



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON CICLODEXTRINAS (METIL- β -CICLODEXTRINAS)
SATURADAS DE COLESTEROL (CLC) EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
PORCINOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ JOCELYN PALACIOS ESLAVA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RAÚL SÁNCHEZ SÁNCHEZ

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA

COMITÉ TUTORAL:

MC ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Ciudad Universitaria, CDMX.

Enero 2022



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

La conclusión del presente trabajo refleja el apoyo de personas a quienes les agradezco por la forma en que han contribuido a mi bienestar, así como mi crecimiento personal y profesional. En primer lugar, a mi familia quienes han estado a mi lado en cada una de las etapas formativas siendo parte de este logro, agradezco su amor y comprensión. También a aquellas personas que con su amistad me han acompañado en este camino, aquellos buenos colegas que me aconsejan y aquellos que me hicieron parte de un hogar a kilómetros de distancia de casa.

Con inmensa gratitud quiero hacer mención de la participación de mi asesor de tesis, el Dr. Raúl Sánchez quien me incluyó en un equipo de trabajo basado en la confianza en mí, quien me ha incentivado siempre a la mejoría, quien me ha guiado y sobretodo quien ha continuado como el primer día brindándome su apoyo.

Quiero agradecer al Dr. Oscar Gutiérrez y la Dra. Ana Rodríguez por la dedicación con la que me han hecho las asesorías que necesitaba mi trabajo, además de las valiosas clases que me brindaron dentro de las aulas.

Agradezco al equipo de trabajo con el que laboré por años en el departamento de Reproducción de la FMVZ, por su calidez y el apoyo que me brindaron. De igual forma estoy agradecida con los investigadores del INIA, Mercedes, Paloma y Ernesto a quienes admiro y me han recibido y apoyado con entusiasmo.

Agradezco a CONACYT por la beca que me proporcionó siendo fundamental para realizar este proyecto.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Revisión de literatura.....	4
1. Daños inducidos por la criopreservación	4
1.1 Alteración estructural de las membranas (plasmática, acrosómica y mitocondrial)	4
1.2 Modificaciones intracelulares.....	7
1.3 Efecto sobre el citoesqueleto.....	8
1.4 Efectos sobre el núcleo.....	8
2. Efectos de la adición del agente crioprotector.....	9
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	14
Material y métodos.....	15
1. Animales.....	15
2. Colección seminal.....	15
3. Valoración del eyaculado.....	15
3.1 Determinación del volumen.....	16
3.2 Cálculo de la concentración espermática.....	16
3.3 Anormalidades espermáticas.....	16
3.4 Valoración de la motilidad.....	16
3.5 Grado de aglutinación.....	17
4. Dilución del eyaculado.....	17
5. Preparación de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC).....	18
6. Preparación de los grupos de trabajo.....	18
7. Congelación espermática.....	18
8. Descongelación de pajillas.....	21

9. Valoraciones del semen post-descongelación.....	21
9.1 Análisis computarizado de la motilidad espermática (ISAS).....	21
9.2 Valoración de la integridad acrosómica.....	23
9.3 Evaluación de la viabilidad espermática.....	25
10. Análisis estadístico.....	26
Resultados.....	27
Discusión.....	31
Conclusiones.....	35
Referencias.....	36

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Relación de parámetros de motilidad estudiados con el sistema ISAS.	23
Cuadro 2. Valores referidos a la motilidad espermática con el sistema ISAS, según la concentración de Ciclodextrinas Saturadas con Colesterol (CLC) utilizados en la criopreservación del semen.	28
Cuadro 3. Valoración del estado del acrosoma post-descongelación, según la concentración de Ciclodextrinas Saturadas con Colesterol (CLC) utilizados en la criopreservación del semen.	29
Cuadro 4. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos post-descongelación, según la concentración de Ciclodextrinas Saturadas con Colesterol (CLC) utilizados en la criopreservación del semen.	29
Esquema 1. Esquema del proceso de congelación realizado.	20
Esquema 2. Esquema del proceso de descongelación realizado.	21
Figura 1. Representación de moléculas de ciclodextrinas formadas por unidades de glucosa β -CD ($C_6H_{10}O_5$) ₇ .	12
Figura 2. Representación tridimensional de las moléculas de colesterol encapsulado en ciclodextrinas.	13
Imagen 1a. Llenado de la cámara ISAS con semen descongelado.	22
Imagen 1b. Platina microscópica.	22
Imagen 2. Visualización de los distintos estados del acrosoma que se pueden apreciar según su integridad.	24
Imagen 3. Fotografía de las tinciones bajo el microscopio de fluorescencia.	30
Imagen 4. Fotografía de las tinciones bajo el microscopio de fluorescencia.	30

RESUMEN

Existen razones comerciales y sanitarias para criopreservar el semen porcino, sin embargo, el semen criopreservado no es utilizado habitualmente en la Inseminación Artificial (IA) a diferencia del refrigerado (15°C). Esto debido a que a los procesos de congelación y descongelación se asocia la disminución en la capacidad de fertilización, la viabilidad o la presencia de daños sub-letales en los espermatozoides, reduciendo el tamaño de las camadas. Los espermatozoides porcinos son particularmente sensibles a la congelación, una de las características asociadas es la baja proporción entre colesterol y fosfolípidos que integran sus membranas. En la búsqueda de mejorar el proceso de criopreservación se realizan ajustes a los protocolos, con la intención de optimizarlos, considerando adecuaciones en la composición de los diluyentes empleados, entre otros. Entre los compuestos que pueden ser incluidos en los diluyentes se encuentran las ciclodextrinas, que tienen la capacidad de formar complejos solubles con moléculas como el colesterol a fin de actuar como vehículo para su incorporación en las membranas celulares. En ese sentido, el objetivo principal del presente trabajo fue observar la eficacia de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) al ser incluidas durante la fase de enfriamiento, en los índices de viabilidad, motilidad e integridad acrosomal de espermatozoides de cerdo descongelados. El diseño experimental incluyó 5 grupos con, 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg de CLC/ml/120x10⁶ espermatozoides. El resultado que destaca es la mejoría en la viabilidad ($p < 0.05$), asociada a la incubación con 1 mg de CLC/ml/120 x10⁶ espermatozoides, así como mejoría en la linealidad y rectitud del movimiento ($p < 0.05$), evaluado por el sistema de análisis computarizado (ISAS). Sin embargo, no se encontró un efecto positivo en la integridad acrosomal. Concluyendo que la concentración de 1 mg de CLC incluida en un diluyente de criopreservación puede beneficiar parámetros de motilidad y viabilidad al descongelado en espermatozoides de cerdo.

INTRODUCCIÓN

El semen de cerdo empleado habitualmente en la inseminación artificial (IA) se conserva en condiciones de refrigeración (15°C). Antes de ser utilizado se evalúan sus parámetros cuantitativos y cualitativos para determinar su calidad y calcular el número posible de dosis a emplear; posteriormente se diluye en una variedad de medios de conservación que le aportan las condiciones físicoquímicas adecuadas para la supervivencia de las células espermáticas. Por otra parte, la criopreservación del semen en esta especie, no se utiliza comúnmente en los programas productivos habituales, dejando su uso en programas genéticos, o también en la conservación de recursos zoogenéticos, como es el caso de la raza Pelón Mexicano (*Herrera, 2017*). Con la criopreservación se obtienen resultados reproductivos inferiores que al utilizar semen refrigerado, debido a que, a la criopreservación y descongelación espermática en la especie porcina se asocia la disminución de la viabilidad y por lo tanto, la capacidad fertilizante de los espermatozoides, así como de la reducción del tamaño de las camadas (*Zhang, et al., 2009*). El costo de producción de dosis seminales se eleva notablemente cuando el semen se procesa por congelación, debido a que el número de espermatozoides por dosis es mayor en el caso de semen congelado frente al refrigerado para asegurar resultados reproductivos aceptables (5-6 x 10⁹ espermatozoides en comparación con 2-3 x 10⁹ espermatozoides respectivamente), así de un solo eyaculado se pueden producir la mitad de las dosis de inseminación (*Williams, 2013*). Otro inconveniente de los espermatozoides porcinos congelados, es el volumen necesario para IA y su almacenaje, ya que no es posible en maxi pajillas de 5 ml, por lo que se han empleado como en otras especies envases que permitan minimizar diferencias sustanciales entre las variaciones de temperatura en el centro y la periferia de las pajillas encontrando mejoría al emplear volúmenes de 0.25 o 0.5 ml o paquetes planos. Sin embargo estos paquetes aún no están bien adaptados para su uso en la práctica (*Eriksson, Rodríguez-Martínez, 2000*) aunque se han observado mejoras en la viabilidad de los espermatozoides *in vitro*. Además de que la producción de las dosis requiere mayor tiempo, materiales y equipamiento sofisticado;

personal capacitado para el manejo de las dosis seminales y el mantenimiento de las dosis en tanques de nitrógeno líquido (*Williams, 2013*).

