



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

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

**“EFECTO DEL CONGELAMIENTO Y  
DESCONGELAMIENTO SOBRE  
LA TECA PERINUCLEAR DEL  
ESPERMATOZOIDE DE CAPRINO”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ALEJANDRA ACEVES RAMOS**

**TUTOR: DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ**

**COMITÉ TUTORAL: DRA. MA. DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA**

**DR. JAIME GALLEGOS SANCHEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **D e c l a r a c i ó n**

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario

**Alejandra Aceves Ramos**

## **DEDICATORIAS**

A mis padres y mis hermanas

Por siempre estar a mi lado y mostrarme que en la vida todo se tiene  
que ganar y que hay que esforzarse más de lo pensado.

A mis amigos

Por apoyarme y soportar mis malos humores

A Leopoldo

Por permitirme estar a su lado a pesar de los malos momentos y  
mostrarme que la vida es para disfrutarse y ser felices.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca  
otorgada para la realización de mis estudios

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación  
Tecnológica (PAPIIT)

A los miembros de mi comité tutorial: los doctores Javier Valencia  
Mendez, María de Lourdes Juárez Mosqueda, Jaime Gallegos Sánchez.

A los miembros de mi jurado: los doctores Enrique Hernández González  
y María Elena Trujillo Ortega.

A la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, por permitirme el  
uso de sus instalaciones y animales para el trabajo.

Al departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia por el apoyo durante todo el trabajo.

A la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología de la  
FMVZ.

## Índice

<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
1. LA CÉLULA ESPERMÁTICA .....	15
1. <i>Estructuras de la célula espermática</i> .....	16
2. MADURACIÓN ESPERMÁTICA .....	18
3. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL .....	18
4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA .....	21
5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN .....	23
5.a) <i>Descongelación del semen</i> .....	24
5.c) <i>Efectos por la criopreservación</i> .....	27
5.d) <i>Estrés osmótico</i> .....	29
5.e) <i>Criopreservación del semen caprino</i> .....	30
6. TECA PERINUCLEAR .....	31
<b>IV. OBJETIVO</b> .....	<b>37</b>
GENERAL .....	37
PARTICULARES .....	37
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA TINCIÓN TRIPLE .....	40
PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA HIPOSMÓTICA .....	42
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA .....	42
PROCEDIMIENTO DEL GRADIENTE DE FICOLL .....	43
CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN .....	43
DESCONGELACIÓN DE LAS PAJILLAS .....	44
PROCESAMIENTO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
CONCENTRACIÓN Y MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES .....	47
DIFERENCIACIÓN ENTRE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS (VIABILIDAD ESPERMÁTICA) .....	47
INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA .....	48
INTEGRIDAD DEL ACROSOMA .....	48
SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES CON Y SIN ACROSOMA .....	48
INTEGRIDAD DE LA TECA PERINUCLEAR .....	49
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>57</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>64</b>

## Índice de cuadros y gráficas

Cuadro 1. Resultados de la motilidad espermática de semen fresco contra descongelado -----	57
cuadro 2. Comparación de la viabilidad en semen fresco y descongelado empleando las técnicas de triple tinción y eosina-nigrosina.-----	57
cuadro 3. Resultados de la integridad de la membrana plasmática en semen fresco contra descongelado mediante la prueba hiposmótica. -----	57
cuadro 4. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco contra descongelado, mediante la técnica de triple tinción -----	58
gráfica 1. Distribución de los porcentajes de integridad acrosomal en semen fresco, para espermatozoides vivos y muertos (triple tinción) -----	58
gráfica 2. Distribución de los valores de integridad acrosomal en semen descongelado en espermatozoides vivos y muertos (triple tinción)-----	59
cuadro 5. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco y descongelado obtenidos del gradiente de 20% de ficoll -----	59
cuadro 6. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco y descongelado obtenidos del gradiente de 30% de ficoll -----	60
cuadro 7. Resultados de la integridad de la teca perinuclear en semen fresco y descongelado con acrosoma íntegro (ai) o con reacción acrosomal (ra)-----	60
figura 1. Vista de la subestructura de la teca perinuclear -----	61
cuadro 8. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de pearson en muestras frescas sin acrosoma. -----	62
cuadro 9. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de pearson en muestras frescas con acrosoma. -----	62
cuadro 10. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de pearson en muestras descongeladas sin acrosoma.-----	63
cuadro 11. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de pearson en muestras descongeladas con acrosoma.-----	63

## I. Resumen

Después del proceso de criopreservación ocurre una disminución en la viabilidad de las células espermáticas; la cual no se ha correlacionado con los daños observados en la membrana plasmática ni en el acrosoma. El objetivo del presente trabajo es evaluar el daño ocasionado por el proceso de criopreservación sobre las células espermáticas a nivel ultraestructural, sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide. Se utilizó semen de 4 machos cabríos, se evaluó la concentración de la muestra obtenida antes y después de la criopreservación del semen, movimiento progresivo de los espermatozoides, viabilidad (eosina-nigrosina al 2%); integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (prueba hiposmótica); el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (triple tinción); integridad del acrosoma (triple tinción); separación de células con acrosoma y sin acrosoma (gradiente de Ficoll), e integridad de la teca perinuclear (tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión). Los resultados fueron analizados por prueba de "t" de student y prueba de correlación de Pearson. Los espermatozoides después de la colección tuvieron una motilidad del  $83.75 \pm 0.82\%$  de movimiento progresivo. Después de descongelar fue de  $43.75 \pm 3.63\%$ . Los resultados de viabilidad empleando tinción de eosina-nigrosina fue  $77.88 \pm 2.73$  en fresco, y descongelado  $40.25 \pm 2.79$ ; con triple tinción el promedio de vivos fue de  $83.88 \pm 0.97$  en fresco; en descongelado  $41 \pm 1.87$ . Antes de la criopreservación el promedio de espermatozoides con membrana plasmática íntegra fue  $80.13 \pm 2.06$ , después de descongelar fue  $39.50 \pm 3.16$ . En el semen fresco hubo  $86.13 \pm 1.71$  espermatozoides con acrosoma intacto, y en descongelado se obtuvo un  $42.13 \pm 3.62$ . En el gradiente de Ficoll de 20% se obtuvo una purificación de células sin acrosoma,  $74.25 \pm 3.8$  en fresco y  $78.75 \pm 2.2$  en descongelado. En el gradiente de 30% se obtuvo una purificación de espermatozoides con acrosoma,  $76.37 \pm 2.4$  en fresco y  $68.37 \pm 2.3$  en descongelado. En la integridad de la TP en las células sin acrosoma se encontró  $31.60 \pm 2.71$  normal y  $68 \pm 2.68$  alteradas en fresco y en descongelado  $32 \pm 2.53$  normales y  $68 \pm 2.53$  alteradas. En las células con acrosoma  $79.6 \pm 3.54$  células con TP normal y  $19.6 \pm 3.54$  alteradas en fresco, y para el descongelado  $67.6 \pm 5.98$  normales y  $32.4 \pm 5.98$  alteradas. Con estos resultados se concluye que existe una relación entre el mantenimiento del acrosoma y la integridad de la teca perinuclear.

**Palabras Clave:** espermatozoide caprino, teca perinuclear, acrosoma, viabilidad espermática.

## Abstract

After the criopreservación process it happens a diminution in the viability of the spermatozoa; which has not been correlated with the damages observed in the plasmatic membrane nor in acrosoma. The objective of the present work is to assess the damage caused by the criopreservación process on the spermatic cells at ultrastructural level, on the integrity of the perinuclear theca of the spermatozoon. It was used semen of 4 male goats, evaluated the concentration of the sample obtained before and after the criopreservación, progressive movement of the spermatozoa, viability (eosin-nigrosin to 2%); integrity and functionality of the plasmatic membrane (hiposmotic test); the percentage of alive and died spermatozoa (triple stain); acrosoma integrity (triple stain); separation of cells with acrosoma and without acrosoma (Ficoll gradient), and integrity of the perinuclear theca (stain negative for electronic microscopy of transmission). The results were analyzed by test of "t" of student and test of Pearson correlation. The spermatozoa later of the collection had a motility of  $83.75 \pm 0.82\%$  of progressive movement. Alter thawing it was  $43.75 \pm 3.63\%$ . The viability results using eosin-nigrosin satín was  $77.88 \pm 2.73$  in fresh semen and  $40.25 \pm 2.79$  in thawed, with triple stain the average of living cells was  $83.88 \pm 0.97$  in fresh and  $41 \pm 1.87$  in thawed. Before the criopreservation the average of spermatozoa with whole plasmatic membrane was  $80.13 \pm 2.06$  and after thawing  $39.50 \pm 3.16$ . in fresh semen was  $86.13 \pm 1.71$  spermatozoa with intact acrosome, and in thawed it was obtained  $42.13 \pm 3.62$ . in the Ficoll gradient from 20% it was obtained a purification of cells without acrosome  $74.25 \pm 3.8$  in fresh and  $78.75 \pm 2.2$  in thawed. In the 30% gradient, it was obtained a purification of cell with acrosome  $76.37 \pm 2.4$  in fressh and  $68.37 \pm 2.3$  in thawed. In the integrity from the perinuclear theca without acrosome it was found  $31.60 \pm 2.71$  of normal and  $68 \pm 2.68$  alter. in fresh and in thawed  $32 \pm 2.53$  normal y  $68 \pm 2.53$  alter. In the cells with acrosome the integrity of the perinuclear theca was  $79.6 \pm 3.54$  and  $19.6 \pm 3.54$  alter in fresh, and for the thawed  $67.6 \pm 5.98$  normal and  $32.4 \pm 5.98$  alter. With this results it concluyes that exists a relation between the acrosome support and the integrity of the perinuclear theca.

## **II. Introducción**

Las técnicas de producción y conservación de espermatozoides basados en criopreservación han sido propuestas por Corteel en 1974, con el fin de disociar el tiempo de producción de su tiempo de uso. Esto tiene ventajas para programas genéticos, y para optimizar la producción de semen y su uso por centros de inseminación artificial: semen de alta calidad de machos cabríos jóvenes puede ser almacenado y usado muchos años después, para razas estacionales, los sementales pueden ser colectados en la época reproductiva y usar el semen en cualquier época del año.

La inseminación artificial es una poderosa arma para adaptar la producción a las demandas de mercado y ayuda para el control de algunas enfermedades infecciosas. Actualmente la genética es la principal justificación para usar inseminación artificial y semen congelado, a través de su formidable habilidad para producir mucha progenie por macho en múltiples ambientes en el tiempo. Esta habilidad es necesaria para crear y difundir los beneficios genéticos y facilitar la aplicación de recientes técnicas genéticas moleculares en programas de selección. Por ejemplo en Francia, específicamente para ganado caprino en producción de leche, existen dos esquemas de selección: producción de proteína y producción de proteína (Leboeuf et al., 1998).

La criopreservación como una técnica de almacenaje de semen caprino tiene ventajas, pero el congelado y descongelado induce efectos detrimentales en términos de daño ultraestructural, bioquímico y funcional en el espermatozoide, resultando en una reducción de la motilidad, integridad de membrana y habilidad fecundante. Como la criopreservación compromete la fertilidad del espermatozoide de caprino basado en índices de preñez por

inseminación artificial, los efectos detrimentales pueden ser compensados por el uso de grandes cantidades de espermatozoides por dosis en la inseminación (Dorado et al., 2007).

