



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE LA CONGELACIÓN Y
DESCONGELACIÓN SOBRE LA TECA
PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE OVINO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A**

KARINA JIMÉNEZ MORALES

**ASESORES: M.V.Z. ROSA BERTA ANGULO MEJORADA
M.V.Z. JORGE HERNÁNDEZ ESPINOSA**

MÉXICO, D. F., Ciudad Universitaria, 2007.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Para ustedes, Papá, Mamá, lo más importante de mi vida siempre estuvieron cerca de mí apoyándome, con un poco de desesperación pero aun así confiando en su peque, tal vez no creían que lo pudiera lograr pero aquí estoy mostrando que el que persevera alcanza. Gracias Dios por tenerlos conmigo.

A mis hermanos Ramón, Alfredo, Marco y Yanet por consentir a su peque y confiar en mí ¡lo hice!.

A mis 6 pequeños, mis 6 angelitos que quiero tanto son mi motor para hacer mis cosas gracias por hacerme tan feliz, por estar cerca de mí cada uno aporta algo especial, cada uno es parte de mí ojalá quieran a su tía tanto como yo a ustedes, tal vez ahora no lo entiendan pero esto es para ustedes. Anarely, Alfredito, Charito, José Antonio, Jaromy y Lupita.

A ti Jhonatan por estar conmigo durante toda mi carrera, por tu apoyo, por no dejar que la desesperación acabara conmigo, por tus palabras de entusiasmo, cada momento lo haces tan valioso, sabes que eres muy importante, eres el hombre de mi vida, gracias por confiar en mí y quererme tanto. 83 266. Ahora faltas tú.

Norma que te puedo decir, siempre hemos estado tan cerca y tan lejos, pero siempre al pendiente una de la otra, gracias por tu apoyo eres mi mejor amiga, mi hermana, mi confidente, de nuevo gracias por tu confianza y amistad infinita.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores MVZ Rosa B. Angulo M. por su gran paciencia, apoyo y amistad sin armonía no hubiera logrado esto y sobre todo gracias por su asesoría, a MVZ Jorge Hernández por su valiosa dirección, paciencia, tiempo y apoyo en este trabajo.

A la Dra. Ma. De Lourdes Juárez Mosqueda por la orientación, paciencia, tiempo y apoyo que me brindó para este trabajo.

Al MVZ Martín Villalobos que me brindó su amistad y apoyo, siempre estuvo pendiente de este trabajo y en la ayuda para la obtención de las muestras, gracias.

A mis compañeros que tanto me ayudaron y me apoyaron Paola, Karla, Janet y Gaby. Y en especial a Mariana y Víctor que compartimos tanto este trabajo gracias por aguantarme y por tolerar mi humor.

A Salvador, Dania y Cipatli por auxiliarme en todas las cosas del laboratorio sin ustedes no lo habría hecho.

A tí Oscar que me enseñaste tanto y siempre tuviste tiempo para explicarme las cosas y sobre todo por enseñarme que tan maravillosa es la estadística mil gracias.

A tí David por tu gran enseñanza, todo vale la pena y de todo se aprende. Ahora se que nada es imposible. Gracias.

*Y aunque no lo crean formaron parte importante de este trabajo, llegaron justo en el momento indicado, gracias **EKOZ**.*

Al Doctor Carlos Cedillo por el apoyo brindado para la observación de las muestras al microscopio electrónico de transmisión de la Unidad de Microscopía Electrónica de la FMVZ de la UNAM.

Agradezco a la Biol. Sirenia González y a la Biol. Lourdes Rojas de la Unidad de Microscopía del CINVESTAV -IPN por la asesoría técnica.

El trabajo de investigación contó con el apoyo de la DIRECCION GENERAL DE APOYO DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO a través del proyecto PAPIIT: IN 206506-3.

IMPOSIBLE ES SOLO UNA PALABRA QUE USAN LOS HOMBRES DÉBILES PARA VIVIR FACILMENTE EN EL MUNDO QUE SE LES DIO, SIN ATREVERSE A EXPLORAR EL PODER QUE TIENEN PARA CAMBIARLO. IMPOSIBLE NO ES UN HECHO, ES UNA OPINIÓN. IMPOSIBLE NO ES UNA DECLARACIÓN, ES UN RETO. IMPOSIBLE ES POTENCIAL. IMPOSIBLE ES TEMPORAL.

NADA ES IMPOSIBLE

CONTENIDO

RESÚMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CÉLULA ESPERMÁTICA.....	5
Estructura de la cabeza.....	6
Estructura del cuello.....	6
Estructura de la cola.....	7
ESPERMATOGÉNESIS.....	9
Fase espermatogónica.....	9
Fase espermatocítica.....	9
Fase de espermiogénesis.....	9
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	13
REACCIÓN ACROSOMAL.....	14
FERTILIZACIÓN.....	16
TECA PERINUCLEAR.....	16
Funciones de la teca perinuclear.....	18
CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Obtención de las muestras.....	22

Evaluación del semen.....	23
Congelación del semen.....	23
Descongelación de pajillas.....	24
Tinción negativa.....	24
Triple tinción.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
RESULTADOS.....	28
Integridad de la teca perinuclear.....	28
Integridad del acrosoma.....	29
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	33
CUADROS Y FIGURAS.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

RESUMEN

JIMÉNEZ MORALES KARINA. EFECTO DE LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN SOBRE LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE OVINO. (Bajo la dirección de MVZ Rosa Berta Angulo Mejorada y MVZ Jorge Hernández Espinosa).

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Ovina y en el Departamento de Morfología de la FMVZ de la UNAM. Se utilizaron 2 sementales de la raza Suffolk y 2 de la raza Dorset, el semen se recolectó mediante la técnica de vagina artificial. El acrosoma se evaluó mediante la técnica de triple tinción para microscopía fotónica y la subestructura de la TP se evaluó mediante tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la integridad de la TP también se afecta en los espermatozoides del ovino criopreservados pero bajo dos temperaturas de enfriamiento (5°C y -5°C) y analizar la posible correlación entre el daño del citoesqueleto y el acrosoma.

El porcentaje de espermatozoides con TP integra en el semen fresco fue de 86.33, mientras que en los espermatozoides descongelados fue de 59.67, y de 73.50 a 5°C y -5°C previo enfriamiento respectivamente, encontrándose una diferencia significativa entre el semen fresco y descongelado ($P < 0.05$),

pero no existió diferencia significativa entre las muestras descongeladas. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma en el semen fresco fue del 43.92, en el semen descongelado fue del 3.33 y 2.67 para los espermatozoides enfriados a 5° C y -5° C respectivamente, no existiendo diferencia estadística entre las diferentes temperaturas de enfriamiento pero si entre el semen fresco y descongelado. Tampoco se encontró correlación entre el daño del citoesqueleto y la pérdida de acrosoma.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) se ha utilizado desde 1950 en los bovinos y desde los años 70 en otras especies domésticas (1). La IA puede definirse como un método reproductivo en el que las células sexuales masculinas son depositadas dentro del tracto genital femenino por medios distintos al de la cópula natural (2) permitiendo un mejor uso del material genético de los machos.

Como técnica de rutina, el semen que procede de sementales valiosos es conservado por congelación y puede ser utilizado varios años después. Se sabe que cuando el semen se congela a muy baja temperatura las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas lo que permite su conservación. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este proceso es que la viabilidad espermática disminuye (3).

