



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA
DE ESTRÉS OSMÓTICO PRECONGELACIÓN
PARA PREDECIR LA CRIOSUPERVIVENCIA DE
SEMEN DE CERDO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CÉ SAR G A R Z Ó N P É R E Z

TUTOR: Dr. José Alfredo Medrano Hernández

COMITÉ TUTORAL: Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Alfredo Medrano Hernández, gracias por compartir sus conocimientos, además de su apoyo, confianza y dedicación para llevar a cabo la realización de este proyecto.

Al Dr. Gerardo García Tovar y a la Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, miembros del Comité Tutoral, gracias por sus contribuciones, observaciones y disponibilidad para la elaboración de este trabajo.

A la Cátedra Comportamiento reproductivo de los animales domésticos (IN2-07) por el apoyo para la realización del trabajo experimental.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, a su director Roberto Martínez, a Aléctor, Catalina, Lourdes y demás personas, gracias por su apoyo y disposición para la obtención de las muestras.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el soporte recibido durante el período de estudios de posgrado.

Al Dr. Daniel Mota y al Dr. Salvador Romo miembros del jurado por sus observaciones y disponibilidad para la revisión de este trabajo.

A los profesores que contribuyeron en mi formación durante mis estudios de maestría.

A las personas que contribuyeron en gran medida a la obtención de muestras, Guadalupe Acosta, Héctor Flores y Daniel López gracias por su gran colaboración.

Alma Álvarez, Marisol Lozano y José Luis Sandría gracias por su apoyo y compañía durante las largas jornadas de trabajo.

A todas las personas que intervinieron de alguna manera para poder llevar a cabo la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Rosario mi esposa

Por su amor, apoyo y comprensión.
Gracias por estar a mi lado en todo momento.

A mis padres María Luisa y Melchor

Por su gran apoyo y amor incondicional.
Seguir su ejemplo es mi propósito.

A mis hermanas Miriam y Sandra, a mis sobrinos Gael, Yamile y Maximiliano

Gracias por su amor y alegría que brindan a mi vida

A mi familia y amigos

Que siempre se encuentran
a mi lado

INDICE

	Página
Índice.....	i
Índice de cuadros.....	v
Índice de figuras	vi
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Revisión de Literatura.....	2
2.1 Criobiología.....	2
2.2 La Membrana Plasmática y la respuesta celular a bajas temperaturas.....	5
2.3 Congelación.....	9
2.4 Descongelación.....	10
2.5 Lesiones crioaducidas.....	10
2.6 Formación de hielo.....	12
2.6.1 Formación de hielo intracelular.....	12
2.6.2 Formación de hielo extracelular.....	13
2.7 Efecto soluto y estrés osmótico.....	14
2.8 Agentes crioprotectores.....	19
2.9 Aspectos prácticos de la crioconservación.....	22
2.10 Evaluación de semen.....	23
2.10.1 Motilidad.....	23
2.10.2 Morfología.....	23
2.10.3 Viabilidad.....	23
2.10.4 Evaluación del acrosoma.....	26
2.10.5 Capacitación.....	28

2.11 Variaciones entre especies y entre individuos.....	33
3. Antecedentes.....	36
4. Justificación.....	38
5. Hipótesis.....	40
6. Objetivos.....	41
6.1 Objetivo general.....	41
6.2 Objetivos particulares.....	41
7. Material y Métodos.....	42
7.1 Diseño experimental.....	42
7.2 Diagrama de flujo de la primera parte experimental.....	43
7.2.1 Obtención y transporte del semen.....	44
7.2.2 Evaluación.....	44
7.2.2.1 Viabilidad.....	44
7.2.2.2 Motilidad progresiva.....	45
7.2.2.3 Concentración espermática.....	45
7.2.2.4 Anormalidades.....	45
7.2.3 Dilución.....	45
7.2.4 Preparación de soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas.....	46
7.2.5 Enfriado lento a -5°C en dos etapas.....	46
7.2.5.1 Primera etapa: enfriado a 5°C.....	46
7.2.5.2 Segunda etapa: enfriado a -5°C.....	47
7.2.6 Desarrollo de la prueba de estrés osmótico.....	48
7.2.6.1 Exposición a soluciones hiperosmóticas.....	48
7.2.6.2 Exposición a soluciones hiposmóticas.....	48
7.2.7 Determinación de viabilidad espermática (SYBR-14/PI).....	49

7.2.8 Determinación de la integridad acrosomal.....	49
7.3 Diagrama de flujo de la segunda parte experimental.....	50
7.3.1 Obtención y transporte del semen.....	51
7.3.2 Evaluación.....	51
7.3.3 Dilución.....	51
7.3.4 Enfriado lento a -5°C.....	51
7.3.4.1 Primera etapa: enfriado a 5°C.....	52
7.3.4.2 Segunda etapa: enfriado a -5°C.....	52
7.3.5 Exposición a soluciones hiperosmóticas.....	53
7.3.6 Exposición a soluciones hiposmóticas.....	53
7.3.7 Exposición de las pajillas a los vapores de nitrógeno.....	53
7.3.8 Descongelación.....	53
7.3.9 Estado de capacitación.....	54
7.4 Análisis estadístico.....	55
8. Resultados	56
8.1 Prueba de estrés osmótico.....	56
8.1.1 Viabilidad espermática.....	58
8.1.2 Espermatozoides con acrosoma intacto.....	61
8.2 Congelación de semen y prueba de estrés osmótico.....	64
8.2.1 Viabilidad espermática.....	66
8.2.2 Acrosomas intactos.....	68
8.2.3 Motilidad progresiva	70
8.2.4 Estado de capacitación	71
8.3 Correlaciones.....	75
8.4 Comparativo de la determinación de viabilidad espermática por SYBR-14/PI y eosina-nigrosina.....	77

9. Discusión.....	78
9.1 Incubación en soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas.....	78
9.2 Proceso de congelación-descongelación.....	82
9.2.1 Viabilidad.....	82
9.2.2 Acrosoma.....	82
9.2.3 Motilidad.....	83
9.2.4 Capacitación.....	84
9.3 Correlación entre la prueba de estrés osmótico pre congelación y la supervivencia espermática al proceso de congelado-descongelado.....	86
9.4 Comparación entre SYBR-14/PI y la eosina-nigrosina en la determinación de la viabilidad.....	87
9.5 Variaciones individuales.....	88
10. Conclusiones.....	91
11. Literatura citada.....	92

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas utilizadas.....	46
2. Valores promedio individuales de los parámetros evaluados en el semen fresco	57
3. Valores generales de viabilidad espermática.....	59
4. Valores individuales de viabilidad espermática en hiperosmolaridad.....	60
5. Valores individuales de viabilidad espermática en isosmolaridad.....	60
6. Valores generales de acrosomas intactos.....	62
7. Espermatozoides con acrosoma intacto en hiperosmolaridad.....	63
8. Espermatozoides con acrosoma intacto en isosmolaridad.....	63
9. Valores promedio individuales de los parámetros evaluados en el semen fresco	65
10. Viabilidad en semen fresco, en estrés osmótico y al descongelado.....	67
11. Espermatozoides con acrosoma intacto en semen fresco, en estrés osmótico y al descongelado.....	69
12. Motilidad progresiva en semen fresco y al descongelado.....	70
13. Patrones de la prueba CTC en semen fresco.....	72
14. Patrones de la prueba CTC en semen descongelado.....	73
15. Espermatozoides capacitados en semen fresco y al descongelado.....	74
16. Correlaciones.....	75
17. Comparativo de la determinación de viabilidad con SYBR-14 y eosina-nigrosina.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Criosupervivencia de diferentes tipos celulares.....	3
2. Estructura tripartita del espermatozoide.....	4
3. Representación esquemática de eventos físicos celulares durante el enfriamiento.....	11
4. Representación de la influencia de dos mecanismos letales sobre la criosupervivencia.....	11
5. Viabilidad Espermática.....	25
6. Estado acrosomal.....	27
7. Patrones de fluorescencia de la prueba de la clortetraciclina (CTC).....	29
8. Recipiente "A".....	47
9. Recipiente "B".....	47
10. Exposición a soluciones hiperosmóticas.....	48
11. Restablecimiento de condiciones isosmóticas.....	49
12. Viabilidad espermática en hiperosmolaridad e isosmolaridad.....	49
13. Espermatozoides con acrosoma intacto en hiperosmolaridad e isosmolaridad.....	62
14. Fotografías de espermatozoides teñidos con SYBR-14/PI.....	66
15. Viabilidad en semen fresco, en hiperosmolaridad, en isosmolaridad y al descongelado.....	67
16. Fotografías de espermatozoides teñidos con PSA-FITC.....	68
17. Espermatozoides con acrosoma intacto en semen fresco, hiperosmolaridad, isosmolaridad y al descongelado.....	69
18. Motilidad progresiva en el semen fresco y al descongelado.....	70
19. Motilidad progresiva en el semen fresco y al descongelado por individuo....	71
20. Espermatozoides mostrando los patrones de fluorescencia.....	71

21. Estado fisiológico de los espermatozoides en semen fresco determinado por CTC.	72
22. Estado fisiológico de los espermatozoides en semen descongelado determinado por CTC	73
23. Espermatozoides capacitados en semen fresco y al descongelado.....	74
24. Congelación entre acrosomas intactos en hiperosmolaridad y al descongelado.....	76
25. Correlación entre acrosomas intactos en isosmolaridad y al descongelado..	76
26. Correlación entre motilidad progresiva al descongelado y viabilidad al descongelado.....	76

RESUMEN

El uso del semen porcino congelado es limitado en comparación con el de otros mamíferos domésticos. Durante la congelación, las células se exponen a condiciones hiperosmóticas como resultado de la formación de hielo extracelular y de la concentración de solutos. Los verracos no se han seleccionado en base a la congelabilidad de su semen, ya que hay evidencias de variaciones individuales. La validación de una prueba anisomótica como medida de predicción de congelabilidad de semen, otorgaría la oportunidad de mejoramiento de la calidad del semen crioconservado a través de programas de reproducción selectiva.

Los objetivos de este trabajo fueron (1) Validar una prueba sencilla, exponiendo al espermatozoide a condiciones hiperosmóticas e hiposmóticas intentando simular el estrés osmótico de la congelación y descongelación y (2) Comparar y correlacionar los resultados de la prueba anisomótica y los resultados de la crioconservación.

En el primer experimento, los espermatozoides de 5 verracos (20 eyaculados) fueron expuestos a 300, 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg de soluciones hiperosmóticas a -5°C por 15 minutos; posteriormente los espermatozoides fueron expuestos a una serie de soluciones hiposmóticas por 15 minutos a 37°C para restaurar la isosmolaridad. La proporción de viabilidad espermática (SYBR-14/PI) disminuyó significativamente a medida que la osmolaridad aumentaba ($P < 0.0001$); observándose un aumento en la disminución posterior a la restauración de las condiciones de isosmolaridad ($P < 0.0001$). En contraste, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (PSA-FITC) no presentó cambios al incremento en la osmolaridad pero disminuyó significativamente cuando la isosmolaridad fue restaurada ($P < 0.002$); el valor de mayor diferencia producida por los tratamientos se observó a 2100 mOsm/Kg, seleccionándose éste valor para llevar a cabo en paralelo la congelación-descongelación de semen.