Por otra parte, la conservación de semen en refrigeración a 15°C permite que la viabilidad espermática se mantenga durante periodos que oscilan entre 4 y 10 días, en función de la calidad intrínseca del eyaculado, el procesamiento realizado y el diluyente empleado. Mientras que la criopreservación permite mantener la viabilidad de los espermatozoides durante años, ya que disminuye su actividad metabólica, reduce su consumo de energía y la producción de metabolitos. A pesar de esto, actualmente existen factores en el proceso de criopreservación que requieren mejorarse, con el objetivo de incrementar el número de espermatozoides que mantienen su viabilidad post-descongelación, a fin de alcanzar una eficacia similar a la obtenida con semen refrigerado en los programas habituales de IA en granjas comerciales (*Williams, 2013*).

A pesar de que la criopreservación de semen se utiliza con éxito para algunas especies, en otras puede ser limitada. Por ejemplo, los espermatozoides bovinos exhiben mayor resistencia al congelamiento que los porcinos; siendo atribuida a la mayor proporción de colesterol respecto a fosfolípidos presentes en la membrana plasmáticas (bovino: 0.45 y porcino: 0.26), además de menor proporción molar de proteínas y fosfolípidos en las membranas espermáticas bovinas (bovino: 0.80; cerdo: 1.26) (*Parks y Lynch, 1992*).

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Daños inducidos por la criopreservación

La razón principal de la baja implementación de la técnica de criopreservación del semen es el daño celular que se provoca durante el enfriamiento, la congelación y la descongelación. La criopreservación de semen incluye variables como el tipo de diluyente, el protocolo, la especie, la raza y el individuo que influyen en el éxito obtenido, debido a que puede producir alteraciones que condicionen la correcta funcionalidad o la supervivencia de los espermatozoides. Algunas de las alteraciones reportadas son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que lleva a la lipoperoxidación y desencadena la ruptura de la teca perinuclear (daños al citoesqueleto), la modificación del medio interno, la exocitosis del acrosoma (daños a la membrana), la reducción de la actividad mitocondrial y la estabilidad de la cromatina (Yeste, *et al.*, 2017).

1.1 Alteración estructural de las membranas plasmática, acrosómica y mitocondrial.

La resistencia a dichas alteraciones se ha relacionado a la composición de sus membranas celulares, principalmente a los fosfolípidos que las conforman (Parks y Lynch, 1992). La pérdida de motilidad irreversible causada por el descenso rápido (>10 °C/min) de temperatura hasta valores cercanos a 0° C; denominado “shock por temperatura” (Parks, 1997) es causada por la ruptura de las membranas celulares, lo que produce pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico por un detrimento de la permeabilidad selectiva del plasmalema y trastornos en el metabolismo aeróbico y glucólisis anaeróbica, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes como la motilidad.

El choque por frío, el choque osmótico y el daño oxidativo inducido por los ROS durante el proceso de enfriamiento (Lacalle, *et al.*, 2021) provocan la ruptura de las membranas, reflejada en el incremento de la lipoperoxidación como consecuencia de la pérdida de

enzimas responsables de la metabolización de los ROS aunado a la disminución de los compuestos antioxidantes en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación. Las membranas de los espermatozoides son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño oxidativo mediado por el proceso de peroxidación lipídica, por lo que es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies y en condiciones *in vitro*, se correlaciona con la pérdida de movilidad espermática.

Se considera que la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide es responsable de la susceptibilidad al congelado entre especies (*Parks y Lynch, 1992*), así mismo se sugiere que está relacionada con la variabilidad individual entre sementales ("buenos y malos congeladores"). Las interacciones entre la velocidad de enfriamiento, la concentración de glicerol y velocidad de calentamiento, pueden producir respuestas diferentes en la supervivencia de los espermatozoides, determinadas por la variabilidad individual; los protocolos de congelación se encaminan a minimizarlos aunado a la selección de los verracos sobre la base de su crioresistencia; generalmente llamada "congelabilidad" (*Medrano, et al., 2002*). Los espermatozoides de la especie porcina son particularmente sensibles a efectos deletéreos al ser expuestos a temperaturas inferiores a 15°C. Esto se puede relacionar a la cantidad de ácidos grasos no saturados, vulnerables a la peroxidación lipídica; cuya alteración es la base común de diferentes procesos degenerativos (*Williams, 2013*).

La membrana plasmática consta de una bicapa lipídica compuesta por varios tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol; mientras que los fosfolípidos representan la mayor proporción, la composición lipídica de la membrana plasmática no es descrita por algunos autores como la responsable de las diferencias de susceptibilidad al frío; además de que dicha composición lipídica no es necesariamente indicativa de la composición de otras membranas como la acrosomal, la cual también es sensible al descenso de temperatura (*González, 2010*).

Por otra parte, el tipo de ácido graso presente en los fosfolípidos estructurales de las membranas y la proporción con el colesterol sí han sido correlacionados con la sensibilidad al choque por frío (*Parks, 1997*). Los espermatozoides porcinos, a diferencia de otras especies, tienen mayor sensibilidad ante la criopreservación debido a la baja proporción entre el colesterol y los fosfolípidos insaturados que componen sus membranas (*Lacalle, et al., 2021*) aunado a la baja capacidad antioxidante del plasma seminal (*Bathgate, 2011*). La relación que existe entre ambos componentes estructurales de la membrana facilitan los efectos deletéreos de transición y separación lateral de fases (*Drobnis, et al., 1993*). Cuando la temperatura desciende, ocurren cambios en el estado de los fosfolípidos de fase líquida a fase de gel, mientras que las cadenas de ácidos grasos que las componen se convierten en rígidas y paralelas (*Drobnis, et al., 1993*). Durante el enfriamiento ocurre la transición de fase a gel en algunos dominios de fosfolípidos y de forma simultánea otros dominios pueden mantenerse de forma líquida provocando la ruptura de las asociaciones normales entre ellos, y con las proteínas integrales de las membranas, que forman agregados (*Müller, 2008*). Cuando las membranas son sometidas a la temperatura inicial persiste la reagrupación de lípidos por familias y la redistribución de proteínas, produciendo una alteración que incide en el aumento en la permeabilidad a cationes y agua así como la interferencia en procesos de difusión por parte de las proteínas integrales (*Blanch, 2007*). Así mismo, los efectos causados por el proceso de congelación no solo afectan la permeabilidad al agua, sino también para moléculas normalmente impermeables a ella (*Drobnis, et al., 1993*).

Sin embargo, a mayor proporción de colesterol se reduce la transición de fase de los fosfolípidos en las membranas (*Purdy y Graham, 2004*).

1.2 Modificaciones intracelulares.

La alteración estructural, la modificación de su composición lipídica y organización molecular de las membranas celulares aunado al aumento de la permeabilidad por efecto del proceso de criopreservación, entre otros daños, provoca la pérdida de moléculas (ATP, ácidos nucleicos, enzimas) e iones intracelulares (magnesio, potasio) provocando alteraciones en el balance iónico (*González, 2010*). La pérdida de la permeabilidad selectiva del plasmalema disminuye la capacidad de regulación de la entrada de iones de Ca^{2+} , acumulándose en el espacio intracelular y desencadenando procesos similares a los de la capacitación espermática (*Maxwell y Johnson, 1997*), debido a modificaciones dependientes de la temperatura, es decir disminución en la actividad de las proteínas que actúan como bombas para su regulación. Debido a que el Ca^{2+} participa en la reacción acrosomal, la acumulación de este ion se ha relacionado con las alteraciones en la continuidad de la membrana acrosomal y la formación de vesículas en la región anterior de la cabeza de los espermatozoides descongelados (*González, 2010*). Se ha demostrado la similitud de los cambios sucedidos durante la capacitación, y las alteraciones que presentan los espermatozoides después de la criopreservación (*Green y Watson, 2001; Bailey, et al., 2003*), por esta razón Bailey et al. (2000) denominaron a este suceso como “criocapacitación”.

La capacitación es un proceso secuencial que involucra numerosos cambios fisiológicos, incluida la desestabilización ordenada de la membrana, la entrada de iones de calcio y la fosforilación de proteínas (*Vadnais, et al., 2005*) que conducen a cambios moleculares posteriores. Por otra parte, la criocapacitación muestra un patrón y un número diferente de proteínas tirosinfosforiladas (*Green y Watson, 2001*), mientras que la desestabilización de la membrana consiste en la eliminación de factores descapacitantes de las proteínas adquiridos en el epidídimo o en la eyaculación, así como el colesterol de la membrana de los espermatozoides (*Watson y Green, 2000*). Se ha observado que los espermatozoides que son sometidos a un proceso de enfriamiento o criopreservados tienen menor tiempo

de sobrevivencia en el aparato reproductor femenino, al ocurrir su reacción acrosomal antes al ser comparados con el semen fresco (*Galantino, et al., 2006*).

1.3 Efecto sobre el citoesqueleto.

La temperatura es un factor que influye en los estadíos de despolimerización y repolimerización de las proteínas del citoesqueleto afectando la función estabilizadora del plasmalema (*González, 2010*).

1.4 Efectos sobre el núcleo.

En la cromatina nuclear se lleva a cabo la supercondensación con incremento en la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides porcinos tras el proceso de congelación-descongelación. Como efecto de la congelación la localización de las nucleoproteínas (protamina 1 e histona 1) se ve afectada, además de romper los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas; la fragmentación del ADN puede relacionarse con la menor fertilidad observada al emplear semen descongelado en la IA (*Yeste, et al., 2017*).