La concentración de eyaculado del macho cabrío varía de 2 a 6.5 mil millones de espermatozoides por ml y tiene un volumen de 0.5 a 1.5 ml por eyaculado (Hafez, 2000). Durante la monta natural, la cantidad de espermatozoides que logran pasar al cérvix son aproximadamente de 100 a 140 millones; por tal razón, en la inseminación artificial el mínimo de espermatozoides con motilidad progresiva al descongelado debe ser de 180 millones espermatozoides depositados en cérvix (Salamon, 1987).

La inseminación artificial se ha venido desarrollando con éxito considerable desde principios del siglo pasado tanto en bovinos como en ovinos y porcinos. En las cabras aunque su utilización ha sido posterior, el éxito y los beneficios obtenidos son similares a los de las otras especies como son el mejoramiento genético en la producción de leche, carne o pelo, una mayor distribución del semen de animales seleccionados de alta calidad y la mayor cantidad de hembras servidas con el semen de un mismo macho (Arbiza, 1986). Cuando se utiliza semen fresco diluido, la fertilidad que se obtiene es alta (Salamon y Maxwell, 1995; Karatzas et al, 1997), sin embargo se reduce al utilizar semen congelado, situación diferente a la del ganado bovino en el que las tasas de concepción con semen congelado son similares a las que se obtienen con monta natural (Watson, 2000)

A pesar de los beneficios obtenidos, existen las desventajas de elevar los costos de producción y reducir la fertilidad al utilizar semen congelado. La disminución de la fertilidad después del proceso de congelación se debe, en

parte, a la incapacidad para mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide durante su tránsito por el cérvix (Windsor et al., 1994). Para evitar este problema se ha desarrollado la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia, que permite el depósito del semen dentro del lumen del útero, lo que aumenta el uso de semen congelado en pequeños rumiantes al obtener fertilidades más satisfactorias, pero incrementando los costos por el procedimiento (Leboeuf et al., 2000).

La técnica de criopreservación (congelamiento del semen) ha procurado ante todo mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide, sin embargo, la conservación a baja temperatura trae consigo efectos desfavorables sobre la sobrevivencia de los espermatozoides (De Leeuw et al., 1990).

En general, se conoce que el 40-50% de los espermatozoides no sobreviven al proceso de congelamiento del semen (Watson, 2000).

El estatus funcional de los espermatozoides depende de: la estabilidad membranal, daños oxidativos, integridad de receptores membranales, y la estructura nuclear (Watson, 2000).

Una conclusión general de los estudios realizados sobre el daño que produce la congelación y descongelación en las células es que el sitio primario de daño es la membrana plasmática (Locksley et al., 1988; De Leeuw et al., 1990).

La integridad de la membrana plasmática es de crucial importancia para el funcionamiento de los espermatozoides, ya que ésta, regula el intercambio de iones y moléculas entre la célula y el medio extracelular (De Robertis, 1998). Las técnicas morfológicas (microscopía electrónica de transmisión y de barrido, tinciones vitales y pruebas de fluorescencia) han proporcionado detalles de los

daños en la membrana plasmática, sin embargo los resultados no siempre han estado correlacionados con el porcentaje de fertilidad, a menos que el daño presente sea muy importante (Rodríguez-Martínez et al., 1997). Además las pruebas de resistencia a los cambios osmóticos confirman los daños en la membrana plasmática que presentan las células (Rodríguez-Martínez et al., 1997).

La integridad del acrosoma también se ha utilizado para predecir la capacidad fertilizante del semen congelado (Buhr, 1989); aún así, el aumento del tamaño del acrosoma y la ruptura de la membrana acrosomal externa, no se han podido correlacionar con la disminución de la viabilidad de los espermatozoides (Heras et al., 1996).

Recientemente se ha propuesto que no sólo estas estructuras se ven afectadas durante el proceso de congelación/descongelación, también la teca perinuclear (TP) puede verse alterada por el mismo proceso. La TP está localizada en la región perinuclear de la cabeza del espermatozoide, es un citoesqueleto estructuralmente continuo que envuelve al núcleo casi en su totalidad (exceptuando la intersección con el flagelo), contiene no solamente elementos del citoesqueleto para mantener la forma de la cabeza espermática e impedir la descondensación de la cromatina espermática, además contiene moléculas de unión funcionales para la activación del ovocito durante la fertilización (Toshimori and Ito, 2003).

En el caso de ganado caprino, además de los daños ocasionados por el congelamiento a los espermatozoides existen informes en los que el uso de la yema de huevo (componente de los diluyentes para la congelación de semen) produce una baja en la fertilidad del semen caprino después de la

criopreservación, debido a la enzima fosfolipasa A, presente en el plasma seminal caprino. Esta enzima coagula el medio de mantenimiento y provoca la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitinas, las cuales resultan ser tóxicas para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 1995; Parks y Graham, 1992). Para evitar este efecto tóxico se ha realizado la remoción del plasma seminal por centrifugación (lavado del semen) (Leboeuf et al., 2000). Los beneficios de remover el plasma seminal de esta manera pueden variar. Ciertas investigaciones indican que remover el plasma seminal es necesario para maximizar la motilidad y la integridad acrosomal del semen caprino después de la congelación (Memon et al., 1985). Sin embargo, otros autores como Azerêdo et al (2001), y Tuli and Holtz (1994) han encontrado que la remoción del plasma seminal causa una reducción significativa en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides en semen congelado, e incluso en el semen fresco. Además de esta disminución en la motilidad, también se ha encontrado que el porcentaje de espermatozoides con daño en la membrana plasmática aumenta después de la remoción del plasma seminal y se acentúa con el proceso de congelación-descongelación (Azerêdo et al., 2001).

De lo anterior se desprende la importancia de investigar las alteraciones en la morfología espermática relacionadas con la viabilidad que ocurren después del proceso de congelación y descongelación en el semen, identificando los daños que ocurren a nivel de citoesqueleto y de membrana plasmática; aún cuando se han realizado estudios del daño que se produce a nivel de TP por el proceso de congelación-descongelación en otras especies como el bovino (Martínez, 2003; Felipe-Pérez, 2006) hasta el momento no

existen reportes de dichos estudios en la especie caprina, por lo que se hace necesario investigar si dicho fenómeno ocurre de la misma manera en los espermatozoides del macho cabrío, y si este daño a nivel de TP tiene relación con la supervivencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación.

### **III. Antecedentes**

El método más usado para conservar el semen es la inhibición de la actividad metabólica mediante la reducción de la temperatura.

Con excepción de los bovinos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas (Parks y Graham, 1992; Holt, 2000), en parte porque los protocolos de congelación no proporcionaron resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992). Las diferencias entre especies radican en la fisiología y la bioquímica del espermatozoide y, también, a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor femenino que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

#### **1. LA CÉLULA ESPERMÁTICA**

La célula espermática es la parte más importante del semen, está diseñado para pasar a través del tracto reproductivo de la hembra, sufrir capacitación, unirse a la zona pelúcida, penetrar el ovocito, y liberar un juego haploide normal de cromosomas al ovocito (Foote, 2003)

En la evaluación de rutina de un eyaculado fresco generalmente están incluidas la determinación inmediata del volumen, de la concentración y del porcentaje de espermatozoides que exhiben motilidad progresiva, siendo estos los parámetros más importantes en la toma de decisiones que conciernen a un posterior procesamiento del eyaculado, como dilución y congelación (Rodríguez-Martínez et al., 1997). Además de la motilidad, otras pruebas relacionadas con la morfología y el metabolismo se han correlacionado con la fertilidad (Foote, 2003).

## 1. Estructuras de la célula espermática

La célula espermática tiene 3 regiones altamente especializadas: la cabeza espermática, involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito; la pieza media con mitocondria, involucrada en la producción de energía y el flagelo, involucrado en la motilidad (Flesch y Gadella, 2000).

La cabeza espermática de los mamíferos está completamente rodeada por una membrana plasmática dando soporte a sus organelos y componentes intracelulares, y por sus características semipermeables mantiene el gradiente químico de iones y otros componentes solubles. Proteínas específicas de la membrana plasmática facilitan el transporte de glucosa y fructosa del ambiente extracelular al interior de la célula (Silva y Gadella, 2006). Si la membrana plasmática no está funcionalmente intacta el espermatozoide es considerado deteriorado o muerto y no es capaz de fertilizar.

La forma de la cabeza es característica de cada especie, con forma de hoz en la rata y el ratón, y aplanada y redonda en el hombre y los animales domésticos. La cabeza espermática está compuesta por dos regiones principales: la región acrosomal y la región postacrosomal. La región acrosomal además está subdividida en dos regiones: la región anterior acrosomal y la región posterior acrosomal (segmento ecuatorial). (Toshimori and Ito, 2003).

La cabeza espermática contiene dos estructuras principales, una es el núcleo, es cual está rodeado por la envoltura nuclear, el otro es el acrosoma, el cual es rodeado por una membrana acrosomal interna y una externa. El núcleo está totalmente presente en la cabeza. El acrosoma es un organelo en forma

de capuchón que cubre la mitad anterior de la cabeza cuya cobertura de área varía por especies. La membrana acrosómica interna está adherida a la envoltura nuclear, se continúa en el margen posterior del capuchón con la membrana acrosomal externa. Las dos membranas corren paralelamente y rodean una cavidad estrecha que está ocupada por un material amorfo y homogéneo: el contenido acrosómico, el cual es rico en enzimas (proteasas, glicohidrolasas, esterasas, fosfatasa ácida, arilsulfatasa) (Fawcett, 1970). La porción principal del acrosoma se llama segmento principal. Además hay una región caudal especializada, donde hay un abrupto ensanchamiento del capuchón y una condensación de su contenido nombrado segmento ecuatorial (Abou-Halia y Tulsani, 2000).

Microtúbulos y microfilamentos son elementos del citoesqueleto que están involucrados en la motilidad celular. Los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas implicadas en varios aspectos del transporte de proteínas y la polaridad de diferentes tipos de células. Los microfilamentos, que están compuestos de actina, son elementos citoesqueléticos ubicuos dentro de la célula. El rol de los microfilamentos es al anclaje del acrosoma y darle forma a la cabeza al envolver la membrana nuclear (Tachibana et al., 2005).

## 2. MADURACIÓN ESPERMÁTICA

Para que un espermatozoide pueda fecundar al ovocito, éste debe de sufrir una serie de cambios funcionales y bioquímicos durante su tránsito por el epidídimo (proceso de maduración) y posteriormente en el tracto genital de la hembra (capacitación espermática), ya que solamente los espermatozoides

maduros y capacitados pueden reconocer y unirse a la zona pelúcida (Abu-Halia y Tulsani, 2000).

Durante el tránsito epididimario los espermatozoides experimentan algunas modificaciones entre las cuales se pueden mencionar: cambios en la membrana plasmática (Flesch y Gadella, 2000) y la adquisición de movimiento (Hoskins et al., 1978). Esta adquisición de movimiento no depende de la disponibilidad de energía, los efectos estimulantes de la motilidad están mediados por un incremento en el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) intracelular (Gabers et al., 1973). El efecto del AMPc en la motilidad puede ser directo o mediado por la fosforilación de proteínas.

