *et al.*, 2011).

Los radicales libres influyen en el equilibrio entre las reacciones de oxido-reducción, alteran la asimetría de la membrana plasmática y mejora la peroxidación lipídica. La melatonina debido a su naturaleza anfílica, es útil en los tejidos al protegerlos del daño oxidativo mediados por radicales libres y la muerte celular (Cruz *et al.*, 2014).

En general, los antioxidantes previenen la oxidación de moléculas biológicamente importantes por los radicales libres o sus metabolitos reactivos. Pueden reducir el impacto del estrés oxidativo durante el proceso de almacenamiento de los espermatozoides y mejorar la calidad del semen de cerdo almacenado en líquido (Hidalgo *et al.*, 2011).

Se han informado de la presencia de receptores para MLT en muchas áreas del cerebro, la glándula pituitaria y los tejidos periféricos, como los órganos reproductivos; varios estudios incluso han demostrado que MLT puede tener efecto

sobre los espermatozoides de humano y varias especies animales (Hidalgo *et al.*, 2011).

La MLT alcanza concentraciones en los organelos intracelulares, incluso en las mitocondrias (Venegas *et al.*, 2012). Además de eliminar los radicales generados en las mitocondrias, reduce la fuga de electrones de la cadena respiratoria, y así reduce la formación de radicales libres (León *et al.*, 2004). El estrés oxidativo debido a la hipoxia por el bajo nivel de oxígeno transitorio se reduce por la MLT, a través de su efecto protector contra el daño oxidativo y su actividad estimuladora en el mecanismo de defensa oxidativa (Kurcer *et al.*, 2010).

Ashrafi *et al.* (2013) demostraron que la suplementación de MLT al medio de congelación, en espermatozoides de toro contrarrestaba los efectos adversos del proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides. Los efectos protectores de los espermatozoides con la MLT están asociados con una reducción en la oxidación de los lípidos, relacionándolos con el aumento de la capacidad antioxidante después del tratamiento.

Se sabe que la MLT estimula actividades de varias enzimas (superoxidasa, glutatión peroxidasa y catalasa) involucradas en el metabolismo de ROS y, por lo tanto, preserva la fluidez de la membrana (Garcia *et al.*, 1997; Okatani *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2000).

La adición de MLT al diluyente del semen de cerdo aumenta la movilidad, la viabilidad y tasas de supervivencia del esperma, además de preservar la integridad de la membrana y disminuir la peroxidación de lípidos (Jang *et al.*, 2010; Martín Hidalgo *et al.*, 2011). En un trabajo previo en este laboratorio, Hernández y Rafael (2018) emplearon tres dosis de MLT (0 mM, 1 mM, 2 mM), y no observaron

diferencias en la supervivencia de los espermatozoides a la crioconservación. Estas autoras sugirieron que se debería probar con dosis más altas de MLT.

## **2.7 Tinciones para evaluar la viabilidad espermática**

### **Eosina/Nigrosina**

Es conocida como test de vitalidad o de Williams Pollack, esta tinción es utilizada para determinar espermatozoides vivos y muertos, debido que los espermatozoides muertos poseen gran permeabilidad de la membrana, permitiendo teñir su estructura de color rojo/rosado distinguiéndose cabeza y cola del espermatozoide (Mallma, 2019).

El colorante Eosina penetra a través de la membrana de los espermatozoides muertos teñiéndolos de color rosa, en tanto que los vivos permanecen incoloros. La nigrosina, por otra parte, dibuja en azul oscuro el perfil de los espermatozoides vivos (Mallma, 2019).

Esta evaluación puede diferenciar entre necrozoospermia y ausencia total de motilidad, indicativa de defectos estructurales en el flagelo. La mayoría de las evaluaciones de la vitalidad de los espermatozoides se basan en la capacidad de la membrana celular para evitar que los tintes entren en los espermatozoides y penetren en su núcleo (Moskovtsev y Librach, 2013).

### **Tinciones fluorescentes**

#### **Evaluación de la viabilidad espermática con SYBR14 y Yoduro de Propidio (IP)**

Garner y Johnson (1994) desarrollaron una tinción nuclear, SYBR14, que penetra la membrana teñiendo los núcleos de las células vivas. La combinación de SYBR14 y Yoduro de Propidio (IP), fue útil para estimar las proporciones de espermatozoides

vivos y muertos. El SYBR14 es un agente que se adhiere al ADN y lo tiñe de color verde, es permeable en la membrana y tiñe todos los nucleos. El Yoduro de Propidio (PI), puede teñir el nucleo solo si la membrana plasmatica esta dañada (rojo) y el apaga la fluorescencia del SYBR14 (Garner y Johnson, 1994).

## **2.8 Evaluacion de la fluidez de la membrana plasmatica con la fluorescencia de Merocianina (MC540)**

La Merocianina (MC540) es una técnica que puede ser util para la evaluacion de la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides. Detecta cambios inducidos por el bicarbonato, causando desestabilizacion y aumento en la fluidez de la membrana plasmatica, evento temprano en el proceso de capacitacion (Harrison *et al.*, 1996; Steckler *et al.*, 2015).

Es un colorante hidrofobo fluorescente natural, se une a la membrana plasmatica de las celulas vivas, esta molecula responde a cambios rapidos en el potencial de membrana con ligeras alteraciones en sus espectros de absorción y emisión (Williamson *et al.*, 1983).

Las concentraciones de MC540 en la fase en gel, la fluorescencia no se une a la membrana plasmatica, por lo tanto se observan espermatozoides con baja fluorescencia, mientras que en la fase líquida la fluorescencia se une mayormente hacia la membrana plasmática, observando mayor fluorescencia considerandose espermatozoides capacitados con alta fluidez (Harrison *et al.*, 1996.; Williamson *et al.*, 1983).

## **2.9 Evaluación del estado de capacitación espermática con la fluorescencia de Clortetraciclina (CTC)**

El uso de la fluorescencia de Clortetraciclina (CTC) se utiliza para identificar el estado de capacitación de los espermatozoides de cerdo (Rathi *et al.*, 2001.; Mattioli *et al.*, 1996). Cuando la molécula de CTC se une a la membrana plasmática, los espermatozoides exhiben una fluorescencia que muestra una distribución característica de acuerdo al estado de capacitación espermática (Green y Watson, 2001). Esta unión produce tres patrones característicos:

**Patrón Full (F):** se observa fluorescencia completa en la cabeza del espermatozoide, significa que son espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.

**Patrón Banda (B):** se observa una banda libre de fluorescencia en el segmento post-acrosomal, indicando que los espermatozoides están capacitados, pero con acrosoma intacto.

**Patrón Reacción Acrosomal (RA):** se observa fluorescencia baja en la mayor parte de la cabeza con una banda fluorescente brillante a través del segmento ecuatorial, indicando que los espermatozoides están capacitados y con reacción acrosomal (Rathi *et al.*, 2001; Green y Watson, 2001).

Estos cambios influyen en la reorganización de las proteínas de membrana, en el metabolismo de los fosfolípidos de membrana, reduciendo los niveles de colesterol (Rathi *et al.*, 2001).

## **2.10 Evaluación de la integridad del acrosoma con fluorescencia de lectinas del chícharo *Pisum sativum* (PSA)**

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas, la cual tiene afinidad específica a moléculas de sacáridos particulares. Se unen a la glucosa, manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y otras glucoproteínas específicas de carbohidratos que están ubicados exclusivamente en el acrosoma (Koehler, 1981).

El uso de *Pisum sativum* conjugado con fluoresceína se utilizó para evaluar la capacidad de aglutinina (FITC-PSA) en donde se puede observar si se encuentran acrosomas intactos o dañados en espermatozoides de cerdo frescos o congelados-descongelado (Berger, 1989; Farlin *et al.*, 1992).

La incubación de espermatozoides frescos y congelados-descongelados (acrosomas dañados) con FITC-PSA muestran que espermatozoides con acrosomas intactos (AI) no inhiben la fluorescencia, mientras que espermatozoides con acrosoma dañado (AD) exhibieron tinción fluorescente sobre la porción rostral de la cabeza y el segmento ecuatorial (Farlin *et al.*, 1992).

## **2.11 Morfología externa y clasificación**

Diversas malformaciones presentes en los espermatozoides pueden ser clasificadas, en función del lugar donde se han originado, en primarias y secundarias. Las malformaciones primarias son aquellas desarrolladas en el testículo a lo largo de la espermatogénesis o la espermiogénesis, y las malformaciones secundarias son aquellas desarrolladas en el epidídimo a lo largo del proceso de maduración espermática (Bonet, 2006). Cuadro 1.

**Cuadro 1. Clasificación de morfoanomalías en los espermatozoides de cerdo**

Malformaciones primarias	Malformaciones secundarias
<b>Cabeza</b> Alargada Cilíndrica Oval Redondeada	<b>Gota citoplasmática</b> Proximal Distal
<b>Tamaño de la cabeza</b> Macrocefálicos Microcefálicos	Acrosoma vacuolado
<b>Número de cabezas</b> Tricefálicos Bicefálicos	<b>Flagelo enroscado</b> Principal Intermedia Proximal
<b>Flagelo</b> Corto Largo Grueso Doblada Múltiples flagelos Implantación abaxial	Colas en ángulo Colas en forma de gancho Colas sueltas

Tomado de Bonet, 2006.

