

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA TREALOSA SOBRE LA VIABILIDAD DEL
ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DEL OVINO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

VÍCTOR ANTONIO MARTÍNEZ ROLDÁN

ASESORAS:

MVZ Rosa Berta Angulo Mejorada
MVZ María de Lourdes Juárez Mosqueda

México, D.F.

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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

ANSELMO Y TOÑA

Con todo mi amor. Por darme siempre de forma incondicional apoyo y cariño, por enseñarme que la única forma de lograr las metas es con esfuerzo y trabajo. Es mi forma de dar gracias por todo el esfuerzo de su parte para que este sueño sea una realidad.

A MIS HERMANAS

AMBAR Y YURI

Con todo mi cariño. Por que son una parte esencial en mi vida. Por contar siempre con ustedes en las buenas y las malas. Por ser mis niñas preciosas. Por compartir una vida juntos. Gracias.

A EMILIANO

Por iluminar nuestras vidas. Que Dios te bendiga siempre chaparro.

A CHRISTIAN

Mi hermano, entre tu y yo, no se requieren palabras, solo un gracias por todo.

A JORGE

Por enseñarme que el aprender no es un ¿Cómo? Si no un ¿Por qué?

A SISI

Por tu cariño. Por darme la fuerza necesaria y la inspiración. Por tu apoyo. Y hacer que cada día quiera ser mejor. Te quiero mucho.

A WILIBERTO

Por ti y los tuyos.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por darme vida y la fuerza suficiente para seguir adelante siempre.

A mis asesoras: Rosa Berta Angulo y Lourdes Juárez. Por su apoyo, además de su amistad. Para el término de esta tesis.

Al Dr. Antonio Ortiz: por su amistad y por el apoyo que me ha dado.

A Ariadna, Juan, Elena, Carlos, Adrián, Wendy, Elizabeth y Betzabe: Por brindarme su amistad y apoyo.

A Gabriela, Janet, José Luis, Karla, Karina, Mariana, Paola: por su ayuda en la elaboración de este trabajo y por el tiempo que compartimos juntos.

A los M.V.Z. que laboran en C.E.I.E.P.O.: Rosy, Martín, Ricardo, Cesar, Alberto, Jesús, José Luis, Cesar. Octavio. Por sus enseñanzas, paciencia, amistad y apoyo.

A Oscar Gutiérrez: por su ayuda y consejos para la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros en el laboratorio de morfología: Salvador, Dania, Cipatli, Juan Carlos. Por su ayuda para la elaboración de esta tesis.

CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCIÓN.....	3
TIPO DE CRIOPROTECTORES.....	4
AZÚCARES COMO CRIOPROTECTORES.....	8
CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL.....	10
CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE CARNERO.....	13
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
II.- MATERILA Y METODOS.....	17
COLECCIÓN DEL SEMEN.....	17
EVALUACIÓN DEL SEMEN.....	18
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE TREALOSA.....	20
DILUSIÓN DEL SEMEN.....	20
CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	22
TRANSPORTACIÓN DEL SEMEN AL LABORATORIO.....	23
DESCONGELACIÓN DEL SEMEN.....	23

LAVADO DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	23
TRIPLE TINCIÓN.....	24
ESTADÍSTICA.....	27
III.- RESULTADOS.....	27
IV.- DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	38
ANEXO.....	39
V.- BIBLIOGRAFIA.....	40

RESUMEN

MARTÍNEZ ROLDÁN VÍCTOR ANTONIO. EVALUACIÓN DE LA TREALOSA SOBRE LA VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DEL OVINO (bajo la dirección de la M.V.Z. Rosa Berta Angulo Mejorada y M.V.Z. María de Lourdes Juárez Mosqueda).

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la trealosa sobre la viabilidad del espermatozoide ovino criopreservado. El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el laboratorio de Morfología de la misma.

Se utilizaron 4 machos, 2 de la raza Suffolk y 2 de la raza Dorset. La colección del semen fue mediante la técnica de vagina artificial. Se realizó una evaluación microscópica y macroscópica del semen utilizado. Este fue dividido en cuatro partes iguales y a tres de ellas se les añadió de trealosa a las concentraciones de; 20, 10 y 5 mM además de yema de huevo al 20% en solución acuosa y la cuarta muestra fue congelada de manera rutinaria con Triladyl (1). La concentración espermática fue de 200×10^6 /ml células en 0.5 ml, previo al congelado el semen se colocó en pajillas de 0.25 ml que se sellaron con alcohol polivinilo, obteniendo un total de 30 pajillas. El enfriado comenzó a una temperatura de 22° C hasta llegar a una temperatura de 5° C en aproximadamente 2 horas, para ello las pajillas fueron introducidas en un recipiente de aluminio conteniendo alcohol etílico de 90°, y colocado dentro de un refrigerador domestico. Una vez que las pajillas llegaron a 5° C, las muestras fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante diez minutos. Para la evaluación del semen criopreservado se

descongelaron dos pajillas por muestra en baño María a 37°C durante 8 segundos (15). Espermatozoides frescos y descongelados fueron teñidos con la técnica de triple tinción. Esta técnica nos permitió diferenciar a los espermatozoides vivos o muertos y viables o no viables. La evaluación mostró que existió una gran disminución en el número de espermatozoides vivos después del proceso de descongelación pero un gran porcentaje de estos conservaron su acrosoma intacto. Los resultados mostraron que la trealosa por sí sola no es un buen criopreservador, pero sí es un excelente protector del acrosoma. Proponemos que futuros experimentos sean realizados con trealosa acompañada con un diluyente no penetrante, lo que posiblemente permita aumentar la viabilidad de las células.

I. INTRODUCCIÓN

No siempre es posible contar con machos reproductores de excelente calidad dentro de una explotación ovina, por lo que en ocasiones se tiene que recurrir a un programa de inseminación artificial. Además, la inseminación artificial (IA) es una técnica que aplicada en las explotaciones pecuarias ofrece ventajas como el mejoramiento genético y el control de enfermedades venéreas. Esta técnica se inicio con la utilización de semen fresco y posteriormente con semen congelado. En especies como la bovina el empleo de este último ha permitido un rápido mejoramiento genético (1). Sin embargo, en especies como la ovina el empleo comercial de semen criopreservado es poco, ello debido a la baja viabilidad de las células después de este proceso. Por ello, la implementación de semen congelado a los programas de inseminación ha dado lugar a un gran número de investigaciones para encontrar los métodos de envasado, componentes de los diluyentes, tiempos de enfriamiento y congelación óptimos para obtener los mejores porcentajes de fertilidad. (2)

El concepto de conservación de células germinales se entiende como toda medida encaminada a disminuir la actividad metabólica de las células con la finalidad de preservar, por un mayor tiempo, la capacidad fecundante de los gametos masculino y femenino, en la que se asegure además la capacidad de vida y desarrollo del futuro cigoto. (3)