### 3. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

Para que el espermatozoide eyaculado pueda fertilizar al óvulo, requiere de un periodo de residencia en el tracto reproductivo de la hembra (Visconti et al., 1995); esta adquisición de competencia se ha definido como capacitación (conjunto de cambios que le confiere al espermatozoide la habilidad para sufrir la reacción acrosomal y fertilizar al óvulo). El espermatozoide eyaculado y fresco no puede experimentar la reacción acrosómica verdadera cuando es expuesto a inductores biológicos de la misma, debiendo primeramente sufrir el proceso de capacitación (Cross y Meizel, 1989). La capacitación espermática implica algunas alteraciones fisiológicas previas a la reacción acrosómica en la membrana del espermatozoide y es por tanto un pre-requisito para ella (Way et al., 1995). El proceso de capacitación incluye varias etapas: activación (involucra un cambio en la velocidad y patrón de movimientos flagelares),

capacitación propiamente dicha (con cambios en la estructura y propiedades en la membrana plasmática y acrosomal externa) y la reacción acrosomal.

Los cambios en la estructura y la membrana plasmática incluyen la remoción de proteínas y glicoproteínas del plasma seminal, que se encontraban absorbidas a la superficie del espermatozoide eyaculado y la modificación/reorganización de moléculas de superficie del espermatozoide (Abou-Haila y Tulsiani, 2000).

Durante la capacitación, ocurre la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática del flagelo y de la cabeza del espermatozoide, y se piensa que estos cambios conformacionales en estas proteínas pueden alterar sus propiedades y contribuir al incremento en la afinidad a la zona pelúcida, hiperactividad y la inducción de la reacción acrosomal que son características de la capacitación espermática (Gadella et al., 2001).

Se ha sugerido que el calcio y el  $\text{HCO}_3^-$  (Gadella, 2004) son requeridos para la activación de la adenil ciclasa espermática, dando como resultado la producción de AMPc y la activación de proteín cinasas A, uniéndose a tirosin cinasa. Esta fosforilación de la tirosina solo puede ocurrir por activación de los receptores de factor de crecimiento epidermal (EGF). Un alto grado de fosforilación causa polimerización de F-actina y unión de fosfolipasa C a la membrana plasmática (Breitbart, 2002).

La reacción acrosomal es un proceso marcado por la fusión múltiple (vesiculación) de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática y se parece a la exocitosis de otras células aunque con algunas características inusuales. Generalmente se está de acuerdo que la glicoproteína de la zona pelúcida (ZP), ZP3 es el iniciador fisiológico de la reacción acrosomal. Se ha

descrito que la progesterona secretada por las células del cúmulo también inducen la reacción acrosomal en varias especies, incluyendo al ganado caprino (Somanath et al., 2000).

Cuando ocurre la unión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito, la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la membrana plasmática que recubre al acrosoma, lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal (enzimas hidrolíticas y proteolíticas), seguidas por la fusión y vesiculación de las membranas plasmáticas y acrosomal externa, las cuales son esenciales para que el espermatozoide atraviese las diferentes capas que recubren el ovocito (Flesch y Gadella, 2000).

En el proceso de dilución, refrigeración y congelación queda particularmente afectada la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, pero también la membrana de las mitocondrias, del acrosoma y el flagelo (Hammerstedt et al., 1990).

Los daños acrosomales de muchas células, incluyendo la región ecuatorial, se manifiestan por la vesiculación acrosómica, conocida como reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular. Esta reacción consiste en la pérdida del acrosoma debido a la desintegración de las membranas acrosomal y plasmática durante la muerte celular y, a diferencia de la reacción acrosómica “verdadera” o fisiológica, estos espermatozoides no representan la población espermática con posibilidades de fertilizar ovocitos (Way *et al.*, 1995)

#### 4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

La evaluación de la motilidad espermática es la prueba más usada porque se puede realizar rápidamente, y el porcentaje de motilidad espermática

está relacionado con la fertilidad. La precisión con que se estima la motilidad espermática y cualquier característica de ésta es obviamente muy importante (Foote, 2003).

Los espermatozoides pueden tener dos tipos de movimiento: de rotación (alrededor del eje); progresivo (desplazamiento de la célula), el cual puede ser lineal o circular.

Dentro de la motilidad total un caso especial hace referencia a la denominada motilidad masal, que es únicamente evaluable en eyaculados de mamíferos con concentraciones espermáticas muy elevadas, como es el caso de los rumiantes. Para la valoración se toman en cuenta dos parámetros: el porcentaje estimado de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento o motilidad total; y el porcentaje de espermatozoides mótiles que presentan un movimiento progresivo o motilidad progresiva. Estas dos estimaciones son un indicador de la calidad de movimiento que presente la muestra seminal.

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales. También el examen a través de la microscopía electrónica de transmisión y de barrido ha sido valiosa para determinar aspectos de integridad espermática (Rodríguez-Martínez et al., 1997). Sin embargo, la mayor parte de estas técnicas sólo aportan información estructural parcial, y suelen ser tediosas y costosas. Además, aún cuando algunas técnicas morfológicas informan de los daños de la membrana

plasmática, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad del semen, a menos que el daño que presenten los espermatozoides sea muy importantes (Rodríguez-Martínez et al., 1997). De hecho, posiblemente la tinción más usada es la eosina-nigrosina, la cual es muy económica, asequible y fácil de realizar.

La evaluación de la integridad de membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho (Jeyendran et al., 1992). Además, esta integridad no solo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosomal y por ende para la fertilidad (Yanagimachi, 1994). Un grupo de pruebas de funcionalidad espermática que ha centrado un gran interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica.

La prueba hiposmótica, consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta reacción se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo.

En cuanto a la morfología espermática, particularmente el estado acrosomal, es un importante indicador de la fertilidad, y esto hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que se encuentra en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones

claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausente suelen tener una baja fertilidad. Al respecto, Martínez (2003) encontró que existe una correlación negativa entre el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides con la subestructura de la teca perinuclear ausente. Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones (giemsa, dobles y triples tinciones).

## 5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

El fundamento de criopreservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, al reducir su movimiento y reacciones metabólicas. Cuando el semen se congela en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para uso futuro y asegurar la disponibilidad genética de un semental en particular (Evans y Maxwell, 1987).

Para la congelación del semen en pajillas, cuyo semen ha sido diluido en un solo paso, se debe enfriar a  $5^{\circ}\text{C}$  en un periodo de 1.5 a 2 horas y luego se congelan. El semen que se ha diluido en dos etapas, se empajillan después de haber sido enfriadas a  $5^{\circ}\text{C}$  y hecho la segunda dilución, se mantienen a esa temperatura por un periodo de 1 a 1.5 horas, para lograr un equilibrio entre el semen y el glicerol, y se congelan (Leboeuf et al, 2000)

Para ser congeladas las pajillas se colocan en una gradilla fría (a  $5^{\circ}\text{C}$ ), que se expone a vapores de nitrógeno líquido ( $-75$  a  $-100^{\circ}\text{C}$ ) a una altura de 5

cm por encima de la superficie por un periodo de 20 minutos, y después se introducen en el nitrógeno líquido para su conservación (Valencia et al., 1994).

#### 5.a) Descongelación del semen

Durante la descongelación del semen la fase de calentamiento es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como la fase de enfriamiento. Los espermatozoides que sobreviven a la congelación a  $-196^{\circ}\text{C}$  aún deben superar el ser descongelados.

El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso de descongelación (Valencia, et al., 1994). Tanto la velocidad de enfriamiento como la de descongelación ejercen un efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides. Este efecto depende de que la tasa de enfriamiento haya sido lo suficientemente lenta para permitir la salida de agua, impidiendo la formación de hielo intracelular y lo suficientemente rápida para evitar los daños por el efecto soluto (exposición a la concentración de solutos por demasiado tiempo). En el primer caso, se requiere de descongelación rápida para prevenir la recristalización de cualquier hielo intracelular presente en el espermatozoide. Los espermatozoides descongelados rápidamente también son expuestos por un corto periodo de tiempo, a las concentraciones de solutos y crioprotectores, y la restauración del equilibrio intra y extracelular es más rápida que al ser descongelados lentamente (Parks y Gram. 1992).

La descongelación se consigue sumergiendo las pajillas en agua a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 a 20 segundos. La descongelación rápida consiste en colocar las pajillas a temperatura más elevada ( $55-60^{\circ}\text{C}$ ) durante un menor periodo. Cuando se comparan la descongelación lenta con la rápida

no se han observado diferencias en la recuperación de la motilidad espermática, pero el daño acrosomal es mayor en la rápida. Además la descongelación rápida requiere de mantener el agua a 60°C, que es difícil de controlar en el campo y existe el riesgo de dañar a los espermatozoides si se mantiene el semen más tiempo que el indicado (Valencia 1994)

#### 5.b) Características de los crioprotectores

El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995).

El propósito de un diluyente es suministrar a las células espermáticas con fuentes de energía, proteger a las células del daño relativo a la temperatura, y mantener temporalmente un ambiente confortable para la sobrevivencia de los espermatozoides. Además, la utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao et al., 1995).

Lógicamente, cada uno de los diferentes componentes de los que consta el medio han sido investigados separadamente y en combinación, para maximizar viabilidad y la fertilidad de espermática después de la descongelación. En general, el medio de criopreservación de semen caprino incluye un crioprotector no penetrante (leche o yema de huevo), un crioprotector penetrante (glicerol o etilen-glicol), un buffer (Tris o Test), una o más azúcares (glucosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trehalosa), sales (citrato

de sodio, ácido cítrico) y antibióticos (penicilina, estreptomina) (Evans y Maxwell, 1987).

La yema de huevo y la leche han sido los primeros componentes utilizados para preservar a los espermatozoides del efecto del frío. Éstas son sustancias crioprotectoras puesto que durante los procesos de refrigeración y congelación (Pickett y Komarek, 1966) minimizan la pérdida de los lípidos de membrana aportándole fosfolípidos de bajo peso molecular (Graham y Foote, 1987).

#### 5.c) Efectos por la criopreservación

Existe evidencia de que la motilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen no congelado, lo que permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación altera las membranas (Parks y Graham, 1992).

Los daños sufridos por la congelación permiten sugerir que las membranas plasmática y acrosomal son más sensibles que el núcleo y la porción intermedia. Además, la membrana acrosomal externa es más vulnerable que la interna y que su contenido, es decir, el acrosoma propiamente dicho (Salamon y Maxwell, 1995).

Los principales factores estresantes para las membranas en los procesos de congelación y descongelación son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico, como son:

- cambios provocados por la adición del crioprotector antes de la congelación
- las alteraciones del volumen de la célula, es decir las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras,
  - la deshidratación derivada de la congelación,
  - las fases de transición de los fosfolípidos de membrana
  - los efectos de la elevada concentración de solutos y la formación de hielo intracelular (Parks y Graham, 1992).

Los daños provocados durante los procesos de congelación y descongelación en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica (Watson, 1995). Además, se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana (Ollero et al., 1998).

La microscopía electrónica evidencia la pérdida de la integridad de la membrana, constatada por plegamientos de la membrana plasmática que rodea la región acrosómica y la región intermedia. También se ha observado la ruptura de la membrana plasmática (Rodríguez-Martínez et al., 1993).