### **3. Justificación**

Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles a la crioconservación, el empleo de antioxidantes naturales como la melatonina puede ayudar a mejorar la criosupervivencia espermática y en consecuencia la fertilidad de las cerdas, cuando se usa semen congelado para la inseminación artificial. Por esto, en este trabajo se evaluará la melatonina en tres diferentes concentraciones (0 mM, 3 mM, 5 mM) para determinar cuál de ellas es la mejor para la viabilidad espermática al descongelado.

### **4. Objetivo general**

Evaluar el efecto de diferentes niveles de melatonina como antioxidante en la criosupervivencia de espermatozoides de cerdo, enfriados a  $-5^{\circ}\text{C}$  previo a la congelación.

#### **Objetivos particulares**

Evaluar la motilidad, viabilidad, fluidez de la membrana, estado de capacitación, e integridad del acrosoma en espermatozoides de cerdo antes y después de la crioconservación (congelación y descongelación).

## 5. Materiales y métodos

Se utilizaron eyaculados de 6 machos adultos de diferente raza con un rango de edad de 1 a 4 años (Cuadro 2), obtenidos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina (CEIEPP - FMVZ), que se encuentra ubicado en el Km. 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, en Jilotepec, Estado de México, el cual se encuentra en los 99° 31' 45" de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, su latitud norte es de 19° 57' 13", y a una altura de 2,250 metros sobre el nivel del mar. El clima de la región es templado en verano y extremoso en invierno, la temperatura media es de 18°C y varía entre los 12°C y los 24°C.

**Cuadro 2. Características de los cerdos empleados en esta investigación.**

Macho	Edad	Línea	Raza
Heimdall	1 año, 2 meses.	Terminal	Pietrain puro
Dorian	3 años	Terminal	Duroc/Pietrain
Keiser	3 años	Terminal	Berkshire/Pietrain
Berthrand	2 años	Materno	York/Landrace
Balder	1 año y medio	Terminal	Pietrain puro
Rafita	4 años	Materno	Landrace / York

### 5.1 Transporte de los eyaculados

Para el transporte del semen se utilizó una caja térmica que contiene en la parte interna dos bolsas de gel, calentadas previamente, teniendo una temperatura de 32°C, el semen llegó al laboratorio a una temperatura promedio de 30°C.

La recolección de los eyaculados se hizo 2 veces a la semana; cada eyaculado se diluyó (1:1) en un diluyente comercial (Androstar Plus, marca Minitube), para poder ser transportado al Laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán.

Al llegar al laboratorio, el semen se dejó atemperar a temperatura de laboratorio (23°C) durante 30 minutos. Enseguida se procedió a la evaluación macro y microscópica del semen como a continuación se describe.

### **5.2 Evaluación macroscópica de semen:**

- 1.- Volumen
- 2.- Color
- 3.- Consistencia (cremoso, lechoso o acuoso)
- 4.- Apariencia (transparente o turbio)

Además, se revisó la temperatura antes de diluirlo.

### **5.3 Evaluación microscópica:**

- 1.- Motilidad masal
- 2.- Motilidad progresiva
- 3.- Concentración espermática

En primer lugar, se evaluó la motilidad masal: se colocó una gota de semen, en un portaobjetos previamente calentado en la platina térmica a 37°C, enfocando el borde de la gota, con un microscopio de luz blanca (Leica DMSL) con el objetivo de 10x, dando un valor subjetivo de 0-3 (Cuadro 3), observando movimientos en ondas, teniendo en cuenta que el semen se encuentra diluido.

### Cuadro 3. Características del movimiento en masa de los espermatozoides

Valor	Descripción
3	Ondas densas con movimiento muy rápido
2	Ondas con poco movimiento
1	Ondas inexistentes, pero se observa movimiento en la mayoría de los espermatozoides.
0	Ondas inexistentes con espermatozoides inmóviles

Tomado de Gonzales-Urdiales *et al.* (2006).

A continuación, se evaluó la motilidad progresiva, esta prueba se utiliza para evaluar el movimiento progresivo y rectilíneo de los espermatozoides, previamente atemperados en una platina térmica a 37°C; en un portaobjetos se colocó una gota de semen diluido y sobre ésta un cubreobjetos, observando en un microscopio óptico (Leica DMSL) con el objetivo 10x, evaluando subjetivamente, el porcentaje de células móviles con movimiento rectilíneo progresivo.

Posteriormente, se evaluó la concentración espermática, para esto se realizaron dos evaluaciones de la concentración espermática durante el proceso experimental. Se utilizó 1990 µl de solución salina formolada al 0.3% en un tubo de ensaye, más 10µl de semen fresco diluido (1:200), se mezcló y se llenó la cámara de Neubauer con una micropipeta de 10-100µl, dejando reposar por 5 minutos para que los espermatozoides se asentaran. Posteriormente, el conteo se hizo en el microscopio (Leica DMSL) con el objetivo de 40x de ambos cuadrantes, tomado de referencia los dos cuadros superiores e inferiores de las esquinas y el central. La primera evaluación se utiliza para conocer el número de espermatozoides que se

encuentran en un ml de eyaculado y la segunda para ajustar la muestra a  $400 \times 10^6$  espermatozoides/ml; a esta concentración se hizo el enfriado del semen diluido.

#### **5.4 Viabilidad espermática con la tinción Eosina/Nigrosina (vivos y muertos)**

Para realizar esta prueba se utiliza un portaobjetos atemperado en una platina térmica a  $37^\circ\text{C}$ , en donde se coloca una pequeña gota del semen diluido con medio de congelación BF5 sin glicerol más una gota de la tinción Eosina/Nigrosina también a  $39^\circ\text{C}$ , se mezclan ambas gotas con la ayuda de otro portaobjetos previamente atemperado e inmediatamente después se hizo un frotis delgado, éste se colocó en un ventilador para secar la laminilla, posteriormente se observó en el microscopio con un objetivo de 100x más aceite de inmersión. Se contabilizaron 200 células en total, evaluando los espermatozoides que se encuentran vivos (de color blanco) ya que la membrana plasmática se encuentra intacta, y los espermatozoides muertos (de color rosa o morado), ya que la membrana plasmática sufrió un daño, permitiendo la entrada de la tinción.

#### **5.5 Morfoanomalías**

Se evaluó la morfología de los espermatozoides empleando la misma laminilla teñida con Eosina/Nigrosina, se contabilizaron 200 células en total, observando y clasificando el tipo de células de acuerdo con la clasificación de las morfoanomalías.

#### **5.6 Viabilidad espermática empleando tinciones fluorescentes: SYBR14 y Yoduro de Propidio (IP)**

En un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf, se colocaron 50 $\mu\text{l}$  de semen diluido con BF5 sin glicerol, posteriormente se agregó 5 $\mu\text{l}$  de SYBR14 e inmediatamente se agregó 5 $\mu\text{l}$  de IP, y por último se colocan 5 $\mu\text{l}$  de glutaraldehído al 0.4%, este

último impide el movimiento de las células, fijándolas para poder observarlas en el microscopio de fluorescencia. Se colocó una gota de la solución en un portaobjetos previamente atemperado a 37°C, y sobre éste se colocó un cubreobjetos, utilizando el microscopio de fluorescencia, con el objetivo de 100x con aceite de inmersión, para su evaluación se contaron 200 células en total. Los espermatozoides que se observan con la fluorescencia de color verde significan, que se encuentran vivos, por lo tanto, son viables y la fluorescencia de color rojo indica que son espermatozoides que se encuentran muertos, no viables.

### **5.7 Fluidez de la membrana plasmática por la fluorescencia de Merocianina 540 (MC540)**

Antes de empezar a realizar la prueba, se preparó una solución stock de MC540 en DMSO, para un 1.0 ml:

Se pesó 0.0028 g de MC450, en una campana de flujo laminar se extrajo 1 ml de DMSO, para evitar contaminar el medio. En un tubo de plástico con tapa, previamente esterilizado, se hizo la mezcla, el tubo se cubrió con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz, y se identificó para su posterior uso.

En cada día de trabajo, se preparó medio TALP:

Se pesó: 0.022 g de piruvato y 0.050 g de albumina (BSA).

En un tubo tipo Eppendorf, se agregó 1.0 ml de agua desionizada (MilliQ) más 0.022g de piruvato. El medio Tyrodes se gasificó con CO<sub>2</sub> por dos minutos, observando el cambio de color de rosa a amarillo, se agregó 50 µl de piruvato más 0.050 g de albumina, dejándolo reposar por 10 minutos en baño maría a 39°C.

Pasando los 10 minutos, en un segundo tubo tipo Eppendorf se agregó 495  $\mu$ l del medio TALP más 5  $\mu$ l de la solución stock de MC540.