Por lo anterior, es necesario aumentar el número de espermatozoides en las dosis de inseminación, realizar inseminaciones intrauterinas y optimizar el momento de esta, realizándola lo más cercano al momento de la ovulación (*Holt, 2000*). El efecto negativo principal de la criopreservación sucede al disminuir la temperatura, ya que ocurren cambios de estado de líquido a sólido del agua intracelular y extracelular. La mortalidad de los espermatozoides es mayor entre los -15°C y -60°C (*Yeste, et al., 2017*). Esta sensibilidad se caracteriza por una pérdida irreversible de la permeabilidad selectiva y de la integridad de la membrana plasmática, desencadenando la muerte de las células. Aunque las alteraciones que se describen en mayor grado son en la motilidad espermática, en la fluidez e integridad de la membrana plasmática, así como en sus canales de iones permitiendo la entrada de Ca^{2+} , bicarbonato y otros componentes del medio (*Bailey et al., 2008*) alterando la homeostasis y facilitando la degradación de proteínas y ARNm (*Yeste,*

et al., 2017). El daño de la membrana afecta aún más la capacidad de los espermatozoides para unirse las células epiteliales de la unión uterotubárica y el istmo oviductal, que son necesarios para establecer el reservorio de espermatozoides y el éxito de la fertilización (*Knox, 2015*). Por lo que resulta de suma importancia controlar el tiempo de congelación y descongelación, así como la inclusión de agentes crioprotectores en el diluyente empleado.

2. Efectos de la adición del agente crioprotector.

A pesar del tipo de crioprotector empleado para optimizar los protocolos de congelación, los efectos negativos en los espermatozoides causados por las restricciones osmóticas debidas a su adición o eliminación y la cristalización del agua, añaden más efectos físicos dañinos a la membrana plasmática. La permeabilidad de la membrana al agua y al crioprotector, así como su fluidez, son a menudo propuestos como parámetros clave en la capacidad de los espermatozoides para soportar estas limitaciones inducidas por la congelación-descongelación.

Los agentes crioprotectores generalmente se clasifican en permeables (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, metanol y amidas) y no permeables (monosacáridos y disacáridos, polivinilpirrolidona, e hidroxietilalmidón). Los crioprotectores permeables atraviesan la membrana plasmática de la célula debido a su peso molecular bajo y carga, mientras que los crioprotectores no permeables son incapaces de atravesar la membrana plasmática (*Vafaei, 2019*).

Los agentes crioprotectores tienen la función de disminuir la temperatura de nucleación del hielo y el tamaño de los cristales de hielo extracelulares, además, aumentan la permeabilidad de las membranas al agua en temperaturas bajo cero, permitiendo que las células continúen deshidratándose durante las fases iniciales de la congelación disminuyendo la formación de hielo intracelular (*Zhang, 2016*).

El glicerol es el agente crioprotector permeable más común para la congelación espermática. Sin embargo, produce un efecto tóxico en los espermatozoides relacionado con el estrés osmótico durante el proceso de congelación (*Vafaei, 2019*). La toxicidad intrínseca y osmótica del glicerol ha incentivado la búsqueda de agentes crioprotectores permeables alternativos.

Las mejoras en los protocolos de criopreservación de semen deben considerar mantener la viabilidad espermática mientras se minimizan los cambios similares a la capacitación. Para alcanzar estas metas, las investigaciones que se desarrollan están enfocadas en los siguientes puntos:

- Mejora de los diluyentes utilizados durante el proceso de congelación, buscando nuevos crioprotectores (*Kaeoket, 2012*), mejora del uso del glicerol como crioprotector, suplemento de sustancias o compuestos añadidos a los diluyentes tales como plasma seminal (*Gómez-Fernández, et al., 2012*) y antioxidantes (*Malo, et al., 2012*).
- Reducir la duración de la fase de enfriamiento a 5°C. Se ha comprobado que el semen porcino puede llegar a tolerar velocidades de enfriamiento rápidas antes de ser congelado, (*Juárez, et al., 2011*) de forma que, se realice en 8 minutos a diferencia de 90 a 120 minutos de forma convencional (*Eriksson y Rodriguez-Martínez, 2000; Wallgren, 2011*).
- Existen investigaciones enfocadas en modificaciones al medio en el que se encuentran los espermatozoides. Se ha demostrado que al controlar condiciones específicas de presión hidrostática como tratamiento previo a la conservación *in vitro*, se han mejorado los niveles de tolerancia a las bajas temperaturas reflejados en la motilidad e integridad membranal (*Pribenszky, et al., 2011*), observándose mejoría en la supervivencia y fertilidad.

- En otros trabajos se pretende modificar las membranas espermáticas durante su formación a través de la alimentación de los individuos, suplementando su dieta con ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3 (*Castellano, et al., 2010*).
- Debido a que un proceso que se repite tanto en la capacitación como después de la criopreservación es la pérdida de colesterol en la membrana plasmática de los espermatozoides (*Visconti, et al., 1999; Cerolini, et al., 2001; Kadirvel, et al., 2009*). La modificación de la estructura molecular de la membrana plasmática realizando tratamientos antes de la congelación, en concreto aportando colesterol siendo transportado a través de ciclodextrinas (*Blanch et al., 2012*), ha mostrado resultados positivos en el semen descongelado.

De forma experimental se sabe que el colesterol regula el orden de la cadena de lípidos, relacionado espesor de membrana, fluidez, permeabilidad al agua y otras moléculas, además de la transición de la fase lipídica. Es por ello que se ha explorado la hipótesis de que mediante la modificación del contenido de colesterol de las membranas espermáticas, sea posible estabilizarlas ante la criopreservación (*Müller, et al., 2008*).

El incremento de colesterol en la membrana plasmática indu mayor resistencia al enfriamiento y al choque osmótico o a la destrucción mecánica de los espermatozoides, interactúa con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos inhibiendo la cristalización de los hidrocarburos a bajas temperaturas y modulando de esta manera su fluidez (*Watson, 1981*). El colesterol intercala su anillo esteroidal rígido entre las cadenas de ácidos grasos haciéndola más estable (*Blanch, et al., 2012*). La composición molecular de la membrana plasmática es esencial para regular la entrada y salida de sustancias en la célula. Por ello se considera que la permeabilidad celular depende fundamentalmente de la composición de lípidos, especialmente del colesterol. La proporción de colesterol en la membrana plasmática, además de tener una función estructural, participa en el mantenimiento de su funcionalidad después del proceso de congelación incidiendo en el

grado de supervivencia del espermatozoide (Mocé, et al., 2010). Debido a la importancia del colesterol se han empleado moléculas que pueden actuar como vehículo para su incorporación a las membranas espermáticas, durante la etapa de enfriamiento previa a la congelación. Algunos autores han obtenido éxito al utilizar ciclodextrinas saturadas de colesterol en los diluyentes para semen de especies como el equino, el bovino, porcino y ovino (Mocé, et al., 2010).

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos naturales derivados del almidón (Figura 1), formados por 1-4 unidades de β - glucopiranososa con una cara hidrofílica que les permite ser solubles en agua y una cara hidrofóbica pudiendo llegar a encapsular compuestos hidrofóbicos como el colesterol. Estas moléculas tienen una gran afinidad *in vitro* por los esteroides, y actúan de manera muy eficiente en retirar colesterol de las membranas de distintos tipos celulares, incluido el espermatozoide (Visconti, et al., 1999). Al tratarse de oligómeros cíclicos de glucosa forman complejos solubles en agua con otras moléculas que por sí mismas no lo son, como el colesterol, por lo que se han asociado al aumento en la supervivencia espermática, cuando son incluidas en los diluyentes de congelación en especies como los bovinos (Combes, et al., 2000; Purdy y Graham, 2004; Morrier, et al., 2004).

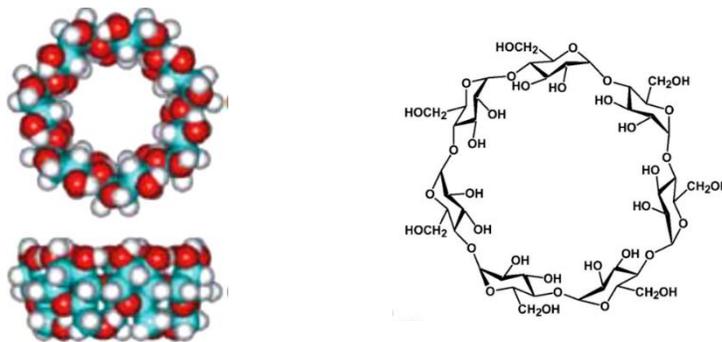


Figura 1. Representación de moléculas de ciclodextrinas formadas por unidades de glucosa β -CD ($C_6H_{10}O_5$)₇ (Pavlov, et al, 2010).

El efecto positivo al incluir ciclodextrinas en la dilución de semen se debe a que al contacto con los espermatozoides son capaces de transferir el colesterol (si han sido presaturadas con colesterol, figura 2) o de extraerlo de las membranas (en caso de que no haber sido presaturadas) probablemente mediante un gradiente de concentración (*Moore, et al., 2005*). Es decir que el contenido de colesterol en la membrana plasmática de los espermatozoides puede ser modificado.