El fundamento básico de la inactivación es el de la anabiosis, en la que se suprimen o mantienen separadas sustancias y condiciones necesarias para la vida sin provocar perjuicios en las estructuras de las unidades conservadas (3). La anabiosis se puede alcanzar por diversas vías; si se recurre al empleo de bajas temperaturas hay que distinguir entre refrigeración y congelación. Cuando el semen se congela y conserva a bajas temperaturas, por ejemplo en nitrógeno líquido a -196°C , las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda mantener viable durante largo tiempo para futuro uso de un semental en particular. Además, de esta forma se facilita el transporte del semen, así como la recolección y conservación en épocas distintas a la estación reproductora. (2)

La congelación propiamente dicha puede realizarse por métodos estáticos o dinámicos, es decir mediante el empleo de sistemas que permitan interferir sobre el proceso de congelación o aquellos que se realizan por la propia inercia de la temperatura. Entre los estáticos están la congelación de vapores, en tanque abierto y píldoras (pellets). Entre los dinámicos tenemos, la congelación con rampas de velocidad controlada. (4)

TIPOS DE CRIOPROTECTORES

Para mantener a los espermatozoides viables por periodos de tiempo más prolongados y para enfriar o criopreservar el semen, es necesaria su dilución con

una solución crioprotectora, la cual no debe de ser toxica (5). Los crioprotectores se han clasificado en: penetrantes e impermeables.

a) **Penetrantes:** son sustancias de bajo peso molecular como, el glicerol (G), dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes. Todos estos compuestos deshidratan a la célula al penetrar a ésta para ayudar a proteger el citoplasma. Por lo tanto, la protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular del agua y por reducir al mínimo el daño celular causado por la concentración de solutos presentes en el medio durante el enfriamiento. (6). Es decir, los agentes penetrantes crean un ambiente adecuado al desplazar y reducir el contenido de agua de la célula a temperatura suficientemente bajas y con ello disminuir el efecto nocivo de la concentración de solutos en la célula. (7)

b) **Impermeables o extracelulares:** son sustancias de peso molecular alto como, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, Ficoll, dextranosorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos sin penetrar a la célula extraen el agua libre intracelular al utilizar la diferencia de presión osmótica. (6)

Por otra parte, es posible utilizar diluyentes naturales o sintéticos, siendo la leche de vaca el diluyente natural de mayor uso. Al momento de emplearse el diluyente y el semen deberán encontrarse a la misma temperatura (30° C), esto con la finalidad de evitar un choque térmico en los espermatozoides. Por otra parte, nunca deberá agregarse el semen al diluyente, y la mezcla deberá

homogenizarse con suavidad y siempre se deberá evaluar el semen para confirmar la viabilidad de los espermatozoides después de la dilución (10). Generalmente la motilidad y concentración de las células dictan la proporción a la que se diluye el semen. Por ejemplo, el semen con puntuación de 5 en movimiento y concentración mayor a 350×10^7 puede diluirse en una proporción de hasta 4:1. Sin embargo la mayor parte de los eyaculados se diluyen a una proporción de 2:1. (10)

Además, todos los diluyentes empleados para congelar el semen deberán cubrir ciertas propiedades, como evitar los cambios de pH, de osmolaridad, contener una fuente de energía y de otras sustancias que permiten proteger la membrana plasmática durante el enfriamiento (2). Para este último fin, la yema de huevo ha sido incluida en la elaboración de algunos diluyentes sintéticos, ya que poseen una fracción fosfolipídica y una lipoproteica en su composición (que le proporciona protección a los espermatozoides contra el choque por frío). En el caso del semen del carnero, la fracción lipoproteica dializable de la yema de huevo es la que parece proporcionar la mejor protección durante la congelación (8); sugestivo de que la baja densidad lipoproteica es lo que probablemente sea la fuente de protección, ya que se ha observado que estas lipoproteínas se unen fuertemente a la membrana plasmática de los espermatozoides. (9)

El llamado choque frío que se presenta durante la congelación del semen se da en el descenso térmico de los 30° a los 0° C. Se ha observado que durante este proceso se producen alteraciones en la superficie de los espermatozoides,

hay pérdida irreversible de la movilidad, de la actividad metabólica y de la capacidad de fecundación. Se ha postulado que el choque frío está relacionado con cambios en la transición de fase de los lípidos de la membrana y con una alteración del estado funcional de la misma. Es por ello que se recomienda el descenso de la temperatura debe de ser realizado cuidadosamente. Sin embargo un enfriado lento también puede inducir un estrés sobre la membrana plasmática del espermatozoide. Tal estrés sobre la membrana ocurre por debajo de los 0° C. Así, otra zona crítica que se presenta durante el proceso de congelación se encuentra entre -15 y -25° C, ya que a estas temperaturas se lleva a cabo la cristalización del agua y con ello la separación de electrolitos y material coloidal (3). Es decir, al alcanzar estas temperaturas se comienzan a formar cristales intracelulares de agua, logrando que por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela y exponiendo a la célula a estas altas concentraciones de sales (efecto solución). Durante esta fase, si el tiempo de exposición de las células es demasiado largo a las soluciones hipertónicas, se puede permitir la remoción de proteínas de membrana plasmática. Aunado a ello, el agua también se difunde hacia el exterior de la célula con la finalidad de que la concentración de sales se equilibre tanto interna como externamente, sucediendo así la deshidratación celular. Por otra parte si el agua no sale rápidamente se da la formación de cristales intracelulares que pueden dañar mecánicamente a la célula. (4)

Debido a lo anterior, cuando el semen se ha conservado congelado durante un largo periodo de tiempo La valoración que se deberá hacer es la afectación de su viabilidad. (2)

AZUCARES COMO CRIOPROTECTORES

Se ha sugerido que los azúcares de peso molecular alto actúan a través de un mecanismo osmótico promoviendo la deshidratación celular durante la congelación e impidiendo la formación de grandes cristales de hielo dentro de la célula. (9)

La trealosa (α D-glucopiranosil (1-1) D glucopiranososa) es un disacárido no reductor con un peso molecular de 342.30 Da) (Figura 1), que se produce en ciertas células cuando estas se encuentra en condiciones de estrés. Se ha comprobado que este azúcar funciona como un osmoregulador y como agente protector al mantener la delicada estructura de las macromoléculas (11). La trealosa posee una gran capacidad higroscópica, ya que es capaz de interaccionar con el agua a través de la formación de puentes de hidrógenos con sus grupos OH y el oxígeno del agua o el oxígeno del azúcar con los hidrógenos del agua (12). Las fuentes en donde se puede encontrar son los hongos, las levaduras y es el azúcar más importante en la hemolinfa de los insectos. (13)