Una vez preparada la solución de trabajo de MC540, se tomaron 140  $\mu$ l del semen diluido con BF5 sin glicerol que se colocaron en un tubo tipo Eppendorf, a este tubo se agregaron 10  $\mu$ l de la solución de trabajo y se dejó reposar por 1 minuto, pasado este tiempo se agregaron 22  $\mu$ l de glutaraldehído al 0.4%.

Enseguida, se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos atemperado, además una gota de DABCO, que ayuda a retrasar la pérdida de fluorescencia de la prueba.

Se contaron 200 células en total, con el objetivo 100x, se identificaron dos tipos de patrones:

**1) Patrón brillante:** significa que la tinción fluorescente de MC540 tiene alta fijación hacia la membrana plasmática de los espermatozoides, es decir que hay mayor fluidez de la membrana plasmática.

**2) Patrón opaco:** significa que la tinción fluorescente de MC540 tiene baja fijación a la membrana plasmática de los espermatozoides, es decir que hay baja fluidez de la membrana plasmática.

### **5.8 Prueba de la evaluación del estado de capacitación espermática mediante la Clortetraciclina (CTC)**

Preparación de buffer CTC para 500 ml:

Con ayuda de la balanza analítica se pesó 3.8 g de NaCl y 1.21 g de Tris.

En un matraz se vertieron los reactivos con un poco de agua mili Q, una vez disueltos se aforó el volumen hasta 500 ml y se mezcló perfectamente.

En una campana de flujo laminar (Telstar AV-30/70), se colocó el matraz, guantes, filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ , jeringas, Parafilm y un frasco con tapa para colocar la solución filtrada. Una vez filtrado el buffer CTC, se vació en el frasco y éste se selló con Parafilm, se identificó y se almacenó en el refrigerador (5°C) para su uso posterior. Cada día de trabajo se preparó la llamada solución de trabajo de la siguiente manera:

Se tomó un tubo de centrifuga de 45 ml, colocando 5 ml de solución stock de CTC, y se agregó 0.03 g de cisteína y 0.002 g de CTC, se mezcló la solución con ayuda de un agitador (Vortex - Genie) por 30 segundos, después se midió y se ajustó el pH a 7.8 con la ayuda de potenciómetro (Hanna - HI223).

Se agregó 100  $\mu\text{l}$  del semen diluido con BF5 sin glicerol más 100  $\mu\text{l}$  de la solución CTC, más 22  $\mu\text{l}$  de glutaraldehído al 0.2% en un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorf de 1.5 ml. Enseguida, se colocó una gota de la muestra sobre un portaobjetos atemperado más una gota de DABCO, se colocó un cubreobjetos, y con la ayuda de un papel absorbente se presionó levemente la preparación para quitar el excedente de la muestra; inmediatamente después la preparación se observó al microscopio de fluorescencia, evaluando 100 células en total con el objetivo de 100x.

Se consideraron los siguientes patrones fluorescentes:

**Patrón F (Full):** fluorescencia homogénea en toda la cabeza; este patrón se considera indicativo de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.

**Patrón B (Band):** fluorescencia homogénea en los 2 primeros tercios anteriores de la cabeza del espermatozoide, el tercio posterior no muestra fluorescencia, lo que identifica a los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.

**Patrón AR (Acrosome Reacted):** presencia de fluorescencia fina y marcada en el segmento ecuatorial, con una fluorescencia débil en el resto de la cabeza; es indicativo de los espermatozoides con reacción acrosomal.

### **5.9 Evaluación de integridad del acrosoma con la prueba de lectinas**

Se hizo un frotis con la muestra de BF5 sin glicerol, rediluida con BTS 1:5 (2 ml de BTS más 500 µl de la muestra), se secó con un ventilador, posteriormente se colocó en un frasco con alcohol del 96° por una hora; pasado ese tiempo, se dejó secar la muestra al aire y se colocaron 50 µl de la lectina PSA-FITC, extendiéndola sobre toda la laminilla. Enseguida, se colocó la preparación dentro de una cámara húmeda por 10 minutos, se enjuagó con agua destilada, se dejó secar al aire, por último, se colocó una gota de DABCO, encima un portaobjetos, y se quitó el exceso de DABCO presionando con papel absorbente; posteriormente, se observó en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x, se evaluaron 100 células en total considerando los siguientes patrones:

**Acrosoma intacto:** fluorescencia homogénea presentando bordes bien definidos.

**Acrosoma dañado:** daño en el borde apical o en cualquier parte del acrosoma.

## **5.10 Procedimiento experimental**

**Primera etapa:** se llevó a cabo la estandarización de un protocolo de crioconservación de espermatozoides de cerdo diluidos con BF5 con glicerol al 1%: dilución, refrigeración, congelación, almacenamiento y descongelación.

### **Evaluación de semen fresco**

El transporte, atemperado y evaluación del semen fresco se hizo de la manera descrita previamente.

Se utilizaron 4-6 tubos de centrifuga de 15 ml para colocar el semen atemperado (10 ml/tubo), posteriormente los tubos se colocaron en una centrifuga (Centrificient - CRM Globe) por 10 minutos, a 500 gravedades, obteniendo la separación del sobrenadante (plasma seminal y diluyente de transporte) y el botón o pellet espermático.

Enseguida, se retiró el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur, dejando intacto el pellet espermático, al término se agregó el diluyente BF5 sin glicerol hasta 2.0 ml, el medio BF5 fue previamente atemperado a temperatura de cuarto, ya que éste se encontraba congelado.

Al obtener todos los pellets diluidos se procedió a juntarlos en un tubo de centrifuga de 50 ml, después se tomaron 10 µl de este "pool" más 1990 µl de solución salina formolada (al 3%) para poder estimar la concentración y ajustar la muestra a  $400 \times 10^6$  células/ml agregando la cantidad necesaria del medio BF5 sin glicerol.

Enseguida, se formó un grupo de 9 tubos de centrífuga de 15.0 ml de la siguiente manera:

**Grupo 1:** tres tubos con 1.0 ml del “pool” previamente ajustado con BF5 sin glicerol (400x10<sup>6</sup> células/ml)

**Grupo 2:** tres tubos con 1.0 ml de medio BF5 (2% de glicerol), previamente descongelado y atemperado a temperatura de cuarto.

**Grupo 3:** tres tubos de centrifuga de 15 ml, conteniendo los tres tratamientos de melatonina (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos de melatonina*	
<b>0 mM</b>	250 µl de DMSO/PBS
<b>3 mM</b>	150 µl de melatonina + 100 µl DMSO/PBS.
<b>5 mM</b>	250 µl de melatonina
* Para la preparación de la melatonina y su vehículo (DMSO/PBS) ver el anexo 12.	

Una vez identificados los tubos de centrifuga de 15 ml, se colocaron dentro de nueve tubos de centrifuga de 50 ml que contenían 35 ml de agua destilada.

### **Enfriado pre-congelación**

Se utilizó un refrigerador, un termómetro digital (HANNA HI 9353R), que dispone de dos sondas, una que registra la temperatura de un tubo monitor que contenía 1.0 ml de medio BF5 con glicerol al 1%, y la segunda que registra la temperatura en el interior del refrigerador; estas lecturas se tomaban cada 30 segundos.

Se colocaron los nueve tubos de centrifuga (Grupos 1, 2 y 3) dentro del refrigerador; al llegar a una temperatura de 5°C, se tomó una pequeña muestra (50 µl) de cada tubo con semen diluido con BF5 sin glicerol, se colocó en un portaobjetos a 37°C y se evaluó la motilidad masal (MM) y la progresiva (MP).

Una vez hecha esta prueba se procedió a agregar el medio BF5 con glicerol (2%), en tres fracciones, a los tubos con semen diluido con BF5 sin glicerol; se dejaron 10 minutos de reposo entre cada fracción, y al final de este procedimiento se evaluó otra vez la MM y MP.

Por último, el semen diluido con BF5 con glicerol (1%;  $200 \times 10^6$  células/ml) se agregó en cada tratamiento de melatonina (0, 3 y 5 mM), se dejó reposar por 10 minutos, pasando este tiempo se evaluó solamente la motilidad progresiva: una gota del semen más una gota de BTS previamente atemperado a 37°C, dejando reposar esta mezcla por 3 minutos y se evaluó en el microscopio óptico con el objetivo 10x. El semen de cada tratamiento se envasó en pajillas de plástico de 0.25 ml, previamente identificadas, con la fecha de elaboración e identificación del macho y tratamiento; las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico (PVA). Posteriormente se colocaron las pajillas en un recipiente de 16 pozos que contenía agua salina al 10%; este recipiente contenía pipetas de plástico (una para cada pajilla), permitiendo que las pajillas no tuvieran contacto con el agua salina ni entre ellas. En la parte central del recipiente se colocó una pajilla monitor para registrar la temperatura, y a su alrededor las demás pajillas; el recipiente se colocó en una hielera que contenía hielo salino al 10% a una temperatura de -13°C, así las pajillas llegaron a una temperatura de -5°C en aproximadamente 1 hora con 12 minutos.