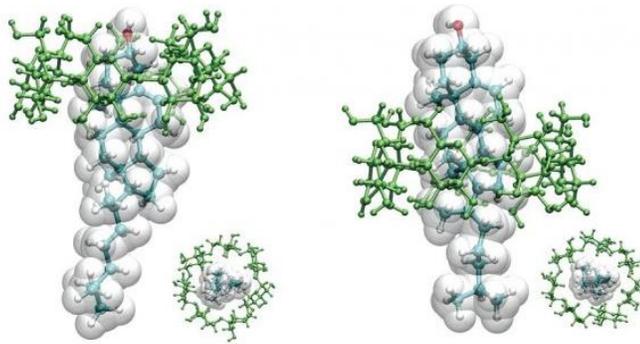


Figura 2. Representación tridimensional de las moléculas de colesterol encapsulado en ciclodextrinas (*Navratil, et al., 2003*).

Existen estudios que demuestran que la incubación de espermatozoides con ciclodextrinas saturadas con colesterol incrementa su proporción en las membranas de los espermatozoides de ganado bovino, ovino y equino, en dos o tres veces (*Mocé, et al., 2010*), pudiendo utilizarse como un tratamiento previo al enfriamiento en la técnica de criopreservación.

En investigaciones con semen de bovino la inclusión de diluyentes con ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) han obtenido mayor porcentaje de motilidad e integridad en la membrana de los espermatozoides posterior a la descongelación en comparación con espermatozoides sin CLC (*Purdy y Graham, 2004*). Sin embargo, este procedimiento aún no ha sido optimizado para los protocolos de congelación de espermatozoides porcinos, ya que se desconoce cómo el colesterol regula la criosupervivencia de los espermatozoides en esta especie. Por lo tanto, resulta de interés la comprensión de la regulación del colesterol en la protección de la membrana y la viabilidad de los

espermatozoides porcinos durante un procedimiento convencional de congelación de semen.

HIPÓTESIS

El tratamiento con ciclodextrinas (metil- β -ciclodextrinas) saturadas de colesterol (CLC), previo a la criopreservación de los espermatozoides, mejorará los índices de viabilidad y motilidad, así como la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides porcinos tras la descongelación.

OBJETIVO GENERAL

Mejorar la viabilidad, movilidad e integridad de las membranas espermáticas del semen porcino descongelado, utilizando diferentes concentraciones de CLC durante el proceso de criopreservación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptación de la técnica de criopreservación estandarizada utilizada en el Departamento de Reproducción Animal, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid (España), a la inclusión de concentraciones crecientes de CLC durante la fase de enfriamiento.
- Valoración de la viabilidad y motilidad de espermatozoides criopreservados tratados con CLC y análisis de la integridad de las membranas plasmáticas y acrosomal de muestras descongeladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales.

El trabajo se realizó en laboratorio de Fisiología y Biotecnología Reproductiva en la Especie Porcina del departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid (España). Se utilizaron 6 sementales híbridos de Large White x Landrace alojados en el animalario del INIA, el estudio se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD53 / 2013, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 / UE sobre la protección de los animales que se utilizan en la experimentación.

2. Colección seminal.

Los sementales estaban entrenados para realizar la recolección de semen utilizando la técnica de mano enguantada sobre un potro de recogida, teniendo una frecuencia de recolección semanal. Se emplearon dos termos precalentados a 37°C, que contenían cada uno un vaso recolector con un filtro para separar el gel o tapioca del eyaculado. En el primer recipiente se recogió la fracción rica o espermática, mientras que en el segundo recipiente se depositó la fracción pobre o post-espermática. Para el presente trabajo únicamente se utilizó la fracción rica.

3. Valoración del eyaculado.

El eyaculado fue transportado al laboratorio para su análisis en los primeros 15 a 30 minutos posteriores a la colección. El filtro con el gel del eyaculado se desechó, para iniciar el proceso de valoración seminal. Se descartaron eyaculados que no contaran con motilidad progresiva $\geq 80\%$ en el momento de la recolección, y que superaran el 20% de morfoanomalías espermáticas totales, más de un grado de aglutinación (+) y con porcentajes de anomalías acrosomales mayores a 20%. Se congelaron 6 eyaculados por macho que cubrieron los criterios de selección.

3.1 Determinación del volumen.

Para la valoración del volumen recolectado se utilizó una balanza granataria con error de ± 1 g. Se consideró una equivalencia de 1 g para 1ml.

3.2 Cálculo de la concentración espermática.

El semen de la fracción rica del eyaculado se diluyó en una proporción 1:100 (v/v) con solución fisiológica con formol (solución al 0.9% v/v de cloruro de sodio y 0.3 % de formol al 38% v/v). Posteriormente se llenó por capilaridad la cámara de conteo celular Bürker. El conteo de espermatozoides se llevó a cabo utilizando microscopia de contraste de fases a x400 aumentos. Se contabilizaron los espermatozoides que contenían la superficie de 40 cuadros (con superficie de 0.0025 mm^2) por duplicado para obtener el promedio, una vez que los conteos no tuviesen una diferencia mayor al 5% entre ellos. El número de espermatozoides contados (N) se multiplicaron $\times 10^7$ para conseguir la concentración espermática por mililitro.

3.3 Anormalidades espermáticas.

Para realizar su cálculo se añadieron 20 μl de semen en 400 μl de solución isosmótica de glutaraldehído al 2%. Una vez situada una muestra de esta dilución entre portaobjetos y cubreobjetos, se visualizó la muestra en microscopia de contraste de fases a x400 aumentos. Se contabilizaron las anomalías espermáticas presentes en 100 espermatozoides. Las anomalías espermáticas buscadas para ser documentadas fueron: gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal y colas en látigo.

3.4 Valoración de la motilidad.

Una gota del semen obtenido fue colocada entre portaobjetos y cubreobjetos, ambos atemperados a 37°C . La muestra se visualizó utilizando microscopía de contraste de fases, a x100 aumentos, para asignar un valor porcentual de

espermatozoides con movimiento, los valores se consideraron en un rango de 0 a 100%.

La calidad del movimiento se valoró de acuerdo con la siguiente escala puntuada de 0 a 5.

Calidad	Características
0	Espermatozoides completamente inmóviles.
1	Movimientos lentos del flagelo, y las cabezas de los espermatozoides fijas.
2	Movimientos en círculos o vibratorios dentro del eje del espermatozoide.
3	Movimientos en círculos o vibratorios fuera del eje del espermatozoide.
4	Movimiento progresivo.
5	Movimiento progresivo muy rápido.

3.5 Grado de aglutinación

La aglutinación se determinó de manera simultánea a la valoración de la motilidad, según la cantidad de espermatozoides aglutinados por campo visualizado.

De forma que se asignó el valor de negativo (-) cuando involucra a menos de 10 espermatozoides, un grado (+) con 10 a 50 espermatozoides, dos grados (++) siendo más de 50 espermatozoides unidos y tres grados (+++) en el caso de la totalidad de espermatozoides.

4. Dilución del eyaculado.

Una vez registradas las características de los eyaculados, se realizó una dilución 1:1 (v/v) en medio BTS (*Beltville Thawing Solution*) atemperado a 37°C. El diluyente BTS se preparó con la siguiente formulación: Glucosa 205 mM; Citrato de sodio 20.4 mM; Bicarbonato de sodio 15 mM; EDTA 3.6 mM; Cloruro de potasio 10 mM (*Roca, et al., 2004*).

5. Preparación de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC).

Se empleó la técnica descrita por *Purdy P. y Graham J. (2004)*, se disolvieron 200 mg de colesterol (77.3307 mol) en 1 ml de cloroformo (solución A) y 500 mg de metil- β -ciclodextrina (660 mol) en 1 ml de metanol (solución B). Posteriormente, se añadieron 225 μ l de la solución A en la solución B hasta homogeneizar por completo; la solución resultante se colocó en placas de Petri de vidrio, para remover los solventes por evaporación. Los cristales resultantes fueron almacenados en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso. De manera previa al procesamiento del semen los cristales pulverizados fueron pesados para obtener la cantidad de producto necesario para adicionar al medio BTS según el tratamiento correspondiente.