Fig. 1: Estructura química del disacárido trealosa. $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$
(α D-glucopiranosil (1-1) D glucopiranososa)

Intracelularmente la concentración de trealosa puede fácilmente exceder 0.1 M sobre el total de la célula. Se ha comprobado que cuando se deshidratan las membranas biológicas, en ausencia de estabilizadores, ocurren cambios altamente destructivos en la fase de transición de los lípidos, lo que causa daños irreversibles a la membrana. Sin embargo la presencia de trealosa puede evitar estos cambios. También en los métodos de criopreservación se ha descrito a la trealosa como un efectivo diluyente hipertónico. (14)

El mecanismo por el cual la trealosa protege a las estructuras biológicas (membranas, lisosomas, microorganismos, polen) y proteínas durante la congelación y la deshidratación ha sido poco dilucidada. Existen varias hipótesis con respecto a su mecanismo de protección: a) la formación de puentes de hidrógeno con las proteínas, reemplazando así moléculas de agua esenciales para mantener la estructura nativa de las mismas; b) la generación estructuras vítreas, con una alta estabilidad, debido a la baja movilidad molecular en estos

sistemas y c) con las membranas biológicas por la formación de puentes de hidrogeno que se podrían establecer entre los grupos hidroxilo de la molécula de trealosa y los grupos fosfatos de los fosfolípidos; así estos enlaces de hidrógeno estarían remplazando a los enlaces entre los lípidos de la membrana y el agua que se encuentran bajo condiciones fisiológicas normales (membrana hidratada) (15). Por lo tanto, las moléculas de trealosa estarían jugando una función similar a las moléculas de agua manteniéndose así la integridad de la membrana plasmática. (14).

CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

El acrosoma del espermatozoide, formado a partir del aparato de Golgi, se encuentra adosado a la superficie nuclear. Esta especie de “sombrero” nuclear contiene las enzimas necesarias para la penetración del espermatozoide a través de la membrana plasmática del óvulo. Este se encuentra rodeado por una membrana continua. Llamamos “membrana acrosomal externa” a la parte que “mira” hacia la membrana plasmática y “membrana acrosomal interna” a la que “mira” hacia la teca perinuclear. Entre las enzimas mejor conocidas se hallan la acrosina, la hialuronidasa y el factor mucolítico. Clásicamente el acrosoma consta de dos segmentos: 1) el “segmento anterior” que es mas grueso y con frecuencia esta rodeado por un reborde anterolateral llamado “engrosamiento marginal”. El segmento puede prolongarse a través de la cresta apical, como ocurre en los bovinos y carneros. El contenido del segmento anterior no es homogéneo y en algunas especies contiene estructuras cristalinas, que posiblemente corresponden

a su contenido en enzimas en una disposición espacial compacta. 2) El otro segmento el "segmento ecuatorial", es mas corto y delgado y con forma de media luna. Se sugiere que este último sería el responsable de mediar la fusión con la membrana del óvulo. (16)

La capacitación y la reacción acrosomal son dos procesos fisiológicos que el espermatozoide de los mamíferos debe de sufrir en secuencia previo a la fusión con el gameto femenino. In vivo, el espermatozoide eyaculado requiere un periodo de residencia en el tracto reproductor de la hembra para hacerse competente para la fertilización. Esta adquisición de competencia ha sido definida como capacitación; la cual es un conjunto de cambios que le confieren al espermatozoide la habilidad para sufrir la reacción acrosomal y fertilizar al óvulo. Mientras que la capacitación produce solo pequeños cambios en la ultraestructura del espermatozoide, la reacción acrosomal (RA) provoca cambios estructurales profundos y bien definidos. La RA se caracteriza por ser un proceso de excitosis regulada, dependiente de calcio externo, que consiste en la función de las membranas plasmática y acrosomal externa en múltiples puntos focales, los cual además de producir la liberación del contenido acrosomal capacita al espermatozoide para que se fusione con la membrana plasmática del óvulo. (17)

Fig. 2: Esquema de la reacción acrosomal. A) cabeza de espermatozoide intacto; de afuera hacia dentro de la célula: membrana plasmática (MP), acrosoma intacto, membrana acrosomal externa (MAE) e interna (MAI) y núcleo. B) Fusión en múltiples sitios entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa con la expulsión de contenido acrosomal. C) Formación de la vesícula híbrida, quedando membrana acrosomal interna expuesta. D) Cabeza espermática con reacción acrosomal, donde de manera importante se conserva el segmento ecuatorial del acrosoma.

CRIOPRESERVACIÓN EN EL SEMEN DEL CARNERO

La IA en los ovinos lleva más de 70 años practicándose, las primeras ovejas que fueron inseminadas artificialmente con resultados satisfactorios fue en 1936. Sin embargo, su aplicación a gran escala (1965) sólo fue posible después de varias décadas cuando se logro la forma de sincronizar, mediante el uso de hormonas endógenas el ciclo estral de las ovejas. Actualmente se calcula que se inseminan un promedio de 50 a 60 millones de borregas en el mundo. (18)

En algunas especies como los bovinos el uso de la técnica de IA se ha extendido desde que se comenzó a estudiar en 1951, dependiendo casi exclusivamente de semen congelado-descongelado, lo que ha hecho posible utilizar intensamente y difundir el potencial genético de sementales superiores a un costo razonable. Sin embargo, en otras especies domesticas, como los porcinos y caprinos el semen congelado en la IA es raramente utilizado. (19)

Las desventajas del empleo de la IA transcervical en ovinos empleando semen congelado es que los valores de fertilidad obtenidos llegan a ser más bajos en comparación con la monta natural, además de que requiere de inversión en material para realizarla. (18)

Sin embargo los resultados pueden mejorarse significativamente cambiando el método de inseminación con auxilio de la técnica de laparoscopia; o realizando la inseminación intrauterina con el método quirúrgico mediante laparotomía. Este último método utilizado por los ganaderos de la mayoría de los países productores de borregos; la fertilidad obtenida con esta técnica va del 50 al 80%. Sin embargo, aunque técnicamente este último método puede ser empleado en México aún no resulta una opción viable, sobre todo por su costo elevado. (19)

En el ovino, una de las ventajas de la congelación del semen es que podría ser congelado y almacenado durante la estación reproductiva, cuando este se produce en mayor concentración y calidad, y después ser aplicado en cualquier época del año y área geográfica (20). Se ha observado que la fertilidad del semen congelado puede ser la misma que en una pajilla almacenada de un año hasta 27 años. Los primeros informes del uso de semen congelado en ovejas fueron los de Bernstein y Petropavlovsky en 1937, usando un diluyente a base de glicerol.