Diversas teorías han sido postuladas para tratar de explicar los efectos posibles que la criopreservación tiene sobre el espermatozoide (4). Adicionalmente las teorías han sido complementadas con estudios realizados *in vitro* y por pruebas de fertilidad, donde se ha evaluado el porcentaje de sobrevivencia y la fertilidad de los espermatozoides (5). En los ovinos, los resultados que se han obtenido en cuanto al número de crías en las hembras inseminadas con semen criopreservado, varían dependiendo de los parámetros evaluados

y de la técnica de congelación. Sin embargo, los resultados siempre son bajos en comparación con los obtenidos al utilizar semen fresco diluido. En el caso de la borrega, para incrementar la fertilidad, es necesario modificar la técnica de IA ya que, la inseminación transcervical tiene poco éxito por lo que generalmente debe de utilizarse la inseminación por laparoscopía (6). Por consiguiente, la IA con semen congelado-descongelado ha tenido un uso relativamente limitado en la especie ovina (7). Sin embargo, la congelación del semen es un proceso importante en el sector pecuario ya que permite a los productores tener un mejor manejo reproductivo de su ganado. Se sabe que la congelación y descongelación del semen daña la membrana plasmática del espermatozoide, lo cual ha sido atribuido a los cambios de la temperatura que modifican la fase en la cual se encuentran los lípidos, lo que a su vez altera la permeabilidad de la misma (8). Lo anterior ha llevado a proponer que el daño ocasionado al espermatozoide es por el llamado choque frío (8), por lo que algunos investigadores recomiendan prolongar el tiempo de enfriado hasta -5° C (convencionalmente para la congelación del semen se utiliza una temperatura de enfriamiento de 5° C). Investigaciones en otro tipo de células mencionan que el proceso de congelación produce alteraciones en el citoesqueleto (9). Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar, a nivel ultraestructural la

integridad de la teca perinuclear (TP) del espermatozoide ovino, antes y después del proceso de criopreservación considerando 2 temperaturas de enfriamiento previo al congelamiento.

A este último respecto, la TP es la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos y las proteínas que la constituyen han sido implicadas en una gran variedad de procesos espermáticos importantes, tanto durante la espermiogénesis como en la fecundación (10); incluyéndose entre ellos, la formación del acrosoma y el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática de la cabeza espermática. Más recientemente, los elementos del citoesqueleto han sido involucrados en el mantenimiento de la osmolaridad de la célula espermática. En el espermatozoide del bovino se ha informado que el proceso de criopreservación induce alteraciones en la TP (8). Por ello la valoración de la TP en el mantenimiento de la capacidad funcional del espermatozoide de los mamíferos después del proceso de criopreservación es de gran interés para futuras mejoras de la técnica.

CÉLULA ESPERMÁTICA

El espermatozoide es una célula altamente especializada. La célula espermática está formada por dos partes principales:

cabeza y cola, aunque algunos autores consideran una tercera región conocida como pieza de conexión o cuello.

Estructura de la cabeza

En la mayoría de las especies la cabeza espermática es plana y ovoide; contiene, de adentro hacia fuera las siguientes estructuras: el núcleo altamente condensado, la envoltura nuclear, la teca perinuclear (11) y el acrosoma (12). Este último es un saco membranoso que contiene una variedad de enzimas hidrolíticas, las cuales juegan un papel activo durante el proceso de fertilización ya que al ser liberadas facilitan el pasaje del espermatozoide a la zona pelúcida (13).

Estructura del cuello

Este tiene forma cónica, con la base más ancha en contacto con la cabeza y la más estrecha en contacto con la pieza media del flagelo; en la zona más cercana a la cabeza presenta una protuberancia anular conocida como envoltura redundante. Como se mencionó, la región del cuello va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza media y dentro se pueden distinguir las siguientes estructuras: la placa basal, los cuerpos laminares, *el capitolio* y las columnas segmentadas (14).

Estructura de la cola

La cola o flagelo, es la pieza locomotora de los espermatozoides. El movimiento de la cola es responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos. La cola está conectada a la cabeza mediante una región del cuello, conocida como la fosa de implantación. En la cola pueden diferenciarse tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. La estructura general que recorre al flagelo es el axonema, rodeado por las fibras densas, y se extienden desde el sitio de inserción a la cabeza hasta el inicio de la pieza terminal (11).

Tanto la cabeza como el flagelo se encuentran recubiertos por la membrana plasmática y en general el espermatozoide posee una cantidad insignificante de citoplasma. La membrana plasmática espermática es considerada como un mosaico de dominios, cada uno con características específicas, relacionados con los procesos de capacitación y reacción acrosomal (11) (Figura 1).

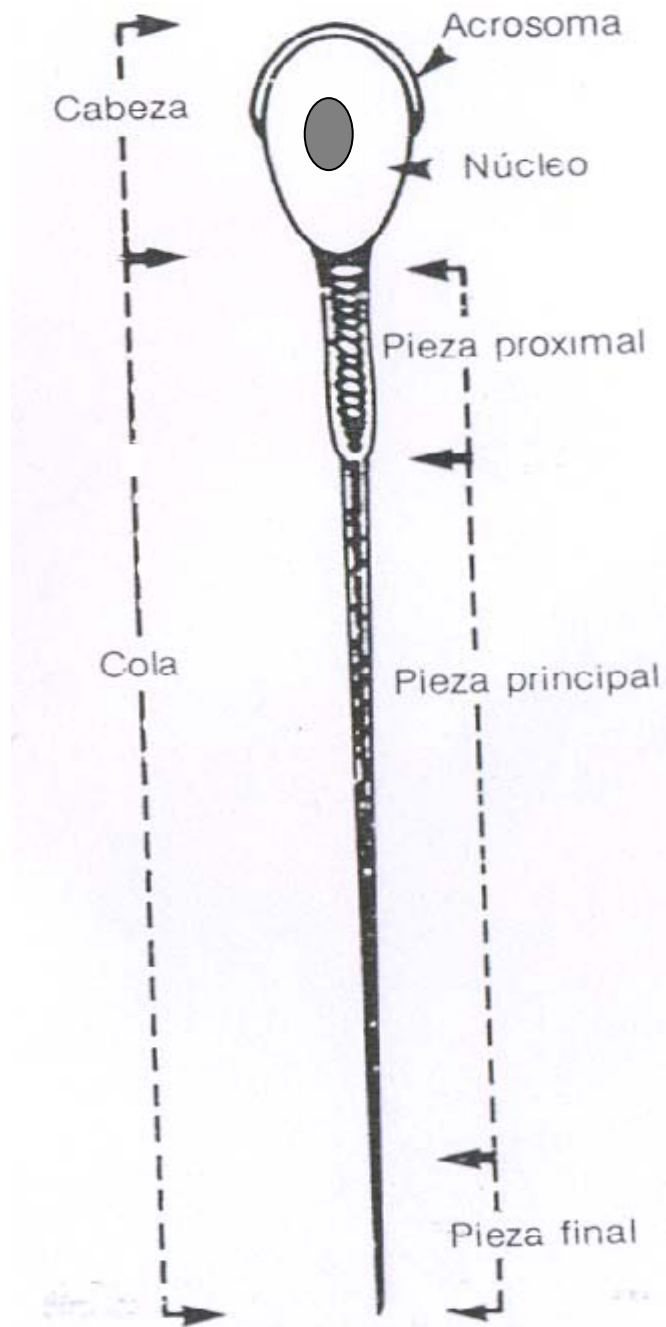


Figura 1. Esquema de un espermatozoide de mamífero. (Salamon 1990)

ESPERMATOGÉNESIS

La producción de espermatozoides se realiza en los túbulos seminíferos de los testículos.

La espermatogénesis es el proceso por el cual las espermatogonias se dividen y se diferencian a espermatozoides.

La espermatogénesis varía de acuerdo a la especie de animal doméstico, siendo en el carnero de 10 días (15).

El proceso de espermatogénesis se divide en tres fases diferenciadas:

- Fase espermatogónica o de espermatogonias.

En esta, las células precursoras se dividen para formar una célula precursora de reemplazo y para proporcionar una población de espermatogonias comprometidas.

- Fase espermatocítica o de espermatocitos.