En el acrosoma, las lesiones son más marcadas después de la descongelación, pero empiezan a evidenciarse con la dilución, refrigeración y el periodo de equilibrio (Oettlé, 1986). Estas alteraciones originan un edema en su porción anterior, que la microscopía electrónica muestra como expansiones de la matriz acrosomal en forma de pliegues y proyecciones. Parece ser que la membrana acrosomal externa se puede dilatar para cubrir el aumento del área acrosomal (Aalseth y Saacke, 1985).

La velocidad de descongelación es uno de los factores más importantes que afectan la viabilidad del espermatozoide (Fiser et al., 1993). Esta deberá estar en concordancia con el protocolo de congelación (Mazur, 1984); y a la velocidad de descongelación sobre la supervivencia del espermatozoide depende del ritmo previo de congelación (Fiser et al., 1993). Las velocidades rápidas de congelación exigen ritmos de descongelación igualmente rápidos, con el fin de recuperar el equilibrio osmótico, la re-hidratación y las propiedades de la membrana, de modo semejante al que fue realizado durante la congelación (Farstad, 1996).

Hay que tener en cuenta que las descongelaciones lentas resultan perjudiciales ya que proporcionan tiempo suficiente para que los pequeños cristales de hielo intra-celulares se agreguen constituyendo grandes cristales, en un proceso denominado de recristalización (Mazur, 1984). Estos cristales causan daños y muerte celular, por la ruptura física de la membrana plasmática y de los organelos (Henry et al., 1993). El aumento de la velocidad de congelación y de descongelación minimiza el tiempo de exposición de la célula a una zona de temperatura intermedia en la que se producen los efectos de solución; este principio es generalmente aceptado en la congelación de distintos tipos de tejidos y células (Saacke, 1983).

#### 5.d) Estrés osmótico

La supervivencia del espermatozoide descongelado puede estar influenciada por el modo en que el glicerol es adicionado antes de la congelación (Fiser y Fairfull, 1989) y por la manera que es eliminado tras la descongelación, ya que ambas operaciones pueden crear un considerable

estrés osmótico, resultando en daños celulares (Gao et al., 1995). El estrés osmótico está relacionado con las diferencias en la permeabilidad relativa al glicerol y al agua de la membrana plasmática. Tras la exposición a un soluto permeable, como es el caso del glicerol, el espermatozoide se encoge debido a la pérdida del agua y después se hincha, así que el agua y dicho soluto permeable entran en la célula. Cuando estas células se suspenden en un medio isosmótico, inicialmente se hinchan ya que el agua entra en la célula y después encogen debido a que tanto el agua y como el soluto se mueven hacia el exterior de la célula (Ball y Vo, 2001).

#### 5.e) Criopreservación del semen caprino

Las interacciones perjudiciales entre el plasma seminal y la yema de huevo fueron primeramente documentada por Roy (1957), el cual observó que las células espermáticas mantienen su motilidad en diluyentes con yema de huevo si el plasma seminal es removido, pero si el semen completo se adiciona a un medio con yema de huevo, ésta se coagula y los espermatozoides mueren. Se determinó que la coagulación de la yema de huevo es debido a una enzima de origen bulbouretral, a la que llamaron enzima coaguladora de la yema de huevo (EYCE, en inglés) (Roy, 1957). Esta enzima (EYCE) fue identificada como una fosfolipasa A (Iritani y Nishikawa, 1963).

La fosfolipasa A actúa como un catalizador que hidroliza a la lecitina de la yema de huevo en ácidos grasos y lisolecitinas. Esta hidrólisis provoca que la membrana plasmática se vuelva más fusogénica, lo que provoca la reacción acrosomal y la descondensación de la cromatina. La activación de esta fosfolipasa en diluyentes es detrimental para la calidad de las células

espermáticas durante el enfriamiento y la criopreservación (Purdy, 2006). Además la fosfolipasa A se activa en presencia de iones de calcio, disminuyendo su acción cuando en el medio aparecen citratos u oxalatos (Roy, 1957)

El método convencional para superar las interacciones perjudiciales del plasma seminal y la yema de huevo consiste en diluir el semen caprino en una solución buffer y separar el plasma seminal de los espermatozoides por centrifugación (Leboeuf et al., 1998). Sin embargo, otros autores como Azerêdo y colaboradores (2001), y Tuli and Holtz (1994) han encontrado que la remoción del plasma seminal causa una reducción significativa en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides en semen congelado incluso en el semen fresco. Además de esta disminución en la motilidad, también se ha encontrado que el porcentaje de espermatozoides con daño en la membrana plasmática aumenta después de la remoción del plasma seminal y se acentúa con el proceso de congelación-descongelación (Azerêdo et al., 2001).

## 6. TECA PERINUCLEAR

En la cabeza del espermatozoide el mayor elemento del citoesqueleto es la teca perinuclear (TP) que recubre al núcleo espermático. La TP, también llamada sustancia perinuclear, es una cápsula rígida que se encuentra entre el acrosoma y el núcleo, y cubre por entero al núcleo espermático, excepto en la región basal donde el tallo se implanta a el núcleo (Oko y Maravei, 1994). La TP es ensamblada durante la espermiogénesis, estableciéndose entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear de manera estructuralmente

continua. Se ha dividido en dos regiones estructuralmente continuas, la lámina subacrosomal y la capa postacrosomal (Oko, 1995).

La lámina subacrosomal de la TP está entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear; y la capa postacrosomal se localiza caudalmente formando un cáliz que rodea la porción entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática excepto en la inserción del flagelo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999; Mújica et al., 2003) (Fig. 1). Otra región es el segmento ecuatorial, el cual se encuentra entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna (Oko, 1995).

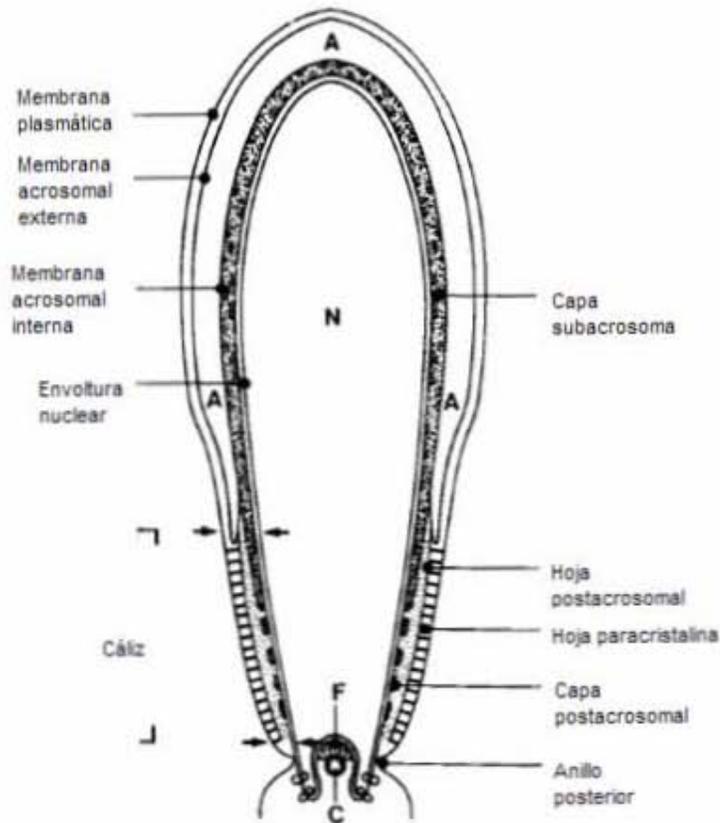


Fig. 1 Esquema de la cabeza del espermatozoide de mamífero (Longo et al., 1987). La teca perinuclear, componente citoesquelético de la cabeza del espermatozoide, está subdividida en la capa subacrosomal, anteriormente y en el cáliz, posteriormente. Este último formado por la capa postacrosomal, adherida a la membrana nuclear externa, la hoja postacrosomal y la capa paracristalina, en contacto con la cara interna de la membrana

plasmática del espermatozoide. N, núcleo; A interior del acrosoma; F, fosa de implantación; C complejo centriolar.

Entre los límites de la región postacrosomal y el segmento ecuatorial de la TP, se localiza la subestructura de la teca perinuclear (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Esta subestructura forma una especie de anillo y su arquitectura es especie específica. En el espermatozoide de cobayo se observa como una hilera de filamentos delgados (Mújica et al., 2003); en el de cerdo forma una cadena de eslabones (Gutiérrez-Pérez, 2006); y en el bovino y el ovino se conforma una línea de grecas (Martínez, 2003). En caprino se ha identificado esta subestructura por medio de microscopía de fuerza atómica, donde muestra forma de grecas, las cuales son más profundas que el resto de la superficie del espermatozoide (Ellis et al., 2002) Esta subestructura se ha empleado como un marcador morfológico de la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

La TP mantiene una continuidad estructural con la matriz nuclear, por lo que es una estructura citoesquelética que da forma al núcleo, al hacer análisis ultraestructurales de espermátides y espermatozoides epididimales se demuestra una estrecha relación entre la TP y las membranas acrosomales espermáticas, que sugieren que la teca participa en la formación de la cabeza y en el ensamblaje del acrosoma (Sutovsky et al, 2003).

Se sabe que las proteínas que conforman a la TP como la calicina y los MBP (polipéptidos de bandas múltiples) contribuyen a la asociación núcleo-acrosoma y proveen algún tipo de cemento intermembranoso. Además están involucradas en la espermiogénesis en donde contribuyen a la reducción del citoplasma en la formación de la cabeza espermática y a la compresión del citoplasma residual dentro de la zona más densa (Longo et al., 1987).

Cuando el núcleo espermático penetra al óvulo, está protegido por las membranas nuclear, acrosomal interna y la TP. Una vez incorporado al citoplasma del óvulo, se observa un rompimiento de la envoltura nuclear del espermatozoide que inicia a nivel del segmento ecuatorial y procede de manera antero posterior. Ocurrido esto, el material de la teca se mezcla con el citoplasma del óvulo antes de que la descondensación del núcleo ocurra. La destrucción de la teca comienza en la porción apical de la región postacrosomal (Yanagimachi, 1994) y se ha encontrado que la descondensación del núcleo espermático también empieza en la porción apical de la región postacrosomal (Fouquet y Kann, 1994).

Además de estas funciones, la teca perinuclear participa en otras como son:

- Durante la espermiogénesis la TP se asocia con las membranas acrosomal y nuclear (Oko y Maravei, 1995). La TP contribuiría a la asociación núcleo-acrosoma proveyendo una clase de cemento intramembranoso (Bellvé y O'Brien, 1983). Escalier (1990) ha asociado las fallas en la diferenciación de la TP con los espermatozoides de cabeza redonda carentes de acrosoma.
- Durante la capacitación y la reacción acrosomal ocurren arreglos específicos de partículas intramembranas, quedando localizadas en dominios diferentes. Los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal muestran un nuevo dominio de membrana en la región ecuatorial del acrosoma (Yanagimachi, 1994), que es reconocida por la membrana plasmática del ovocito para unirse y fusionarse durante la fertilización. La posición y la motilidad de las proteínas

transmembranales están controladas por vínculos entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Mújica et al., 2003).

- Se ha demostrado que la integridad de la TP previene el acceso de los factores citoplasmáticos del ovocito al DNA espermático, bloqueando así la descondensación del núcleo espermático (Sutovsky et al., 1997).