La conservación del semen ovino ha tenido dificultades por que presenta bajos porcentajes de supervivencia después de congelado, que se refleja en los índices bajos de fertilidad. En la mayoría de los casos la viabilidad obtenida va de un 25 a un 45%. (19)

En la especie ovina como en otras especies, la baja fertilidad del semen criopreservado es atribuida a cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que sufre una proporción significativa de las [células](#) espermáticas y

que conducen a un [transporte](#) insuficiente y pérdida de viabilidad de los espermatozoides en el tracto genital. Se ha encontrado que el [daño](#) por la congelación es más severo en los espermatozoides del ovino que en los espermatozoides del bovino, particularmente la integridad del borde apical en los primeros es más sensible que el segmento postacrosomal y la pieza media del flagelo; por ello, la motilidad espermática de los espermatozoides ovinos criopreservados es habitualmente mayor que la integridad morfológica del acrosoma. (22)

Se postula que los cambios ultraestructurales afectan principalmente a las membranas, debido a una reordenación de los [lípidos](#) de la membrana durante la congelación-descongelación, alterándose así las asociaciones lípido-lípido y lípido-[proteínas](#), necesarias para una [función](#) normal de las membranas. (23)

De manera rutinaria el espermatozoide bovino es criopreservado usando, una concentración de 4-8% de glicerol en el medio de congelación, sin embargo los espermatozoides de otras especies no toleran la exposición a estas concentraciones. Por ejemplo, el espermatozoide del cerdo sufre un severo daño acrosomal si la concentración del glicerol excede de un 3%, lo mismo sucede en el caso del ovino. Además, en el caso del espermatozoide del carnero Aisen, et al, reportaron que existe una interacción lábil entre los lípidos de la membrana y los lípidos presentes en la yema de huevo o cualquier otro componente empleado en los diluyentes (13). También se menciona que, las dificultades encontradas en la criopreservación del semen de esta especie podrían estar relacionadas a la

proporción ácidos grasos insaturados: saturados, y a la proporción de colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide. (20)

Además, Watson (1996) menciona que el enfriado y la congelación del semen al igual que en otras especies, inducen cambios en los espermatozoides que simulan aquellos producidos durante capacitación y reacción acrosomal fenómeno que ha sido llamado criocapacitación o falsa capacitación. (21)

Por lo mencionado, se ha sugerido el ensayo de otros diluyentes en los que se sustituya el glicerol. Por lo que el empleo de componentes sintetizados de manera natural por plantas y animales expuestos a bajas temperaturas, entre ellos a la trehalosa, podrían ser una buena opción. (21)

HIPOTESIS

La adición de trealosa en el medio de congelación mejorara la viabilidad de los espermatozoides criopreservados del carnero.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Evaluar el efecto crioprotector de la trealosa en un medio de congelación para semen ovino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Determinar la concentración de trealosa óptima para conservar la viabilidad de los espermatozoides criopreservados del ovino.
- 2.- Valorar la viabilidad de los espermatozoides criopreservados con trealosa utilizando la técnica de triple tinción.
- 3.- Valorar la trealosa como crioprotector del semen ovino.

I. MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (C.E.I.E.P.O.) 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. (24)

COLECCIÓN DEL SEMEN

Se utilizó el semen de 2 machos de la raza Suffolk y 2 de la raza 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 dos eyaculados por macho. El semen se obtenía a una temperatura de 37° C y era colocado en un termo que contenía agua a la misma temperatura.

EVALUACION DEL SEMEN

En la evaluación macroscópica del semen fresco, se tomó en consideración el volumen, color y presencia de cuerpos extraños. En la evaluación microscópica se

considero la motilidad en masa, la motilidad progresiva, la concentración espermática, la integridad de la membrana plasmática (eosina-negrosina) y la integridad del acrosoma (triple tinción). La motilidad en masa se evaluó directamente en una gota de semen sin diluir observada al microscopio óptico con el objetivo 10x, la escala empleada para la evaluación fue 0 a 5, donde 0 fue la motilidad mínima y 5 la máxima. Para la congelación de las muestras la motilidad debió ser mayor o igual a tres. La motilidad progresiva se evaluó utilizando una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica (SSF), y observada en el microscopio óptico con el objetivo 40x, sólo se congelo el semen con una motilidad mayor o igual al 70%.

La evaluación de la concentración espermática se realizó diluyendo 0.05ml de semen en 1ml de agua destilada y colocando una gota de la misma en una cámara de Neubauer. Se contaron 5 cuadros y la concentración se determinó utilizando la técnica del hemocitómetro de la siguiente manera:

- Se preparo la cámara de conteo, colocando el cubre sobre la misma.
- El semen, depositado en un tubo mantenido en baño María a 37° C, fue mezclado gentilmente.
- Se monto la boquilla en la pipeta y se aspiro la muestra de semen hasta la marca 0.5, la lengua se mantuvo contra el agujero de la boquilla para retirar la pipeta del tubo, limpiando enseguida la punta de la pipeta con un paño seco.
- Se aspiro solución salina al 3% hasta la marca de 101.

- Ambos extremos de la pipeta fueron obturados con los dedos índice y pulgar y se agito para que se mezclara el semen con la solución salina.
- Una vez agitado, se descartaron las primeras 4 o 5 gotas procedentes del bulbo de la pipeta.
- Se colocó la punta de la pipeta en el borde de la cámara y se permitió que se deslizaran por debajo del cubre una gota de la muestra.
- La muestra se dejó reposar unos 5-6 minutos para permitir que los espermatozoides sedimentaran antes de ser observados en el microscopio.
- La cámara fue colocada en el microscopio y se realizó el conteo espermático, con el objetivo de 40X, en 5 cuadrados grandes. Los cuadrados contados fueron de los extremos de la retícula y el central. Para el conteo los espermatozoides que sobrepasaron las líneas de los cuadrados, sólo se contabilizaron los que estuvieran en las líneas superior y derecha.
- Se anotó el número total de espermatozoides en los 5 cuadrados.

La concentración de espermatozoides por ml de semen se calculó simplemente multiplicando el número total de espermatozoides en las 5 cuadrículas grandes por 10^7 . (2)

La integridad de la membrana plasmática se evaluó mediante un frotis de los espermatozoides teñido con eosina-nigrosina. (2) (8)

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LA TREALOSA

La selección de la concentración de trealosa a emplear en la congelación de los espermatozoides se realizó tomando en consideración la reportada en otros estudios, realizándose para esto solo un ensayo.