6. Preparación de los grupos de trabajo.

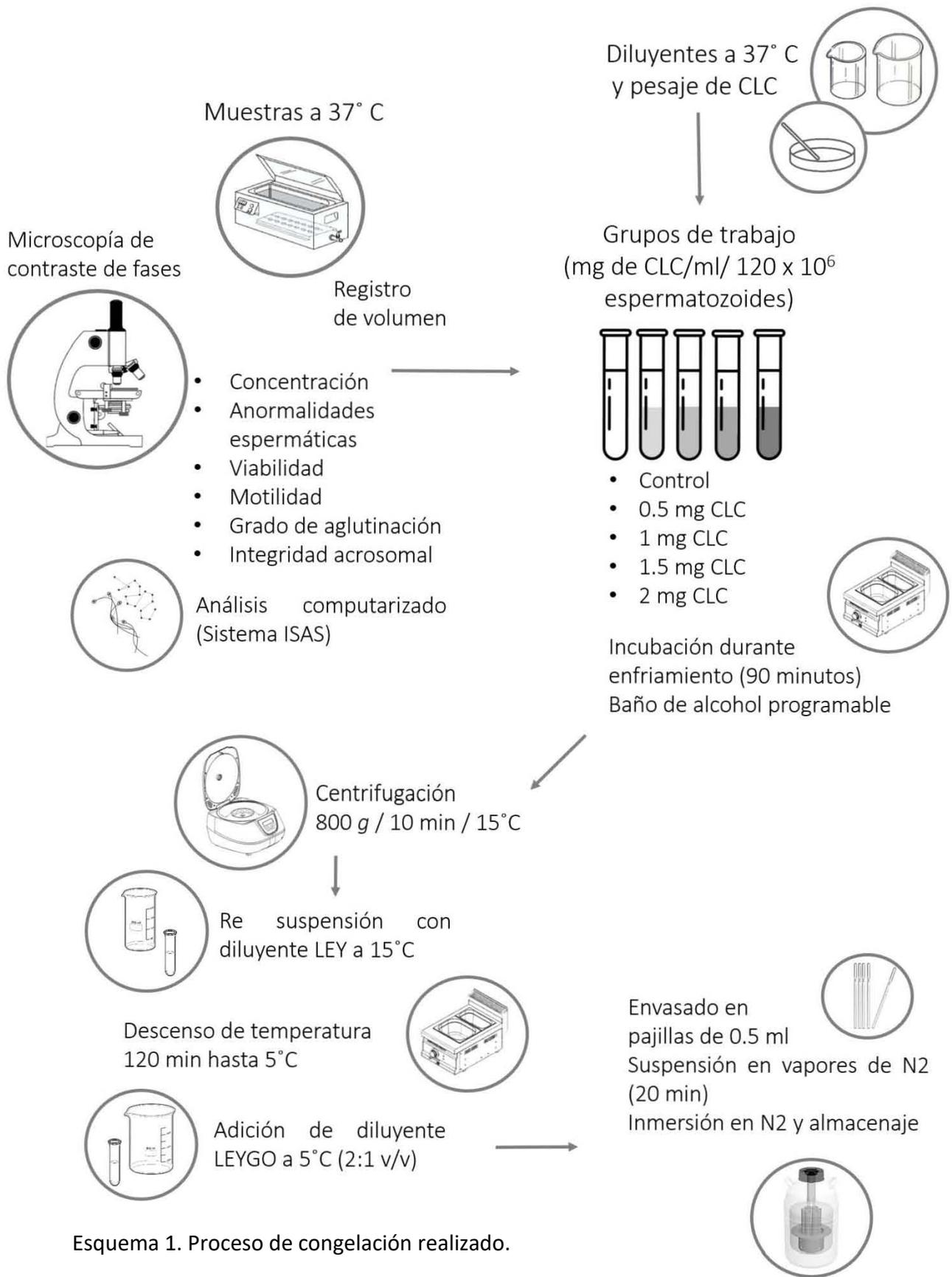
Previo a iniciar el proceso de congelación, el semen diluido se dividió en 5 grupos de trabajo: control en ausencia de CLC, a los cuatro grupos restantes se les adicionaron 0.5, 1, 1.5 o 2 mg de CLC por ml con 120×10^6 espermatozoides cada uno. La incubación de espermatozoides con CLC se realizó durante el proceso de enfriamiento del protocolo de congelación.

7. Congelación espermática.

Los medios utilizados en el proceso de congelación fueron:

- Diluyente LEY o Lactosa-yema de huevo: a una solución de lactosa 310 mM se le añaden 20 ml de yema de huevo; 328 mOsm y pH de 6.2 (modificado de *Westendorf, et al., 1975*).
- Diluyente LEYGO, su composición es: 91% del medio LEY, más 1.5% (v/v) del agente tensoactivo Orvus ES Paste[®], y 7.5% (v/v) del crioprotector glicerol; 1700 mOsm pH: 6.6 (LEYGO; *Westendorf, et al., 1975*).

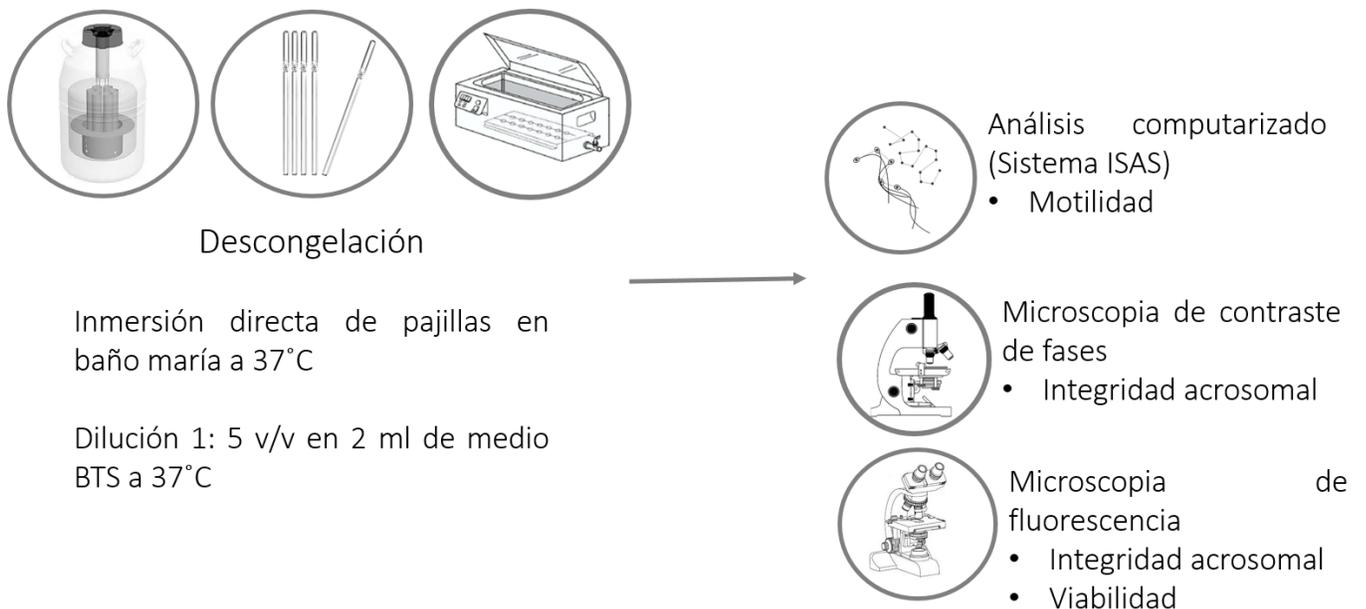
Una vez preparados los 5 grupos de trabajo, se inició con el descenso de la temperatura hasta llegar a 15°C en un periodo de 90 minutos, mediante un baño de alcohol programable. Una vez alcanzada la temperatura, las muestras se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos. Se retiró el plasma seminal y la pastilla espermática (pellet) fue homogeneizada con diluyente LEY atemperado a 15°C. En una segunda fase de enfriamiento, se colocaron nuevamente en el baño de alcohol programable hasta llegar a 5°C durante 120 minutos. Los espermatozoides fueron diluidos con medio LEYGO atemperado a 5°C (2:1; v/v) hasta llegar a una concentración final de 500×10^6 espermatozoides/0.5 ml y 3% glicerol y se envasó en pajillas de 0.5 ml. Después del sellado de las pajillas con alcohol polivinílico, fueron suspendidas sobre vapor de nitrógeno líquido, a una altura de 4 cm durante 20 minutos, para posteriormente ser inmersas en nitrógeno líquido para su almacenaje (esquema 1).



Esquema 1. Proceso de congelación realizado.

8. Descongelación de pajillas.

Se realizó la inmersión directa de 36 pajillas por grupo experimental en baño maría a 37°C durante 20 segundos. Pasado este tiempo se retiró el sello de las pajillas para incorporar su contenido en 2 ml de medio BTS a la misma temperatura. El semen reconstituido se sometió a las pruebas de contrastación para valorar la viabilidad espermática post-descongelación (esquema 2).



Esquema 2. Proceso de descongelación realizado.

9. Valoraciones del semen post-descongelación.

9.1 Análisis computarizado de la motilidad espermática (Sistema ISAS).

Con este programa informático se registró la motilidad espermática obteniendo diversos parámetros, que se reflejan en el cuadro 1. Se efectuó el análisis automático del semen utilizando el módulo de movilidad espermática. Una vez descongelado el semen se cargó la cámara ISAS (imagen 1a), visualizando en

microscopia de contraste de fases a x100 aumentos, con una platina microscópica a 37°C tal y como se aprecia en la imagen 1b.

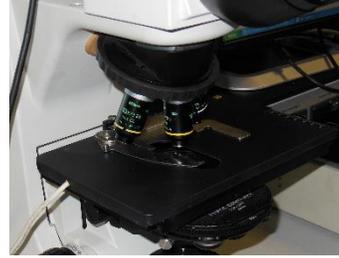
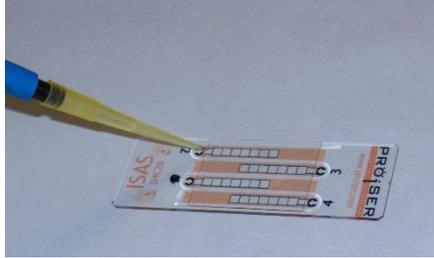


Imagen 1a. Llenado de la cámara ISAS con semen descongelado.
Imagen 1b. Platina microscópica.