### **Congelación**

Al momento en que las pajillas llegaron a una temperatura de -5°C, se expusieron a los vapores de nitrógeno durante 15 minutos. Esto se hizo colocándolas sobre unas varillas de cobre situadas a 4 cm sobre el nitrógeno líquido, con la ayuda de unas

pinzas; este procedimiento se hizo dentro de una caja de unicel que contenía nitrógeno líquido (-196°C). Un minuto antes de que terminara el tiempo de exposición de las pajillas a los vapores del nitrógeno se colocaron unas pinzas dentro del nitrógeno líquido para que se enfriaran, con estas pinzas se tomaron las pajillas y se sumergieron en el nitrógeno líquido. Enseguida, las pajillas congeladas se pasaron al tanque de nitrógeno líquido. Para el almacenamiento de las pajillas, los gobelets se identificaron previamente por cada macho y fecha de elaboración, y, por último, se identificó en que canastilla del tanque de nitrógeno estaban almacenadas para su posterior descongelación.

### **Descongelación**

Antes de cada día de trabajo, se preparó la mesa para la descongelación y evaluación del semen: se colocó un baño maría a una temperatura de 39°C, con una gradilla que contenía 6 tubos de ensaye, marcados para cada uno de los tratamientos del macho que se iba a descongelar. Los primeros 3 tubos de ensaye estaban vacíos y sirvieron para verter el contenido de las tres pajillas descongeladas, los segundos 3 tubos de ensaye contenían 200 µl de BTS (dilución 1:2, 200µl de BTS más 100 µl del semen diluido descongelado).

Se colocaron portaobjetos y cubre

objetos en una platina a una temperatura de 37°C; se empleó un microscopio óptico y uno de fluorescencia para hacer las evaluaciones correspondientes.

La descongelación y evaluación de los espermatozoides se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se toma el tanque de nitrógeno en donde se encuentran las pajillas almacenadas previamente identificadas y se colocó a un lado de la mesa, esto fue para facilitar el

manejo de las pajillas; una vez identificado el macho a descongelar, se colocaron 3 pajillas (una por una) en el baño maría por 30 segundos, pasando el tiempo, se sacaron las pajillas con papel absorbente evitando causar fricción, luego se cortó la parte del alcohol polivinílico y el contenido de las 3 pajillas, de cada tratamiento, se depositó en su tubo correspondiente. Después de 2 minutos, se colocó una gota de los espermatozoides descongelados en un portaobjetos atemperado y se observó al microscopio con el objetivo de 10x, evaluando la MM. Si los espermatozoides tuvieron una  $MM \geq 0.5$  se procedió a diluir la muestra en el segundo tubo de ensaye que contenía 200  $\mu\text{l}$  de BTS más 100  $\mu\text{l}$  de la muestra, se dejó reposar por 10 minutos, se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos atemperado más un cubreobjetos para poder evaluar la motilidad progresiva: si la  $MP \geq 20\%$  se procedió a hacer las pruebas de fluorescencia antes mencionadas; los espermatozoides cuya  $MP$  fue  $<20\%$  no se evaluaron.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de esta investigación fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (2006, Chicago, USA). Los resultados del semen fresco se evaluaron mediante estadística descriptiva. Los resultados obtenidos al descongelado de los diferentes tratamientos de melatonina (0mM, 3mM, 5mM), así como la interacción tratamiento x macho se analizaron mediante ANOVA y prueba de Tukey, previa transformación al arcoseno para normalizarlos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media, el nivel de significancia se estableció en  $P < 0.05$ .

## **6. Resultados**

En la Cuadro 5, se muestran las características del semen de cada cerdo previo a la congelación. No existieron diferencias significativas entre machos en las diferentes variables evaluadas, excepto en la motilidad progresiva entre algunos machos. A pesar de esto, todos los machos tuvieron calidad seminal aceptable para ser incluidos en estos experimentos.

En la Cuadro 6, se presentan las variables de criosupervivencia espermática con base en los tratamientos de melatonina empleados. No hubo diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas entre tratamientos de melatonina.

En la Cuadro 7, se presentan las características de los espermatozoides de cada macho al descongelado sin considerar el tratamiento de melatonina. Solamente hubo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la viabilidad (eosina/nigrosina) entre el macho 2 y macho 3, en el resto de los machos no hubo diferencias en ninguna de las variables.

En la Cuadro 8 se presenta el efecto de la melatonina sobre la criosupervivencia de los espermatozoides de cada macho al descongelado. No hubo diferencias significativas entre tratamientos de melatonina dentro de cada macho al descongelado.

Cuadro 5. Características de los espermatozoides de cada macho (cerdo) en fresco previo a la congelación

Macho (número de eyaculados)	Motilidad Progresiva (%)	Concentración Espermática (x10 <sup>6</sup> /ml)	Viabilidad espermática, SYBR14/IP (%)	Espermatozoides vivos, prueba Eosina/ Nigrosina (%)	Acrosoma Intacto (%)	Patrón Brillante Por MC540 (%)	Patrones CTC (%)		
							F	B	RA
1 (6)	79.5 ± 1.03a	218.3 ± 59.44	57.3 ± 9.87	88.8 ± 3.52	45.3 ± 7.16	4.3 ± 1.64	95.1 ± 2.20	1.8 ± 1.21	3.1 ± 1.60
2 (4)	65.0 ± 5.14 b	226.3 ± 65.78	54.4 ± 5.51	85.9 ± 3.60	43.5 ± 14.19	9.3 ± 3.15	94.5 ± 0.98	3.1 ± 0.13	2.4 ± 1.07
3 (3)	80.0 ± 0.98 a	435.0 ± 137.48	45.7 ± 9.61	90.2 ± 1.45	43.2 ± 5.55	1.0 ± 0.29	97.2 ± 2.35	2.0 ± 2.00	0.8 ± 0.44
4 (3)	71.1 ± 6.73 ab	273.3 ± 87.29	42.8 ± 17.65	87.7 ± 5.09	35.7 ± 19.68	6.8 ± 5.34	70.3 ± 23.75	3.0 ± 0.00	1.8 ± 1.25
5 (4)	79.2 ± 1.73 a	173.8 ± 42.00	68.0 ± 6.00	86.5 ± 3.78	47.0 ± 8.79 a	14.5 ± 7.76	93.3 ± 1.31	4.6 ± 1.11	2.1 ± 0.43
6 (4)	85.0 ± 0.69 a	231.3 ± 20.85	44.1 ± 8.03	86.0 ± 4.98	44.8 ± 5.85	8.8 ± 6.09	95.3 ± 1.60	2.3 ± 0.48	2.5 ± 1.19

Los valores son promedios ± error estándar de la media. Valores con diferentes letras en columnas, difieren significativamente (P<0.05).

SYBR 14 + Ioduro de Propidio: integridad de la membrana plasmática; Lectinas: Acrosoma intacto; Merocianina 540: Membranas hiperfluidas; Patrón FULL: espermatozoide no capacitado con acrosoma intacto; Patrón BANDA: espermatozoides capacitados con acrosoma intacto. Patrón REACCIÓN ACROSOMAL: espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

Cuadro 6. Efecto de la adición de Melatonina sobre las características de los espermatozoides de cerdo al descongelado

Tratamiento MLT (mM)	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad espermática, SYBR14/IP (%)	Espermatozoides vivos, prueba Eosina Nigrosina (%)	Acrosoma intacto (%)	Patrón brillante MC540 (%)
0mM	27.0 ± 2.50	18.1 ± 2.51	35.6 ± 4.15	28.5 ± 5.05	66.0 ± 6.88
3mM	24.3 ± 2.55	11.3 ± 1.21	22.9 ± 4.08	31.0 ± 5.72	70.9 ± 7.24
5mM	25.0 ± 2.50	11.7 ± 1.85	24.8 ± 4.14	28.8 ± 4.68	66.2 ± 8.18

Los valores son promedios ± error estándar de la media. No hubo diferencias entre tratamientos en ninguna variable.

SYBR14 + Ioduro de Propidio: integridad de la membrana plasmática; Lectinas: Integridad del acrosoma; Merocianina 540: Membranas Hiperfluidas.

**Cuadro 7. Características de los espermatozoides de cada macho al descongelado**

<b>Macho</b>	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad espermática, SYBR14/IP (%)	Espermatozoides vivos, prueba Eosina/Nigrosina (%)	Acrosoma intacto (%)	Patrón brillante MC540 (%)
<b>Macho 1</b>	29.8 ± 2.68	15.1 ± 2.87	24.9 ± 4.15ab	31.8 ± 2.88	77.3 ± 6.87
<b>Macho 2</b>	27.0 ± 2.66	13.6 ± 1.9	40.8 ± 5.66 a	35.3 ± 5.73	58.2 ± 8.33
<b>Macho 3</b>	25.0 ± 4.08	12.3 ± 3.99	16.6 ± 3.77b	15.7 ± 5.86	81.8 ± 5.44
<b>Macho 4</b>	22.0 ± 2.00	22.3 ± 8.75	nd	30.5 ± 15.50	80.8 ± 5.25
<b>Macho 5</b>	22.0 ± 5.83	14.3 ± 3.49	27.8 ± 3.18ab	24.0 ± 20.01	42.9 ± 7.36
<b>Macho 6</b>	22.5 ± 4.01	12.1 ± 2.61	23.8 ± 3.18ab	27.7 ± 7.99	72.0 ± 10.40

Los valores son promedios ± error estándar de la media. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente (P<0.05). nd= no determinado; SYBR 14 + Ioduro de Propidio: Integridad de la membrana plasmática; Lectinas: Acrosoma intacto; Merocianina 540: Membranas Hiperfluidas.