Para ello espermatozoides a la concentración de $200 \times 10^6/\text{ml}$, fueron diluidos en trealosa a las concentraciones de 5, 10, 20, 50, 100 y 200 mM, adicionados con yema de huevo al 20%, en solución acuosa. La evaluación de las células, al microscopio de luz, inmediatamente después de su dilución en trealosa mostró que a las concentraciones de 50, 100 y 200mM se producía la inmovilización de los espermatozoides, mientras que a las concentraciones menores, es decir 5, 10 y 20 mM, aún era posible observar espermatozoides moviéndose.

DILUSION DEL SEMEN

Para determinar el volumen final de dilución del semen primero se determino el número de pajillas a congelar por muestra, empleando para ello el método de Salamon y Visser (1972). Aplicando la siguiente fórmula:

$$NP = C \times MP \times VE / 200$$

Donde

NP= número de pajillas

C= concentración espermática

MP= motilidad progresiva

VE= volumen del eyaculado

200= la concentración en millones deseadas al final de la dilución.

Una vez calculado el número de pajillas, el volumen final de dilución se determino con utilizando la siguiente fórmula:

$$VF = NP \times VP - VE / NM$$

Donde:

VF= volumen final

NP= número de pajillas

VP= volumen de la pajilla (0.25 ml)

VE= volumen del eyaculado

NM= numero de muestras (tratamientos; en este estudio fueron 4)

Para la dilución del semen, este fue dividido en cuatro alícuotas las cuales fueron llevadas al volumen final de dilución con los medios adecuados (trealosa 5, 10 y 20 mM y Triladyl como muestra control). Por ejemplo, si el volumen final de

dilución era 4 ml y la muestra de semen era de 1 ml, este último se debía dividir en alícuotas de 0.25 ml y a cada una se le debía de adicionar 0.75 ml del diluyente correspondiente.

Todo el procedimiento se realizó inicialmente con el semen mantenido a 37° C.

CONGELACIÓN DEL SEMEN

De las cuatro alícuotas en las que se dividió el semen, a una se le adiciono el diluyente comercial Triladyl, yema de huevo al 20%, agua destilada en una relación 1:1:3 respectivamente (2); y a las otras tres, por separado, se les adiciono trealosa para obtener concentraciones finales de 20, 10, 5mM, adicionadas todas ellas con de yema de huevo al 20%, en agua bidestilada. Los diluyentes fueron adicionados a la temperatura en que en ese momento se encontrará en semen y se dejó que esta descendiera hasta 22° C para que fueran empajilladas. Las pajillas utilizadas fueron de 0.25 ml. Una vez alcanzada la temperatura de 22° C, las pajillas conteniendo el semen fueron enfriadas lentamente hasta alcanzar una temperatura de 5° C (en dos horas aprox.) Esta se logró mediante la utilización de un refrigerador de uso doméstico, para ello las pajillas se colocaron dentro de un recipiente de aluminio con capacidad de 310 ml, y la temperatura fue monitoreada constantemente por medio de un termocoplín.

Una vez que las pajillas llegaron a los 5° C, las muestras fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido, a 2cm de la superficie (-90° C) por 10 minutos e

inmediatamente sumergidas al nitrógeno líquido para su conservación (-197° C).

(25)

TRANSPORTACIÓN DEL SEMEN AL LABORATORIO DE MORFOLOGIA DE LA FMVZ DE LA UNAM.

Muestra alícuotas de los diferentes tratamientos fueron colocadas dentro de un termo transportador conteniendo agua a la temperatura a la que se encontraba la dilución (28° C), la transportación duraba en promedio 1hr 30min, lo cual indica que el semen fresco permanecía diluido en trealosa 2hrs.

DESCONGELACION DEL SEMEN

Para la evaluación del semen criopreservado se descongelaron dos pajillas por muestra en un baño María a 37° C durante 8 segundos. (26)

LAVADO DE LOS ESPERMATOZOIDES

Para retirar la trealosa del medio de congelación se realizaron 3 lavados utilizando una solución de amortiguador de fosfato salino (PBS) (NaCl 137 Mm, KCL 2.7 Mm, NaH₂PO₄ 9.6 Mm, KH₂PO₄ 1.4 Mm, pH 7.4), colocando para ello el

contenido de la pajilla descongelada (0.25ml) en 4.75ml del amortiguador, y las muestras se centrifugaron a 1500 rpm/10m.

TRIPLE TINCION

Este método nos permite diferenciar entre células vivas y muertas además de valorar la integridad del acrosoma de las mismas. Esta evaluación se realizó tanto en semen fresco como en semen descongelado. Para ello los espermatozoides fueron suspendidos a una concentración de 35×10^6 células/ml en solución salina fisiológica (SSF) (NaCl 154 mM). Se tomaron 100 μ l de la suspensión espermática y se le adiciono 100 μ l azul de tripán al 2% y se incubaron a 37° C durante 15 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1200rpm/3min, y el sobrenadante se descarto. Las muestras fueron resuspendidas y lavadas con PBS a 1200rpm/3min hasta que el sobrenadante se observara transparente. Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato durante 30 minutos a una temperatura de 4° C, enseguida las muestras fueron centrifugadas a 1200rpm/8min y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente se realizó un frotis de cada muestra y se dejó secar al aire. Los frotis fueron teñidos con café Bismarck al 0.8% en solución acuosa (pH de 1.8), durante 15 minutos en baño maría y después se lavaron con agua desionizada y fueron teñidos con rosa de bengala al 0.8% en amortiguador de Tris 0.1M, pH 5.3 durante 1 minuto.

Finalmente los frotis se lavaron con agua desionizada y se montaron en resina para su observación al microscopio de luz (26). De cada muestra se contabilizaron 100 células y se clasificaron de acuerdo a los patrones de afinidad y reacción tintorial de esta prueba. (27). Se evaluaron ocho muestras, dos por macho.

Interpretación de la tinción

1. Región acrosomal rosa y post-acrosomal ligeramente marrón: espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VAI).
2. Región acrosomal y post-acrosomal ligeramente marrón: espermatozoide vivo con reacción acrosomal (VSA).
3. Región acrosomal rosa y región post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MAI).
4. Región acrosomal y post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con reacción acrosomal (MSA).