En el segundo experimento, los espermatozoides (alícuotas) de seis verracos (30 eyaculados) fueron sometidos a la prueba anisomótica y en forma paralela a un proceso de congelación-descongelación utilizando un protocolo estándar. La motilidad progresiva disminuyó de 74% en semen fresco a 45% al descongelado ($P < 0.0001$); la proporción de espermatozoides capacitados (CTC) aumentó de 15.9% en semen fresco a 73.3% al descongelado ($P < 0.0001$). No hubo diferencias estadísticas entre la viabilidad a la prueba hiperosmótica (36%) y al descongelado (35%) y entre los acrosomas intactos a la prueba hiperosmótica (80%) y al descongelado (80%). La viabilidad al descongelado fue correlacionada con la viabilidad a la prueba hiperosmótica ($r = 0.2022$, $p < 0.01$) y con la viabilidad a la prueba isosmótica ($r = 0.1221$, $p < 0.01$). De gran interés fueron las correlaciones observadas entre los acrosomas intactos al descongelado con los acrosomas intactos a la prueba hiperosmótica ($r = 0.8062$, $p < 0.01$) y con los acrosomas intactos a la prueba isosmótica ($r = 0.9012$, $p < 0.01$), así como la viabilidad al descongelado con la motilidad al descongelado ($r = 0.6561$, $p < 0.01$). La exposición del espermatozoide porcino a condiciones anisomóticas produce daño cuantificable a la membrana plasmática y acrosomal. Es posible el uso de una prueba anisomótica como parámetro de predicción de la calidad del semen porcino al descongelado utilizando un protocolo estándar de congelación, sin embargo, es de gran importancia tomar en cuenta la variabilidad individual (“buenos, promedio y malos congeladores”) y otros factores no directamente relacionados a los cambios osmóticos que tengan influencia sobre la supervivencia del espermatozoide porcino al descongelado.

Palabras clave: espermatozoide porcino, crioconservación de semen porcino, estrés osmótico, SYBR-14/PI, PSA-FITC, CTC.

ABSTRACT

The use of frozen boar spermatozoa has been limited compared to other domestic mammals. During freezing, cells are exposed to hyperosmotic conditions resulting from extracellular ice formation and solute concentration. Commercial studs boars are not selected on the basis of semen freezability; there is an evidence of individual variability. The validation of an anisosmotic test as a predictive measure of semen freezability will provide an opportunity to improve quality of cryopreserved semen through selective breeding programs.

The objectives of this work were: (1) To validate a simple test, exposing spermatozoa to hyper- and hypo-osmotic conditions that intended to simulate osmotic stress during freeze-thawing and (2) To compare and correlate results from that anisosmotic test and those from sperm cryosurvival.

In the first experiment, spermatozoa from 5 boars (20 ejaculates) were exposed to 300, 900, 1500 and 2100 mOsm/Kg of hyper-osmotic solutions (BF5 standard freezing medium plus glucose) at -5°C for 15 minutes; spermatozoa were then rewarmed to 37°C and exposed to a series of suitable hypo-osmotic solutions for 15 minutes to restore isosmolarity; the proportion of viability (SYBR-14/PI) significantly decreased as osmolarity increased ($P < 0.0001$); a further decrease was observed when isotonicity was restored ($P < 0.0001$). In contrast, percentage of acrosoma-intact cells (PSA-FITC) did not change as osmolarity increased but it decreased significantly when isosmolarity was restored ($P < 0.002$). The biggest numeric change produced by the treatments was observed at 2100 mOsm/Kg, thus this value was selected to be performed in parallel to freeze-thawing.

In the second experiment, spermatozoa (aliquots) from 6 boars (30 ejaculates) were exposed to the anisosmotic test and subsequently frozen-thawed using a standard technique; sperm motility decreased from 74% in fresh semen to 45% after thawing ($P < 0.0001$); proportion of capacitated spermatozoa (CTC) increased from 15.9% in fresh semen to 73.3% after thawing ($P < 0.0001$). There were no statistical differences between viability at hyper-osmotic test (36%) and that after freeze-thawing (35%) and between intact acrosomes at hyper-osmotic test (80.2%) and that after freeze-thawing (80%) as group. Viability after freeze-thawing was correlated with viability at hyper-osmotic test ($r = 0.2022$, $p < 0.01$) and viability at isosmotic test ($r = 0.1221$, $p < 0.01$). The most interesting of these correlations were those established between intact acrosomes after freeze-thawing with intact acrosomes at hyper-osmotic test ($r = 0.8062$, $p < 0.01$) and with intact acrosomes at isosmotic test ($r = 0.9012$, $p < 0.01$), whereas viability after freeze-thawing was correlated with motility after freeze-thawing ($r = 0.6561$, $p < 0.01$).

Exposition of pig spermatozoa to anisosmotic conditions produced measurable damage to both plasma and acrosome membrane. It is possible the usefulness of an anisosmotic test as a predicting parameter of the quality of frozen-thawed boar semen using a standard protocol of freezing, however it is important the individual variability (“good, average and poor freezers”) and other factors not directly related to osmotic changes that influenced the survival rate of boar spermatozoa after freeze-thawing.

Keywords: boar sperm, boar sperm cryopreservation, osmotic stress, SYBR-14/PI, PSA-FITC, CTC.

1. INTRODUCCIÓN

Los primeros intentos de inseminación artificial (IA) en la especie porcina, fueron realizados entre 1926 y 1927 por Ivanov y fueron continuados entre 1930 y 1936 por Milanov. La utilización de semen conservado para inseminación artificial se ha triplicado en la industria porcina en los pasados 15 años, más del 99% de las 19 millones de inseminaciones que se llevan a cabo en el mundo se realizan con semen que se conserva en estado líquido y es utilizado el mismo día o es almacenado entre 15 y 20 °C de 1 a 5 días. El 85% de todas las inseminaciones se llevan a cabo el día de la colección o al día siguiente. El semen porcino congelado ha estado disponible comercialmente desde 1975 en forma de pellets o en pajillas; sin embargo, menos del 1% de todas las inseminaciones se realizan con semen que ha sufrido el proceso de congelación-descongelación (Johnson *et al.*, 2000)

Para llevar a cabo la conservación de espermatozoides en el siglo 20 se han utilizado principalmente dos sistemas de tecnologías de almacenamiento, almacenamiento líquido y almacenamiento congelado. La principal ventaja de la utilización de semen líquido no congelado, es el mantenimiento de la fertilidad con un bajo número de espermatozoides; debido a que el espermatozoide porcino es sensible al choque frío, usualmente es mantenido entre 15-20°C (Yoshida, 2000).

En 1970 nacieron los primeros lechones a partir de espermatozoides crioconservados tras la inseminación quirúrgica por laparotomía por Polge y colaboradores; en 1971, tres equipos de investigación en E. U. obtuvieron las primeras camadas de lechones con espermatozoides crioconservados tras inseminación artificial tradicional; en 1975, se establecieron los primeros protocolos de criopreservación específicos para espermatozoides de porcino, en Alemania el Método Hülsenber de Westendorf y en Estados Unidos de Norteamérica el método Beltsville de Pursel y Johnson. La inseminación artificial se realiza en su mayoría con semen fresco o refrigerado, lo cual limita las enormes posibilidades de dicha técnica (Bonet *et al.*, 2006).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Criobiología

El metabolismo biológico de las células vivas disminuye dramáticamente a temperaturas bajas, este hecho permite la preservación a largo plazo de células y tejidos para investigación científica, así como para aplicaciones médicas como la transfusión sanguínea, trasplante de médula ósea, inseminación artificial y fertilización *in vitro*. La criobiología es una ciencia multidisciplinaria que estudia el comportamiento físico y biológico de células y tejidos (incluyendo sus interacciones con el ambiente) a bajas temperaturas (especialmente por debajo del punto de congelación del agua, 0°C). (Gao y Critser, 2000).

Los objetivos principales de la criobiología son la comprensión de la biofísica de los efectos de la baja temperatura sobre los sistemas celulares y la utilización de este conocimiento para el desarrollo de protocolos mejorados. La concentración extracelular de solutos, la constitución de solutos permeables y no permeables y la tasa del cambio de temperatura (a la congelación y descongelación), son los tres parámetros disponibles para el control que dan a los criobiólogos poderosas herramientas para regular las condiciones fisicoquímicas del medio intracelular y extracelular, permitiendo al investigador el desarrollo de protocolos optimizados para crioconservar tipos celulares específicos (Woods *et al.*, 2004)

Un problema importante de la criobiología es la variabilidad en el éxito de los protocolos de congelación no solo en los diferentes tipos celulares, sino también en los mismos tipos celulares de diferentes especies, por lo que es necesario a través de las ramificaciones criobiológicas el entendimiento de los sucesos del enfriamiento de una célula por debajo de temperaturas fisiológicas. Las predicciones teóricas y los resultados empíricos, sugieren que para las tasas de congelación y la concentración de solutos existe una curva en forma de “U” invertida (Figura 1), misma que puede ser optimizada (Gao y Critser, 2000).

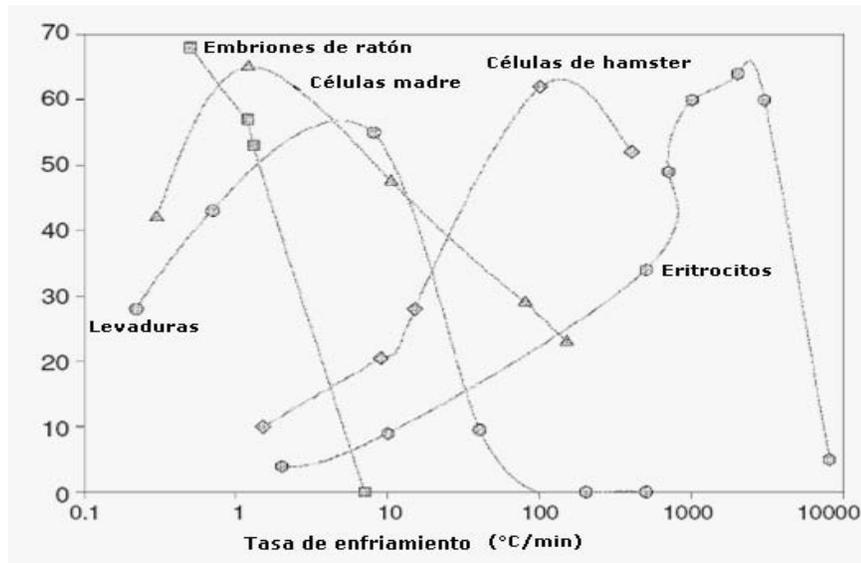


Figura 1. Criosupervivencia de diferentes tipos celulares a diferentes tasas de enfriamiento (Tomada y modificada de Gao y Critser, 2000).