Mediante el programa de ISAS se capturaron 5 videos de diferentes campos para obtener el informe global por muestra; de todos los parámetros que se relacionan en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Relación de parámetros de motilidad espermática evaluados con el sistema ISAS.

Parámetro	Siglas	Descripción del parámetro (%)
Espermatozoides móviles progresivos	MP	Tienen movimiento progresivo
Espermatozoides móviles no progresivos	MNP	No tienen movimiento progresivo
Espermatozoides estáticos	E	No tienen movimiento
Espermatozoides rápidos	R	Tienen movimiento rápido
Espermatozoides velocidad media	M	Tienen movimiento medio
Espermatozoides lentos	L	Con movimiento lento
Velocidad curvilínea (VCL)	VCL	Distancia recorrida a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea (VSL)	VSL	Distancia recorrida en el primer punto y el último de su trayectoria.
Velocidad media (VAP)	VAP	Distancia recorrida a lo largo de su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	LIN	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de rectitud	STR	Relación porcentual entre la VSL y la VAP
Índice de oscilación	WOB	Relación porcentual entre la VAP y VCL
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide	ALH	Desplazamiento de la cabeza del espermatozoide respecto de la trayectoria media
Frecuencia de batida del espermatozoide	BCF	Promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio.

9.2 Valoración de la integridad acrosomal.

Se añadieron 20 µl de semen descongelado en 400 µl de solución isosmótica de glutaraldehído al 2%. Una vez situada una muestra de esta dilución entre

portaobjetos y cubreobjetos, se visualizó la muestra en microscopia de contraste de fases a x1000 aumentos.

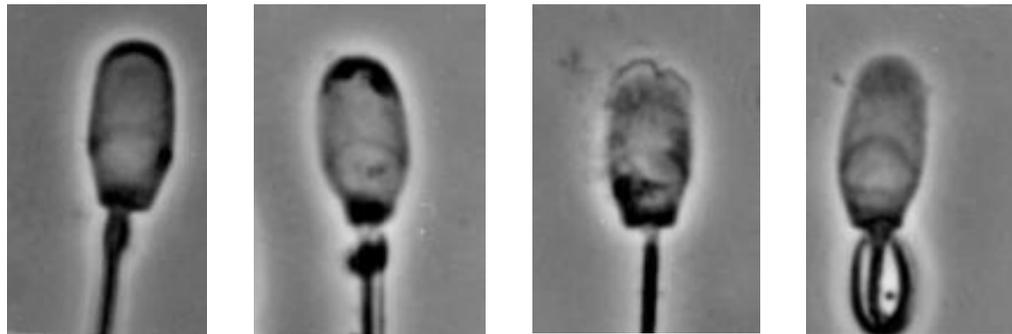
La integridad acrosomal se reportó en porcentajes según la siguiente clasificación (imagen 2):

Acrosomas normales: aquellos donde se distingue la continuidad de los bordes apical e interno del acrosoma.

Acrosomas dañados: el borde apical e interno del cromosoma presenta discontinuidad.

Acrosomas perdiéndose: se aprecia la membrana acrosómica extendida e irregular, de color transparente por la pérdida de las enzimas acrosomales

Acrosomas perdidos: aquellos que han perdido en su totalidad la membrana acrosómica por acción de las enzimas acrosomales



Acrosoma
normal

Acrosoma
dañado

Acrosoma
perdiéndose

Acrosoma
perdido

Imagen 2. Visualización de los distintos estados del acrosoma que se pueden apreciar según su integridad. (Microscopio de contraste de fases x1000 aumentos).

9.3 Evaluación de la viabilidad espermática

La funcionalidad espermática se evaluó mediante tinciones para verificar la integridad de la membrana plasmática, como indicador indirecto de la viabilidad post-descongelación.

Los fluorocromos utilizados fueron Ioduro de Propidio (IP) que tiñe el ADN de los espermatozoides con membrana plasmática dañada y lectinas conjugadas con fluoresceína; PNA (Aglutinina de *Arachis hypogaea*) que se une a residuos de β -galactosa asociados a la membrana acrosomal externa, para permitir la diferenciación de espermatozoides con acrosomas intactos y espermatozoides sin acrosoma, con acrosoma dañado y con el acrosoma presente sólo en la región ecuatorial.

Las soluciones de los fluorocromos se mantuvieron almacenadas en congelación (-20°C) en condiciones de oscuridad hasta su uso.

Los espermatozoides fueron contabilizados según la inclusión o exclusión del IP, considerando que los que tuviesen daños en la membrana, se observaban con las cabezas de color rojo como indicativo de la unión de la tinción con el ADN del espermatozoide, mientras que los espermatozoides cuya membrana continúa siendo impermeable las cabezas se observan de color verde, mientras que la tinción de PNA permitió la visualización de las membranas acrosomales y la tinción de Rodamina 123 mostró las mitocondrias con actividad en color verde (González, 2010).

Metodología.

1. Dilución 1:20 de semen en BTS,
475 μ l de BTS y 25 μ l de semen.
2. Se colocaron 250 μ l de la muestra en un vial color ámbar
3. Se añadieron de manera simultánea: 2 μ l de la solución de IP, 3 μ l de la solución con Rodamina 123 y 5 μ l de la solución con PNA.

4. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 37° C en estufa de cultivo.
5. Finalmente se colocaron 5 µl de la muestra teñida en una laminilla con cubreobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia.

10. Análisis estadístico.

En todos los experimentos se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el procedimiento MIXED del software SAS (versión 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), las diferencias entre medias se compararon mediante la prueba de Mínimos cuadrados (Least Square Means, LSmeans). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para un valor de $P < 0.05$. Todos los resultados están expresados en forma de media \pm error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

Los espermatozoides móviles, determinados por el análisis computarizado (ISAS), tratados con CLC, después de ser descongelados se muestran en el cuadro 2. El porcentaje de espermatozoides móviles del grupo control fue 19.03% y se incrementó a 25.06% con la inclusión de 1 mg/ml de CLC. Los espermatozoides con movimiento progresivo en los controles fueron 12.42%, el incremento significativo ($p < 0.05$) registrado se observó como efecto de la incubación con 1.5 mg/ml de CLC. Los espermatozoides con los tres tipos de velocidad cuantificados (VCL, VSL y VAP), disminuyeron en el grupo con 0.5 mg/ml de CLC, con respecto al grupo control. Los índices de linealidad y oscilación se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en el grupo incubado con 1 mg/ml de CLC, respecto al grupo control, mientras que el índice de rectitud no se modificó con ningún tratamiento.

La integridad acrosomal de las muestras descongeladas (cuadro 3) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para los espermatozoides con acrosomas dañados entre los grupos control e incubados con 1 y 2 mg de CLC; de igual forma entre el grupo control y el grupo con 0.5 mg de CLC. Para los otros parámetros evaluados en la integridad acrosomal, las diferencias no fueron significativas como resultado del diseño experimental.

La viabilidad espermática observada con 1 mg/ml de CLC fue mayor significativamente ($p < 0.05$) (46.49%) que la obtenida con el grupo control (31.50%) (cuadro 4).

Cuadro 2. Valores referidos a la motilidad espermática con el sistema ISAS, según la concentración de CLC utilizada en la criopreservación del semen.

Parámetros registrados	Concentración de CLC (mg/ml/ 120 x 10 ⁶ espermatozoides)				
	0	0.5	1	1.5	2
% de espermatozoides					
Móviles	19.03 ^a ± 2.06	20.66 ± 2.03	25.06 ^b ± 2.12	20.91 ± 2.14	23.20 ± 2.35
Estáticos	80.97 ^a ± 0.11	79.34 ± 0.12	74.94 ^b ± 0.11	79.09 ± 0.11	76.80 ± 0.12
Móviles progresivos	12.42 ± 1.72	9.72 ^a ± 1.70	13.83 ± 1.76	15.94 ^b ± 1.79	13.50 ± 1.96
Móviles no progresivos	6.61 ^{a,d} ± 1.10	10.93 ^c ± 1.08	11.24 ^{b,e} ± 1.13	7.64 ± 1.14	9.70 ^f ± 1.25
Con velocidad rápida	11.39 ^b ± 1.12	6.93 ^a ± 1.17	11.87 ^b ± 1.21	13.60 ^b ± 1.23	13.00 ^b ± 1.35
Con velocidad media	3.74 ^b ± 0.61	4.68 ± 0.60	5.54 ^a ± 0.63	3.57 ^b ± 0.64	5.04 ± 0.70
Con velocidad lenta	3.98 ^{b,d} ± 1.13	9.10 ^a ± 1.12	7.64 ^c ± 1.16	3.89 ^{b,d} ± 1.18	5.16 ^b ± 1.29
Velocidad curvilínea (VCL)(µm/s)	74.77 ^b ± 1.13	49.86 ^a ± 3.68	61.79 ^b ± 3.83	75.17 ^b ± 3.88	71.15 ^b ± 4.25
Velocidad rectilínea (VSL)(µm/s)	28.16 ^b ± 1.30	19.46 ^a ± 1.29	27.29 ± 1.34	27.72 ± 1.36	26.42 ^b ± 1.49
Velocidad lineal (VAP) (µm/s)	40.90 ^b ± 1.74	28.4 ^a ± 1.72	36.70 ^b ± 1.79	41.00 ^b ± 1.81	38.6 ^b ± 1.98
Índice de linealidad (%)	38.89 ^b ± 2.03	43.48 ^b ± 2.01	44.92 ^a ± 2.09	38.72 ± 2.12	41.93 ± 2.32
Índice de rectitud (%)	68.11 ± 1.93	69.06 ± 1.91	72.28 ± 1.98	67.74 ± 2.01	70.51 ± 2.20
Índice de oscilación (%)	56.48 ^{b,d} ± 1.68	62.15 ^a ± 1.91	61.67 ^c ± 1.72	56.64 ^{b,d} ± 1.75	57.90 ± 1.91