Las espermatogonias comprometidas se dividen por mitosis y originan a los espermatocitos primarios los cuales se dividen por meiosis para reducir el número de cromosomas.

- Fase de espermiogénesis o de espermátides.

Aquí, las espermátides se diferencian en espermatozoides (12) (Figura 2).

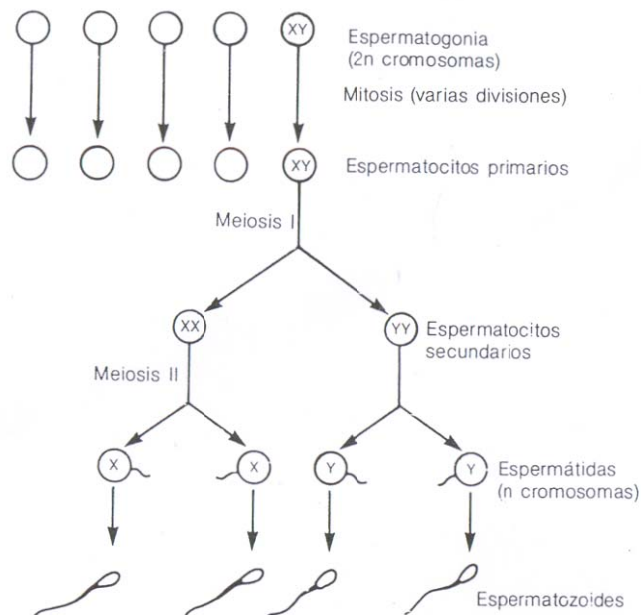


Figura 2. Representación esquemática del proceso de espermatogénesis. (Salamon 1990)

La espermiogénesis se divide en cuatro fases:

a) Fase de Golgi: Se caracteriza por la formación de gránulos por el aparato de Golgi. Estos pequeños gránulos son secretados y aparecen rodeados de una membrana lisa, que reciben el nombre de vesículas proacrosómicas. Las vesículas coalescen para formar un gránulo único, el gránulo acrosómico. Durante esta fase, el centriolo proximal se acerca al núcleo (15).

b) Fase del capuchón: Se caracteriza por el aumento y la diseminación del gránulo acrosómico sobre la superficie del núcleo de la espermatide. Este proceso continúa hasta que, cerca de dos terceras partes de la porción anterior del núcleo de la espermatide quedan cubiertas por una delgada membrana de

doble pared que se adhiere íntimamente a la envoltura nuclear. Así se forma una estructura homogénea que se ajusta a la superficie nuclear a modo de sombrero denominada "casquete o caperuza" (15).

c) Fase acrosómica: Desde su formación el gránulo acrosómico y el casquete de la espermatide se orientan hacia la lámina propia del túbulo seminífero. Simultáneamente la masa citoplasmática se desliza hacia el lado opuesto del núcleo de donde se hallan el gránulo y el casquete (sistema acrosómico), el aparato de Golgi se separa del sistema acrosómico y el citoplasma se desplaza hacia la parte caudal del núcleo. Como todo el citoplasma se ha desplazado, la membrana plasmática apoya directamente sobre todo el sistema acrosómico (15).

d) Fase de maduración: Esta fase de la espermiogénesis comprende la transformación final de las espermatides alargadas en células que serán liberadas a la luz del túbulo seminífero. La remodelación del núcleo y el acrosoma de cada espermatide, iniciada durante la fase previa, produce espermatozoides característicos para cada especie. Dentro del núcleo, la cromatina experimenta una condensación progresiva, mientras que las histonas son sustituidas por protaminas, transformándose en un fino material homogéneo que llena de manera uniforme todo el núcleo espermático.

Durante la fase de maduración, alrededor del axonema se forma la vaina fibrosa y las 9 fibras gruesas subyacentes. Dichas fibras se asocian individualmente con los nuevos pares de microtúbulos del axonema y son continuas con las presentes en el cuello del segmento conector de la espermatíde. La vaina fibrosa cubre el axonema desde el cuello hasta el inicio del segmento caudal. El anillo citoplasmático migra distalmente desde su posición adyacente al núcleo, a lo largo de la cola, hasta un punto en el que mas tarde separará el segmento medio del segmento principal de la cola. Las mitocondrias se empaquetan apretadamente en una vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo citoplasmático. Durante las últimas etapas de la espermatogénesis, el manguillo desaparece y las células de Sertoli forman entonces el citoplasma restante después de alargarse la espermatíde para convertirse en un lóbulo esferoide llamado cuerpo residual. Este lóbulo de citoplasma, que permanece unido a la espermatíde alargada por medio de un delgado filamento citoplasmático, también esta interconectado con otros cuerpos residuales mediante puentes intercelulares resultando de la división incompleta de las células germinales durante la espermatogénesis. Con la formación del cuerpo residual se completa la maduración final, y las espermatídes alargadas están listas para ser liberadas como espermatozoides (15).

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides sufren una serie de cambios funcionales y bioquímicos durante su tránsito por el epidídimo (proceso llamado maduración epididimal) y posteriormente requieren una fase adicional de maduración en el tracto reproductor de la hembra que los prepara para ser capaces de fertilizar. Este proceso se conoce como **capacitación**, y podemos decir que es el conjunto de cambios que le confiere al espermatozoide la habilidad para sufrir la reacción acrosomal, el tiempo de capacitación varía de acuerdo a las especies, en oveja es alrededor de 1.5 horas (13).

La capacitación es necesaria para que el espermatozoide sea receptivo a las membranas del óvulo, se una a la zona pelúcida y sufra la reacción acrosomal. Los eventos principales de la capacitación conducentes a la reacción acrosomal incluyen:

- I. El retiro de partículas intramembranas del área de la membrana plasmática asociada con el acrosoma.
- II. La disminución de la rigidez de la membrana plasmática.
- III. El aumento de la concentración del calcio libre intracelular.
- IV. El aumento del metabolismo energético y de la motilidad del gameto (13).

REACCIÓN ACROSOMAL

La capacitación es seguida por la reacción acrosomal, ésta se considera como un indicador de la capacitación espermática. La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis. Sólo los espermatozoides con reacción acrosomal son capaces de atravesar la zona pelúcida, unirse a la membrana plasmática del óvulo y fusionarse con éste. La zona pelúcida induce la reacción acrosomal a través de una de sus glicoproteínas. El mecanismo por el cual la zona pelúcida y la progesterona inducen la reacción acrosomal, involucra receptores en la membrana plasmática.

Inmediatamente después de la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, la membrana plasmática que cubre el acrosoma y la membrana acrosomal externa se fusionan en múltiples sitios formando vesículas mixtas permitiendo la liberación del contenido, lo que le permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida. Además la reacción acrosomal es un requisito absoluto para la fusión espermatozoide-óvulo (13) (Figura 3).