FIGURAS

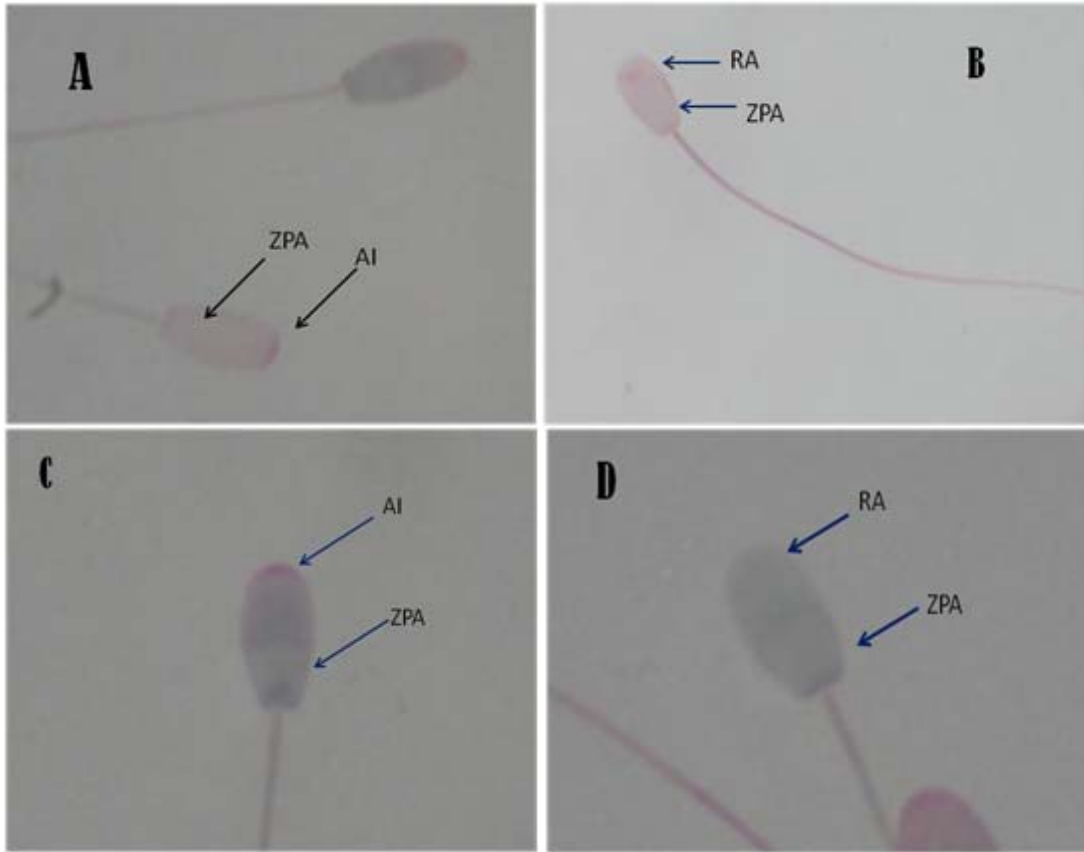


Fig. 3.- Fotografía de espermatozoides a 40X con la técnica de TT. A) espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VAI): acrosoma color rosa (AI) y zona postacrosomal (ZPA) color marrón claro (vivo); B) espermatozoide vivo con reacción acrosomal (VSA): coloración marrón clara tanto en el acrosoma (RA) como en el ZPA; C) espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MAI): acrosoma rosa (AI) y ZPA marrón oscuro (muerto); D) espermatozoide muerto con reacción acrosomal (MSA): coloración marrón obscura tanto en el acrosoma (RA) como en la ZPA.

ESTADISTICA

El análisis estadístico se realizo mediante la utilización del programa para P.C. Minitab utilizando la prueba de ANOVA con la técnica de TUKEY. (28)

I. RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados de la evaluación macro y microscópica de cada uno de los eyaculados obtenidos. En promedio el volumen de los eyaculados fue de 1.05 ml, con una concentración de 314×10^7 /ml. La motilidad en masa promedio fue de 3.2, mientras que la progresiva fue de 78.1%.

Los espermatozoides diluidos a las concentraciones de trealosa de 50mM, 100mM, 200mM al ser valorados bajo el microscopio de luz se observaron aglutinados y sin movimiento, además la mayor parte de células se encontraban muertas. Por otra parte, los espermatozoides diluidos a 5mM, 10mM y 20mM de trealosa son los que presentaron la mejor viabilidad, por lo que el proceso de congelación se realizó empleando estas tres concentraciones.

Tabla 1.- Evaluación macroscópica y microscópica del semen fresco de carnero.

No. REGISTRO	VOLUMEN (ml)	MOV. MASA	MOV. PROG. (%)	CONCENTRACIÓN (x107)
Ortíz (501 A)	0.9	3	90	261
Gumaro (649 G).	1.5	3	70	380
Ortíz (501 A)	1	3	70	290
Charly	1.5	4	90	360
Charly	1	3	70	420
Gabo	1	3	80	250
Gumaro (649 G).	1	3	70	434
Gabo	0.5	4	85	117
Promedios	1.05	3.2	78.1	314

Antes del congelamiento (espermatozoides frescos) las células diluidas a la concentración de 10mM de trealosa fueron las que presentaron la mayor viabilidad (16.38%) seguidas por la de 5mM (14.25%) y la más baja viabilidad fue a la concentración de 20mM (12.13%) (Tabla 2). Después del descongelado el porcentaje de viabilidad de este tipo de muestras fue de 6.75, 4.75 y 5.38% respectivamente. Como podemos observar el mayor porcentaje de los espermatozoides vivos tanto en fresco como al descongelado (16.38 y 6.75%) se obtuvo a la concentración de 10mM de trealosa, sin embargo no hubo una diferencia estadística significativa con las otras dos concentraciones del azúcar (5 y 20mM). Sin embargo, al calcular los porcentajes de viabilidad para cada una de las diferentes concentraciones de trealosa, la que mantuvo el porcentaje mayor fue la de 5 mM, siendo este de 66.6% al ser descongelado. Al comparar los resultados de los tratamientos de trealosa con los del grupo control (Triladyl) antes del descongelado hubo una diferencia estadística, sin embargo esta no fue así después del descongelado.

Sin embargo el porcentaje de viabilidad disminuyó drásticamente en el grupo control después del descongelado, ya que de 48.75% pasó a 3%.

Tabla 2.- Porcentaje de espermatozoides vivos, en el semen fresco y en el criopreservado con trealosa y Triladyl.

ESPERMATOZOIDES VIVOS (%)				
TRATAMIENTO	Try	t20	t10	t5
FRESCO	48.75 ± 8.68 ^a	12.13 ± 2.79 ^a	16.38 ± 5 ^b	14..25 ± 4.8 ^a
DESCONGELADO	3 ± .78 ^c	5.38 ± 1.16 ^c	6.75 ± 1.73 ^c	4.75 ± 0.77 ^c
% VIABILIDAD DESPUES DEL PROCESO (%)	6.15	56.65	58.79	66.6

***Literales diferentes por línea indican diferencia significativa; P<0.005**

TRY= Triladyl, t20= trealosa 20mM, t10= trealosa 10mM, t5= vivos trealosa 5m.