- Reservorio de moléculas de señalización que pueden ser desencadenantes de la activación del ovocito, defensa antipoliespérmica y el desarrollo embrionario temprano (Mújica et al., 2003)

- Después de la penetración del espermatozoide al ovocito, la TP es removida y las proteínas de ésta son liberadas al citoplasma. Al mismo tiempo el núcleo espermático se descondensa y se forma el pronúcleo masculino (Sutovsky et al., 1997). Kimura y colaboradores (1998), encontraron que cuando se microinyectan cabezas espermáticas con la TP expuesta al citoplasma del óvulo, se forma un pronúcleo bien desarrollado y el óvulo se activa; mientras que, los óvulos que son microinyectados con núcleos espermáticos sin TP no se activan. Por lo que, el citoplasma del huevo tiene la capacidad de descondensar a la TP, y los productos de la TP son capaces de activar al ovocito.

Se ha mencionado que parámetros como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática o del acrosoma no tienen correlación significativa con la viabilidad espermática o con la fertilidad del semen criopreservado, y que otros aspectos de la estructura espermática están siendo alterados por el proceso de congelación/descongelación (Martínez, 2003; Martínez et al., 2006) de manera específica, la teca perinuclear. Al hacer la evaluación mediante microscopia

electrónica en la TP de espermatozoides de bovino, tanto en semen fresco como descongelado, Martínez (2003, 2006), encontró que se produce daño a la subestructura de la TP después del proceso de criopreservación, el cual puede afectar hasta el 52% de los espermatozoides. Las alteraciones van desde cambios en la morfología hasta la pérdida total de la misma. Así mismo, encontró que existe una correlación negativa entre el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides con la subestructura ausente.

Esta información, permite inferir que una de las estructuras que están provocando una disminución en la calidad del semen criopreservado de caprino es la TP. Por lo mismo la TP podría considerarse como un marcador de la integridad del espermatozoide, lo que permitiría en el futuro optimizar las técnicas usadas para la criopreservación del semen en esta especie.

## **IV. Objetivo**

### General

Evaluar el efecto negativo de la criopreservación del semen de caprino sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide y su relación con la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma.

### Particulares

1. Valorar la integridad de la teca perinuclear en los espermatozoides frescos
2. Valorar la integridad de la teca en los espermatozoides después del proceso de congelación-descongelación.
3. Correlacionar los cambios observados en la teca perinuclear con los parámetros de la calidad del semen (integridad de la membrana plasmática y acrosomal) pre y post congelación.

## **V. Hipótesis**

El proceso de criopreservación de semen de caprino ocasiona daño en la teca perinuclear del espermatozoide, que se relaciona con un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones a nivel de membrana plasmática y acrosomal.

## **VI. Material y métodos**

Las muestras seminales fueron obtenidas durante la época reproductiva, de sementales caprinos pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 2,450 msnm, a 19 grados 43 minutos de latitud norte, y a 99 grados 14 minutos de longitud poniente (García, 1981).

Se colectaron 8 eyaculados, de 4 machos cabríos de la raza Alpino Francés, mediante la vagina artificial, la cual se encontraba a una temperatura de 42-45°C al momento de la colección.

Se realizó la evaluación macro y microscópica, tomando en cuenta el volumen y color del eyaculado, el movimiento progresivo de los espermatozoides y la concentración espermática. El movimiento en masa de los espermatozoides se evaluó mediante observación de una gota de semen sobre un portaobjetos al microscopio de luz, a una temperatura de 37°C y a un aumento de total de 16x.

La concentración espermática se evaluó utilizando cámara de Neubauer.

Además de esta pruebas se valoró la viabilidad espermática empleando la técnica de tinción vital de eosina-nigrosina al 2%; mientras que la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática se realizó mediante la prueba hiposmótica (Correa y Zavos, 1994). La integridad del acrosoma se evaluó con el empleo de la técnica de triple tinción, que permite diferenciar tanto los espermatozoides vivos de los muertos, como los que mantienen el acrosoma intacto de aquellos que ya han sufrido reacción acrosomal. Estas pruebas se realizaron antes y después del congelamiento de los espermatozoides empleando la misma muestra de semen. Para ello, cada eyaculado se separó

en dos partes. En la primera (la mitad de la muestra) los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en solución salina (154 mM) a una temperatura de 37°C y a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml, con el objeto de no afectar la viabilidad seminal. El resto se procesó para ser congelado.

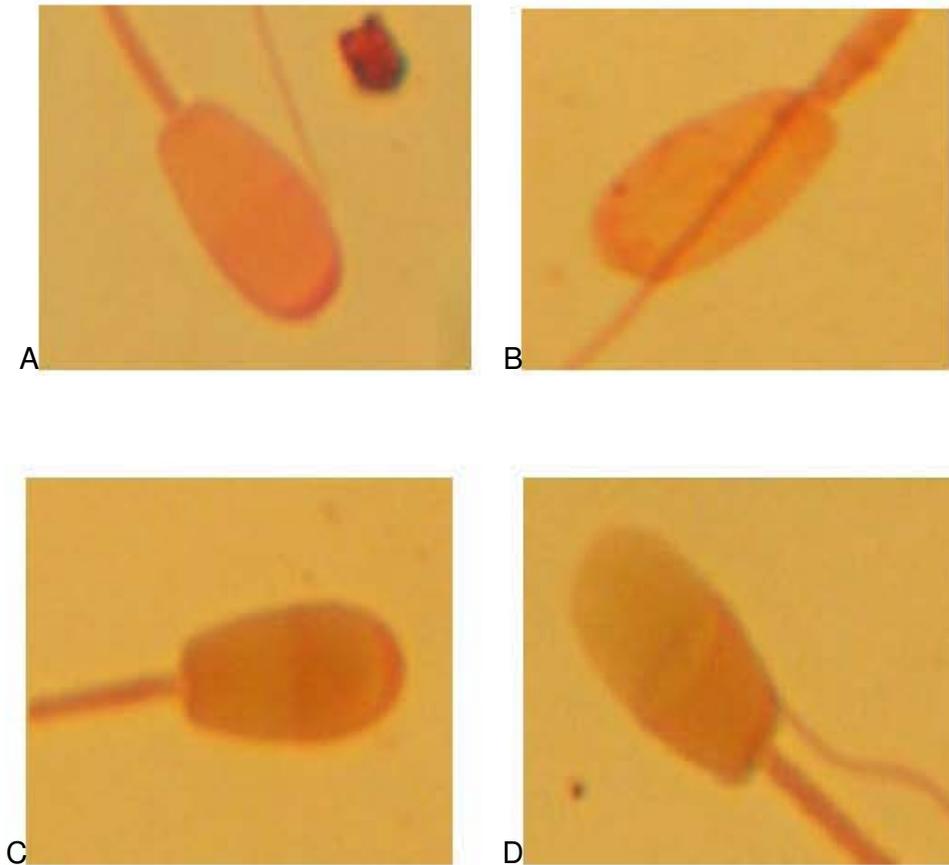
Procedimiento para realizar la tinción triple.

Una vez que los espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml, se tomó una muestra de 100  $\mu$ l a la cual se le adicionó un volumen igual de azul de tripan al 2% en amortiguador de fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM, pH 7.4), y se incubaron a 37°C durante 15 min. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 2,500 rpm durante 3 min y el sobrenadante fue descartado. Las muestras fueron resuspendidas y lavadas con PBS a 37°C por centrifugación/resuspensión hasta que el sobrenadante se observó transparente.

Posteriormente la muestra fue fijada en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilatos al 0.1 M, pH 7.4, durante 1 h a una temperatura de 4°C. Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 3,250 g por 3 min, se hicieron dos lavados con agua desionizada y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de solución salina fisiológica. Posteriormente se realizó un frotis de cada muestra y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los frotis fueron incubados con 20  $\mu$ l de café Bismarck al 0.8% en solución acuosa, pH 1.8 durante 50 min a 37°C, después se lavaron con agua desionizada, se dejaron secar a temperatura ambiente y se incubaron con rosa de Bengala al 0.8% en amortiguador de Tris 0.1 M, pH 5.3 durante 30 min a temperatura ambiente. Al final se lavaron con

agua desionizada y se montó en un portaobjetos para su observación. La observación se realizó en el microscopio de luz a 100x.

Se observó un total de 100 células espermáticas por cada muestra y se clasificaron y contabilizaron de acuerdo a los patrones de afinidad y reacción tintorial de esta prueba, como se muestra en las imágenes.



	Estatus	Región Acrosomal	Región Postacrosomal
A	Vivo con acrosoma	Rosada	Café claro
B	Vivo sin acrosoma	Sin teñir	Café claro
C	Muerto con acrosoma	Rosada	Café oscuro
D	Muerto sin acrosoma	Sin teñir	Café oscuro

Procedimiento para la prueba hiposmótica.

Se usó esta prueba para evaluar la integridad y la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide.

El medio hipotónico se hizo de la siguiente manera: Se elaboró una solución con 0.5 ml de citrato de sodio (25 mM) y 0.5 ml de fructosa (75 mM) y se incubó por 10 min a 37°C. De una muestra de semen de 200 µl, a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml, 10µl fueron colocados en un portaobjetos, con la finalidad de evaluar el enrollamiento de los flagelos, se contaron 100 espermatozoides. Del resto de la muestra, 100µl fueron adicionados con un volumen de 1 ml de la solución hipotónica (100 mOsm) y se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente fueron tomados 10 µl de la muestra incubada y se depositaron sobre un portaobjetos para ser observados al microscopio de luz, a un aumento total de 100x; se contó un total de 100 espermatozoides los que mostraron enrollamiento del flagelo se consideraron como positivos a la prueba, es decir con membrana íntegra y funcional.

Procedimiento de la prueba de viabilidad espermática.

Se tomó una muestra espermática de 10 µl, a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml, la que se colocó sobre un portaobjetos junto con 10 µl de eosina-nigrosina al 2% en PBS, y se cubrieron con un portaobjetos para su observación al microscopio de luz a 100x. Se contaron 100

Las células teñidas se consideraron muertas puesto que el colorante penetró al interior por alguna discontinuidad de la membrana celular, mientras que aquellos espermatozoides que mantuvieron la membrana plasmática intacta se observaron transparentes.

Procedimiento del gradiente de Ficoll.

Se utilizó para separar espermatozoides con y sin acrosoma. Se utilizó una solución madre de Ficoll al 50% en solución salina (Hernández, 2004). De la solución madre se prepararon soluciones al 30%, 20% y 10%. Se colocó al fondo de un tubo de ensayo la solución más concentrada y se fueron poniendo en la superficie las soluciones de menor concentración (se añadió 1 ml de cada una de las soluciones, excepto de la solución al 20%, de la cual se colocaron 2 ml). La muestra de semen que debe estar a una concentración de  $20 \times 10^6$ , se agregó resbalándolo por las paredes del tubo. Después de esto, se centrifugaron por 8 minutos a 1,500 rpm en una centrífuga clínica. De las fases de 20 y 30% se obtuvieron los espermatozoides sin acrosoma y con acrosoma respectivamente. Estas alícuotas se utilizaron para la prueba de microscopía electrónica.