Valores expresados: media ± error estándar
Medias en una misma fila con una letra común no presentan diferencias significativas (p<0.05)

Cuadro 3 .- Efecto de las CLC en el estado del acrosoma post-descongelación

CLC (mg/ml/120x10⁶ espermatozoides)

Espermatozoides con acrosoma (%)	0	0.5	1	1.5	2
Normales	59,26 ± 2,50	56,52 ± 2,47	58,68 ± 2,57	58,39 ± 2,61	54,40 ± 2,85
Dañados	16,44 ^{a,c} ± 1,16	19,73 ^d ± 1,15	20,43 ^b ± 1,19	18,11 ± 1,21	20,03 ^b ± 1,33
Perdiendo	22,28 ± 2,08	21,02 ± 2,05	18,00 ± 2,14	21,03 ± 2,16	22,97 ± 2,37
Perdidos	2,03 ± 0,44	2,72 ± 0,44	2,89 ± 0,45	2,47 ± 0,46	2,60 ± 0,50

Valores expresados: Media ± Error estándar, n= 40

Medias de una misma fila con una letra común no presentan diferencias significativas (p<0.05)

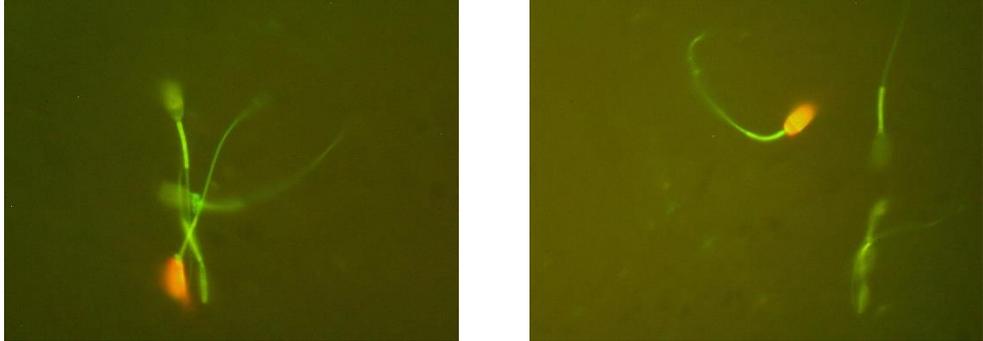
Cuadro 4 .- Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos post-descongelación, según la concentración de Ciclodextrinas Saturadas con Colesterol (CLC) utilizados en la criopreservación del semen

CLC (mg/ml/120x10⁶ espermatozoides)

Espermatozoides (%)	Control	0.5	1	1.5	2
Vivos	31.50 ^b ± 2.77	37.98 ^b ± 2.47	46.49 ^a ± 2.85	35.43 ^b ± 2.89	36.54 ^b ± 3.16
Muertos	68.50 ^b ± 2.77	62.02 ^b ± 2.74	53.51 ^a ± 2.85	64.57 ^b ± 2.89	63.46 ^b ± 3.16

Valores expresados: Media ± Error estándar, n= 40

Medias de una misma fila con una letra común no presentan diferencias significativas (p<0.05).



Imágenes 3 y 4. Fotografía de las tinciones bajo el microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides con cabezas de color rojo se consideran muertos como reflejo de la pérdida de la permeabilidad de su membrana plasmática, mientras que los espermatozoides con membranas intactas se tiñeron de color verde.

DISCUSIÓN

En este trabajo los parámetros valorados en las muestras descongeladas fueron la motilidad analizada mediante el sistema computarizado (ISAS), la integridad acrosomal y la viabilidad. El resultado que destaca y responde a la hipótesis planteada, es el mayor porcentaje de viabilidad obtenido a través de la incubación con 1 mg/ml de CLC (46.9%) referido en el cuadro 4, coincidiendo con los reportes de algunas investigaciones en donde refieren el incremento entre 10 y 20 puntos porcentuales en comparación con espermatozoides no tratados (*Rajoriya, et al., 2019*). Este efecto puede estar relacionado con el posible aumento de la proporción entre colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática, lo cual reduce la ruptura de las membranas a causa de la transición de fase de los fosfolípidos que las componen, sugiriendo que el tratamiento de los espermatozoides con ciclodextrinas saturadas de colesterol antes de la criopreservación podría reducir la sensibilidad de las membranas de los espermatozoides al daño por enfriamiento, al eliminar o al menos minimizar la separación de fase lateral de los lípidos (*Watson, 1981*).

Mientras que en otras especies se han obtenido resultados exitosos por la inclusión de CLC durante la fase de enfriamiento, comúnmente los grupos experimentales se realizan con concentraciones entre 1 y 2 mg de CLC/ml de diluyente con 120×10^6 espermatozoides, o hasta 7.5 mg de CLC/ ml en algunas especies como los bovinos (*Purdy y Graham, 2004*). Considerando que en estudios previos (*Rajoriya, et al., 2019*) se ha comprobó que existe una cantidad límite de colesterol que puede incorporarse a las membranas espermáticas, el presente tuvo la finalidad de identificar la concentración de CLC con mejores efectos en la criopreservación. Tradicionalmente los diluyentes de congelación incluyen yema de huevo, debido a que el efecto positivo está relacionado con el contenido de colesterol (*Blanch, et al., 2014*) y las lipoproteínas de baja densidad (*Muhamma., et al., 2019*) minimizando el estrés causado por el enfriamiento; sin embargo, al ser un producto de

origen animal existe el riesgo potencial de contaminación microbiológica de los diluyentes, así como una composición variable (*Muhammad, et al., 2019*). Basado en que los porcentajes de movilidad más altos de los espermatozoides descongelados (25.06 ± 2.12) y vivos (46.49 ± 2.85) fueron resultado de la incubación con CLC en concentración de 1 mg/ml de diluyente con 120×10^6 espermatozoides se puede considerar que no se requiere concentración mayor de CLC, pudiendo ser una estrategia para el desarrollo de diluyentes con composición definida químicamente.

A pesar del empleo de protocolos de congelación optimizados, su uso en comparación con el semen fresco es limitado debido a tener menor cantidad de espermatozoides móviles, asumiendo que sean viables. La valoración de la motilidad mediante el uso del sistema ISAS permite reducir la subjetividad a diferencia de la estimación visual. Considerando que la población viable posterior a la congelación puede verse afectada teniendo menor motilidad, los resultados obtenidos destacan que la mayor proporción de espermatozoides con motilidad progresiva (15.94 ± 1.79) fue obtenido en el grupo con 1.5 mg de CLC (Cuadro 2).

La diferencia entre los porcentajes medios de espermatozoides descongelados vivos y móviles 21.43% para el grupo de 1 mg de CLC ($46.49\% - 25.06\%$), al igual que en otras investigaciones (*Medrano, et al., 2002*), puede estar relacionado con el estado metabólico bajo de una población espermática (*Flores, et al., 2008*).

Mientras que algunos autores han reportado que los espermatozoides descongelados obtuvieron un aumento significativo en su velocidad media aunado a la disminución en la linealidad media del movimiento progresivo otros, al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio, han mostrado mejorías en algunos parámetros. Para el grupo de tratamiento con 1 mg de CLC se obtuvieron mejores resultados en la linealidad y rectitud del movimiento espermático post descongelación. Los resultados de los parámetros de espermatozoides descongelados pueden deberse a diferencias propias entre los

eyaculados o los diluyentes empleados previos a la congelación. Mientras que, como norma general, en todas las especies de mamíferos estudiadas, los procesos de congelación y descongelación modifican la capacidad de función espermática reflejada por ejemplo en la motilidad, algunos de los mecanismos específicos de dichas alteraciones, como cambios en actividad mitocondrial y el aumento en niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno continúan siendo investigadas (Flores, *et al.*, 2008).

El colesterol empleado en la incubación de espermatozoides durante la fase de enfriamiento tiene la capacidad de modificar dominios de la membrana plasmática de los espermatozoides dependiendo de la composición lipídica o el grado de saturación de los ácidos grasos de dominios específicos de las membranas espermáticas (Müller K., *et al.*, 2008). En algunas especies como equinos o ratones se ha reportado que los efectos positivos de la inclusión de CLC resultaron ser benéficos en mayor proporción en individuos clasificados como “malos congeladores” que en individuos clasificados como “buenos” (Müller, *et al.*, 2008).