Por otra parte los espermatozoides que presentaron el mayor porcentaje de acrosoma intacto fueron los diluidos a la concentración 20mM de trealosa (86.63%) seguidos por los de 5mM y 10mM (84.63 y 83.88, respectivamente), presentando el menor porcentaje el grupo control (triladyl) (71.75%). Este mismo tipo de muestras al descongelado mostraron una disminución en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto 78.25, 83.88 y 78.88 respectivamente. A pesar de que estadísticamente no existió diferencia estadística entre los tratamientos de trealosa y Triladyl, la trealosa mantuvo en un mayor porcentaje el acrosoma intacto. Así, al descongelar se observa que en los espermatozoides con acrosoma intacto (AI) que fueron tratados con Triladyl disminuyeron en un 17%, mientras que aquellos que fueron protegidos con trealosa solo disminuyeron en 9% para 20mM, 8% 10mM y 0.5% 5mM. Siendo este ultimo el que brindo mejor protección para el acrosoma durante el congelado y descongelado.

TABLA 3.- Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, en los espermatozoides tratados con Triladyl y trealosa antes y después del proceso de congelación

ESPERMATOZOIDES CON ACROSOMA INTACTO		
TRATAMIENTO	T20	T10
FRESCO	86.63 ± 2.64 ^a	83.88 ± 3.55 ^a
DESCONGELADO	71.75 ± 9.42 ^a	76.88 ± 3.76 ^a

(P<0.005)

T= Triladyl, T20= trealosa 20mM, T10= trealosa 10mM, T5= trealosa 5mm

I. DISCUSION

Los disacáridos como la sacarosa, la lactosa y más recientemente la trealosa, han sido ampliamente usados como crioprotectores esto debido a su habilidad para formar cristales, los cuales presentan una alta viscosidad y baja movilidad, lo que conduce un incremento de estabilidad del material preservado. Algunos científicos han sugerido que el único requerimiento para la preservación de la estructura y la función de las membranas, liposomas y proteínas es la habilidad de los aditivos, (por ejemplo azúcares y polisacáridos) para formar cristales.

En este trabajo la dilución de los espermatozoides del carnero a las concentraciones de 5, 10 y 20mM de trealosa no mejoro la viabilidad de los espermatozoides después del proceso congelación. Trabajos previos han encontrado que el empleo de trealosa a concentraciones mayores a las ensayadas en esta investigación aumenta la viabilidad del espermatozoide de esta misma especie, siempre y cuando este azúcar vaya acompañada de otro agente crioprotector como el glicerol, concluyendo que la concentración más adecuada para proteger a la membrana plasmática es de 100mM. En concordancia con nuestros resultados en dichos trabajos han encontrado porcentajes similares de acrosoma intacto. (29). Recientemente, experimentos realizados por Fernández-Santos et. al. encontraron que el empleo de trealosa para la congelación del semen del ciervo rojo no es apropiado, ya que la células presentaron daños en el DNA. (30)

Abó gala y Terado (2003) mostraron que la trealosa incrementa la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide de macho cabrío. Posiblemente, en este estudio la disminución en la viabilidad producida por la dilución de los espermatozoides en trealosa pudo deberse a un fenómeno similar, el cual pudo ocasionar una modificación en el proceso de regulación de la osmolaridad por parte de la célula. Sin embargo, en contraste con lo anterior diversos autores han determinado que la presencia de azúcares en los diluyentes de congelación probablemente estén afectando el patrón de cristalización del hielo, la forma y ancho de los canales de la solución no congelada, lo cual puede retrasar o prevenir el daño por el enfriado rápido de los espermatozoides. Más aun, la presencia de los azúcares puede conducir a una baja en la concentración de sales en el agua no congelada, consecuentemente reduciendo el daño debido al efecto solución.

A pesar de que el diluyente a base de trealosa no mantuvo la viabilidad del semen de carnero esta fue superior a la presentada por el diluyente comercial (Triladyl) después del descongelado. (9) La acción crioprotectora de la trealosa a nivel de la membrana celular ha sido demostrada en varios trabajos (8). Se ha sugerido que el efecto crioprotector de este azúcar se debe a la formación de puentes de hidrogeno entre el azúcar y los grupos polares que constituyen las biomembranas, lo que contribuye a la preservación de la integridad de las estructuras biológicas. Así conforme las células son deshidratadas y congeladas,

este tipo de interacciones remplazan aquellas del agua de hidratación de la interfase membrana-fluidos y de esta forma previene la transición de fases. (8)

La integridad del acrosoma se ha utilizado como medida de éxito para evaluar las técnicas de congelación de semen y la relación entre estas y los diluyentes. (30). En nuestro trabajo, en promedio el acrosoma permanece intacto en más del 70% de los espermatozoides que fueron diluidos bajo el tratamiento con trealosa. Se ha sugerido que la deshidratación intracelular causada por la hipertonidad de la trealosa puede contribuir al preservación de los organelos durante la congelación a través de reducir la formación de cristales de hielo. (1)

Tomando en consideración solo la integridad del acrosoma, sin considerar la viabilidad de los espermatozoides (vivos o muertos), la protección conferida por la trealosa después del descongelado fue del 90% lo cual nos indica que el azúcar proporciona una protección sobre las membranas, sin embargo esto no significa que la célula tenga la capacidad de regular su volumen celular. Los porcentajes de integridad de acrosoma coinciden con lo descrito por Dalimata y Graham en el semen de conejo al congelado con trealosa (53%), sin embargo nuestros porcentajes fueron más altos. Sin embargo los autores mencionan que una combinación de crioprotectores penetrantes y no penetrantes (acetamida, trealosa) es más eficaz para preservar a los espermatozoides de conejo. (30)

Por otra parte, se ha reportado que la combinación de trealosa-EDTA le confiere una mayor protección a los espermatozoides durante los procesos de

congelación y descongelación, posiblemente el retiro del calcio del medio previene la competencia de catión con trealosa para ocupar los sitios en la membrana. (31)

La yema de huevo, han sido incluida en la elaboración de los diluyentes sintéticos con el propósito de conferir protección a los espermatozoides contra el choque por frío. Uno de los obstáculos que se presenta para evaluar el semen postdescongelado es la adición de la yema de huevo esto debido a su consistencia, ya que su viscosidad interfiere con la nitidez de las muestras al ser observadas en el microscopio de luz. (9). Esto posiblemente pudo ocasionar las variaciones en los patrones de tinción reportados para la triple tinción ya que en nuestro estudio los espermatozoides vivos presentaron una coloración marrón oscura en la región post acrosomal mientras que los muertos la coloración fue marrón clara. (27)

En cuanto al decremento en la viabilidad de los espermatozoides al ser diluidos con la trealosa, antes del proceso de congelación, posiblemente pudo ser ocasionado por un cambio en el pH de la dilución, esto debido a que la trealosa tiende a acidificar el medio.