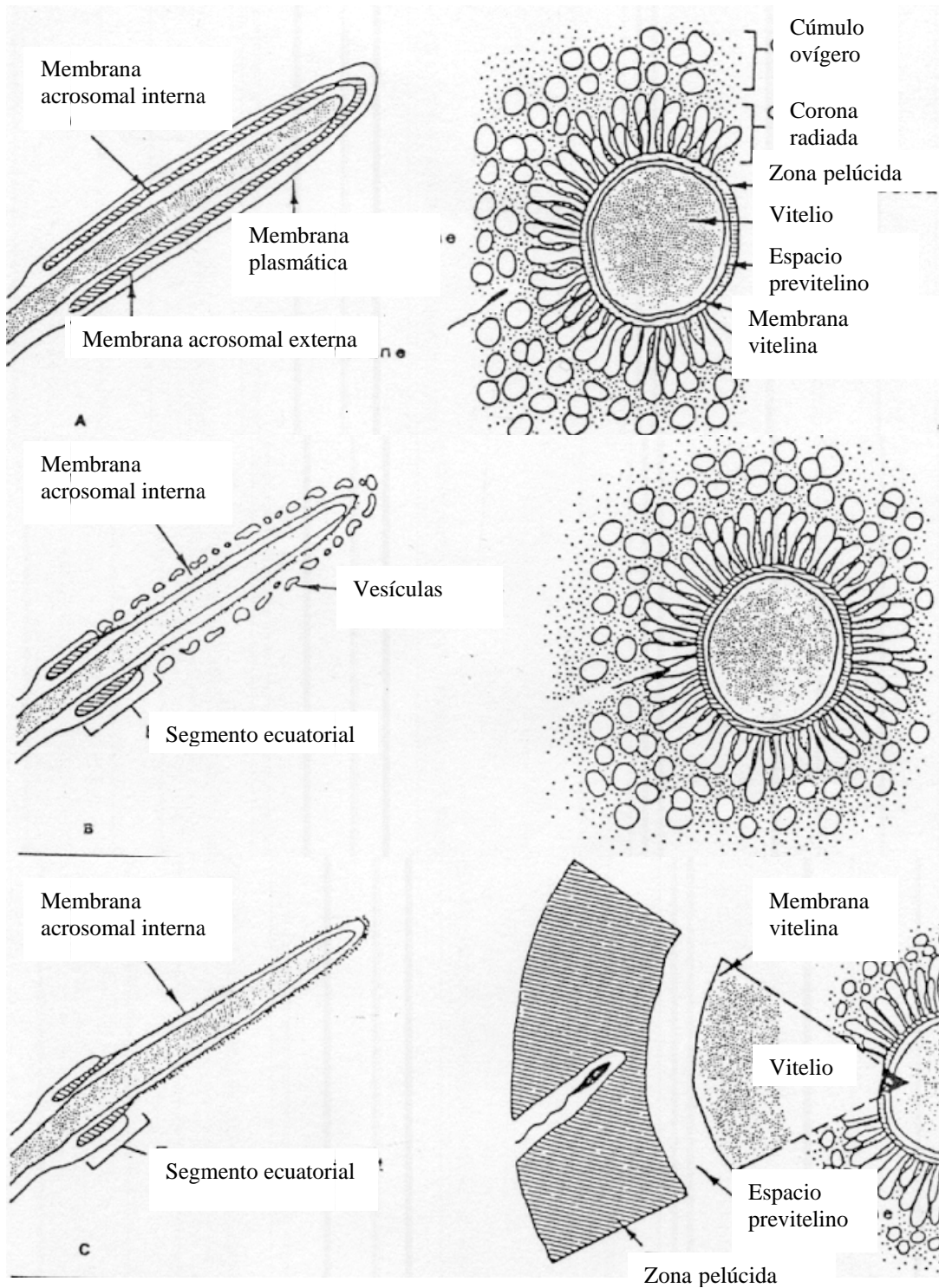


FIGURA 3. PENETRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE Y REACCIÓN ACROSOMAL

A) Espermatozoide capacitado penetrando al cúmulo ovífero, B) Formación de vesículas en el espermatozoide por la fusión de membranas y penetrando a la corona radiada, C) Reacción del espermatozoide penetrando a la zona pelúcida. (Mac'Donalds, 2003)

FERTILIZACIÓN

La interacción del espermatozoide y del huevo inicia una serie de transformaciones que involucran a los componentes nucleares y citoplasmáticos de ambos gametos. Estas transformaciones constituyen el proceso de fertilización, y termina con la asociación de los grupos correspondientes de cromosomas derivados de los pronúcleos, uno de origen materno y el otro paterno (13).

TECA PERINUCLEAR

La teca perinuclear (TP) es la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos, ésta cubre al núcleo, excepto en la región de la inserción del flagelo (10,16,17) y ha sido involucrada en el mantenimiento de la integridad núcleo-acrosoma y en diversos procesos durante la fertilización. La TP se encuentra formada por la capa subacrosomal y la capa postacrosomal y está constituida por diversas proteínas como son; la actina, la espectrina, la calicina, las proteínas de la banda multipeptídica, la vimentina, calicinas, y la PERF 15 entre otras (17).

La TP presenta una subestructura localizada a manera de cinturón en la porción apical de la capa postacrosomal. En el

espermatozoide de ovino presenta un patrón dentado como papilas truncadas (18).

Se reporta que la subestructura se forma durante la maduración epididimal. En los espermatozoides del cobayo, obtenidos de la cabeza del epidídimo, la subestructura se encuentra ausente, pero en los espermatozoides obtenidos del cuerpo del epidídimo la mayoría la presentan. Se ha observado que la subestructura se conserva en los espermatozoides capacitados, mientras que en los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal, ya sea inducida o espontánea la subestructura se pierde (18).

La TP también llamada sustancia perinuclear o matriz perinuclear. Se ensambla durante la espermiogénesis entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, participando en ensamblaje del acrosoma y formación de la cabeza del espermatozoide durante la espermiogénesis. Además ésta incrementa protección para el núcleo durante la maduración del espermatozoide y fertilización, incrementa su estabilidad, por la formación de puentes disulfuro entre sus proteínas constituyentes, durante la maduración epididimal (19) (Figura 4).

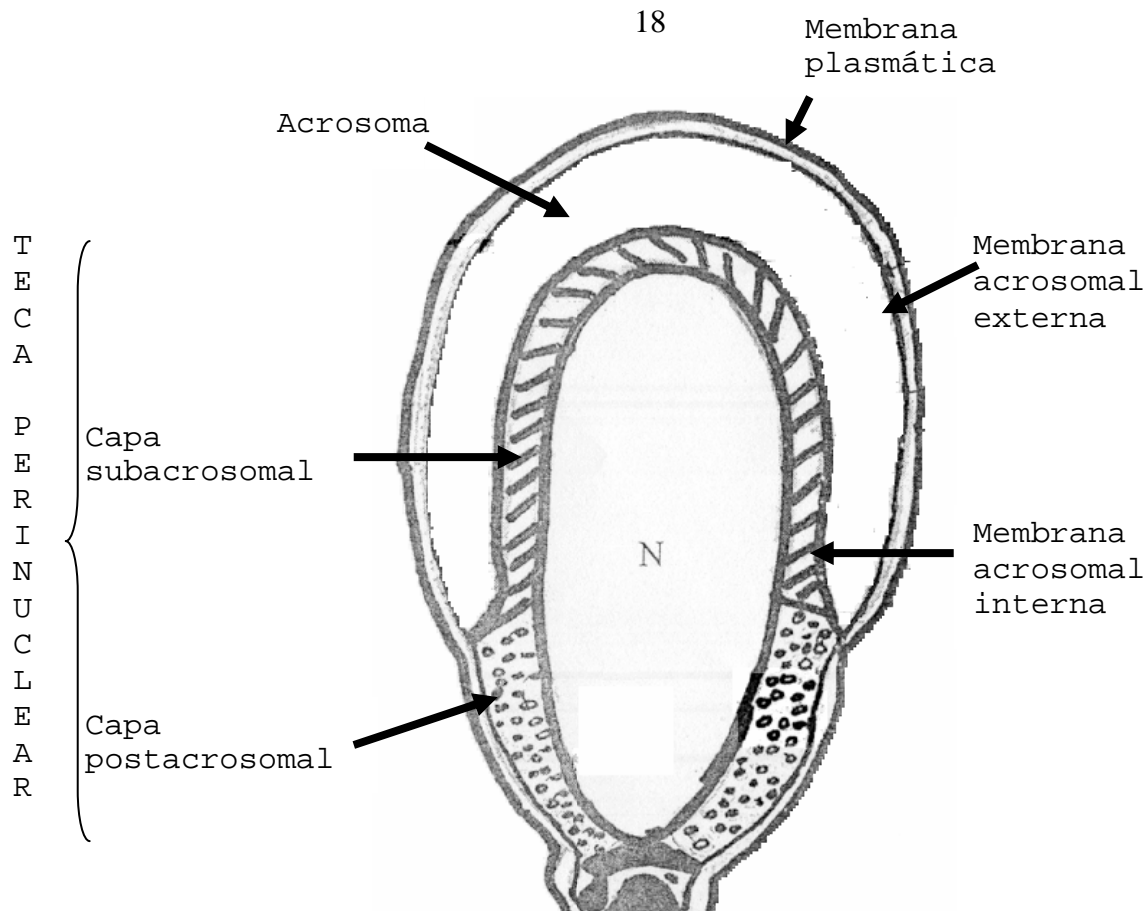


FIGURA 4. Esquema de la cabeza del espermatozoide. (Gutiérrez 2006)