La membrana plasmática es una estructura altamente dinámica que regula no solo el intercambio extracelular sino también el proceso de fertilización. Diversos estudios han investigado acerca del impacto de las modificaciones en el contenido de colesterol de las membranas plasmáticas y su afeción en parámetros funcionales de la célula como la motilidad y la capacidad de fertilización, concluyendo que los espermatozoides son células con una capacidad alta de adaptarse a un amplio rango de concentraciones de colesterol en sus membranas plasmáticas. Es por ello que la alteración en las propiedades biofísicas como es la estructura de la membrana plasmática ha mostrado estar relacionado con la resistencia al estrés osmótico al ser dependiente de la permeabilidad al agua (Müller, *et al.*, 2008). Sin embargo ante la inclusión de las CLC como vehículo para la incorporación de colesterol a las membranas espermáticas, otras investigaciones (Yong-Seung, *et al.*, 2015) refieren que ocurre de manera distinta en distintos compartimentos de la

membrana (región acrosomal, región post acrosomal de la cabeza, pieza intermedia y pieza principal) es por ello que la reducción en la fertilidad del semen descongelado en comparación al semen fresco además de relacionarse con menor viabilidad al descongelado se asocia a daños sub-letales en una proporción de la población sobreviviente (*Watson, 2000*) y en el presente estudio a diferencia de otros resultados el efecto positivo en la membrana acrosomal evidenciado por su integridad no fue encontrado como respuesta de la inclusión de CLC.

Sin embargo, la evaluación de la integridad de la membrana acrosomal en el presente trabajo mostró ser mayor en comparación con el porcentaje de viabilidad espermática, esto puede ser explicado por teorías antes expuestas en investigaciones que consideran que el acrosoma presenta mayor estabilidad que la membrana plasmática ante fenómenos adversos, entre los cuales se encuentran, la criopreservación (*Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994*).

CONCLUSIONES

El tratamiento de espermatozoides porcinos con CLC previo a la criopreservación beneficia la supervivencia al descongelado de manera similar a otras especies cuyas membranas plasmáticas se consideran susceptibles a daños por congelación (*Combes, et al., 2000, Rajoriya, et al., 2019*). A pesar de existir una población espermática descongelada viva sin motilidad, pudiendo deberse a daños a la membrana mitocondrial durante la congelación referida en investigaciones previas (*Schober, et al., 2007*), la inclusión de las CLC puede relacionarse con el incremento en la motilidad del grupo de tratamiento con 1 mg de CLC. Aunque existen numerosos trabajos previos que incluyen a las CLC como tratamiento previo a la congelación con distintas concentraciones, podemos sugerir que la concentración de 1 mg/ ml de diluyente con 120×10^6 espermatozoides incrementó la proporción de espermatozoides vivos, móviles y aumentó su índice de linealidad, sugiriendo su uso dentro de los protocolos de criopreservación de semen porcino con la finalidad de optimizarlos.

REFERENCIAS

- Bailey JL., Bilodeau JF., Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 2000; 21:1-7.
- Bailey J. L., Lessard C., Jacques J., Bréque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 2008; 70: 1251–1259.
- Bailey J., Morrier A., Cormier N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*. 2003; 83: 393–401.
- Bathgate R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 23–25.
- Blanch E., Tomás C., Graham JK., Mocé E. Response of boar sperm to the treatment with cholesterol-loaded cyclodextrins added prior to cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47: 959-964.
- Blanch E. Tomás C., Hernández M., Roca J., Martínez EA., Vázquez JM., Mocé E. Egg yolk and glicerol requirements for freezing boar spermatazoa treated with methyl- β -cyclodextrin or cholesterol-loaded cyclodextrin. *Journal of Reproduction and Development*. 2014; 60:143-149
- Castellano C., Audet I., Bailey J., Laforest J., Matte J. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology*. 2010; 74: 1482–1490.
- Cerolini S., Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi TM., Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 2001; 121: 395–401.
- Combes GB., Varner DD., Schroeder F., Burghardt RC., Blanchard TL. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Reproduction Fertility Supply*. 2000; 56:127-32.
- Drobnis E., Crowe L., Berger T., Anchordoguy T., Overstreet J., Crowe J. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of experimental zoology*. 1993; 265:432-437.

- Eriksson B.M., Rodríguez-Martínez H., Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-straws. *Animal Reproduction Science*. 2000; 63: 205-220.
- Flores E., Taberner E., Rivera MM., Peña A., Rigau T., Miró J., Rodríguez-Gil JE. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculate. *Theriogenology*. 2008; 70: 936–945.
- Gómez-Fernández J., Gómez-Izquierdo E., Tomás C., Mocé E., De Mercado E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 2012; 133: 109– 116.
- González R. Valoración de la capacidad de criopreservación espermática del semen porcino mediante técnicas de choque *a frigore* y termorresistencia. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad de León. España. 2010
- Green CE., Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 2001; 122: 889–898.
- Herrera JA. Efecto del tipo de azúcar utilizado en el diluyente sobre la criopreservación del semen de cerdo pelón mexicano. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical. Instituto de Conkal. México. 2017.
- Holt. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53: 47-58.
- Juárez JD., Parrilla I., Vázquez JM., Martínez EA., Roca J. Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011; 23: 681–690.
- Kaeoket K. Cryopreservation of Boar Spermatozoa: An Important Role of Antioxidants. *Current Frontiers in Cryopreservation*. 2012; 139-164
- Kadirvel G., Kumar S., Kumaresan A., Kathiravan P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal Reproduction Science*. 2009; 116: 244–253.

- Knox R. V. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015; 50: 90–97.
- Lacalle E., Núñez A., Fernández-Alegre E., Crespo-Félez I., Domínguez J., Alonso M., González-Urdiales R., Martínez-Pastor F. Cold-Shock Test Is a practical method for selecting boar ejaculates yielding appropriate seminal plasma for post-thawing supplementation. *Animals*. 2021; 11: 871.
- Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P., Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*. 2005; 63:411–421.
- Malo C., Gil L., Cano R., González N., Luño V. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. *Andrología*. 2012; 44: 710–715.
- Maxwell WMC. Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*. 1997; 46:408–418.
- Medrano A., Watson P. F., Holt W. V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*. 2002; 123: 315–322.
- Mocé E., Purdy PH., Graham JK., Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves Cryosurvival. *Animal Reproduction Science*. 2010; 118: 236–247.
- Moore AI., Squires EL., Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 2005; 51:241–249.
- Morrier A., Thériault M., Castonguay F., Bailey JL. Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. *Biology of Reproduction*. 2004: 239

- Muhammad A., Rajapaksha K., Boswall L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *Plos One*. 2019; 14 (10).
- Müller K., Müller P., Pincemy G., Kurz A., Labbe C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: Consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2008; 78: 390–399.
- Navratil AM., Bliss SP., Berghorn KA., Haughian JM., Farmerie TA., Graham JK., Clay CM., Roberson MS. Constitutive localization of the Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 31593–31602.
- Ortman K., Rodríguez-Martínez H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa package in plastic bags. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1994; 41:37-47.
- Parks JE., Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992; 29: 255-266.
- Parks J. Hypothermian and mammalian gametes. *Reproductive tissue banking*. 1997; 229-261.
- Pavlov GM., Korneeva EV., Smolina NA., Schubert US. Hydrodynamic properties of cyclodextrin molecules in dilute solutions. *European Biophysics*. 2010; 39:371–379.
- Pribenszky C., Horváth A., Végh L., Huang S-Y., Kuo Y-H., Szenci O. Stress preconditioning of boar spermatozoa: A new approach to enhance semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46 (Suppl. 2): 26–30.
- Purdy PH., Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004; 48: 36–45.
- Rajoriya JS., Singh AK., Ojha BK., Raje A. Role of cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) in cryocapacitation of sperm – A review. *Wayamba Journal of Animal Science*. 2019; 1549121012: 1815 – 1826.

- Roca J., Gil M., Hernández M., Parrilla I., Vazquez J., Martínez E. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*. 2004; 25: 397-405.
- Rodríguez-Martínez H., Wallgren M. Advances in boar semen cryopreservation. *Veterinary Medicine International*. 2010; 2011: 396181.
- Schober D., Aurich C., Nohl H., Gille L., Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2007; 68: 745–754.
- Vafaei F., Kohram H., Zareh-Shahne A., Ahmad E. Influence of different combinations of permeable and nonpermeable cryoprotectants on the freezing capacity of equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2019; 75: 69-73.
- Vadnais M. L., Kirkwood R.N., Tempelman R.J., Sprecher D.J., Chou K. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal Reproduction Science*. 2005; 87: 121–132.
- Visconti PE., Ning X., Fornés MW., Alvarez JG., Stein P., Connors SA., Kopf GS. Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation. *Developmental Biology*. 1999; 214: 429–443.
- Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press. 1981; 189–218.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60–61: 481–492.
- Westendorf P., Richter L., Treu H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr*. 1975; 82:261-300.
- Williams S. Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2013; 37: 207-212.
- Yeste M., Rodríguez-Gil JE., Bonet S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction Development*. 2017; 84:802–813.

- Yong-Seung L., Seunghyung L., Sang-Hee L., Boo-Keun Y., Choon-Keun P. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 2015; 159: 124–130.
- Zhang M. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1858. 2016; 1400-1409.
- Zhang SS., Hu JH., Li QW., Jiang ZL., Zhang XY. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8: 6476-6480.