#### Criopreservación del semen.

El semen fue diluido en una solución para congelar mediante el método de un paso, la cual constó de los siguientes ingredientes:

#### Solución Madre

Tris (Hidroximetilaminometano)	18.02 gr.
D-Glucosa	9.978 gr.
Acido Cítrico	7.44 gr.
Agua Bidestilada	500.00 ml

#### Solución de trabajo

Solución Madre	35 ml
Yema de huevo	10 ml

Glicerol	3.5 ml (7%)
Agua bidestilada	1.5 ml

El semen diluido fue envasado en pajillas de 0.5 ml, a una concentración de  $150 \times 10^6$  espermatozoides por pajilla. Una vez llenas, las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico. Inmediatamente después, las pajillas se metieron en una cámara fría en baño maría a una temperatura de 35°C, hasta que las pajillas llegaron a una temperatura de 5°C, donde permanecieron durante un periodo de equilibrio de 2 horas. Transcurrido este tiempo se congelaron en los vapores de nitrógeno líquido, colocando las pajillas en posición horizontal, sobre una rejilla, a una distancia de 5 cm del nitrógeno líquido durante 20 minutos. Después se sumergieron en el nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su procesamiento (Valencia, 1994).

#### Descongelación de las pajillas.

Las pajillas fueron sumergidas durante 15 seg en baño María a 37°C. Enseguida los espermatozoides fueron procesados para la valoración de su integridad empleando los mismos métodos que se utilizaron para evaluar a las células espermáticas del semen fresco.

#### Procesamiento para microscopia electrónica.

Tanto las muestras de semen recién obtenidas como las que fueron criopreservadas, se procesaron para la valoración de la teca perinuclear al microscopio electrónico de transmisión, mediante la técnica de tinción negativa. Para exponer la superficie de la teca perinuclear los espermatozoides

resuspendidos a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml fueron incubadas a temperatura ambiente en una solución acuosa de Brij 36-T al 10% durante 10 min (70  $\mu$ l /0.5 ml de suspensión), con la finalidad de solubilizar las membranas y dejar expuesta la teca perinuclear. Las células se centrifugaron a 3,250 g por 3 min y se lavaron 3 veces con agua desionizada. Las muestras espermáticas con la teca perinuclear expuesta fueron fijadas en solución de Karnovsky durante 2 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 3,250 g por 3 min, lavadas 2 veces en PBS, dos veces en agua desionizada filtrada y resuspendidas en esta última en su volumen inicial. Después de los lavados, las muestras espermáticas fueron colocadas en rejillas de cobre de 200 mesh cubiertas con membrana de soporte colodión-carbón. Para ello, en la cara cubierta de la rejilla se colocó en la superficie una gota de la suspensión espermática. Se mantuvieron así, entre 5 y 10 min para que los espermatozoides quedaran adheridos a la membrana, se retiró el exceso de la muestra y se dejaron secar. Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo 0.01% en solución acuosa durante 12 seg y se enjuagaron pasando la rejilla en una gota de agua destilada. Las rejillas se colocaron sobre papel filtro en cajas de Petri y se cubrieron para permitir que se secaran. El procesamiento de las muestras se realizó en el Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM) y las muestras se observaron en la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM, en un microscopio electrónico de transmisión.

### Analisis Estadístico.

Los resultados se analizaron mediante la prueba de t de Student para datos pareados para los datos obtenidos en microscopía óptica (viabilidad espermática, integridad acrosomal, integridad de la membrana plasmática) y microscopia electrónica (valoración de la teca perinuclear) en fresco y descongelado; la prueba de correlación de Pearson para relacionar los datos anteriormente mencionados. Para esto, se usó el programa de cómputo MINITAB 13.0.

## **VII. Resultados**

### **Concentración y motilidad de los espermatozoides**

La valoración de la concentración espermática se realizó en los eyaculados recién obtenidos. El promedio de la concentración espermática de los 8 eyaculados fue de  $3.046 \pm 1.3 \times 10^6$  células/ml.

La motilidad progresiva fue menor ( $P < 0.05$ ) en los espermatozoides descongelados, en comparación con el semen fresco ( $43.75 \pm 3.63$  vs  $83.75 \pm 0.82\%$ ; Cuadro 1).

### **Diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos (viabilidad espermática)**

La viabilidad de los espermatozoides empleando la tinción de eosina-nigrosina fue significativamente menor en el semen descongelado en comparación con el semen fresco ( $38.5 \pm 2.2$  vs  $77.88 \pm 2.73\%$ ;  $P < 0.05$ ), (Cuadro 2). Igualmente, usando la técnica de triple tinción se encontró que el promedio de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fue mayor en el semen fresco que a la descongelación ( $83.88 \pm 0.97$  vs  $41 \pm 1.87$ ;  $P < 0.000$ ) (Cuadro 2).

Al comparar los resultados de eosina-nigrosina con triple tinción para vivos (Gráfica 4) y muertos (Gráfica 5), no se encontró diferencia significativa entre estos ( $P = 0.000$ ) (Cuadro 3).

### **Integridad de la membrana plasmática**

La prueba hiposmótica, utilizada para valorar la integridad de la membrana plasmática, mostró un mayor daño en los espermatozoides descongelados ( $P=0.000$ ). Antes del proceso de criopreservación el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra fue del  $80.13\pm 2.06$  y después del descongelado fue de  $39.50\pm 3.16$ . (Cuadro 4)

### **Integridad del acrosoma**

Con la técnica de triple tinción, se encontró que el  $86.13\pm 1.71\%$  espermatozoides tenían acrosoma intacto (Cuadro 5), de este porcentaje el  $80.62\pm 1.54$  correspondía a espermatozoides vivos y  $5.50\pm 0.46$  a espermatozoides muertos; El valor de espermatozoides que no presentaron acrosoma fue de  $13.88\pm 1.71$ , de los cuales  $3.25\pm 0.61$  correspondió a espermatozoides vivos (con reacción acrosomal), y el  $10.62\pm 1.10$  a espermatozoides muertos (Cuadro 6, Gráfica 8)

En cuanto al semen descongelado se obtuvo un  $42.13\pm 3.62$  de espermatozoides que presentaron acrosoma intacto (Cuadro 5, Gráfica 7) ( $30.25\pm 2.68$  vivos y  $11.87\pm 1.34$  muertos), y de los espermatozoides que no presentaron acrosoma  $10.75\pm 1.30$  correspondió a los vivos y  $47.12\pm 2.78$  a los espermatozoides muertos (Cuadro 7, Gráfica 9).

### **Separación de espermatozoides con y sin acrosoma**

Utilizando el gradiente de Ficoll, se logró hacer la separación de los espermatozoides con acrosoma de los espermatozoides sin acrosoma. En el gradiente de 20% se obtuvo una mayor separación de células sin acrosoma,  $74.25\pm 3.8$  en fresco y  $78.75\pm 2.2$  en descongelado (Cuadro 8).

Mientras que en el gradiente de 30% se obtuvo una mayor cantidad de espermatozoides con acrosoma,  $76.37 \pm 2.4$  en fresco y  $68.37 \pm 2.3$  en descongelado (Cuadro 9).

Al comparar estos resultados, se encontró que existe diferencia estadística significativa entre los espermatozoides que presentan acrosoma intacto de los ya han perdido el acrosoma en cada uno de los gradientes (Gráfica 12 y 13)

### **Integridad de la teca perinuclear**

Para la evaluación de la TP se emplearon espermatozoides desmembrados y procesados para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET) por la técnica de tinción negativa. Se usó la subestructura de la TP como marcador morfológico de la integridad de la misma, la cual se encuentra rodeando la cabeza espermática en la parte apical de la región postacrosomal de la TP (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Conforme a esto las muestras se clasificaron como: teca íntegra o normal, cuando la subestructura era de forma de grecas continuas (Martínez, 2003); teca alterada, cuando la subestructura presentó algún daño (falta de grecas o interrupciones en la continuidad).

En los espermatozoides sin acrosoma (que han sufrido reacción acrosomal), la proporción de espermatozoides con teca perinuclear alterada fue de  $68 \pm 2.68\%$  en el semen fresco y  $68 \pm 2.53\%$  en el descongelado (Gráfica 14). Mientras que en los espermatozoides con acrosoma intacto el porcentaje de espermatozoides con teca perinuclear normal o íntegra en el semen fresco y descongelado fue de  $79.6 \pm 3.54$  y  $67.6 \pm 5.98$  (%) (Gráfica 15).

En el cuadro 11, se muestra la integridad de la teca perinuclear y los parámetros de calidad del semen en los espermatozoides sin acrosoma antes del congelamiento. Existió una correlación negativa entre los espermatozoides con TP normal y los espermatozoides con TP alterada ( $r = -0.989$ ,  $p < 0.05$ ). En los espermatozoides con acrosoma en fresco se puede ver que existe una correlación positiva entre las células vivas evaluadas con triple tinción (TT) y las células que presentan TP normal ( $r = 0.882$ ,  $p < 0.05$ ); en cambio con las células que presentan TP alterada, existe una correlación negativa con los espermatozoides vivos ( $r = -0.933$ ,  $p = 0.021$ ) (Cuadro 12).

En el semen descongelado se puede observar nuevamente la correlación negativa que existe entre los espermatozoides con TP normal y los espermatozoides con TP alterada (Cuadro 13 y 14).

## VIII. Discusión

Al descongelar las pajillas de semen se observó que tanto la motilidad, la viabilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosoma, se ven disminuidas alrededor de un 50% en relación al semen fresco, lo que coincide con datos de otros autores (Marco-Jimenez et al., 2006; Purdy 2006; Watson 2000).

La motilidad encontrada en semen fresco fue de 83.75 y de 43.75 en semen descongelado. Los rangos manejados para la motilidad en fresco van desde el 85% (Azeredo et al., 2001) hasta el 70% (Marco-Jimenez et al., 2006; Karatzas et al., 1997). Mientras que para el descongelado se manejan valores desde 50% (Karatzas et al., 1997) hasta valores alrededor del 30% (Azeredo et al., 2001; Marco-Jimenez et al., 2006), por lo que lo registrado en este trabajo esta dentro de los parámetros que otros autores han encontrado.

Al hacer la evaluación de la vitalidad de los espermatozoides con triple tinción y con eosina-nigrosina, no se encontraron diferencias estadísticas al identificar a los espermatozoides vivos de los muertos tanto en fresco como en descongelado, por lo que las dos técnicas cumplen su función. La eosina-nigrosina es rápida y se puede emplear como prueba rutinaria en la evaluación del semen. Mientras que la triple tinción proporciona más información acerca del estatus fisiológico del espermatozoide y su capacidad fertilizante.

En cuanto a la integridad de la membrana (prueba hiposmótica), para provocar en las células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo por la entrada del agua, se requiere que la membrana plasmática del espermatozoide esté íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Mientras que las células con la membrana física o

funcionalmente dañada no se observan cambios en la forma del flagelo (Correa y Zavos, 1994; Pérez-Llano et al., 2001). Desafortunadamente no se logró correlacionar con otros parámetros estudiados (viabilidad, integridad del acrosoma e integridad de la TP), posiblemente debido al tamaño de la muestra analizada.