Funciones de la TP:

- ❖ Proteger al núcleo del espermatozoide contra agentes descondensantes externos.
- ❖ Reducir el citoplasma durante la formación del espermatozoide y comprimir el citoplasma residual.
- ❖ Actuar como cemento entre el núcleo y las estructuras que lo cubren.
- ❖ Dar la forma a la cabeza durante la espermiogénesis.
- ❖ Estabilizar el acrosoma del espermatozoide.

- ❖ Mantener los dominios, en la superficie de la región ecuatorial, de las membranas acrosomal externa y plasmática, durante la reacción acrosomal.
- ❖ Participar en la penetración del espermatozoide a las envolturas del óvulo.
- ❖ Así como en la activación del huevo en el ingreso de la cabeza espermática al óvulo durante el proceso de fecundación. Cuando cabezas espermáticas con la TP expuesta son microinyectadas al citoplasma del óvulo, estas forman un pronúcleo bien desarrollado y el óvulo se activa. Sin embargo los óvulos microinyectados con núcleo espermáticos sin TP no se activan. Por lo tanto, se puede decir que el citoplasma del huevo tiene la capacidad de descondensar a la teca perinuclear (17,20).

CONGELACIÓN DEL SEMEN

El proceso de congelamiento del semen es llamado criopreservación, como consecuencia de este proceso, el metabolismo de las células espermáticas se disminuye al mínimo, quedando solamente lo que ellas necesitan para sobrevivir sin perder su capacidad para fertilizar un ovocito (21).

El semen congelado y conservado de carnero estaba limitado a la IA debido a los bajos coeficientes de corderos que se obtenían

por el uso del semen congelado. La fertilidad del semen congelado, en la mayoría de los casos, se han obtenido índices del 25 al 45%. Ésta baja de fertilidad del semen congelado después de la inseminación, esta relacionada con la reducida viabilidad de los espermatozoides congelados-descongelados, esto debido a que son pocos los espermatozoides viables y/o sin daño, los que llegan al lugar de la fertilización. (22).

El problema real que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C , sino la combinación de efectos dañinos que en el proceso del congelado-descongelado tienen sobre la fisiología y morfología espermática (9).

La teoría del daño celular por congelación se basa en los cambios físicos que afectan la estabilidad celular, como el sobreenfriamiento, que ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0°C y el agua extracelular se congela mientras que la intracelular no lo hace al mismo tiempo ya que la membrana funciona como una barrera que impide que el cristal extracelular crezca hacia el interior de manera continua. Es por ello que se recomienda tasas de enfriamiento lentas que permitan al agua salir de la célula y congelarse fuera de ella (9).

Por otra parte, también se ha utilizado la integridad del acrosoma para predecir la habilidad fertilizante del semen

congelado (21). Varias técnicas han sido desarrolladas para estimar la integridad del acrosoma sin embargo, el aumento del tamaño del acrosoma, la ruptura de la membrana acrosomal externa o la vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, no se han podido correlacionar con la disminución de la viabilidad del espermatozoide.

El citoesqueleto también se altera por la congelación, Watson (1995) en una revisión sobre el daño espermático por el proceso de congelación, menciona que las proteínas del citoesqueleto espermático que soportan las membranas plasmáticas y acrosomal, pueden presentar despolimerización y repolimerización dependiente de temperatura, lo cual sería el reflejo de los rápidos cambios de volumen que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación.

Recientemente se ha demostrado que la TP del espermatozoide del bovino se daña durante la criopreservación; observándose que el porcentaje de espermatozoides con TP ausente se incrementa mientras que el número de espermatozoides vivos disminuye. Por lo que se ha inferido que el daño a la TP podría contribuir a la reducción de la viabilidad del semen congelado-descongelado (23).

HIPÓTESIS

El proceso de congelación y descongelación del espermatozoide ovino, causa una alteración en la Teca Perinuclear (TP).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar a nivel ultraestructural la integridad de la teca perinuclear (TP) del espermatozoide ovino, antes y después del proceso de criopreservación considerando 2 temperaturas de enfriamiento previo al congelamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Los animales utilizados para el presente estudio pertenecen al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. Ubicado en el km.53.1 de la carretera Federal México-Cuernavaca, en el poblado de Tres Marías, Municipio de Huitzilac, Estado de Morelos. El centro se encuentra a una altura de 2810 m.s.n.m., el clima de la región es Cb (m) (w), con una precipitación pluvial de 1724.6 mm y una temperatura media anual de 9.9° C. Se utilizó el semen de 4 machos de las razas Suffolk y Dorset, con una edad que osciló entre los 2 y 6 años. La recolección del semen se realizó una

vez por semana, utilizando la técnica de vagina artificial descrita por Salamon (1990). Se colectaron 3 eyaculados por macho, el semen fue dividido en dos fracciones, una de ellas se empleo como semen fresco y la otra se congeló previo enfriamiento a dos diferentes temperaturas (5° C y -5° C). La congelación del semen se realizó en el centro.

Evaluación del semen

En la evaluación macroscópica del semen fresco se tomó en cuenta el volúmen, color y presencia de cuerpos extraños (14-15) y en la evaluación microscópica del semen fresco se valoró la motilidad en masa teniendo (en un rango de 1-5), motilidad progresiva expresada en porcentaje (considerando un porcentaje mínimo para la congelación de 60%) y la concentración espermática por ml de eyaculado.

Congelación de semen

Posteriormente se diluyó con un medio compuesto por Triladyl* (1 ml), yema de huevo (1 ml) y agua bidestilada (3 ml). El semen se diluyó hasta lograr una concentración de 200×10^6 células móviles, posteriormente se almacenó en pajillas de 0.25 ml que fueron selladas con alcohol polivinílico y colocadas para su enfriamiento dentro de un recipiente de aluminio que contenía alcohol etílico al 96°. El enfriado comenzó a una temperatura de 22° C (temperatura ambiente) hasta llegar a una temperatura de 5° C (en dos horas) y posteriormente se redujo

*Minitub

hasta llegar a -5°C (en media hora más), utilizando para ello un refrigerador de uso doméstico. Una vez alcanzadas las temperaturas se procedió al congelado de las muestras en vapores de nitrógeno líquido. El método utilizado para la congelación es el descrito por Salamon (1990) que consiste en que las pajillas se colocan horizontalmente en una gradilla fría, que se expone a los vapores del nitrógeno líquido, 3-4 cm por encima de la superficie. Transcurridos 7-8 minutos las pajillas, con el semen congelado, se introducen en un termo contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) donde se almacenaron por un período de 30 días. Después de cumplirse el período de congelación, el semen fue transportado y se procesó en el Departamento de Morfología de la FMVZ.

Descongelación de las pajillas

Para la evaluación del semen criopreservado se descongelaron dos pajillas por temperatura en un baño María a 37°C durante 30 segundos.

Ambas muestras, semen fresco y descongelado fueron sometidas a las siguientes técnicas.