Podemos sugerir que para obtener mejores resultados en la criopreservación del semen ovino es recomendable utilizar a la trealosa para proteger el acrosoma, sin embargo no solo es suficiente mantener un alto porcentaje de acrosomas intactos en los espermatozoides ya que si los

espermatozoides no mantienen la motilidad no tendrán la capacidad de fertilizar al óvulo. Buenos resultados de motilidad (64%) han sido obtenidos empleando trealosa al 7.6% en los diluyentes de congelación. (10).

En nuestro caso es recomendable la repetición del experimento con un numero mayor de muestras y combinar a la trealosa con un agente crioprotector penetrante. Además, para evaluar la viabilidad de los espermatozoides (vivos y muertos) se podrían usar otras técnicas, como el empleo del Hoechst.

CONCLUSIONES

La trealosa confiere una buena protección al acrosoma del espermatozoide criopreservado del ovino.

La viabilidad de las células al descongelado es mejor empleando trealosa a una concentración de 10mM en el diluyente de congelación.

En futuros trabajos se deberá evaluar el efecto crioprotector de la trealosa en combinación con un crioprotector penetrante para ver si esto logra mejorar la motilidad.

ANEXO

La manera correcta de escribir trealosa en castellano de acuerdo al vocabulario científico y técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España, lo correcto es sin h intermedia, es decir trealosa.

Sin embargo en la búsqueda de artículos y paginas en español en la WEB (internet), sobre este azúcar es posible encontrar más veces escrita la palabra trehalosa con h intermedia, encontrando 174 páginas con la palabra trehalosa y solo 67 para trealosa.

Por otra parte la palabra trehalosa con la h intermedia es la aceptada por el Diario oficial de las Comunidades Europeas que con fecha del 25 de septiembre de 2001 *autoriza la comercialización de trehalosa como nuevo alimento o nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE)n ° 258/97 del parlamento Europeo y del consejo foliada como C (2001)2687. (39)*

I. BIBLIOGRAFIA

1. Salamon S., Visser, D. Recent advances in the deep-freezing of ram semen. *S Afr. J. Sci.* 4: 275-288 (1974).
2. Salamon S. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1ª ed., *Acribia*. España. 1990.
3. Diedrich S. Endocrinología y Fisiología de los animales zootécnicos. 1ª ed., *Acribia*. España. 1972.
4. Hafez E. S. E. Reproducción e inseminación artificial de los animales. 7ª ed., *Interamericana*. México. 2000.
5. Palacios A. A. Aspectos fisiológicos acerca de la congelación del semen. *Vet. Méx.* 25:207-210 (1994)
6. Vázquez Gonzáles I. Reproducción y mejora de pequeños rumiantes. 1ª ed. *Conserjería de agricultura y pesca*. España. 1998.
7. http://www.monografias.com/trabajos903/vitrificacion-tecnica-crioconservacion/vitrificacion-tecnica-crioconservacion2.shtml#_Toc149706716
20/02/07 22:55
8. Aisen E.G. et al. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different **trehalose** concentrations. *Theriogenology*. 57:7 1801-1808 (2002)
9. [www. Apiamerica.com.ar](http://www.Apiamerica.com.ar)
10. Bustamante G. Curso sobre aspectos de reproducción ovina. *FMVZ*. UNAM. México. 1981.
11. Lehninger A. Bioquímica. 7ª ed. Omega. Barcelona. España

12. Cortés, G. S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis de doctorado. *Fac. Ciencias Biológicas*. Universidad Complutense de Madrid. España.
13. Aisen E.G., Álvarez H.I. et al. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053-1061 (2000).
14. Murria R., Et al. Bioquímica ilustrada. 17ª ed., *El manual moderno*. México. 2004.
15. http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documentos/uni_02/58/texthtml/cap804.htm. 19/01/07 18:15
16. Delhon G. A. lecciones de histología veterinaria, ed hemisferio sur 3º ed argentina 1985
17. Visconti et al 1995 capacitation of Mouse spermatozoa I. correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121:1129-1137.
18. Salisbury G.W. Et. al. Fisiología de la reproducción artificial en los bóvidos. *Acribia*. 2ª edición. Zaragoza. España.
19. Rios Granillo E. comparación del enfriado tradicional a 5°C vs el enfriado a 2 y -2°C sobre la criosupervivencia y la capacitación prematura del semen de carnero, tesis de maestría. Fes Cuatitlan. UNAM. 2005
20. De Alba J. Reproducción animal. *La prensa médica mexicana*. 1ª edición. México. D.F. 1985.
21. C.E.I.E.P.O. Memorias del curso Inseminación artificial en ovinos. U.N.A.M. 2005

22. <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3050301.pdf>
23. Hunter R.H. Fisiología y tecnología de la hembra de los animales domésticos, *Acribia*; 1ª ed. Zaragoza. España. 1992
24. García, M.E. Modificación al sistema de clasificación climática de Koppen. 3ª ed, *Offset Iarios*. México, D.F. 1981.
25. Salamon, S., W.M.C. Maxwell. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination *Anim. Repr. Sci.* 37: 185-249. 1995
26. Angulo, M. R. B. Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen ovino. Tesis de licenciatura. *Fac. Med. Vet. Y Zoo*. Universidad Nacional Autónoma de México D.F., 1988.
27. <http://usuarios.lycos.es/vicobos/nutricion/quimica2.html> . 15:05. 14/01/07
28. Ortego R. E. Bioestadística básica para médicos asistenciales. *Bioingeniería e informática médica*. Argentina. 2005
29. Martínez, O.C.O. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide bovino. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
30. Vázquez J. Carrizosa J. Identificación del estado del acrosoma y viabilidad de los espermatozoides por una técnica de triple tinción. 4as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. *León Comunicaciones*: 35-38 (1980).
31. Numan B. M. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. *Theriogenology*, 67: 1060-1067. (2007)

32. Bharat C.D. Preservation of a ram semen. *Indian Veterinary Journal*. 57:130-134. (1980)
33. Dalimata A.M. Graham J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with **trehalose** and methyl cellulose. *Theriogenology* [48:5](#). 831-841 (1997)
34. Lopez-Saez A. Liquid storage (50⁰c) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology* 44: 155 - 164, (2000)
35. Fernández-Santos M.R. et. AL. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. [67:4](#) 738-753 (2007)
36. Aisen E.G., Alvarez, et, al. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. *Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Universidad de Castilla-La Mancha*. Albacete, España. 2000.
37. Watson, P.F. A comparison of changes in the the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*, 28: 99-101 (1972).
38. Maxwell. W. Liquid storage of ram. *Reproduction, Fertility Developmend*, 5, 613-638 (1993).
39. Byrne D. Guide to specifications for general notices, general analytical techniques, identification tests, tests solutions and other reference material. JECFA. 5:2 17-19 (2001).