La mayoría de la investigación en criobiología se ha enfocado en la conservación de varios tipos de células somáticas, como eritrocitos o líneas celulares en cultivo, las cuales responden a las fluctuaciones osmóticas asociadas a la congelación y descongelación, mediante cambios de volumen en formas que pueden seguir modelos matemáticos; esto ha dado como consecuencia el desarrollo de teorías criobiológicas que han sido exitosas en la predicción de tasas óptimas de congelación y descongelación para una variedad de tipos celulares. Sin embargo al aplicar los mismos principios teóricos al espermatozoide de mamíferos, se han obtenido resultados menos exitosos, posiblemente debido a la elaborada diferenciación morfológica y extensiva heterogeneidad de membrana mostrada por las células espermáticas (Holt *et al.*, 2005)

No es sorprendente que los espermatozoides y los eritrocitos se comporten de forma diferente durante el enfriamiento, ya que el espermatozoide tiene una subestructura más compleja y rígida que contiene un núcleo condensado en la región de la cabeza, mitocondrias y componentes móviles en el flagelo, además del poco citoplasma y el contenido relativamente bajo de agua intracelular (Watson y Duncan, 1988).

El espermatozoide es una célula altamente polarizada y especializada, con una estructura tripartita conformada por cabeza, pieza media y cola. La cabeza espermática puede ser subdividida en cuatro regiones: la región apical, la región pre-ecuatorial, la

región ecuatorial y la región post-ecuatorial (Figura 2) (Flesch y Gadella, 2000).

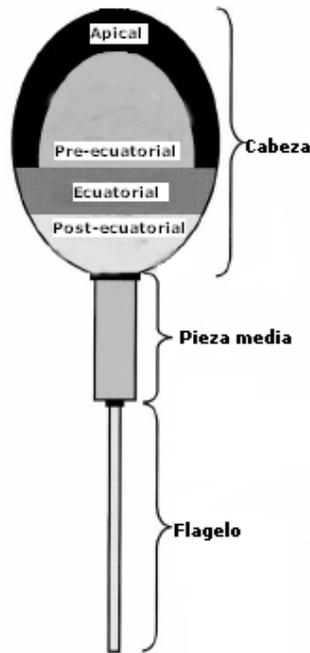


Figura 2. Estructura tripartita del espermatozoide (Tomada y modificada de Flesch y Gadella, 2000).

El espermatozoide ha perdido la capacidad de biosíntesis, reparación, crecimiento y división celular durante la fase final de la espermatogénesis. La conservación espermática generalmente requiere una disminución o interrupción del metabolismo espermático, lo que conduce a la prolongación de su vida (Yoshida, 2000).

Aunque la supervivencia del espermatozoide criopreservado no excede los 50 años, se ha estimado que los especímenes biológicos criopreservados en nitrógeno líquido, pueden permanecer viables por más de 3000 años debido a la ausencia de reacciones térmicas a -196°C . El uso extensivo de espermatozoides congelados encamina las investigaciones al mejoramiento de la criopreservación espermática, con el objetivo principal de la obtención de gestaciones mediante la aplicación de la inseminación artificial de forma tan efectiva como las obtenidas con el servicio natural (Yoshida, 2000).

2.2 La membrana plasmática y la respuesta celular a las bajas temperaturas

La membrana plasmática cubre la célula espermática en su totalidad manteniendo unidos sus organelos y los componentes intracelulares, debido a sus características semi-permeables mantiene el gradiente químico de iones y otros componentes solubles (Silva y Gadella, 2006).

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y se conforma de cinco dominios específicos: el dominio del acrosoma, el dominio del segmento ecuatorial, el dominio de la pieza media, el dominio de la pieza principal, y el dominio de la pieza final. Las diferencias entre estas regiones están relacionadas a sus diferentes funciones fisiológicas (Aurich, 2005).

La viabilidad celular asociada a los procesos de crioconservación depende casi exclusivamente de la integridad de la membrana plasmática; los procesos de congelación y descongelación producen un movimiento de solutos y de moléculas de agua a través de las membranas celulares lo que puede superar las resistencias físicas de éstas; en este sentido, la mayoría de los procesos de transporte a través de la membrana dependen de la fluidez de ésta, que a su vez depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos y de la temperatura (Rodríguez, 2005).

Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o en uno más flexible y relativamente ordenado (fluido); la transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, del cual, al promedio se le conoce como temperatura de transición de fase (Melting Temperature, T_m) (Alberts *et al.*, 2002).

Esta T_m será mayor o menor dependiendo de la composición de los ácidos grasos que componen las membranas (el grupo polar, la longitud del grupo acilo y la saturación de la cadena), la mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su T_m entre los 0°C y los 20°C (Hays *et al.*, 2001).

La transición de fase de una membrana plasmática no se da simultáneamente en todos sus fosfolípidos y por tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado sólido rígido durante la transición de fase; esta situación produce

defectos en el empaquetamiento de la membrana y está asociado a una mayor permeabilidad de solutos a través de la membrana (Watson, 2000).

Así, se ha demostrado que al alcanzar la T_m en una bicapa determinada, se produce la mayor pérdida de solutos a través de la membrana; alternativamente, se ha propuesto que la pérdida de fosfolípidos de membrana durante la deshidratación celular, que tiene lugar en el proceso de congelación, es un mecanismo mediante el cual la membrana plasmática pierde capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas, comprometiendo en ese momento la integridad de membrana. Por último, las bajas temperaturas asociadas al aumento de la rigidez de membrana y la rapidez (décimas de segundo) a la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hace muy difícil el movimiento a través de la membrana mediante procesos de transporte activo dependientes de ATP, ya que la disminución de temperatura de 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP, además de la difusión facilitada o el cotransporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H⁺); en consecuencia los procesos de difusión y osmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico asociados a la congelación-descongelación y adicionalmente, los que conducirán el movimiento de agua a través de la membrana y su integridad (Rodríguez, 2005).

La membrana plasmática del espermatozoide es única entre especies con respecto a la composición fosfolipídica (aproximadamente 70% fosfolípidos, 25% lípidos neutrales y 5% glicolípidos); la variación entre especies en cuanto a la susceptibilidad al choque frío parece estar correlacionada con la composición lipídica de la membrana; la resistencia al choque frío es generalmente mayor para especies con membranas espermáticas caracterizadas por una mayor proporción de esteroides y fosfolípidos y una mayor saturación con grupos acil enlazados a los fosfolípidos (Flesh y Gadella, 2000).

Las membranas plasmáticas responden a los cambios de temperatura con transiciones de fase lipídicas, de modo que las fases de líquido y gel pueden coexistir, los espermatozoides de la mayoría de las especies de mamífero sufren transiciones de fase lipídica termotrópica en un rango de temperatura de 17-36°C. Se ha observado que el espermatozoide porcino sufre una transición de fase más abrupta en

comparación con el espermatozoide humano, el cual mostró una transición menor, lo que indica que el espermatozoide porcino responde al choque frío mostrando un comportamiento de transición de fase distinto (Crowe *et al.*, 1989; Parks y Lynch, 1992; Drobnis *et al.*, 1993).

Es bien conocido que el enfriamiento muy rápido del semen de ungulados entre, 30°C y 0°C, induce un estrés letal en algunas células proporcional a la tasa de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura; este fenómeno conocido como choque frío, también afecta de forma variable a otras especies, como resultado del enfriamiento en este rango, previo a la crioconservación, es cuidadosamente llevado a cabo (Watson, 2000).

El semen porcino difiere del semen de otras especies en varios aspectos: es producido en volúmenes grandes y es extremadamente sensible al choque frío o al enfriamiento repentino inmediato a la colección (Johnson *et al.*, 2000).

Se sabe que el espermatozoide porcino es muy susceptible al choque frío, mismo que se cree podría estar relacionado a la composición lipídica de la bicapa, afectando la fluidez de la membrana plasmática. Conforme la temperatura desciende, se restringe el movimiento lateral de los fosfolípidos lo que provoca una transición de fase de fluido a gel. Debido a las diferentes temperaturas de transición para los diferentes lípidos de membrana, la separación de fase puede presentarse, por lo que las proteínas se agruparían irreversiblemente (De Leeuw *et al.*, 1990).

Debido a que la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos determina el comportamiento de fase, las diferencias más notables en fosfolípidos entre el espermatozoide de verraco y el de toro, son el porcentaje más bajo de fosfatidilcolina y más alto de fosfatidiletanolamina y esfingomiélin en el espermatozoide porcino, dificultando la medición de la estabilidad de las membranas espermáticas porcinas en la base de diferencias en la composición fosfolipídica (Johnson *et al.*, 2000).

Otro factor que tiene influencia sobre el comportamiento térmico de las membranas es el porcentaje de colesterol, la proporción de colesterol/fosfolípidos en el espermatozoide porcino es muy bajo y como se encuentra distribuido asimétricamente,

se encuentra en mayores cantidades en la monocapa externa de la membrana. Esta combinación podría hacer a la monocapa interna especialmente vulnerable al choque frío. La reorganización de las partículas de la membrana inducida por el frío, aunque parcialmente reversible, podría influenciar la función de la membrana en varias formas, incluyendo un incremento de la permeabilidad (pérdida de cationes y enzimas), la reducción en la actividad enzimática, la difusión controlada de membrana y cambios en el movimiento lateral de canales (De Leeuw *et al.*, 1990).

En todos los tipos celulares de mamíferos estudiados, incluyendo al espermatozoide, las dos monocapas de la membrana plasmática difieren en la composición fosfolipídica, la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) están concentradas en la monocapa interna; mientras que, la esfingomielina (SM) y fosfatidilcolina (PC) están concentradas en la monocapa externa (Gadella *et al.*, 2000).

Estudios más recientes han mostrado que bajo condiciones normales, la distribución es mantenida por la actividad combinada de varias transferasas fosfolipídicas: una transferasa aminofosfolipídica (flipasa) que mueve PS y PE de la monocapa externa a la monocapa interna, una transferasa fosfolipídica no específica (flopasa) que transfiere fosfolípidos de la monocapa interna a la externa y una transportadora bidireccional (escramblasa) que mueve los cuatro fosfolípidos en ambas direcciones a través de la bicapa (Harrison y Gadella, 2005)

En adición, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura, el enfriamiento de otros tipos celulares provoca una despolimerización prematura de los filamentos de actina. Se ha postulado que la despolimerización de F-actina del citoesqueleto es un paso necesario que permite la aproximación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa promoviendo la exocitosis acrosomal; tal vez, también esto podría contribuir a la fusión desorganizada de membranas después del enfriamiento o la crioconservación (Watson, 2000).