**Cuadro 8. Efecto de la melatonina sobre crio supervivencia de los espermatozoides de cerdo de cada macho al descongelado.**

<b>Macho</b>	<b>Tratamiento MLT (mM)</b>	<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>Viabilidad espermática SYBR14/IP (%)</b>	<b>Viabilidad espermática Eosina/Nigrosina (%)</b>	<b>Acrosoma intacto (%)</b>	<b>Patrón brillante MC540 (%)</b>
1	0	30.0 ± 12.25	19.9 ± 13.68	34.8 ± 14.50	34.7 ± 9.50	69.2 ± 21.03
1	3	25.0 ± 8.66	10.9 ± 3.75	22.7 ± 5.80	29.5 ± 7.51	80.0 ± 9.50
1	5	32.5 ± 9.57	12.8 ± 6.81	20.5 ± 14.47	32.0 ± 7.64	82.8 ± 11.27
2	0	28.0 ± 7.58	15.1 ± 9.74	46.5 ± 14.99	39.3 ± 23.61	64.3 ± 28.99
2	3	29.0 ± 13.42	12.1 ± 4.83	30.5 ± 22.96	38.0 ± 27.63	58.3 ± 35.88
2	5	24.0 ± 10.84	13.6 ± 7.64	45.0 ± 9.90	28.5 ± 5.45	51.9 ± 37.66
3	0	30.0 ± 14.14	16.5 ± 16.26	20.0 ± 2.83	9.0 ± 1.41	75.3 ± 21.57
3	3	22.5 ± 10.61	9.5 ± 10.61	16.0 ± 15.56	18.0 ± 15.56	86.0 ± 3.54
3	5	22.5 ± 10.61	10.8 ± 6.72	13.8 ± 11.67	20.0 ± 25.46	84.3 ± 16.62
4	0	25.0 ± 7.07	31.0		54.0	75.5
4	3	20.0 ± 0	13.5		23.0	86.0
4	5	20.0				
5	0	20.0 ± 14.14	17.8 ± 1.77	31.5	5.0	46.0 ± 23.3
5	3	15.0 ± 7.07		21.5	3.0	34.0
5	5	40.0	7.5	30.5	64.0	45.5
6	0	25.0 ± 17.32	16.5 ± 9.19	32.3 ± 1.06	20.3 ± 5.13	68.8 ± 39.57
6	3	25.0 ± 17.80	11.0 ± 4.77	19.3 ± 13.08	51.0 ± 32.53	77.9 ± 36.33
6	5	17.5 ± 6.45	6.5	21.2 ± 4.86	15.5 ± 4.95	68.3 ± 38.85

**Los valores son promedios ± error estándar de la media. No se observó diferencia significativa (P<0.05) entre los tratamientos de melatonina, de cada macho. Medias que no tienen error estándar, no presentaron suficientes datos.**

**SYBR 14 + Ioduro de Propidio: Integridad de la membrana plasmática; Lectinas: Acrosoma intacto; Merocianina 540: Membranas Hiperfluidas.**

## 7. Discusión

En el presente estudio se investigaron los efectos de la suplementación de MLT como antioxidante a diferentes concentraciones (0 mM, 3 mM, 5 mM) al descongelado en espermatozoides de cerdo, a una temperatura de enfriado pre-congelado de -5°C.

Los espermatozoides almacenados *in vitro*, están expuestos a estrés oxidativo por lo tanto el uso de antioxidantes como la melatonina, capaz de neutralizar los radicales libres, radicales hidroxilo y peróxido de hidrogeno, está indicado para reducir el estrés oxidativo. La MLT protege el ADN y las mitocondrias del daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), ayudando a que haya una mejor motilidad espermática y su posible uso en la fertilización.

Hernández y Rafael (2018) hicieron un estudio similar al presente empleando 3 concentraciones de MLT (0 mM, 1 mM, 2 mM), sus resultados son similares a los nuestros excepto en el porcentaje de membranas hiperfluidas que fueron más bajos que los nuestros. Quizá la época del año en que se colecta el semen determine la supervivencia de los espermatozoides a la crioconservación.

En relación con la criosupervivencia de los espermatozoides de los diferentes machos al descongelado se encontraron diferencias entre algunos individuos. Se ha reportado que las diferencias en la susceptibilidad a la congelación-descongelación entre machos es un factor muy importante que determina el éxito de los protocolos de crioconservación (Holt *et al.*, 2005).

El enfriado lento pre-congelación a temperaturas bajo cero ha reducido el porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura en diferentes especies (Medrano

*et al.*, 2010; García *et al.*, 2016). Por esta razón, se decidió incluir el enfriado a -5°C en nuestro protocolo, adicional al efecto antioxidante de la melatonina.

Jang *et al.* (2007) utilizaron como antioxidantes el piruvato (1 mM), taurina (50 mM) y melatonina (100 nM) como antioxidantes, teniendo como objetivo el mejorar la motilidad espermática, integridad de la membrana y peroxidación lipídica. Se observó que la suplementación de antioxidantes en el diluyente de los espermatozoides puede aumentar la motilidad y la integridad de la membrana y disminuir la peroxidación lipídica de la membrana plasmática.

Ashrafi *et al.* (2013) evaluaron la suplementación de MLT al descongelado como antioxidante en el diluyente de semen de toro, a una concentración de 0, 0.1, 1, 2, 3 y 4 mM; estos autores concluyeron que la concentración de 2 mM de MLT mejoró la calidad de semen post-descongelado, asociándose con la reducción en la peroxidación lipídica, así como un aumento en la capacidad antioxidante total y actividad enzimática antioxidante. Por otro lado, Hidalgo *et al.* (2010) evaluaron los efectos de la MLT a 1µM en semen de cerdo, almacenado a 17°C durante 7 días; estos autores observaron que el porcentaje de espermatozoides móviles mejoró al séptimo día. El porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto fue mayor en muestras de MLT durante el periodo de almacenamiento, pero no mejoró la calidad de los espermatozoides de cerdo refrigerados. Por lo tanto, se observó un efecto negativo de MLT, aumentando el porcentaje de espermatozoides estáticos después de 7 días de almacenamiento.

Jang *et al.* (2010) examinaron si el efecto de MLT es directo o indirecto como antioxidante a través de ROS cuando el semen porcino es almacenado *in vitro*; estos autores utilizaron MLT a una concentración 100 nM en presencia o ausencia

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250 µM), refrigerando el semen durante 3, 6, 9 y 12 h a 37°C. La administración de MLT (100 nM) aumentó la motilidad del espermatozoide, la viabilidad, las tasas de supervivencia y de la membrana y la disminución de LPO.

Rodríguez (2020) congeló semen de Bulldog Inglés, adicionando MLT a concentraciones de 0 mM, 0.5 mM, 2 mM y 3.5 mM, obteniendo diferencias significativas en la prueba de Fluidez de la Membrana (MC540) e Integridad del Acrosoma (Prueba de Lectinas), concluyendo que el uso de MLT a una concentración de 2 y 3.5 mM de MLT mejoró la criosupervivencia de los espermatozoides.

En contraste con los resultados anteriores, en nuestro trabajo no se encontraron diferencias entre los tratamientos con MLT; desconocemos las causas de esta aparente falta de efecto positivo de la adición de MLT. En general, nuestros resultados de criosupervivencia son bajos, entonces es posible que el efecto de la MLT no fue suficiente para compensarla, también es posible que la época del año en que se llevó a cabo este trabajo haya influido en los resultados.

## **8. Conclusión**

La adición de melatonina a diferentes concentraciones en el diluyente para la crioconservación de espermatozoides de cerdo no produjo efectos significativos en la supervivencia espermática al descongelado entre machos a una temperatura de enfriado pre-congelación de -5°C.

Se sugiere que se continúe investigando sobre las concentraciones de melatonina para favorecer la crioconservación en espermatozoides de cerdo.

## 9. Bibliografía

1. Ashrafi I, Kohram H, Farrokhi AF. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 139, 25-30.
2. Avila Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. 2006. Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57 (4), 291-300.
3. Berger T. 1989. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal, stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology* 33, 689-695.
4. Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. 2000. Morfología espermática en porcino. Instituto de Estudios Catalanes, Barcelona. pp. 41-
5. Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. 2006. Biotecnología de la reproducción porcina. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Universidad de Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. 22-.
6. Coelho Cruz MH, Verde Leal CL, Ferreira da Cruz J, Tan DX, Reiter RJ. 2014. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. *Animal Reproduction Science* 145, 150-160.
7. Curry MR. 2007. Cryopreservation of Mammalian Semen. In: Day JG (ed) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. *Methods in Molecular Biology* Humana Press. Vol. 368, 301-310.
8. Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL. 1992. Assessment of Pisum sativum Agglutinin in identifying Acrosomal Damage in Stallion Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 32, 23-27.
9. García-Olivares A, Garzon-Perez C, Gutierrez-Perez O, Medrano A, 2016. Effect of cooling to different subzero temperatures on boar sperm cryosurvival. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5, 63-66.
10. Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Muñoz Hoyos H, 1997. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Letters* 408, 297-300.

11. Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. 1994. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology* 15 (6), 620-629.
12. Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals* pp 96-109.
13. Green C E, Watson PF. 2001. Comparison of the capacitation like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122, 889-898.
14. Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an Effector of Capacitation, Induces a Rapid and Reversible Change in the Lipid Architecture of Boar Sperm Plasma Membranes. *Molecular Reproduction and Development* 54, 378-391.
15. Hipakka RA, Hammerstedt RH. 1978. Changes in 2 – Deoxyglucose Transport during Epididymal Maturation of Ram Sperm. *Biology of Reproduction* 19, 1030-1035.
16. Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63, 370-382.
17. Jang HY, Park CK, Cheong HT, Kim JT, Lee HK, Yang BK. 2007. Antioxidative Effect of Pyruvate, Taurine and Melatonin, and Relationship of the Evaluation Methods on Boar Sperm Viability for In Vitro Storage. *Journal of Animal Science and Technology (Kor)* 49, 729-736.
18. Jang H, Kim YB, Park I, Cheong H, Kim J, Park C, Kong H, Lee H, Yang B. 2010. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 943-950.
19. Koehler JK. 1981. Lectins as Probes of the spermatozoon Surface. *Archives of Andrology* 6 (3), 197-217.
20. Kurcer Z, Hekimoglu A, Aral F, Baba F, Sahna E. 2010. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertility and Sterility* 93, 1545-1549.

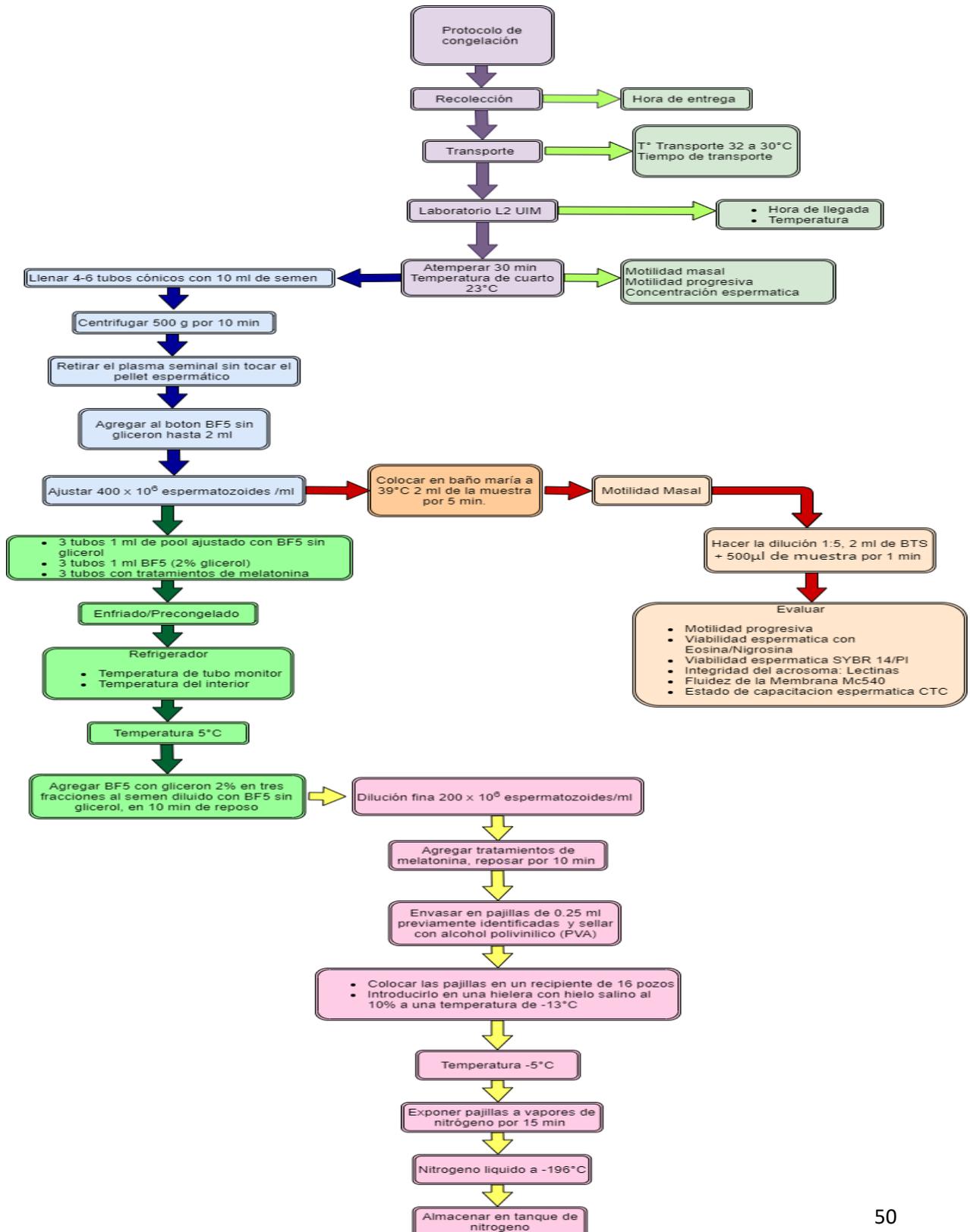
21. Leon J, Acuña Catroviejo D, Escames G, Tan DX, Retie, RJ. 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of Pineal Research* 38, 1-9.
22. Mallma Marca Percy. 2019. Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen de toro Holstein. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Abancay Perú, pp 27.
23. Martín Hidalgo D, Barón FJ, Bragado MJ, Carmona P, Robina A, García Marín LJ, Gil MC. 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long term storage at 17°C. *Theriogenology* 75, 1550-1560.
24. Martínez DA, Rafael M. 2018. Efecto de la melatonina como antioxidante en semen de cerdo crioconservado. Tesis de Licenciatura, FES Cuautitlán, UNAM. México: 148 pp.
25. Martínez JA. 2020. Efecto de la melatonina como antioxidante en la supervivencia de espermatozoides crioconservados de perro. Tesis de licenciatura, FES Cuautitlán, UNAM. México: 58 pp.
26. Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E. 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 45, 373-381.
27. Mazur P. 1984. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *American Journal Physiology* 247, 125-142.
28. Medrano A, Terrazas A, Soto R. 2010. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small Ruminant Research* 89, 140-143.
29. Montero López EM, Martínez Gamba RG, Herradora Lozano MA, Ramírez Hernández G, Espinosa Hernández S, Sánchez Hernández M, Martínez Rodríguez R. 2015. Alternativas para la producción porcina a pequeña escala. Primera Edición, Vol. 205. México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
30. Moskovtsev SI, Librach CL. 2013. Methods of Sperm Vitality Assessment. In: Carrell D., Aston K. (eds) Spermatogenesis. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* Vol 927. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-62703-038-0\\_2](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-62703-038-0_2).

31. OCDE. 2019. Exámenes de mercado en México: Estudio del mercado de la carne de cerdo. [www.oecd.org/daf/competition/examenes-de-mercado-en-mexico-estudio-de-caso-del-mercado-de-la-carne-de-cerdo.htm](http://www.oecd.org/daf/competition/examenes-de-mercado-en-mexico-estudio-de-caso-del-mercado-de-la-carne-de-cerdo.htm)
32. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. 2000. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *Journal of Pineal Research* 28, 89-96.
33. Pursel VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40, 99-102.
34. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. 1977. Effect of glycerol concentration on frozen sperm. *Theriogenology* 9 (4), 305-312.
35. Rath R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65, 462-470.
36. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *Journal of Biomedical Science* 7(6), 444–458.
37. Retier RJ. 2000. Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiology Science* 15, 246-250.
38. Sañudo Astiz C. 2011. Atlas mundial de Etnología Zootécnica. Editorial Servet España: 493-512.
39. Steckler D, Stout TAE, Durandt C, Nöthling JO. 2015. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation related membrane destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology* 83, 1451-1460.
40. Sumardani NLG, Tuty LY, Siagian PH. 2008. The Boar Sperm Viability in Modified BTS (Beltsville Thawing Solution) in Different Storage. *Media Peternakan* 31 (2), 81-86.
41. Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García Corzo L, López L, C, Retier RJ, Acuña Castroviejo D. 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research* 52, 217-227.