La enzima fosfolipasa, que cataliza la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo a ácidos grasos y lisolecitinas, las cuales son las responsables de la toxicidad. Para evitar este efecto se recomienda no exceder del 2% la cantidad de yema de huevo del diluyente o quitar el plasma seminal por centrifugación (Evans y Maxwell, 1987), sin embargo, estudios más recientes encuentran un efecto desfavorable en las muestras previamente centrifugados tras su descongelación sobre la motilidad e integridad acrosómica (Tuli & Holtz, 1994). Al diluir los eyaculados no se observó ningún caso de toxicidad.

La integridad del acrosoma también ha sido considerado como un marcador para predecir la capacidad fertilizante del semen congelado (Buhr, 1989), aunque no se ha podido correlacionar el daño ocurrido en el acrosoma con la disminución en la fertilidad de los espermatozoides (Heras et al., 1996). Los resultados encontrados de la integridad acrosomal en este estudio van de 86% en semen fresco hasta 42% en semen descongelado. Estos valores son mayores a los descritos por otros autores (Marco-Jimenez et al., 2006 Valencia, 1994) que trabajaron con semen de chivo.

La baja fertilidad que tiene el semen criopreservado, se puede deber no solo al daño ocurrido en la membrana plasmática o a la integridad del acrosoma, sino a estructuras dentro de la célula (Locksley et al., 1988). La TP es el principal elemento citoesquelético de la cabeza de los espermatozoides

de mamífero (Longo, et al., 1987; Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999) y su integridad es de crucial importancia para el funcionamiento del espermatozoide. En diversas investigaciones señalan la participación de la TP en funciones espermáticas como el mantenimiento de dominios de la membrana plasmática de la cabeza, en la integridad del acrosoma y del núcleo, en la activación del ovocito (Buhr et al., 1989)

Martínez (2003, et al., 2006) encontró que en la TP del espermatozoide de bovino existe un incremento en el daño a la subestructura de la TP después del proceso de criopreservación. A pesar de los daños ocurridos después de la criopreservación, solo se encontró correlación positiva entre las células vivas evaluadas con triple tinción y la TP normal, y una negativa con las células vivas y la TP alterada (Cuadro 9).

En este estudio se observó una relación entre la integridad de la subestructura de la TP y los espermatozoides con acrosoma intacto tanto en el semen fresco como descongelado (Cuadro 7). Es posible, que la razón por la cual encontremos cierta cantidad de células con TP alterada en los espermatozoides con acrosoma, sea debido al porcentaje de purificación de las células con acrosoma (76% en semen fresco), el cual fue aún menor después del proceso de criopreservación (68%).

Así, en los espermatozoides que han sufrido reacción acrosomal, la TP está alterada o ausente tanto en semen fresco como descongelado. Esta pérdida de la subestructura después de la reacción acrosomal es como la descrita por Juárez-Mosqueda y Mujica (1999) en espermatozoides de cobayo.

Ellis y colaboradores (2002) al evaluar una subestructura de la superficie espermática (subsegmento ecuatorial), logran identificar hundimientos

alrededor de la cabeza del espermatozoide en forma de grecas posiblemente provocadas por la subestructura de la TP en espermatozoides frescos con acrosoma íntegro. En ese trabajo después de provocar la reacción acrosomal, la zona que corresponde a la subestructura de la TP se observa menos marcada y los hundimientos disminuyen. Esto nos indica que al igual que en nuestro trabajo existen alteraciones en la subestructura de la TP después del ocurrida la reacción acrosomal.

Además de este hay otros trabajos que refuerzan los resultados obtenidos entre la integridad del acrosoma y de la TP. En el caso de espermatozoides de humano con cabeza redonda carentes de acrosoma se han asociado a fallas en la diferenciación de la TP (Escalier, 1990). Martínez et al., (2006) encontraron que existe una correlación negativa entre el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides con la subestructura ausente.

Se ha pensado que la TP puede ser el mayor colaborador para la formación y moldeamiento de la cabeza del espermatozoide. Durante la espermiogénesis la TP se asocia con las membranas acrosomal y nuclear (Oko y Maravei, 1995). Después de la capacitación y la reacción acrosomal ocurre un reacomodo de los dominios de membrana los cuales son mediados por vínculos entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Mújica et al., 2003). En semen de cerdo se ha demostrado que existe una redistribución de los dominios de membrana por la criopreservación, similares a la capacitación *in vivo* (criocapitación) (Yescas, 2006). En este trabajo se encontró que el semen criopreservado tiene valores elevados de espermatozoides que han

sufrido reacción acrosomal, lo cual nos llevaría a un mayor número de células en las cuales la TP se encuentra alterada.

Usando altas concentraciones de trehalosa como crioprotector se obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en semen de chivo (Aboagla y Terada, 2003). Así, se podría hacer una evaluación de la subestructura de la TP utilizando trehalosa en lugar de Tris-ácido cítrico, y poder identificar si el daño a esta subestructura disminuye, al igual que disminuye la cantidad de células con acrosoma dañado.

## **IX. Conclusiones**

Después del proceso de criopreservación hay un aumento en la cantidad de acrosomas dañados en las células y una disminución de la viabilidad en el semen caprino.

Así, si se conserva la integridad de la teca perinuclear se logra mantener también la integridad del acrosoma, aún después del proceso de criopreservación, por lo que la teca perinuclear está involucrada en el mantenimiento del acrosoma del espermatozoide de caprino, cuando el espermatozoide está vivo.

## Anexos

**Cuadro 1. Resultados de la motilidad espermática de semen fresco contra descongelado**

	Fresco	Descongelado
Motilidad	83.75±0.82 <sup>a</sup>	43.75±3.63 <sup>b</sup>

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa (P<0.05), medias± ee.

**Cuadro 2. Comparación de la viabilidad en semen fresco y descongelado empleando las técnicas de triple tinción y eosina-nigrosina.**

	TT	E-N
Fresco	83.88±0.97 <sup>a</sup>	77.88±2.7 <sup>a</sup>
Descongelado	41.0±1.90 <sup>a</sup>	38.5±2.2 <sup>a</sup>

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa (P<0.05), medias±ee.

**Cuadro 3. Resultados de la integridad de la membrana plasmática en semen fresco contra descongelado mediante la prueba hiposmótica.**

	Fresco	Descongelado
Integridad membrana plasmática	80.13±2.06 <sup>a</sup>	39.50±3.16 <sup>b</sup>

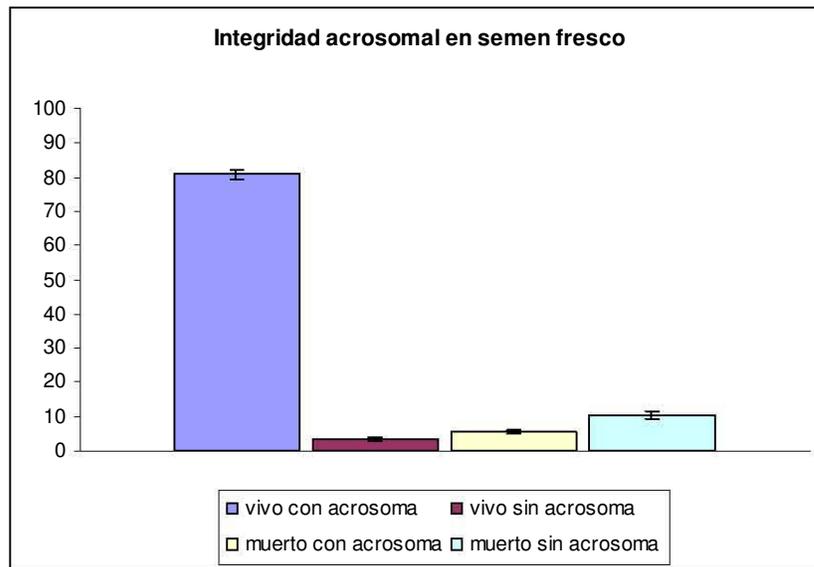
Literales diferentes por línea indican diferencia significativa (P<0.05), medias±ee.

**Cuadro 4. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco contra descongelado, mediante la técnica de triple tinción**

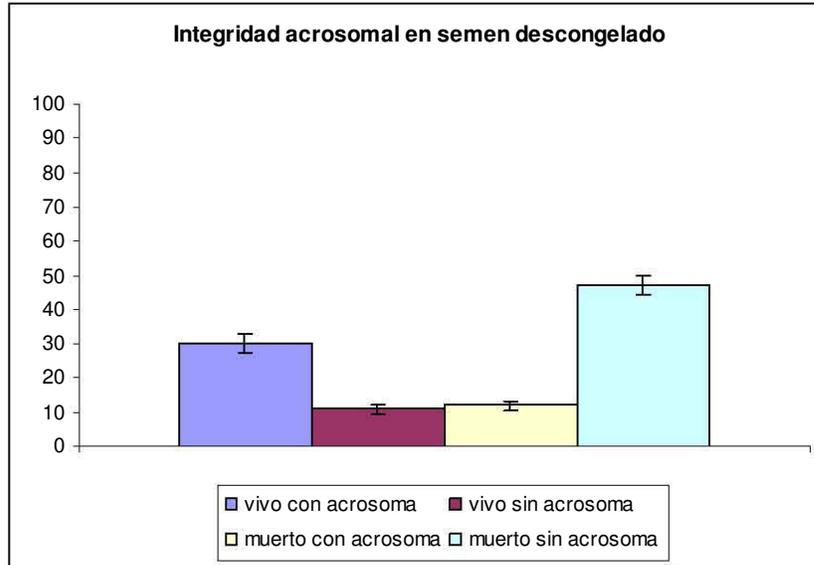
	Fresco	Descongelado
Integridad acrosomal	86.13±1.71 <sup>a</sup>	42.13±3.62 <sup>b</sup>

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), medias±ee.

**Gráfica 1. Distribución de los porcentajes de integridad acrosomal en semen fresco, para espermatozoides vivos y muertos (triple tinción)**



**Gráfica 2. Distribución de los valores de integridad acrosomal en semen descongelado en espermatozoides vivos y muertos (triple tinción)**



**Cuadro 5. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco y descongelado obtenidos del gradiente de 20% de Ficoll**

	Con acrosoma fresco	Sin acrosoma fresco	Con acrosoma descongelado	Sin acrosoma descongelado
Gradiente 20%	25.75±3.8 <sup>a</sup>	74.25±3.8 <sup>b</sup>	21.25±2.2 <sup>a</sup>	78.75±2.2 <sup>b</sup>

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), medias ± ee.