La sensibilidad espermática al choque frío varía entre especies, los espermatozoides del toro, del carnero, del cerdo y del equino son altamente sensibles; los espermatozoides del perro y del gato son moderadamente sensibles; y los espermatozoides del humano y del conejo son relativamente resistentes. Esto es

también un ejemplo importante de las diferencias en la criobiología fundamental de los tipos celulares entre especies, resaltando el hecho de que las modificaciones simples en el desarrollo de los procedimientos de crioconservación espermática de ciertos animales domésticos, probablemente no logren los resultados óptimos observados en otras especies (Gao y Critser, 2000).

2.3 Congelación

Las células crioconservadas se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido; a esta temperatura no existen fenómenos de difusión, ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación. Contrario a lo esperado, el reto de las células durante la crioconservación no radica en su habilidad para soportar el almacenamiento a bajas temperaturas, sino en la letalidad de una zona intermedia de temperatura (-15 a $\sim 0^{\circ}\text{C}$) la cual deben cruzar en dos ocasiones, una durante el enfriamiento y otra durante el calentamiento (Mazur, 1963).

Durante el proceso de congelación se producen diversos cambios fisicoquímicos en el espacio extracelular, las células responden a estos cambios actuando como osmómetros (se hidratan y deshidratan). Los principales eventos a nivel celular que tienen lugar durante el proceso de congelación se resumen a continuación: durante el proceso de enfriamiento, entre los 4°C y los -10°C , las células son sometidas a temperaturas menores que las de congelación de la solución que las rodea, pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar (sobreenfriados), presumiblemente debido a que la membrana celular bloquea el crecimiento de cristales de hielo en el citoplasma; este es un estado metaestable y el momento de la aparición de hielo (entre los -10°C y los -20°C) depende de la probabilidad de la formación de centros de nucleación a partir de los que crecerán los cristales de hielo; a medida que la temperatura disminuye los cristales crecen en forma de frentes de congelación, entre los que las células se sitúan en canales de solución líquida que progresivamente aumentan su viscosidad a medida que el agua líquida pasa a formar parte de la fracción congelada (Rodríguez, 2005).

El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular, que simplificando, está formada de agua y solutos, al producirse la cristalización, las moléculas de agua se incorporan al hielo, mientras que el soluto queda excluido de la base sólida; de esta manera el espacio extracelular se va concentrando progresivamente (se va haciendo cada vez más hipertónico) a la vez que el potencial químico del agua (en el espacio extracelular) decrece. Este cambio de potencial perturba el equilibrio termodinámico entre los espacios intra y extracelular produciendo una salida de agua de las células que intenta revertir el desequilibrio; en consecuencia, las células se deshidratan progresivamente a medida que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo el agua que sale de las células se congela en el exterior, así las concentraciones de sales aumentan pudiendo ser tóxicas. Los eventos físicos subsecuentes dependen de la tasa de enfriamiento (Gao y Critser, 2000).

2.4 Descongelación

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación; así que, cuando el agua congelada cambia de estado (sólido a líquido), la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y las células vuelven a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular (Gao y Critser, 2000).

2.5 Lesiones crioaducidas

Existen diferentes teorías sobre los mecanismos de daño celular durante la congelación de células vivas. Los más evidentes y demostrados empíricamente son aquellos producidos por la formación de hielo y los relacionados a la deshidratación celular (estrés osmótico) que tiene lugar durante el proceso de congelación. El daño celular directo inducido por la congelación, se ha explicado con la hipótesis de “los dos factores”, la cual sugiere dos diferentes factores dependientes de la tasa de enfriamiento: 1) la formación de hielo intracelular (IIF) a tasas rápidas y 2) “efectos de solución” a tasa lentas (Figura 3) (Mazur *et al.*, 1972).

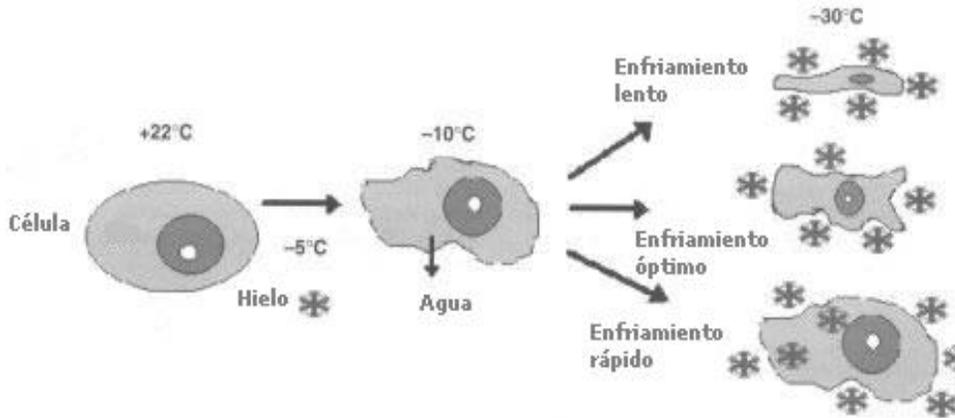


Figura 3. Representación esquemática de eventos físicos celulares durante el enfriamiento (Tomada y modificada de Gao y Critser, 2000).

Estos factores son posibles eventos que pueden causar daños celulares como resultado de la concentración de los solutos; se piensa que el daño es provocado por la concentración de solutos intra y extracelular (Acker y McGann, 2003), así como por efectos de contracción de área y efectos volumétricos (Zawlodzka y Takamatsu, 2005).

Tanto la formación de hielo intracelular y la exposición prolongada a concentraciones elevadas de solutos son letales para las células, esto significa que las tasas de enfriamiento muy rápidas o muy lentas pueden provocar la muerte celular, por lo tanto, una tasa de enfriamiento óptima podría existir entre la tasa rápida y la tasa lenta (Figura 4) (Devireddy *et al.*, 1999).

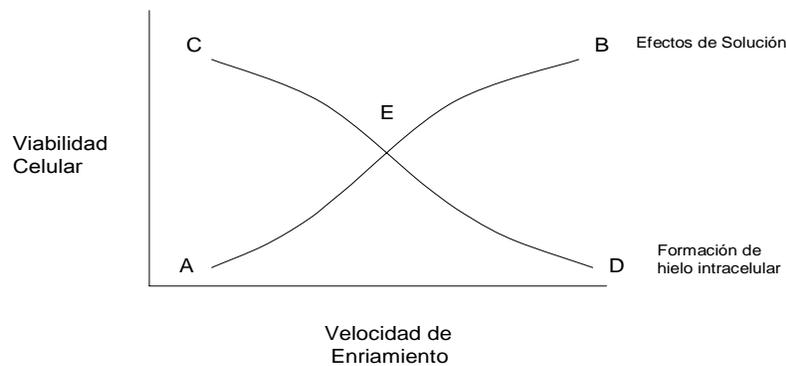


Figura 4. Representación de la influencia de dos mecanismos letales sobre la criosupervivencia (Tomada de Watson, 1996).

2.6 Formación de hielo

La presencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (descenso crioscópico) y en consecuencia la cristalización del agua se produce a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura (Mazur, 1963); este fenómeno produce, al disminuir la temperatura, un sobreenfriamiento intracelular por lo que el citoplasma puede enfriarse varios grados y el agua en la célula puede disminuir a más de 0°C y permanecer sin congelarse. El grado de sobreenfriamiento depende de varios factores incluyendo la presencia de nucleadores de hielo, mismos que no se encuentran a nivel intracelular (Mazur, 1963).

En una solución sobreenfriada la formación de hielo depende de la probabilidad de formación de un punto de nucleación (punto de inicio de un frente de cristales de hielo), que es inversamente proporcional a la temperatura. La nucleación se puede dar al azar (nucleación homogénea) o mediante una inducción externa (nucleación heterogénea) (Karlsson y Toner, 1996)

El cambio de estado en el agua (líquido a sólido) libera energía en forma de calor latente de solidificación que debe ser contrarrestado para evitar fluctuaciones de temperatura sobre las membranas celulares. Así, el hielo se forma a partir de un punto de nucleación donde se inicia la transición de fase (agua-hielo) y al que se van añadiendo moléculas de agua que hacen crecer el cristal de hielo. El crecimiento de cristales de hielo durante el descenso de temperaturas podría ejercer un daño mecánico sobre las membranas celulares causando lesiones irreversibles que conducirían a la muerte celular, ya que los cristales de hielo se pueden formar en el exterior y el interior de la célula (Rodríguez, 2005).

2.6.1 Formación de hielo intracelular

En el momento en el que se inicia la nucleación y el posterior crecimiento de los cristales de hielo en el espacio extracelular, se produce una disminución de la proporción de agua extracelular en estado líquido lo que provoca la salida neta de agua intracelular para equilibrar el potencial químico del agua a ambos lados de la

membrana; en este momento, lo que suceda en el espacio intracelular depende básicamente de la velocidad de enfriado; si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular, éste puede alcanzar un tamaño mayor o menor dependiendo de la velocidad de enfriamiento, en general, cuanto más rápida es la congelación más pequeños serán los cristales (Rodríguez, 2005)

Por el contrario, si la velocidad de enfriado es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (daño osmótico). Con una velocidad de enfriado adecuada, la célula se deshidratará antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y el consecuente daño celular se minimizará (Devireddy *et al.*, 1999).

El hielo y el agua interactúan de forma diferente sobre las superficies de las membranas y macromoléculas, lo cual es de gran importancia debido a que estas interacciones (vía tensión superficial del agua o efecto hidrofóbico) también están involucradas en el mantenimiento del estado de la estructura celular interna o ultraestructura (Wolfe y Bryant, 2001).

2.6.2 Formación de hielo extracelular

Se ha demostrado que en eritrocitos humanos la formación de hielo extracelular no es una causa de lesión, debido a que las células criocervadas se mantienen en canales de solución no congelada mientras crecen los cristales de hielo en la solución extracelular superenfriada, cuando la temperatura del medio alcanza los -130°C , el agua no se encuentra en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se encuentran en un estado vítreo (con una alta viscosidad) y sin cristalización, un estado en el que los fenómenos de difusión de las reacciones bioquímicas no son posibles (Rodríguez, 2005).

Sin embargo, observaciones realizadas en trabajos hechos con espermatozoides mediante la utilización de criomicroscopia de fluorescencia, mostraron que los

espermatozoides pueden extenderse a través de los canales, exponiéndose así a altas y bajas concentraciones de solutos simultáneamente (Holt, 2000b), en adición, otros trabajos han demostrado que los espermatozoides pueden estar en contacto directo con el hielo extracelular y por lo tanto sufrir daño (Morris *et al.*, 1999).

2.7 Efecto soluto y estrés osmótico

La mayoría de los investigadores coinciden en que la formación de hielo intracelular es letal, y se cree que es el mecanismo más importante de daño; sin embargo, el daño por efectos de solución no está completamente entendido (Han y Bischof, 2004).