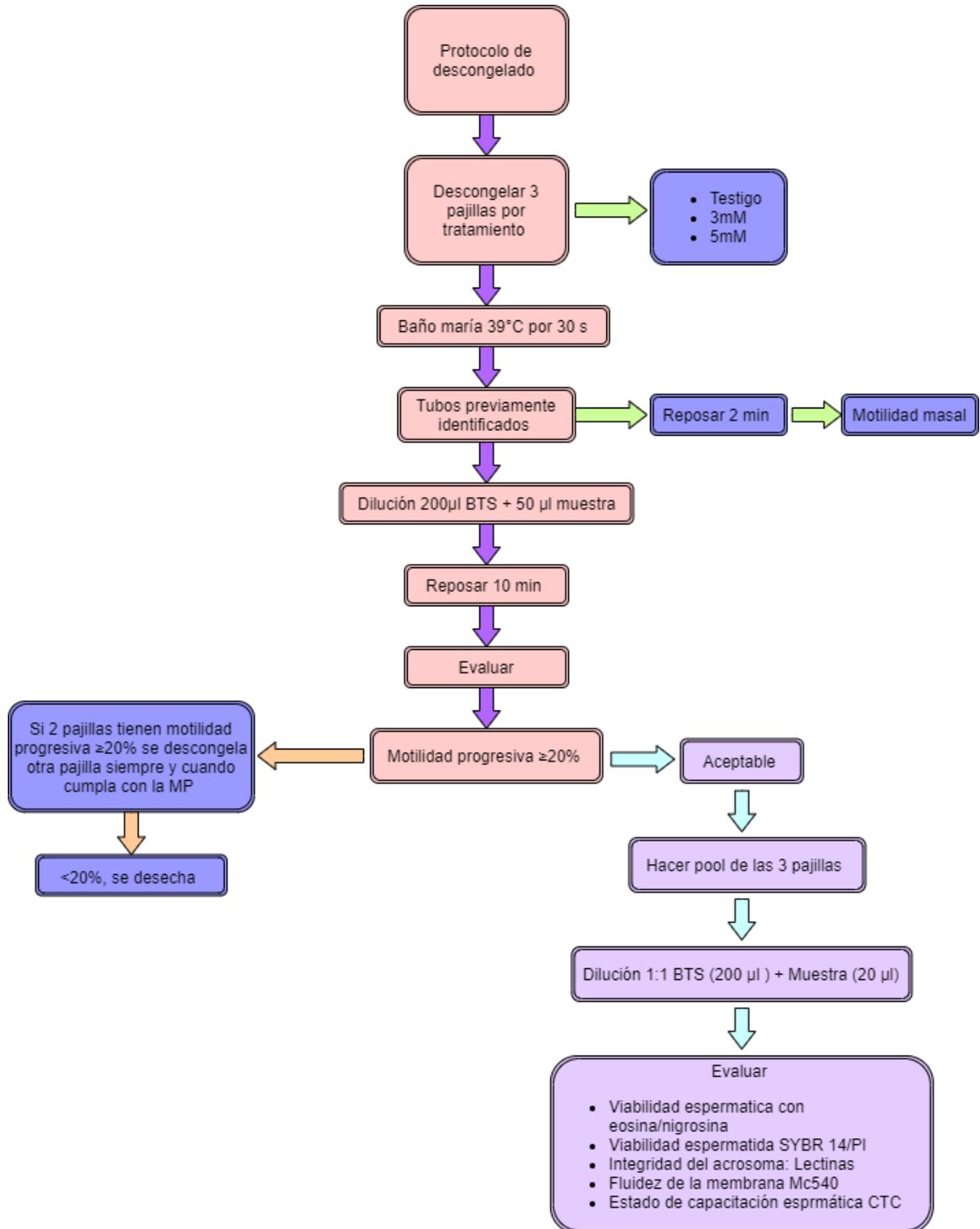
42. Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7, 871-891.
43. Williamson P, Mattocks K, Schlegel RA. 1983. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochimica et Biophysica Acta* 732, 387-393.

## 10. Anexos

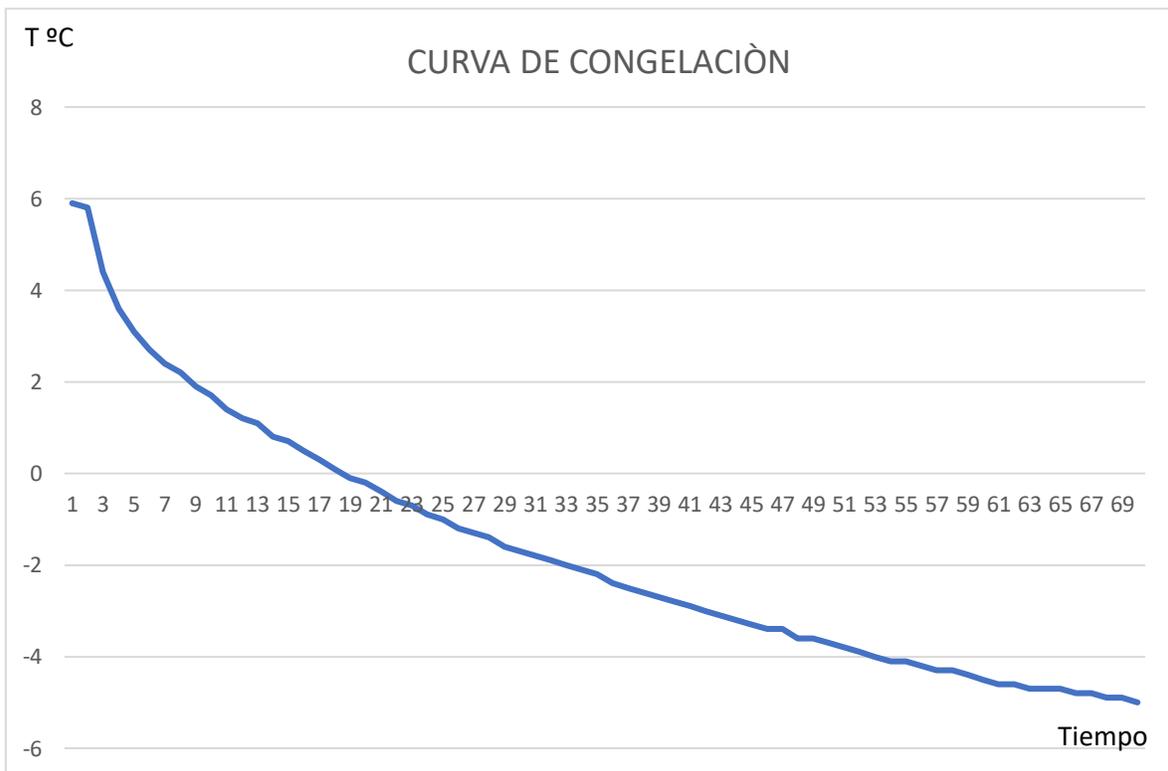
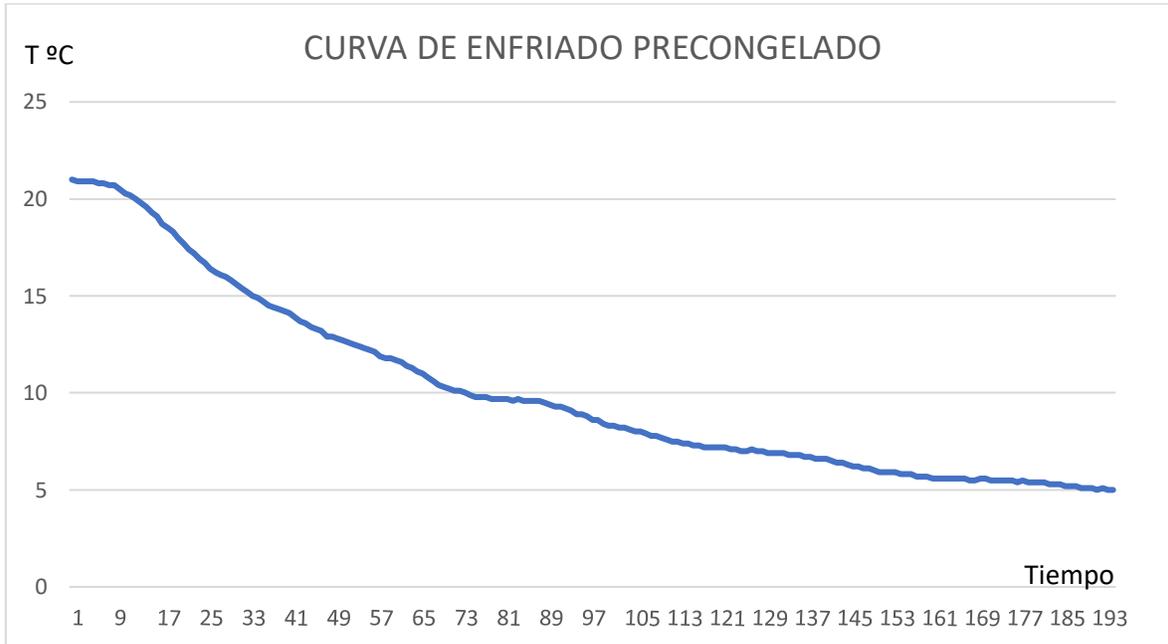
### Anexo 1 Diagrama de flujo para congelación y adición de melatonina en las pajillas de semen de cerdo



**Anexo 2 Diagrama de flujo de descongelación a 39°C en pajillas de semen de cerdo**



### Anexo 3. Curvas de precongelado y congelación



Se presentan las curvas de enfriamiento y congelado con el tiempo y temperatura estimada.