**Cuadro 6. Resultados de la integridad del acrosoma en semen fresco y descongelado obtenidos del gradiente de 30% de Ficoll**

	Con acrosoma fresco	Sin acrosoma fresco	Con acrosoma descongelado	Sin acrosoma descongelado
Gradiente 30%	76.37±2.4 <sup>a</sup>	24.62±2.5 <sup>b</sup>	68.37±2.3 <sup>c</sup>	31.62±2.3 <sup>d</sup>

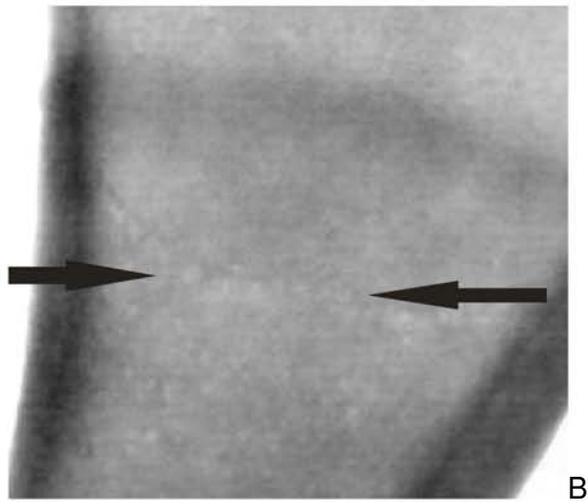
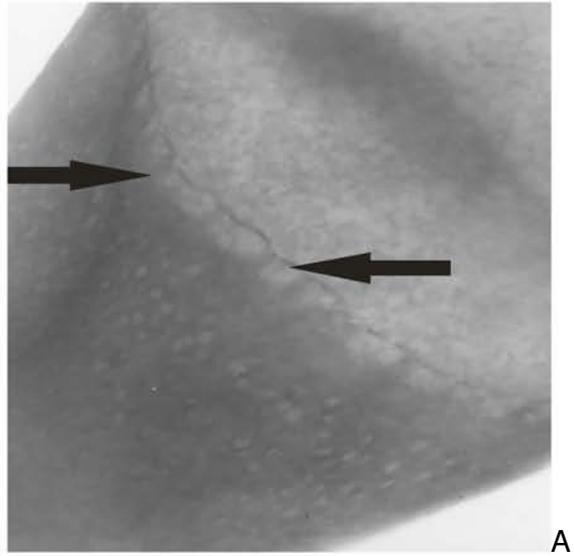
Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), medias±ee.

**Cuadro 7. Resultados de la integridad de la teca perinuclear en semen fresco y descongelado con acrosoma íntegro (AI) o con reacción acrosomal (RA)**

	TP Normal (RA)	TP Alterado (RA)	TP Normal (AI)	TP Alterado (AI)
Fresco	31.6 ± 2.71a	68 ± 2.68 b	79.6 ± 3.54c	19.6 ± 3.54d
Descongelado	32 ± 2.53a	68 ± 2.53b	67.6 ± 5.98b	32.4 ± 5.98a

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), medias±ee.

**Figura 1. Vista de la subestructura de la Teca Perinuclear**



Microscopía electrónica de la cabeza de un espermatozoide de caprino con la TP expuesta. Se observa la forma característica de la subestructura intacta (A) y las alteraciones morfológicas que se presentaron en la subestructura de la TP (B).

**Cuadro 8. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en muestras frescas sin acrosoma.**

	Vivos E-N	Vivos TT	TPN	TPA	MI
Vivos E-N	1	0.324	0.046	-0.094	0.784
		0.595	0.942	0.880	0.116
Vivos TT			0.564	-0.654	0.314
			0.322	0.232	0.607
Tpn				-0.989	-0.421
				0.001	0.480
Tpa					0.325
					0.594

Vivos E-N Vivos con Eosina-Nigrosina, Vivos TT Vivos con Triple Tinción, TPN Teca Perinuclear Normal, TPA Teca Perinuclear Alterada, MI Membrana Integra

**Cuadro 9. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en muestras frescas con acrosoma.**

	Vivos E-N	Vivos TT	TPN	TPA	MI
Vivos E-N	1	0.324	0.344	-0.338	0.784
		0.595	0.571	0.578	0.116
Vivos TT			0.882	-0.933	0.314
			0.048	0.021	0.607
Tpn				-0.990	0.580
				0.001	0.306
Tpa					-0.500
					0.391

Vivos E-N Vivos con Eosina-Nigrosina, Vivos TT Vivos con Triple Tinción, TPN Teca Perinuclear Normal, TPA Teca Perinuclear Alterada, MI Membrana Integra

**Cuadro 10. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en muestras descongeladas sin acrosoma.**

	Vivos e-n	Vivos TT	TPN	TPA	MI
Vivos e-n	1	-0.213 0.731	0.569 0.317	-0.569 0.317	0.263 0.670
Vivos TT			-0.846 0.071	0.846 0.071	0.256 0.678
Tpn				1.00	0.229 0.711
Tpa					-0.229 0.711

Vivos E-N Vivos con Eosina-Nigrosina, Vivos TT Vivos con Triple Tinción, TPN Teca Perinuclear Normal, TPA Teca Perinuclear Alterada, MI Membrana Integra

**Cuadro 11. Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en muestras descongeladas con acrosoma.**

	Vivos e-n	Vivos TT	TPN	TPA	MI
Vivos e-n	1	-0.213 0.731	0.325 0.594	-0.325 0.594	0.263 0.670
Vivos TT			0.475 0.419	-0.475 0.419	0.256 0.678
Tpn				-1.00	0.573 0.313
Tpa					-0.573 0.313

Vivos E-N Vivos con Eosina-Nigrosina, Vivos TT Vivos con Triple Tinción, TPN Teca Perinuclear Normal, TPA Teca Perinuclear Alterada, MI Membrana Integra

## X. LITERATURA CITADA

- Aalseth EP, Saacke RG. Morfological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4°C. J Reprod Fert 1985; 74:473-478.
- Abou-Halia A, Tulsani DRP. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. Arch Biochem Biophys 2000; 379:173-182.
- Arbiza, S. Producción de caprinos. AGT Editor, S.A. México, D.F. 1986.
- Azerêdo GA, Esper CR, Resende KT. Evaluation of plasma membrana integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Rumin Res 2001; 41:257-263.
- Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. J Androl 2001; 22:1061-1069.
- Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS, Barth AH. The perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. Biol Reprod 1992; 47:451-465.
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. Molec Cell Endoc 2002; 187:139-144.
- Buhr M, Canvin A, Bauley L. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. Gamete Research 1989; 23:441-449.
- Correa JR, Zavos PM. The hypoosmotic swelling test: its employments as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. Theriogenology 1994; 42:351-360.
- Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol Reprod 1989; 41:653-641.

- De Leeuw F, Chen H, Colenberd L. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 1990; 27:171-183.
- De Robertis E. *Biología celular y molecular*. 12<sup>a</sup> edición. Ed. El Ateneo. Argentina, 1998.
- Dorado J, Rodriguez I, Hidalgo M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 2007; 68:168-177.
- Ellis DJ, Shadan S, James PS, Henderson RM, Edwardson JM, Hutchings A, Jones R. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, buck, boar, and goat spermatozoa as view by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 2002; 138:187-198.
- Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol* 1990; 34: 287-297.
- Evans G, Maxwell WMC. Frozen storage of semen. In: *Artificial Insemination of sheep and goats*. Butterworths, Wellington.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, John Douglas MST, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 1990; 27: 247-268.
- Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:251-260.

- Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod Supp* 1970; 2:90-127.
- Felipe-Pérez YE. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación en semen bovino. Tesis de maestría. México, D.F. México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2006.
- Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989; 26:64-69.
- Fiser PS, Fairfull RW, Hansen C, Panich PL Shrestha JNB, Undehill L. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol reprod Dev* 1993; 34:190-195
- Flesch F, Gadella B. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the process of fertilization. *Biochim et Bio Acta* 2000; 1469:197-235.
- Foote RH. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, 2003; 75:119-139.
- Fouquet J, Kann M. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Bio Cell* 1994; 81:89-93.
- Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz, Perry ACF, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58(1407-1415).

- Gabers D, First NL, Lardy HA. The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Bio Reprod* 1973; 8:589-598.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in the equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2001; 68:249-265.
- Gadella BM, van Gestel RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* 2004; 83:307-319.
- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod* 1995; 10:1109-1122.
- García ME. Modificación al sistema de clasificación climatológica de Köepen. Offset Larios S.A. (editor), México, 1981.
- Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987; 24:42-52.
- Gutiérrez-Pérez O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondesación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis de maestría. México, D.F. México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2006.
- Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F., 2002.

- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11:73-88.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa IV. The effects of cooling rate and warming on the maintenance of motility plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility* 1993; 60:911-918.
- Heras M, Valcarcel A, Furnus C, Perez L, Moses D, Baldassarre H. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Anim Reprod Sci* 1996; 45:81-89.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:3-22.
- Hoskins DD, Brandt H, Acott TS. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed Proc* 1978; 37:2534-2542
- Iritani, A., Nishikawa, 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 8, 113–117.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl* 1992; 39: 1279-1289.
- Juárez-Mosqueda ML y Mújica A. A perinuclear substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol* 1999; 128:225-236.

- Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakelil S, Brikas P. Fertility of fresh and frozen- thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 1997; 1049-1059.
- Leboeuf B, Manfredi E, Boue P, Piac`ere A, Brice G, Baril G, Broqua C, Humblot P, Terqui M. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest Prod Sci* 1998; 55:193–202.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:113-141.
- Locksley E, Yang H, Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 1988; 25:178-185.
- Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeleton elements. *J Cell Biol* 1987; 105:1105-1120.
- Marco-Jimenez F, Viude-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52:295-304.
- Martinez CO. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. Tesis de licenciatura. México, D.F. México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2003.
- Martinez CO, Juárez-Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006; 66:1969-1975.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications . *Am J Physiol* 1984; 247:125-142.

- Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS Effect of washing on motility and acrosoma morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am J Vet Res* 1985; 46:473–475.
- Mújica A. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Research and Technique* 2003; 61:76-87.
- Oettlé EE. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* 1986; 12:145-150.
- Oko RJ. Developmental Expresión and Posible Role of Perinuclear Theca Proteins in Mammalian Spermatozoa. *Repro Fertil Dev*, 1995; 7:777-797.
- Oko R y Maravei R. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50:1000-1004.
- Ollero M, Bescós O, Cebrian-Peréz JA, Muiño-Blanco T. Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 1998; 49:547-555.
- Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38:209-222.
- Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, García-Casado P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 2001; 56:387-398.
- Pickett BW. Komareck RJ. Effect of cold shock and freezing on lost of lipids from spermatozoa. *J Dairy Sci* 1966; 50:753-757.
- Purdy PH. A review in goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res* 2006; 63:215-225.

- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 1993; 47:279-285.
- Rodríguez-Martínez H, Laarson B, Pertof H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997; 9:297-308.
- Roy, A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179, 318–319.
- Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. *Anim Repro Sci* 1995; 37:185-249.
- Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995; 38:1-36.
- Salamon S. Salomon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworths Pty Limited. Australia, 1987.
- Silva PFN y Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65:958-978.
- Somanath PR, Suraj K, Gandhi KK. Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rum Res* 2000; 37:279-286.
- Sutovsky P, Oko R Hewitson L, Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol* 1997; 188:75-84.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. 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.

- Tachibana M, Terada Y, Murakawa H, Murakami T, Nobou Y, Okamura K. Dynamic changes in the cytoskeleton during human spermiogenesis. *Fertility and Sterility* 2005; 84:1242:1248.
- Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 1994; 42:547-555.
- Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol* 2003; 66:383-396.
- Valencia J, González G, González M, Trejo A. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 y 0.50 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet Mex.* 1994; 25:127-131.
- Vázquez JM, Martínez EA, Martínez P, García-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for nalyising the sperm membrane. *Theriogenology* 1997; 47:913-922.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Laclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation in mouse spermatozoa . II Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121:1139-1150.
- Watson PF. Recent developepments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 1995; 7: 871-891.

- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-492.
- Way AL, Henault MA, Killian GJ. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 43:1301-1316.
- Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC, Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1994; 42:147-157.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. Raven New York. Knobil, E, Neill JD Ed. 1994.