La criopreservación expone a los espermatozoides a variaciones extremas en temperatura y osmolaridad; la cristalización de hielo extracelular provoca un incremento en la concentración de solutos a los que la célula responde con la pérdida de agua y disminución del volumen, para equilibrar las concentraciones de solutos entre los compartimentos intra y extracelular. (Holt y North, 1994; Watson, 1995).

De forma inversa, cuando las células son expuestas al ambiente extracelular hipotónico, como sucede en el caso de la descongelación, el volumen celular es aumentado por difusión pasiva de agua en balance con las Na^+/K^+ ATPasas asociadas a la membrana. Por ello la resistencia celular a la anisomolaridad es esencial para prevenir la lisis y muerte celular; la capacidad del espermatozoide para responder al cambio del volumen celular está determinado por varios factores incluyendo composición fosfolipídica, permeabilidad al agua, temperatura de transición de fase lipídica, actividad Na^+/K^+ ATPasa, canales de agua y canales iónicos (Meyers, 2005).

Por otra parte la tasa a la cual se lleva a cabo la regulación del volumen osmótico, es altamente dependiente de la conductibilidad hidráulica celular, es decir, la permeabilidad al agua (L_p). El espermatozoide de los mamíferos generalmente muestra una alta conductibilidad hidráulica L_p en relación a las células somáticas. En el espermatozoide porcino la permeabilidad al agua ha mostrado ser dependiente de temperatura, del crioprotector, y formación de cristales de hielo, además de que también se ha mostrado la evidencia de que la permeabilidad de la membrana

plasmática del espermatozoide es regionalmente variable (Watson *et al.*, 1992; Noiles *et al.*, 1993; Gilmore *et al.*, 1996).

Sin embargo, la optimización empírica de los protocolos de congelación ha hecho poco para explicar las causas actuales de criodañó durante el ciclo de congelación y descongelación; uno de los factores más importantes durante la crioconservación es el estrés osmótico de las células; el cual también se asocia a la adición y a la eliminación de crioprotectores como el glicerol (Hammerstedt, 1990).

Estos cambios osmóticos pueden ocurrir gradual o rápidamente dependiendo de la tasa de enfriamiento, si es o no inducida la nucleación de hielo y por el método de adición del crioprotector, lo que involucra la confusión dos factores de estrés: (i) la osmolaridad final alcanzada por las células y (ii) la diferencia osmótica entre la osmolaridad intra y extracelular; ambas junto con la conductibilidad hidráulica, gobiernan la tasa a la cual el agua se mueve dentro o fuera de las células; es posible separar los efectos de estos dos factores mediante la exposición de las células a diferentes osmolaridades en un simple paso o una serie de pasos de tal forma que diferentes osmolaridades finales puedan ser alcanzadas mientras las células sólo experimentan una pequeña y controlada diferencia osmótica a través de sus membranas (Curry y Watson, 1994).

El estrés osmótico es un mecanismo importante involucrado en la resistencia espermática a la congelación y descongelación. El criodañó celular a menudo está relacionado con los cambios mayores de la presión osmótica (π) producida durante el proceso de congelación y descongelación. Estos cambios inducirán alteraciones en el volumen de agua intracelular y en el estado físico de esta misma agua (Mazur, 1984; Caiza de la Cueva *et al.*, 1997).

En cuanto a la transducción de señales, cuando las células espermáticas son expuestas a cambios en las condiciones osmóticas aparecen eventos que tienen influencia sobre la capacidad celular para mantener los procesos de señalización, lo que podría ser una consecuencia de criodañó importante (Meyers, 2005).

Cuando una suspensión celular es enfriada, los solutos extracelulares (solutos iónicos, no iónicos y los agentes crioprotectores, CPA's) se concentran progresivamente

conforme avanza el enfriamiento y el agua se precipita como hielo; esto crea un ambiente hiperosmótico para las células, el cual puede causar: 1) cambios en el pH conforme las sales alcanzan sus solubilidades (Fishbein y Winkert, 1978), 2) aumentan la deshidratación celular provocando una interposición de estructuras intracelulares (Levitt, 1962), y 3) debilitan los complejos proteína-lípidos en la membrana celular incrementando la pérdida de fosfolípidos (Gao y Critser, 2000). Las altas concentraciones de solutos afectan las interacciones eléctricas o iónicas, incluyendo las que estabilizan el estado nativo de las enzimas; a menudo el desplegamiento y desnaturalización de las enzimas es irreversible (Wolfe y Bryant, 2001)

Todos estos son mecanismos potenciales que pueden afectar la viabilidad celular; estos posibles efectos que pueden causar daños celulares como resultado de la concentración de los solutos han sido caracterizados por Mazur *et al.* (1972) como "efectos de solución". Estos autores sugirieron que los efectos de una solución en las células son en gran medida intensificados por un proceso de enfriado lento, durante el cual el tiempo de exposición de las células a la solución concentrada es prolongado. En adición a los "efectos de solución" en las células durante el enfriado y descongelado, se ha notado que el cambio en el ambiente osmótico de las células que puede causar daño es inducido por la adición de CPA's a las células antes del enfriado y la subsiguiente remoción de ellos de las células después de la descongelación (Critser *et al.*, 1988).

"La cristalización eutéctica" se define como la solidificación simultánea de la fracción no congelada (por ejemplo, agua y solutos) en sólidos (por ejemplo, hidratos) que se ha estudiado muy poco en los sistemas biológicos; el comportamiento de cambio de fase durante el enfriado y calentamiento es muy diferente comparándolo con el agua pura, incluyendo depresión del punto de congelación, incremento de la concentración de solutos en la fracción no congelada y la existencia de un cambio de fase eutéctico. La cristalización eutéctica es una solidificación cinética similar a la cristalización de hielo, la cual implica nucleación y crecimiento de hielo, agregando un daño adicional por congelación, asociado a la formación eutéctica, el cual no se ha incluido en los tradicionales "efectos de solución" o "formación de hielo intracelular" (IIF) (Gao y Critser, 2000).

Debido a que la formación eutéctica está asociada al cambio de fase agua-soluto, se ha sugerido que este efecto puede ser considerado como parte adicional del daño por efectos de solución. Cuando las suspensiones celulares son congeladas a tasas lentas, el hielo se forma en el espacio extracelular, conforme continua el enfriamiento, las células se deshidratan debido a la alta concentración de la fracción no congelada, cuando la concentración y temperatura de la solución extracelular son suficientes para la cristalización eutéctica, la fracción no congelada en el espacio extracelular puede cristalizarse y formar la fase eutéctica. Esto puede causar daño mecánico directo a la membrana y/o propagarse al espacio intracelular cruzando la membrana a través de poros pre-existentes o formados por el daño mecánico (Han y Bischof, 2004).

El daño a tasas rápidas es atribuido a IIF, sin embargo se ha propuesto el daño a la membrana debido al flujo osmótico (Karlson y Toner, 1996). El daño por congelación a tasas de congelación subóptimas es atribuido a los efectos de solución y a las interacciones mecánicas con el hielo extracelular; el daño a tasas supraóptimas se piensa que se debe a la formación de hielo intracelular o ruptura osmótica (Karlsson y Toner, 1996).

Al comparar las fuerzas que se presentan durante la congelación con las fuerzas requeridas para romper membranas en circunstancias no relacionadas a temperaturas bajas (por ejemplo, succión con micropipetas) se comprobó que la presión provocada por el flujo de agua durante la congelación es suficiente para provocar la ruptura de la membrana plasmática (Muldew y McGann, 1994).

La adaptabilidad de células eucarióticas a los cambios en el ambiente osmótico depende en gran parte de la actividad de las proteínas de membrana involucradas en el transporte de iones; en el espermatozoide estas proteínas regulan estrictamente el ritmo de intercambio iónico, de esta manera regulan una amplia variedad de funciones celulares, que van desde la energía para la flexión del flagelo hasta la inducción de la reacción acrosomal posterior a la interacción espermatozoide-ovocito (Peris *et al.*, 2000).

Para prevenir el daño osmótico a las células durante la crioconservación, se necesita conocer la tolerancia osmótica de las células en función de: 1) tiempo, 2) temperatura,

3) tipo de solutos, y 4) concentración de solutos. La tolerancia osmótica varía entre tipos celulares y entre el tipo celular entre especies (Gao *et al.*, 1993).

El espermatozoide porcino tolera un rango relativo de osmolaridad entre 240 y 380 mOsm/kg; parece ser que un medio isotónico o ligeramente hipertónico ofrece una mejor conservación de la capacidad fertilizante, que los diluyentes hipertónicos (Johnson *et al.*, 2000).

El volumen celular es un factor de gran importancia para el funcionamiento normal, definición de la forma y el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de iones y de las moléculas esenciales; los cambios en el volumen celular no solo afectan la homeostasis, también ejercen estrés mecánico sobre la membrana plasmática lo cual puede afectar las condiciones óptimas para llevar a cabo las actividades de los complejos moleculares responsables de la transducción de señales (Yeung *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo el aumento o disminución de volumen provocado por la hipo- o hipertonicidad extracelular, se activan los procesos conocidos como disminución reguladora de volumen (RVD-regulatory volume decrease) o aumento regulador de volumen (RVI- regulatory volume increase) que activa el flujo de solutos al interior o exterior y conduce el movimiento de agua que ajusta el volumen celular (Wehner *et al.*, 2003).

El espermatozoide en maduración que se transporta a través del epidídimo, experimenta un incremento de la osmolaridad en el ambiente luminal; las células maduras son almacenadas en fluidos hiperosmóticos o fluidos similares a la osmolaridad sérica. La osmolaridad en los fluidos del lumen del epidídimo se incrementa a lo largo de éste hasta alcanzar cerca de 400 mOsm/Kg en el hámster y el ratón, son mantenidos a altos niveles de osmolaridad en la cola del epidídimo en donde son almacenados. Cuando el eyaculado es depositado en el tracto de la hembra, se somete a un cambio hiposmótico el cual inicia el proceso de RVD; al parecer, en este proceso de RVD fisiológico del espermatozoide se encuentran involucrados canales de K^+ y Cl^- así como solutos orgánicos, con mecanismos desarrollados durante la maduración epididimal; los defectos en el mecanismo de RVD provocan fallas en la

penetración del mucus en humano y fallas en el tránsito a través de la unión útero-tubal en el ratón (Yeung *et al.*, 2006).