#### Anexo 4. Preparación de la solución Beltsville Thawing Solution (BTS)

Ingredientes	Cantidad (g)
Dextrosa anhidra	17.5
Citrato de sodio dihidratado	3
Bicarbonato de sodio	0.625
Acido etileno diamino tetra-acetico (EDTA)	0.625
Cloruro de potasio	0.375

Se prende la balanza y se procede a pesar los siguientes reactivos.

1. Se colocó cada uno de los ingredientes en un matraz aforado para disolver con agua Milli Q.
2. Se aforo 100 ml colocándolo en el agitador magnético hasta homogenizar todos los reactivos.
3. Se preparó la campana de flujo laminar y se filtró la solución con filtros de PVDF 0.22  $\mu$ M.
4. Se guardó en un frasco de vidrio rotulado en el refrigerador hasta su uso.

#### Anexo 5. Preparación de la solución Beltsville Freezing 5 (BF5)

Ingredientes	Cantidad (g)
TES-N-TRIS (hidroximetilo)	1.2
TRIS (hidroximetilo)	0.2
Dextrosa anhidra	3.2
Yema de huevo	100
Orvus ES	2.5
Antibiótico (Kanamicina)	5.0

Se prende la balanza y se procedió a pesar los reactivos

1. Se agregó el TES-N-TRIS, TRIS y la Dextrosa Anhidra en un matraz aforado con agua Milli Q. hasta 400 ml.
2. Se lavaron los huevos con agua corriente y se secaron perfectamente para después desinfectar con alcohol.
3. Se eliminó la clara para extraer la yema con ayuda de toallas absorbentes.

4. Con una jeringa de 10 ml se recolectó la yema, colocándola en una probeta, obteniendo 100 ml de yema de huevo.
5. Se colocó el Orvus ES y el antibiótico en un matraz aforado con agua Milli Q hasta 500 ml.
6. Se colocó el matraz aforado en el agitador magnético hasta homogenizar los reactivos.
7. El matraz aforado se selló con Parafilm y se dejó reposar por 30 minutos.
8. Pasando los 30 minutos se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml para centrifugar los a 500 gravedades por 10 minutos.
9. Se recuperó el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar el pellet que es la parte no deseada.
10. Se tomaron 255 ml, colocándolos en tubos de 15 ml para su almacenaje y se rotularon, especificando que no contiene glicerol.
11. Los otros 245 ml, se le colocó 5 ml de glicerol, estos se guardaron en tubos de 15 ml, se rotularon especificando que contenían glicerol al 2%.
12. Los tubos se guardaron en el congelador hasta su uso.

#### **Anexo 6. Preparación de SYBR14/IP**

Se hace una preparación con el diluyente utilizado BF5 para cerdo.

1. Se prepara una dilución 1:50.
2. En un tubo Eppendorf protegido de la luz con papel aluminio se coloca 1 ml de BF5.
3. Se adicionan 20 µl de SYBR 14.
4. Se mezcla perfectamente y se congela hasta su utilización.

#### **Anexo 7. Buffer CTC**

Reactivo	Cantidad
TRIS	240 g
NaCL	760 g
Agua Milli Q	100 ml

Procedimiento

1. Se pesan los reactivos en la balanza analítica

2. Se colocaron uno a uno de los reactivos en un matraz aforado y se disuelven con agua Milli Q.
3. Se afora con agua Milli Q hasta llegar a la cantidad a preparar.
4. Se mezcla perfectamente.
5. En una campana de flujo laminar realiza un filtrado con filtros de 0.22  $\mu\text{M}$  (millipor)
6. Se almacena a 4°C hasta su uso.

#### Anexo 8. Preparación de solución BL1 (por cada 500 ml)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	3 g
Citrato de sodio	1 g
Bicarbonato de sodio 0.2 g	0.2 g
Agua desionizada (Milli Q)	Aforar a 100 ml

se prende la balanza y se procede a pesar los siguientes reactivos

1. Se colocaron los reactivos en un matraz aforado
2. Se agregó agua Milli Q para mezclarlos y homogenizar
3. Se afora hasta 100 ml con agua Milli Q

#### Anexo 9. Preparación de Glutaraldehído 0.4%

Reactivo	Cantidad
Buffer BL1	24.8 ml
Glutaraldehído al 50%	200

Se prendió la balanza y se procedió a pesar los reactivos.

1. En un recipiente de 25 ml protegido con aluminio, agregar los reactivos y mezclar perfectamente.
2. Se conserva en el refrigerador hasta su uso.

#### Anexo 10. Preparación de glutaraldehído 0.2%

Reactivo	Cantidad
Buffer BL 1	24.8 ml
Glutaraldehído al 50%	100 ml

Se prendió la balanza y se procedió a pesar los siguientes reactivos.

1. En un recipiente de 25 ml protegido con aluminio, agregar los reactivos y mezclar perfectamente
2. Se conserva en refrigeración hasta su uso.

### **Anexo 11. Preparación de la solución salina formolada 0.3% (SSF)**

Preparación para 500 ml:

1. En una botella de cristal de 500 ml de solución salina al 0.9%
2. Agregar 4.25 ml de formaldehído al 38%, mezclar.

### **Anexo 12. Preparación de solución stock de Merocianina en DMSO 5 mM (MC540)**

<b>560.67 g - 1M</b>
<b>X – 5 mM</b>
<b>X = 2.80335 g/L</b>
<b>X = 0.01402/5 ml</b>

Se prendió la balanza y se procedió a pesar los siguientes reactivos.

1. Se peso 0.0140 g de merocianina.
2. Con una jeringa de 5 ml se tomó 5 ml de DMSO.
3. En un tubo de plástico estéril, se colocaron los reactivos anteriormente mencionados, forrándolo con papel aluminio para protegerlo de la luz.
4. Se guarda en un lugar en donde no reciba la luz.

### **Anexo 13. Preparación de medio Tyrodes**

Preparación de solución stock para el medio Tyrodes

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>NaCl (0.5 M)</b>	2.922 g / 100 ml
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1M)</b>	0.690 g / 50 ml
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	2.100 g /100 ml
<b>Na-Hepes (0.24 M)</b>	9.532 g / 200 ml
<b>KCL (0.5 M)</b>	3.728 g / 100 ml
<b>CaCl<sub>2</sub> (1.04 M)</b>	14.702 g / 100 ml
<b>Glucosa (0.5 M)</b>	4.5 g / 50 ml
<b>MgSO<sub>4</sub> (0.014 M)</b>	1.235 g / 50 ml

Se prendió la balanza y se procede a pesar los siguientes reactivos

1. Cada gramaje se diluye agua desionizada
2. Una vez realizadas las mezclas anteriores se prosigue a realizar la preparación del medio Tyrodes.

Preparación por cada 100 ml

Reactivo	Cantidad
<b>NaCl</b>	192 ml
<b>Na phosphate</b>	0.300 ml
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	6 ml
<b>Hepes</b>	10 ml
<b>KCl</b>	0.620 ml
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.460 ml
<b>Glucosa</b>	1 ml
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.40 ml
<b>Penicilina – estreptomicina</b>	
<b>Rojo fenol</b>	2 mg

Después de agregar cada una de las cantidades, se procede a aforar.

#### **Anexo 14. Preparación de melatonina M - 5250**

La melatonina fue disuelta en DMSO y PBS, se adiciono el diluyente para producir 5 diferentes concentraciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 Mm,

Grupo control: la misma concentración de DMSO

Peso	Molaridad	Volumen
<b>232.28 g</b>	1 M	1 Lt
<b>2322.8</b>	10 M	1 Lt
<b>2.3228</b>	10 mM	1 Lt
<b>0.23228</b>	10 Mm	100 ml
<b>0.023228</b>	10 Mm	10 ml

Peso Molecular	Molaridad	Volumen
<b>9291.2</b>	40 M	1 Lt
<b>9.2912</b>	40 mM	1 Lt
<b>0.92912</b>	40 mM	100 ml
<b>0.092912</b>	40 mM	10 ml

#### Preparación de la solución de melatonina

1. Se filtró PBS con filtro Milliporc.
2. Se mezcló 1.0 ml de PBS con 1.0 ml de DMSO
3. Esta mezcla (2.0 ml) se agregó al frasco de Melatonina que contiene 250 mg y se mezcló perfectamente.
4. Se requirieron 743.3  $\mu$ l de esta mezcla para aportar 92.912  $\mu$ g de melatonina (40 mM).

Entonces para preparar 10 ml se requiere: 1.0 ml de DMSO + 8.257 ml de PBS + 0.743 ml solución de Melatonina.

5. Se prepararon alícuotas de 250  $\mu$ l, se rotularon y se congelaron.
6. Se preparó una mezcla 1 DMSO + 9 PBS para el grupo testigo: 3.6 ml PBS + 0.4 ML DMSO = 4.0 ML mezcla total.
7. Se prepararon alícuotas de 250  $\mu$ l.