Tinción negativa

Para la valoración de la integridad de la TP al microscopio electrónico de transmisión (MET), ambas muestras frescas y descongeladas fueron procesadas mediante la técnica de tinción negativa. Para exponer la superficie de la TP, los

espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración de 35×10^6 células/ml y se añadieron 175 μ l de una solución acuosa de Brij 36-T al 10% enseguida se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. El detergente Brij 36-T solubiliza la membrana plasmática y el acrosoma (23). Las muestras fueron fijadas con Karnovsky (23) por dos horas a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos, en seguida el sobrenadante fue descartado y la pastilla fue resuspendida en PBS para ser lavada tres veces mas utilizando una centrífuga clínica con el mismo amortiguador. Después del último lavado la muestra fue suspendida en agua desionizada. Una gota de cada muestra fue colocada sobre rejillas de cobre de 100 mesh cubiertas con una membrana de colodión-carbón y se dejó sedimentar por 10 minutos. El exceso de muestra fue retirada con el filo de un papel filtro y las células se contrastaron con ácido fosfotúngstico al 0.02% en solución acuosa, para su observación al MET. De cada muestra se evaluaron 50 células. La característica que se tomó en consideración para la valoración de la TP fue la morfología de la subestructura. De acuerdo a esto, las muestras fueron clasificadas como:

- Subestructura íntegra o normal, cuando la subestructura presentó una apariencia en forma de grecas continuas.

- Subestructura alterada, cuando la subestructura presentó algún daño, como la falta de grecas y/o interrupciones en su continuidad.
- Subestructura ausente, fueron clasificadas las células que no presentaron a la subestructura (figura 5).

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM-9 de la Unidad de Microscopía Electrónica de la FMVZ de la UNAM.

Triple tinción

El método de triple tinción nos permite diferenciar entre células vivas y muertas con y sin acrosoma. Para ello los espermatozoides fueron suspendidos a una concentración de 35×10^6 células /ml en NaCl 154 mM, se le adicionó 100 μ l de azul de tripán al 2% en amortiguador de fosfato salino (PBS) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue descartado. Las muestras fueron resuspendidas y lavadas con PBS por centrifugación /resuspensión hasta que el sobrenadante se observó transparente, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3% durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, enseguida las muestras fueron centrifugadas y lavadas dos veces con agua desionizada. Posteriormente se realizó un frotis de cada muestra y se dejó secar al aire. Los frotis fueron teñidos con café Bismarck al 8% en agua desionizada, pH 1.8, y

después se lavaron con agua desionizada, se secaron al aire y se tiñeron con rosa de Bengala al 0.8% en amortiguador de Tris 0.1 M, pH 5.3. Finalmente se lavaron con agua desionizada y nuevamente se dejaron secar al aire (24). Su observación se realizó en microscopio fotónico, marca Leite, modelo Labortux-D, utilizando el objetivo 100x con aceite de inmersión. De cada muestra se evaluaron 100 células, las muestras se clasificaron de acuerdo a los patrones de afinidad y reacción tintorial de esta prueba en el que se clasifican cuatro estados diferentes:

1. Espermatozoide muerto con acrosoma intacto (acrosoma teñido de rosa y región postacrosomal de color marrón oscuro).
2. Espermatozoide muerto, sin acrosoma (región acrosomal y postacrosomal de color marrón oscuro).
3. Espermatozoide vivo que no ha experimentado la reacción acrosómica (acrosoma teñido de rosa y región postacrosomal teñida muy levemente por el marrón).
4. Espermatozoide vivo que ha experimentado la reacción acrosómica (región acrosomal y postacrosomal teñidas muy levemente por el marrón) (25) (Figura 6).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó en el programa Minitab versión 13.0 mediante la prueba de T-pareada, ANOVA y Pearson (Tukey).

RESULTADOS

Integridad de la teca perinuclear

El porcentaje de espermatozoides con TP integra en el semen fresco fue de 86.33, mientras que en los espermatozoides descongelados fue de 59.67, y de 73.50 a 5° C y -5° C previo enfriamiento respectivamente, encontrándose una diferencia estadística entre el semen fresco y descongelado ($P < 0.002$); sin embargo, se observó una tendencia numérica a una morfología integra a la temperatura de enfriado de -5° C ($P < 0.05$) (Cuadro 1). En cuanto en la TP alterada se encontró que el mayor porcentaje se presentó en los espermatozoides enfriados a 5° C (38%) encontrándose una diferencia significativa sólo con el semen fresco (12%) ($P < 0.001$) (Cuadro 1). Por otra parte no se encontró diferencia estadística en cuanto a la ausencia de la subestructura de la TP (Cuadro 1), sin embargo al comparar los diferentes tratamientos (5° C y -5° C) no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$). De igual forma, al aplicar la prueba de T-pareada se encontró diferencia

estadística ($P < 0.05$) al comparar el porcentaje de espermatozoides con la subestructura de la TP íntegra y alterada entre las muestras de semen fresco con las descongeladas, previo enfriado al congelamiento de 5°C y -5°C (cuadro 2).

Integridad del acrosoma

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma disminuyó por el proceso de criopreservación, ya que mientras éste fue del 43.92 en el semen fresco, en el semen descongelado fue del 3.33 y 2.67 para los espermatozoides enfriados a 5°C y -5°C respectivamente, no existiendo diferencia estadística entre las diferentes temperaturas de enfriado pero sí entre semen fresco y descongelado (cuadro 3). Por otra parte el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma fue menor en el semen fresco (27.83) y mayor en el semen descongelado, 54.62 y 48.58 para el semen enfriado a 5°C y -5°C respectivamente, no existiendo diferencia estadística entre estos dos últimos porcentajes. Sin embargo aritméticamente sí se encontró diferencia numérica entre los tratamientos a 5°C y -5°C pues se presentó un mayor porcentaje (3.33) de espermatozoides vivos sin pérdida de acrosoma y un menor porcentaje (41.66) de espermatozoides muertos sin acrosoma en el tratamiento a 5°C .

Utilizando la prueba estadística de Pearson, no se encontró correlación entre la integridad de la teca perinuclear y la presencia del acrosoma.

En cuanto a la evaluación de la motilidad progresiva, se encontró que el rango entre los eyaculados recién obtenidos fue de 90-60% mientras que se observó una disminución considerable en el porcentaje de la misma en los espermatozoides descongelados. Sin embargo, los espermatozoides enfriados a -5° C mostraron el mejor porcentaje (53.12%) con respecto a los enfriados a 5° C (38.12%) (Gráfica 1).

DISCUSIÓN

Se sabe que la congelación-descongelación altera el citoesqueleto de las células somáticas. Los resultados en el presente trabajo indican que la TP sufre alteraciones durante el proceso de criopreservación del semen de ovino. La TP es la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos (10). El daño encontrado sobre la TP coincide con lo informado por Martínez *et al.* (2006) en el espermatozoide de bovino, sin embargo el daño encontrado en esta última especie fue menor, lo que posiblemente esté relacionado a una diferencia en la composición proteica de la TP entre ambas especies (26).

Existen informes donde se indica que se logra una mejora en la viabilidad de los espermatozoides criopreservados si se prolonga el tiempo de enfriamiento a temperaturas menores a 0° C durante el proceso (5). Sin embargo al evaluar la subestructura de la TP a las temperaturas de enfriamiento de 5° C y -5° C no se encontró una diferencia estadística significativa. Estos resultados son contrarios a lo informado en diversos estudios en semen de porcino y semen de ovino, donde señalan que el enfriado lento favorece la supervivencia de los espermatozoides (5, 27, 28). Además en estos trabajos lo que se evaluó fue la motilidad y la integridad de la membrana así como la presencia del acrosoma. Nuestros resultados apoyan la propuesta de que la baja en la fertilidad del semen criopreservado podría ser atribuida no sólo a un daño primario de la membrana plasmática, sino también a daños en otras estructuras sensibles dentro de la célula (29,30).