La osmolaridad seminal es de alrededor de 300 mOsm: el porcino presenta un rango de 317-339 mOsm, el bovino 247-392 mOsm, el perro 312-322 mOsm, el humano 296-312 mOsm, el carnero 296-376, el equino 301 mOsm, para el gato y una amplia variedad de aves se ha reportado un valor de ~300 mOsm, y para el hurón de ~500 mOsm (Santymire *et al.*, 2006)

Trabajos realizados para evaluar y examinar los efectos de diferentes diluyentes de congelación hipertónicos sobre la criosupervivencia del espermatozoide porcino, demostraron que los espermatozoide congelados en diluyentes BF5 moderadamente hipertónicos (420 a 580 mOsm/Kg) obtuvieron los valores más altos en motilidad, motilidad progresiva, acrosomas intactos y viabilidad (Zeng *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que para llevar a cabo la regulación del volumen en el espermatozoide porcino es de gran importancia la red de microfilamentos, y al parecer los microtúbulos intactos no son necesarios para la regulación inducida del volumen, aunque si tienen influencia sobre la respuesta inicial en el espermatozoide en maduración y el volumen celular isotónico durante la capacitación (Petrunkina *et al.*, 2004).

2.8 Agentes crioprotectores

Se han probado diversos componentes para verificar su eficacia como crioprotectores espermáticos, pero siguiendo el ejemplo de Polge *et al.* (1949), la mayoría de los protocolos de crioconservación todavía favorecen al glicerol como crioprotector. En ciertos casos, otros crioprotectores posiblemente sean mejores, por ejemplo, el dimetil sulfóxido (DMSO) es preferido para la crioconservación de espermatozoides de elefante y conejo. La elección del crioprotector ha sido materia de ensayo y error, esto se debe en parte a que no existe una explicación completa y satisfactoria del mecanismo de acción de los crioprotectores (Holt, 2000a).

Los crioprotectores pueden ser clasificados en dos grupos con modos de acción diferentes, el glicerol junto con sustancias como el metanol, etilen glicol, 1,2-propanediol, butanediol, acetamida y DMSO pertenecen al grupo de compuestos permeables al citoplasma celular. Se ha propuesto que los efectos protectores del glicerol son mediados por sus propiedades coligativas, la depresión del punto de congelación y la consecuente baja de concentraciones de electrolitos en la fracción no congelada (Lovelock y Polge 1954).

Es evidente que el glicerol en alguna forma es citotóxico para el espermatozoide; entre especies hay diferencias sobre la capacidad de resistir la exposición al glicerol y por lo tanto en la interacción en forma compleja con las tasas de congelación empleadas y el grado de crioprotección otorgado. El espermatozoide porcino sufre baja en la fertilidad si la concentración de glicerol excede 3%, este efecto es causado por el aumento de daño acrosomal (Holt, 2000b).

Se ha identificado una proteína canal de agua, la acuaporina 7 (AQP7), la cual también facilita el transporte de glicerol en el estado de espermátida tardía en el testículo de rata, esta proteína podría proveer una ruta específica para la entrada del glicerol al espermatozoide (Curry, 2000).

Además del glicerol y otros crioprotectores permeables, se han identificado azúcares como la rafinosa y lactosa, polímeros como el polivinil pirrolidona (PVP) y componentes anfipáticos como la glicina, betaína, glutamina y prolina como crioprotectores potenciales que no pueden penetrar la célula (no permeables). Adicionalmente a los componentes crioprotectores, de forma rutinaria se incluye yema de huevo en los protocolos de crioconservación, de la cual, se sabe que ofrece protección contra el choque frío, un efecto de transición de fase lipídica. Varios investigadores han concluido que la adición de surfactantes a la yema de huevo mejora la motilidad espermática post-descongelación, la integridad acrosomal, la supervivencia y la fertilidad; la explicación más aceptada para éste efecto benéfico es que el detergente modifica las partículas de la yema de huevo, facilitando una interacción más eficiente con la membrana plasmática del espermatozoide (Pontbriand *et al.*, 1989).

En adición a la elección del crioprotector y varios aditivos potenciales, los diluyentes de semen deben ser preparados en un medio acuoso; algunas formulaciones comúnmente

usadas, especialmente las de alto contenido de azúcares, no contienen un amortiguador de pH incluso cuando los componentes como la yema de huevo pueden afectar el pH de la solución; se ha sugerido que las lipoproteínas de la yema de huevo actúan interactúan con los componentes de la membrana plasmática; además de que se ha demostrado que un tratamiento con detergente mejora la eficiencia crioprotectora de estas lipoproteínas. Muchos medios incluyen citrato de sodio, tris (tris(hidroximetil)aminometano) o amortiguadores zwitteriónicos como el TES (*N*-tris(hidroximetil) ácido sulfónico metil-2-aminoetano); el Tris titrado con TES (medio TEST) ha probado ser una elección particularmente exitosa para especies silvestres debido a su amplia aplicación. El diluyente BF5 (Pursel y Johnson, 1975) ampliamente usado para la congelación rutinaria de semen porcino contiene la combinación TEST (Holt, 2000b).

Cuando las células son expuestas a soluciones con crioprotectores, sufren una disminución de volumen en respuesta a una solución hiperosmótica extracelular, posteriormente retornando a un volumen ligeramente mayor que su volumen isosmótico inicial conforme los agentes crioprotectores entran a la célula junto con el flujo de agua para mantener su potencial químico (Agca *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que la estructura de empaquetamiento lipídico puede ser alterada por crioprotectores intramembranosos y puede ser un mecanismo por el cual la conductibilidad hidráulica y los procesos de transducción de señales pueden ser alterados durante el enfriamiento (Watson, 1995). Se ha observado que el espermatozoide humano tiene una baja conductibilidad hidráulica al glicerol, etilenglicol y DMSO en comparación con la reportada para el espermatozoide porcino (Gilmore, 1996).

Se ha sugerido que los agentes crioprotectores (CPAs) como el glicerol y el DMSO previenen la formación eutéctica de solutos; la baja concentración de electrolitos en soluciones fisiológicas y la presencia de CPAs hacen que la cristalización eutéctica durante la criopreservación de sistemas biológicos, sea sutil o no existente, ya que se ha demostrado que con la adición de varios CPAs en un sistema binario agua-NaCl desaparece la formación eutéctica, al igual que al ser adicionados en una mezcla más compleja como PBS (Han *et al.*, 2002).

2.9 Aspectos prácticos de la crioconservación de semen

El semen es colocado en pajillas (0.25 y 0.5 mL) para llevar a cabo la congelación y el almacenamiento, o es congelado como pellets en depresiones realizadas en hielo seco (CO₂ sólido). Las pajillas son congeladas en la fase de vapor sobre el nitrógeno líquido o en una máquina de congelación controlada. Los requerimientos prácticos de las técnicas de inseminación artificial tienen influencia considerable sobre la elección de la técnica; el espermatozoide bovino es envasado en pajillas de 0.25 mL y 0.5 mL que contienen un número conocido de espermatozoides (entre 10 y 30 millones), los cuales pueden ser inseminados directamente de la pajilla después de la descongelación. Por otro lado, el semen porcino tiene que ser congelado en cantidades más grandes y frecuentemente son preferidos pellets de aproximadamente 200 µl de volumen, éstos pueden ser almacenados en congelación en tubos de 10-15 mL, cada uno provee espermatozoides suficientes para una inseminación (Holt, 2000a).

Para cubrir el alto número de espermatozoides en las dosis de IA se han introducido pajillas más grandes (Weitze et al., 1991) y bolsas plásticas planas (Bwanga et al., 1991).

La descongelación de las pajillas usualmente se lleva a cabo por inmersión en agua caliente (37°C), ésta tiene sus propias ventajas basadas en la temperatura estandarizada y las combinaciones de tiempo que pueden ser usadas. En general, se considera que las tasas rápidas de calentamiento son apropiadas para una mejor recuperación espermática, ya que esto se ha atribuido a la reducción de la posibilidad de que pequeños cristales de hielo intracelular formados en algunas células durante el congelamiento puedan crecer durante un proceso de calentamiento lento (recristalización) (Holt, 2000a).

La restauración del equilibrio isosmótico es una causa significativa de daño a la membrana durante la crioconservación, por esto, mejores técnicas de manejo durante la descongelación probablemente eviten pérdida de la viabilidad; además de que tratamientos capaces de prevenir la reorganización molecular de la membrana durante la congelación probablemente inhibirán la subsiguiente permeabilización inducida por la descongelación (Holt y North, 1994).

2.10 Evaluación del semen

En los últimos 10 a 15 años se han desarrollado muchos métodos técnicos para la determinación de la función espermática, haciendo posible la combinación de técnicas para la medición simultánea de diferentes aspectos de funcionalidad (Holt, 2000a).

2.10.1 Motilidad

Aunque la motilidad es solo uno de los atributos de un espermatozoide fértil, continúa siendo el indicador más ampliamente usado de la función espermática; ya que se sabe que la motilidad se requiere para la colonización de la tuba uterina durante la fase de transporte espermático y para la fertilización normal. La motilidad es una manifestación de competencia estructural y funcional del espermatozoide, de tal manera que el porcentaje de motilidad progresiva usualmente está correlacionado positivamente con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal (Peña-Martínez, 2004).

2.10.2 Morfología

Las anomalías morfológicas del espermatozoide pueden ser clasificadas de acuerdo a la región afectada, como anomalías primarias se clasifican a las anomalías que representan aberraciones que se presentaron durante la espermatogénesis y como anomalías secundarias a las que ocurren durante la maduración espermática en el epidídimo o posterior a la eyaculación. (Peña-Martínez, 2004).

2.10.3 Viabilidad espermática

Los avances en la tecnología de las tinciones, han proporcionado nuevos medios para la medición de la capacidad funcional del espermatozoide. Se ha puesto énfasis en el uso de combinaciones de tinciones para determinar la viabilidad espermática; muchas de estas combinaciones tienen problemas de dependencia de tiempo, debido a que se

basan en la conversión enzimática del sustrato en un producto fluorescente. En adición, el período de latencia del tiempo de muerte celular hasta la pérdida de fluorescencia, agrega variabilidad al resultado de la tinción; un procedimiento más lógico podría ser el uso de dos tinciones que reaccionen con el mismo constituyente celular: una tinción que identifique solo espermatozoides vivos y una segunda tinción que identifique solo espermatozoides muertos (Garner y Johnson, 1995).

De forma típica, las tinciones involucran la exclusión de una tinción fluorescente impermeable por las células intactas y el ingreso y retención simultánea de un fluorocromo diferente (Holt, 2000a).

Se han desarrollado, para las células espermáticas, diferentes pruebas que funcionan con este principio, cada una con distintas propiedades de excitación (ex) y emisión (em), tales como, Hoechst 33258 (ex / em de 358 / 488 nm de longitud de onda); YoPro-1 (ex / em de 488 y 568/>620 nm de longitud de onda); Yoduro de Propidio u Homodímero de Etidio (ambos tienen una ex / em de 488 y 568 / >620 nm de longitud de onda); ToPro-3 y TOTO (ex / em de 647 / 670 nm de longitud de onda). Una forma alternativa (o de forma simultánea) para estudiar la integridad de la membrana es mediante el uso de tinciones de membrana aciladas, por virtud de sus partes acetil estas pruebas de membrana son anfipáticas y por lo tanto pueden pasar la membrana intacta y entrar a la célula viva; una vez dentro, son inmediatamente deaciladas por esterasas intracelulares adquiriendo las propiedades de impermeabilidad; para la tinción de espermatozoides viables se han utilizado derivados de la carboximetil y diacetato de fluoresceína (Silva y Gadella, 2006).

Se desarrolló una tinción nuclear que tiñe brillantemente el ADN de las células vivas, conocida como SYBR-14, una vez dentro de la célula viva, la deacilación del SYBR-14 provoca la unión con el DNA emitiendo fluorescencia (fluorescencia de color verde) (ex/em 488/515 nm de longitud de onda) (Silva y Gadella, 2006). Sin embargo, se ha reportado que la tinción SYBR-14 puede penetrar tanto membranas intactas como membranas dañadas de los espermatozoides (Medrano, 1998).

Por otro lado, la tinción con Yoduro de Propidio (PI), penetra la membrana plasmática de espermatozoides muertos en varias especies (fluorescencia roja). La combinación

de SYBR-14 y PI se ha utilizado para la determinación de las proporciones de espermatozoides vivos y muertos en varias especies (Johnson *et al.*, 2000; Silva y Gadella, 2006) (Figura 5).

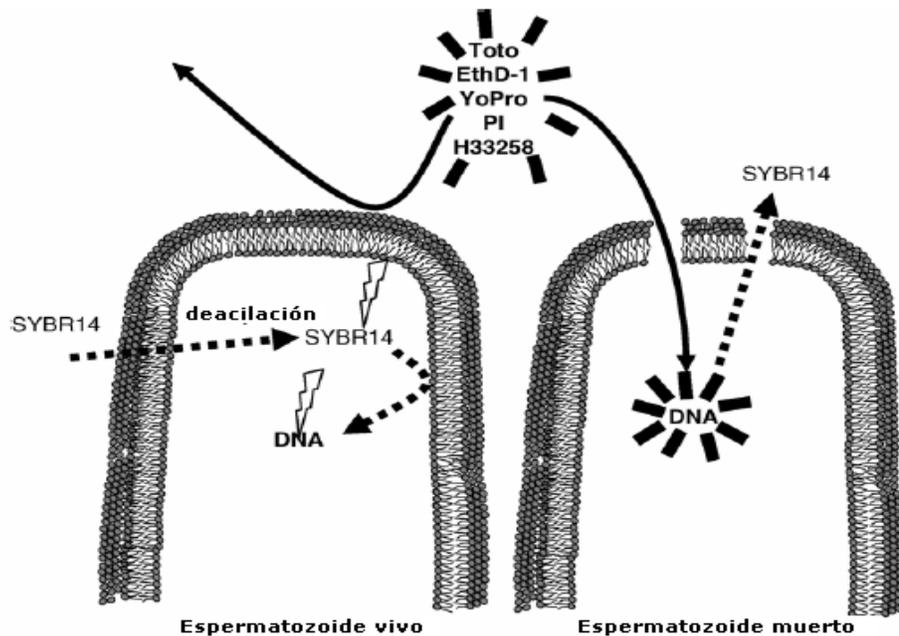


Figura 5. Viabilidad espermática. Diferenciación entre espermatozoide con membrana intacta y espermatozoides con membrana dañada utilizando tinciones fluorescentes con afinidad por el ADN (Tomada y modificada de Silva y Gadella, 2006).

SYBR-14/PI es una tinción efectiva para la determinación por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo de espermatozoides vivos y espermatozoides muertos, las ventajas del método son su relativa rapidez y la medición de los niveles de ambas tinciones pueden ser estimados en la misma muestra (Johnson *et al.*, 2000).

Otro efecto positivo del uso de la combinación SYBR-14/PI, es que las partículas no espermáticas adicionadas deliberadamente a los medios de conservación como las vesículas de yema de huevo o las partículas lipídicas de leche, no tienen que ser separadas para la determinación de la integridad de la membrana plasmática (Medrano y Holt, 1996; Silva y Gadella, 2006).

Desafortunadamente los procedimientos antes mencionados en la mayoría de las ocasiones, son determinados por citometría de flujo, un recurso que no se encuentra

disponible en la mayoría de los laboratorios; la cuantificación no podría llevarse a cabo tan fácilmente con la observación al microscopio de fluorescencia debido a que los espermatozoides presentarán movimiento, por lo que se ha descrito el uso de muy bajas concentraciones de formaldehído para inmovilizar espermatozoides que presumiblemente está mediado por la interacción reversible con los grupos amino de la superficie espermática, de modo que la evaluación de la viabilidad se pueda llevar a cabo con el uso de un microscopio de fluorescencia estándar (Harrison y Vickers, 1990).

2.10.4 Acrosoma

El acrosoma es un gran organelo ácido y secretorio derivado del aparato Golgi-Retículo endoplásmico, en el interior se localizan enzimas hidrolíticas que se encuentran organizadas en una matriz, muchas de estas enzimas están altamente glicosiladas (Ramalo-Santos, 2002).

La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis que involucra múltiples sitios de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, con la subsecuente vesiculación y liberación de enzimas acrosomales requeridas para la fertilización (Sukardi *et al.*, 1997).

Hay dos clases de pruebas fluorescentes para la determinación del estado acrosomal; las que detectan material asociado al acrosoma (intracelular) y por lo tanto requieren que la célula sea permeabilizada antes de realizar la tinción, y las que pueden ser usadas en células vivas no permeabilizadas. En la primera categoría se encuentran las lectinas y anticuerpos para los antígenos intracelulares acrosomales; en la segunda categoría se encuentra la clortetraciclina y los anticuerpos para los antígenos expuestos en el exterior de la célula (Cross y Meizel, 1989).

La integridad del acrosoma se determina comúnmente con lectinas conjugadas fluorescentes, estas lectinas conjugadas se unen a carbohidratos específicos de las glicoproteínas que se encuentran localizados exclusivamente en el acrosoma. Dependiendo de las especies de mamíferos, los conjugados de lectinas comúnmente

más usadas son *Pisum sativum* (obtenida del chícharo verde; PSA) o *Arachis hypogaea* (obtenida del cacahuate, PNA) aunque para el espermatozoide humano puede ser usada la Conavalina A (Con A) (Silva y Gadella, 2006).

Para espermatozoides de porcino, equino y canino la PNA fue específica para la membrana acrosomal externa, mientras que PSA se une a las glicoproteínas de la matriz acrosomal (Flesch *et al.*, 1998).

La determinación del estado acrosomal puede ser realizada en espermatozoides vivos, la ausencia de fluorescencia es indicativa de una acrosoma intacto y la fluorescencia es indicativa de daño o reacción acrosomal; esta técnica es comúnmente usada en citometría de flujo. Cuando la determinación se lleva a cabo en espermatozoides fijados y permeabilizados, la fluorescencia completa del acrosoma nos indica que esta estructura está intacta, mientras que los acrosomas con baja fluorescencia o una banda de fluorescencia ecuatorial muestra daño al acrosoma o reacción acrosomal (Silva y Gadella, 2006) (Figura 6).

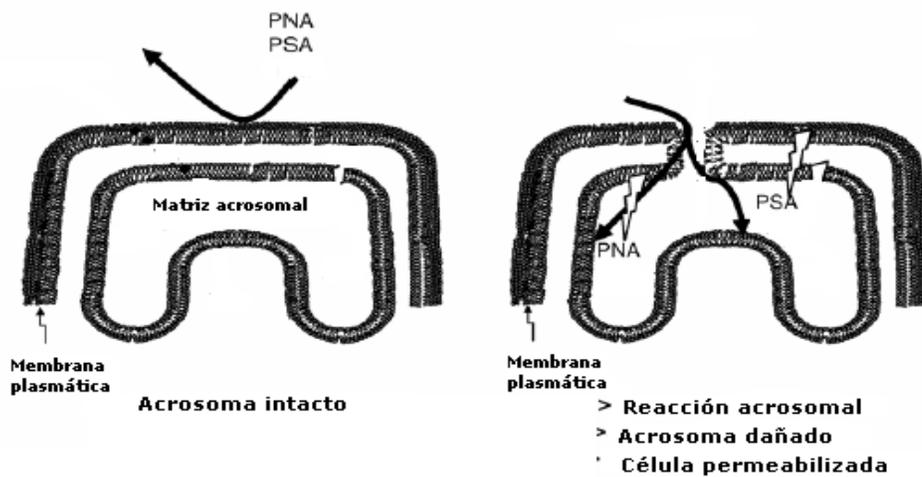


Figura 6. Estado Acrosomal. Diferenciación entre acrosomas intactos y acrosomas con reacción o daño (Tomado y modificado de Silva y Gadella, 2006).

Debido a que las pruebas son impermeables al interior celular, no pueden teñir las células no permeabilizadas; la tinción de la región acrosomal en espermatozoides no permeabilizados implica la barrera de la membrana plasmática y posiblemente de la membrana acrosomal (Cross y Meizel, 1989).

2.10.5 Capacitación

El proceso de capacitación consiste en una serie de modificaciones funcionales bioquímicas y biofísicas que confieren al espermatozoide eyaculado la capacidad de fertilizar al ovocito. Estos procesos fundamentales normalmente ocurren en el tracto genital de la hembra durante la migración del espermatozoide al sitio de fertilización. Una de las consecuencias funcionales de la capacitación es el desarrollo de un patrón de motilidad distintivo llamado hiperactivación, el cual se caracteriza por movimientos flagelares pronunciados, desplazamiento lateral marcado de la cabeza espermática y una trayectoria no lineal. Una manifestación adicional de la capacitación espermática es la adquisición de la capacidad para sufrir la reacción acrosomal en respuesta a un estímulo fisiológico como lo es la proteína ZP3 de la zona pelúcida y progesterona. La capacitación está asociada con modificaciones en la distribución de las proteínas de superficie, alteraciones en las características de la membrana plasmática, cambios en la actividad enzimática y modulación de la expresión de constituyentes intracelulares (Baldi *et al.*, 1996).

Se ha observado que la capacitación puede ocurrir *in vitro* espontáneamente en un medio definido sin la adición de fluidos biológicos, lo que sugiere que este proceso está intrínsecamente modulado por el mismo espermatozoide, de tal forma que las células están pre-programadas para sufrir la capacitación cuando son incubadas en el medio adecuado; además, de que es posible que la regulación de la capacitación recaiga más en eliminar la represión de los moduladores inhibitorios mediante la remoción de los factores discapacitantes más que en el estímulo de este proceso (Visconti y Kopf, 1998).

La capacitación es un proceso largo, que para completarse se lleva a cabo en promedio en el caso del espermatozoide porcino en dos horas; la lentitud a la cual se lleva a cabo la capacitación implica el involucramiento de una serie de eventos secuenciales (Harrison y Gadella, 2005).