El acrosoma contiene una variedad de enzimas hidrolíticas, las cuales tienen un papel activo durante el proceso de fertilización ya que al ser liberadas facilitan el pasaje del espermatozoide a la zona pelúcida (13).

Existen métodos que permiten distinguir en una misma preparación la viabilidad de la célula espermática y su integridad morfológica (acrosoma) (31). En este estudio la observación de espermatozoides vivos y muertos con y sin

acrosoma se hizo mediante el uso de la triple tinción. Algunos investigadores señalan que las tinciones supravitales clásicas no son apropiadas para predecir la viabilidad de los espermatozoides descongelaos ya que la presencia del glicerol interfiere con la tinción diferencial entre células vivas y muertas (32). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo anterior pues la técnica de triple tinción solo pudo ser valorada en el semen fresco, ya que al utilizarla en la evaluación de semen descongelaos se obtuvieron resultados no concordantes al compararlo con la motilidad progresiva. Posiblemente es necesario hacer modificaciones a la técnica para obtener mejores resultados ya que en el espermatozoide de bovino si ha sido utilizada (23). Por otra parte, la interferencia de la técnica con la valoración del acrosoma en el semen descongelaos sea una de las razones por las que no se pudo obtener una relación entre el daño sufrido en la subestructura de la TP y la pérdida de acrosoma, como fue reportado por Martínez *et al.* (2006).

Con respecto al porcentaje de motilidad progresiva si existió diferencia numérica entre las temperaturas de enfriado, siendo el porcentaje de células mótils mayor en los espermatozoides descongelaos previamente enfriados a -5° C, estos datos coinciden con lo informado por Flores (2005) en semen porcino. Además, los resultados de este trabajo mantienen una tendencia

numérica similar a otros trabajos publicados (5), donde el enfriado por debajo de los 0° C mejora la viabilidad de los espermatozoides del ovino.

A pesar de que no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos de enfriado, los datos encontrados en este trabajo muestran una tendencia, por lo menos numérica, a que el enfriado a la temperatura -5° C es más favorable para la criosupervivencia de los espermatozoides de carnero.

CONCLUSIÓN

La criopreservación altera la TP del espermatozoide ovino. Se recomienda en un futuro mejoras a la técnica de triple tinción para la valoración del acrosoma o el uso de otra técnica. Esto último con la finalidad de establecer una posible relación entre la integridad del acrosoma con la integridad de la TP. Además, sería de gran interés comparar los hallazgos de laboratorio contra los resultados de fertilidad y prolificidad in vivo en borregas inseminadas artificialmente.

CUADROS

Y

FIGURAS

CUADRO 1 .EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA SUBESTRUCTURA DE LA TP ENTRE SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO ENFRIADO A 5° C Y -5° C. (ANOVA)

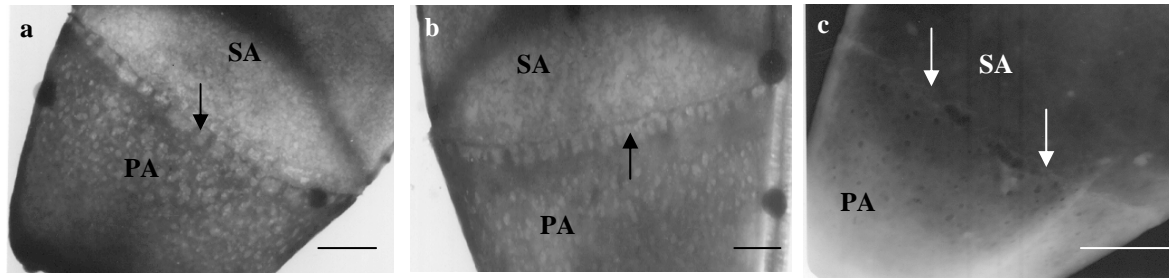
TP	Fresco %	5°C %	-5°C %	Valor de P
Integra	86.33	59.67	73.50	0.002*
Alterada	12	38	24.67	0.001*
Ausente	1.66	2.32	1.834	0.841

*Existe diferencia estadística significativa en por lo menos uno de los tratamientos $P < 0.05$

CUADRO 2.EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA SUBESTRUCTURA DE LA TP ENTRE TRATAMIENTOS. (T-PAREADA)

TP	Fresco	5° C	-5° C
Integra	86.33+/-4.48 ^a	59.67+/-5.87 ^b	73.50+/-4.06 ^b
Alterada	12+/-4.11 ^a	38+/-5.44 ^b	24.67+/-2.80 ^b

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa $P < 0.05$



INTEGRIDAD DE LA SUBESTRUCTURA DE LA TECA PERINUCLEAR

FIGURA.5. Ultramicrofotografías de cabezas de espermatozoides de ovino contrastadas con tinción negativa, donde se observa la integridad de la subestructura de la teca perinuclear (TP).

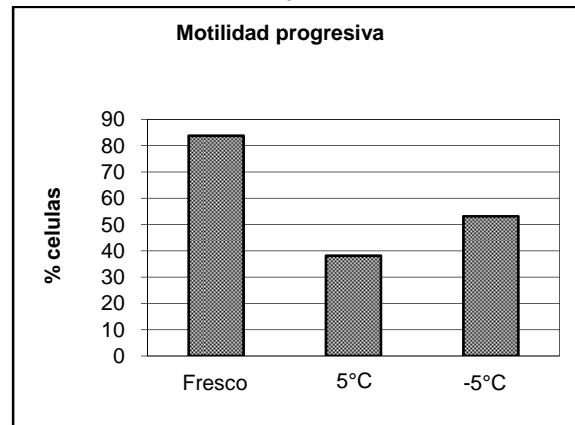
- a) Subestructura normal mostrando las papilas (flecha) distribuidas a lo largo del borde apical de la PA y la delimitación de las mismas por una línea continúa.
- b) Subestructura alterada mostrando la pérdida de algunas papilas (flecha).
- c) Cabeza espermática mostrando la ausencia de la subestructura (flechas) de la TP.
- Barra 1 μm . SA: capa subacrosomal de la TP; PA: capa postacrosomal de la TP.

CUADRO 3. EVALUACIÓN ENTRE PATRONES DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y DESCONGELADOS TEÑIDOS CON TRIPLE TINCIÓN.

PATRONES	FRESCO %	5° C %	-5 ° C %
Muertos con acrosoma	27.83 ^a	54.67 ^b	48.58 ^b
Muertos sin acrosoma	25.00 ^a	41.0 ^b	47.83 ^b
Vivos con acrosoma	43.92 ^a	3.33 ^b	2.67 ^b
Vivos sin acrosoma	3.25 ^a	0.3 ^b	0.92 ^b

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos (P < 0.05)

GRAFICA 1. PORCENTAJE DE MOTILIDAD PROGRESIVA DE LOS ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y DESCONGELADOS (ENFRIADOS A 5° C Y -5° C).



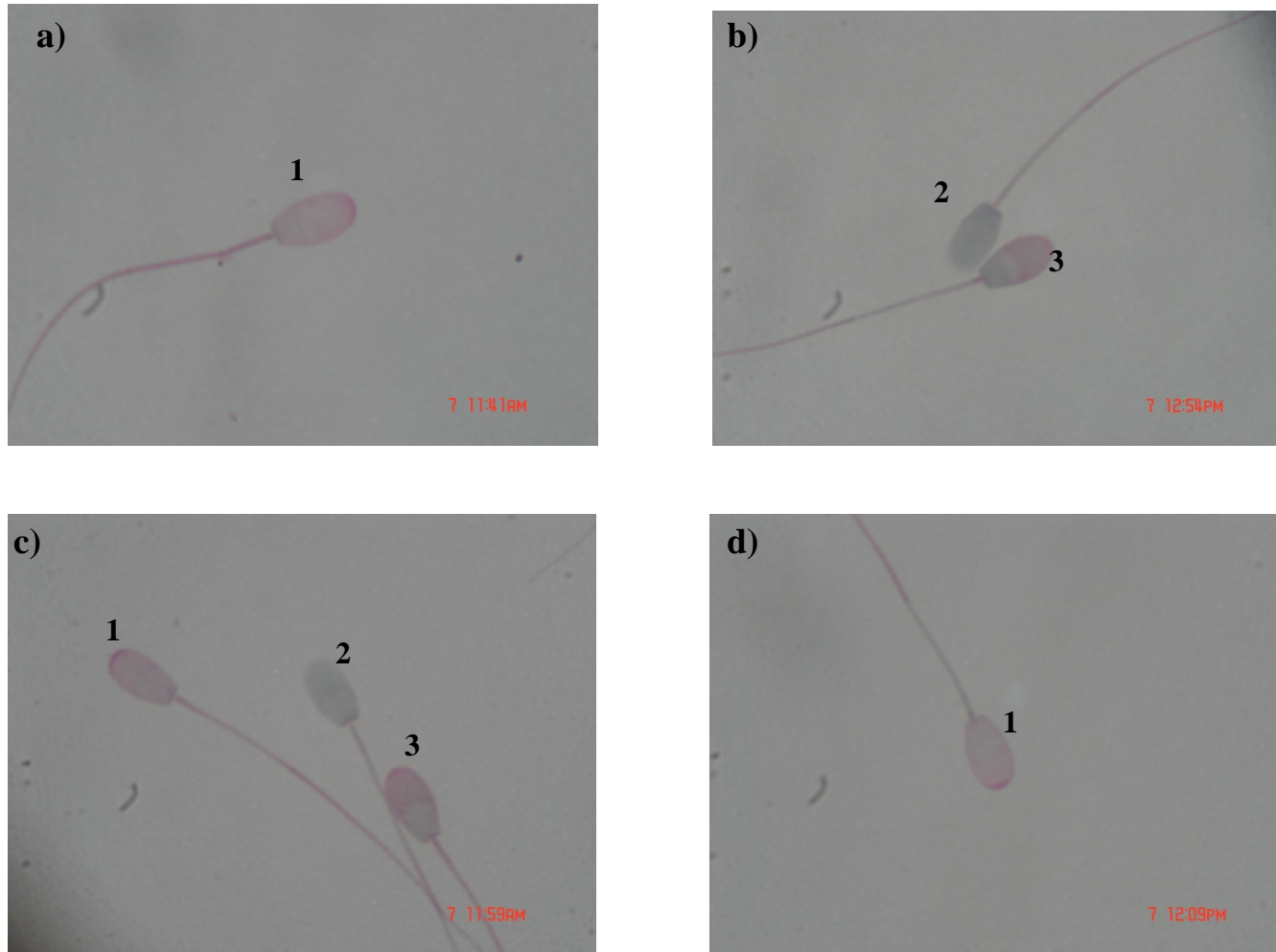


FIGURA 6. MICROSCOPIA DE LUZ MOSTRANDO LOS PATRONES EN LOS ESPERMATOZOIDES TEÑIDOS CON LA TÉCNICA DE TRIPLE TINCIÓN (utilizando el objetivo 100x).

a) Vivo con acrosoma¹, b) Muerto sin acrosoma², muerto con acrosoma³, c) Vivo con acrosoma¹, muerto sin acrosoma², muerto con acrosoma³, d) Vivo con acrosoma¹.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ponsart C, Gerard O, Caplin S. Insemination; history and state of the art in animals. *Gynecol Obstet Ferti* 2004;32(10)880-886.
2. Ortíz A. Antecedentes sobre el uso de la inseminación artificial. Memorias de curso de inseminación artificial en ovinos; 2005 octubre 27-28; Huitzilac (Morelos) México.
3. Ostermeier G, Sartor, Susko L, Parrish JB. Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag. Biotech Net*. 2000;2.
4. Neil Dm, Bm de Gazella, Magnesio de Chaves, Migaraya Mh, Colenbrander B, Agüero A. Membrana change during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2003;59(8):1693-705.
5. Ríos GE. Comparación del enfriado tradicional a +5°C vs el enfriado a 2°C y -2°C sobre la criosupervivencia y la capacitación prematura del semen de carnero. (tesis de maestría). México (D.F.). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. 2005.
6. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod*. 2000;5:46-52.
7. Salomon S, Maxwell WMC. : Frozen storage of ram semen I. progressing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 1995;3-4(37)185-249.

8. Watson PF. The Causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000;(60-61)481-492.
9. Watson PF. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7:871-891.
10. Oko R, Maravei D. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol. Reprod*. 1994;50:1000-1014.
11. Gutiérrez P. O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. (tesis de maestría). México (D.F.) Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
12. Ross M. *Histología*. 3^{ra}ed. México: Médica Panamericana, 1992.
13. Valencia J, Juarez-Mosqueda M.L.: Transporte de gametos y fertilización. En Galina C. *Reproducción de animales domésticos*. 2da ed. México: Limusa Noriega, 2006.
14. Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N. y Badia E. *Morfología espermática en porci*. Institut d'Estudis Catalans (Ed.) *Arxius de les seleccions de sciencies*, vol. 126. Barcelona, España. 2000.
15. Hafez E. *Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos*. 7^a ed. México: Interamericana-Mc Graw-hill, 2002.

16. Oko R, Clermont Y.: Origin and distribution of perforatorial proteins during spermatogenesis of the rat: an immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 1991;230:489-501.
17. Hernández EJ. ¿Depende la descondensación de núcleo espermático del cobayo de la estabilidad de la subestructura de la teca perinuclear?. (tesis de maestría). México (D.F.) Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2004.
18. Juárez-Mosqueda M, Mujica A.: A perinuclear theca substructure is formed during epididymal Guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J. Struct. Biol.* 1999;128:225-236.
19. Sutovsky P. et al.: Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research And Technique.* 2003;61:362-378.
20. Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretate S, Bortkiewicz H, Perry A, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggest the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.* 1998;58:1407-1415.
21. Buhr M, Canvin A, Bauley L. Effects of Semen Preservation on Boar Spermatozoa Head Membranes. *Gamete Research.* 1990;23:441-449.
22. Salamon S, Evans G and Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1ra ed. España: Acribia, 1990.

23. Martínez OC, Juárez-Mosqueda M de L, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*. 2006;66:1969-1975.
24. Vázquez J, Carrizosa J.: Identificación del estado del acrosoma y viabilidad de los espermatozoides por una técnica de triple tinción. 4tas. Jornadas internacionales de reproducción animal e inseminación artificial. León comunicaciones. 1980:35-38.
25. Garde J, García Artiga C, Gutiérrez A, Vásquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med. Vet.* 1992;(9)2.
26. Longo FJ. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *The journal of Cell Biology*. 1987;105:1105-1120.
27. Flores GH. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. (tesis de maestría). México (D.F.). Facultad de estudios Superiores-Cuautitlán. 2005.
28. Medrano A, Cabrera F, González F, Batista M, Calero P, Quesada E, and Gracia A.: Cryopreservation of spermatozoa. Poster presentation. *Cryobiology*. 2001;43: 316-389.
29. Locksley E, Yang H, Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology*. 1988;25:178-185.

30. Jager S, Wijchman J, Kremer J.: Studies on the descondensation of Human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J Exp Zoo.* 1990;256:315-322.
31. Talbot P, Chacon R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology.* 1981;215:201-208.
32. Way A, Henault M, Killan G. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculates and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriology.* 1995;43:1301-1316.
33. McDonald's. *Veterinary Endocrinology and Reproduction.* 5^a ed. U.S.A.: Iowa State Press, 2003.