La tasa y extensión de los cambios precedentes a la reacción acrosomal han sido muy difíciles de investigar debido a que no hay cambios observables en morfología, además de que los espermatozoides en un eyaculado no se capacitan en forma sincronizada

sino en pequeñas subpoblaciones. Desde hace algunos años, el antibiótico clortetraciclina fluorescente se ha utilizado para estudiar la capacitación en varias especies (Prueba CTC) caracterizándose tres diferentes patrones: el patrón F asociado a células no capacitadas, el patrón B para células que al menos parcialmente han completado la capacitación pero sin reacción acrosomal y el patrón AR característico de células con reacción acrosomal (Curry, 2000) (Figura 7).

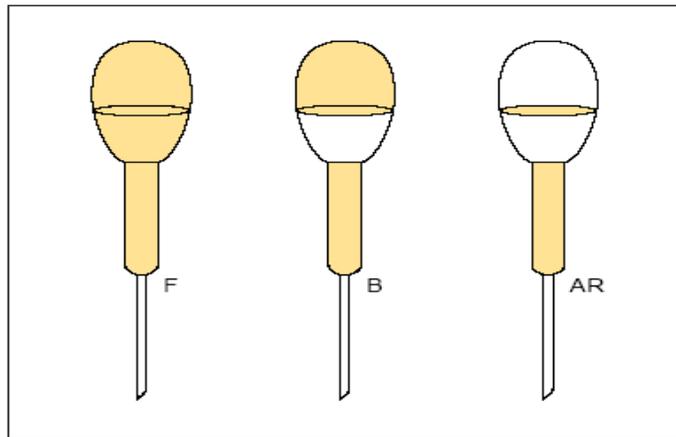


Figura 7. Patrones de fluorescencia de la prueba de la clortetraciclina (CTC) (Tomada de Curry, 2000).

Se ha utilizado la clortetraciclina para la determinación del estado funcional del espermatozoide, debido a que en adición a la determinación del estado acrosomal del espermatozoide, permite la discriminación células con acrosoma intacto en un grupo de capacitados y no capacitados (Fraser *et al.*, 1995).

Aunque no se han clarificado los detalles del mecanismo de la CTC, una hipótesis ha propuesto que la clortetraciclina podría interactuar con el calcio en la superficie espermática y por lo tanto sería un indicativo de la actividad de la bomba calcio-ATPasa (Holt y Medrano, 1997).

Se ha mencionado que la clortetraciclina se une a la membrana plasmática en una forma dependiente de calcio-magnesio, formando complejos altamente fluorescentes unidos a la membrana. Las células espermáticas viables se tiñen con CTC en las partes de la superficie de la membrana donde el calcio está presente sobre cierto umbral de concentración que permite la inmovilización de la clortetraciclina (Chandler y Williams, 1978).

Durante la capacitación espermática, una serie de eventos de membrana son requeridos para la fertilización: la salida de colesterol es necesaria para incrementar la fluidez de la membrana y estimular la fosforilación de tirosina. El incremento de calcio intracelular y la salida del colesterol se observan con la capacitación espermática y con la crioconservación (Holt, 2000a; Watson, 2000).

En el cerdo se ha demostrado que el bicarbonato altera la arquitectura de la membrana plasmática y aumenta la motilidad progresiva, induciendo la actividad de la sAC (la mayor isoforma de la adenilciclase) en el espermatozoide. El aumento de los niveles resultantes del AMP cíclico en la célula, activa a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) para fosforilar varias proteínas blanco las cuales aún no se han identificado, pero presumiblemente inician varias vías de señalización (Harrison y Gadella, 20005).

Como resultado del colapso de membrana y el intercambio de fosfolípidos, se facilita la eliminación de colesterol por la albúmina; este hallazgo entra en conflicto con estudios previos que mencionan que la pérdida de colesterol precede a la activación del eje AMP cíclico – Proteína cinasa A (Pk A). También se ha notado que no todas las células en una población espermática muestran cambios rápidos en respuesta a la estimulación por bicarbonato, muestras a nivel individual también difieren en respuesta. El acrosoma se ha identificado como reservorio de calcio, del cual la vía de señalización dependiente de bicarbonato podría causar una liberación de calcio para aumentar la actividad de la escramblasa (Harrison y Gadella, 20005).

La fosforilación de proteínas es un evento de modificación post-traducciona que actúa como uno de los mecanismos celulares de regulación para controlar varios procesos como el crecimiento celular, control del ciclo celular, ensamble del citoesqueleto y regulación de receptores; de hecho, en células eucariotas, es uno de los mecanismos más comunes para regular la actividad proteica mediante la adición y/o eliminación de grupos fosfato de residuos serina, treonina o tirosina de los componentes proteicos. La adición o eliminación de grupos fosfato pueden inducir modificaciones alostéricas provocando cambios de conformación de proteínas conduciendo a su activación o inactivación (Naz y Rajes, 2004).

El estado de fosforilación/desfosforilación de fosfoproteínas es controlado por la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas y su interacción provee a las células un “switch” que puede encender o apagar la función de varias proteínas. Estudios previos reportan la presencia de varias fosfoproteínas, proteínas cinasas y proteínas fosfatasas en el espermatozoide de mamífero, así como su implicación en la adquisición de motilidad espermática, capacitación y reacción acrosomal (Harrison y Gadella, 2005).

En comparación con otras especies, los sistemas de capacitación del espermatozoide de humano y de ratón han sido mejor caracterizados; en contraste, la capacitación espermática del porcino se encuentra poco elucidada (Bailey *et al.*, 2005).

Los protocolos de crioconservación óptimos para espermatozoides de mamíferos mantienen aproximadamente el 50% de supervivencia y se ha reconocido que la población sobreviviente está comprometida como resultado de cambios similares a la capacitación (Watson, 1995). Consecuentemente, algunos autores han proclamado de esta observación que el proceso de congelación y descongelación induce una respuesta similar a la capacitación espermática. El fenómeno especulativamente fue llamado “criocapacitación” (Pommer *et al.*, 2003). La inducción de criocapacitación se ha atribuido al incremento de calcio intracelular asociado con el daño de la membrana (Bailey y Burh, 1994)

Desde las etapas tempranas de la historia de la conservación de semen se ha reconocido que el semen crioconservado tiene una vida más corta en el tracto reproductivo de la hembra en comparación con el semen fresco (Curry, 2000).

En muchas especies de mamíferos incluyendo los porcinos, los espermatozoides que se introducen en el tracto de la hembra se acumulan en un reservorio espermático en la tuba uterina donde son mantenidos hasta que se acerca el tiempo de ovulación, y en respuesta a una señal aún no conocida, son liberados progresivamente y se mueven para encontrarse con el ovocito en la ampolla (Hunter, 1983).

Estudios *in vitro* han demostrado que la unión a las células epiteliales de la tuba uterina prolonga el tiempo de vida del espermatozoide, de hecho, en estudios que utilizaron

células epiteliales de la tuba uterina porcina en cultivo se demostró que se unían preferentemente espermatozoides no capacitados (Fazeli *et al.*, 1999).

Si la capacitación disminuye la capacidad del espermatozoide para unirse al epitelio de la tuba uterina, los cambios en el estado descritos para el semen congelado y descongelado podrían interferir con el establecimiento del reservorio espermático en la tuba uterina. Esta falla en el establecimiento de las interacciones entre espermatozoide y el epitelio oviductal, podrían contribuir a la baja fertilidad y vida más corta del espermatozoide descongelado; tomando esto en cuenta, si bajo condiciones *in vivo* el espermatozoide capacitado se encuentra solo en la tuba uterina y el proceso de congelación-descongelación produce una población espermática capacitada, podría decirse que la tuba uterina podría ser el sitio más efectivo para depositar el semen descongelado (Curry, 2000).

A este respecto se ha visto que las interacciones espermatozoide - epitelio de la tuba uterina son reconocidas como interacciones receptor-ligando, que a menudo involucran mecanismos de señalización intracelular; las observaciones realizadas por medio de crio-fractura por congelación, sugieren que el agrupamiento de las proteínas de membranas celulares durante las separaciones de fase lipídicas inducidas por el enfriamiento no son completamente reversibles, lo cual puede tener implicaciones sobre las interacciones receptor-ligando (Watson, 2000).

Las posibles soluciones ofrecen problemas de tipo práctico y de costo, la inseminación con un gran número de espermatozoides provocaría un incremento en los costos, el procedimiento del desarrollo de inseminación quirúrgica, la cual debe ser llevada a cabo por un cirujano veterinario calificado, no es apta por sí misma para su aplicación en la producción animal a gran escala (Green y Watson, 2001).

La industria porcina requiere el desarrollo de estrategias de inseminación con un bajo número de espermatozoides. En la actualidad hay procedimientos que permiten el depósito de la dosis espermática en el cuerpo uterino (inseminación post-cervical) o en la parte profunda del cuerno uterino (inseminación intrauterina profunda). Con el uso de la inseminación post-cervical, se ha logrado exitosamente una reducción de tres veces la dosis de semen fresco, la utilización de la inseminación intrauterina profunda se ha

llevado a cabo con una reducción de 20 veces en el número de espermatozoides en semen fresco o una reducción de seis veces en espermatozoides descongelados, ambos con resultados muy similares a los obtenidos con la inseminación artificial estándar (Vazquez *et al.*, 2007)

La inseminación intrauterina profunda ha hecho posible la reducción de la dosis espermática de seis a un billón de espermatozoides sin poner en riesgo la tasa de partos o tamaño de camada (Grobfield *et al.*, 2007).

2.11 Variaciones entre especies y entre individuos

El descubrimiento del glicerol como crioprotector significó un gran avance en la crioconservación del semen, sin embargo sólo se han hecho pequeñas mejoras a las técnicas básicas establecidas a principios de 1950. El gran éxito obtenido con el semen bovino no ha sido el mismo con otros mamíferos como los porcinos, ovinos o especies exóticas. Las diferencias resultan de al menos dos fuentes de variabilidad: (i) la fisiología y bioquímica espermática por sí mismas y (ii) las variaciones en la anatomía y fisiología del transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra. En la vaca son suficientes pocos espermatozoides bovinos (decenas de miles) para llevar a cabo la fertilización, mientras que el cerdo se requieren varios millones de espermatozoides. Estas diferencias cuantitativas entre especies son factores de gran importancia que tienen influencia sobre la fertilidad del semen crioconservado (Holt, 2000b).

Tomando en cuenta consideraciones prácticas, un protocolo estándar general de crioconservación sería lo más adecuado; sin embargo, en la actualidad los protocolos estándar de crioconservación espermática de mamíferos tienen limitaciones, ya que el éxito varía entre especies e incluso varía entre individuos entre la misma especie (Kumar *et al.*, 2003).

El entendimiento de la fuente de las diferencias de la susceptibilidad a la criosupervivencia entre las especies es complicado, debido a que existen diversos factores potenciales a considerar. Una forma de simplificar este análisis es mediante la comparación de las diferencias entre individuos de la misma especie; muchos

practicantes de la inseminación artificial con espermatozoides descongelados mencionan anécdotas relacionadas a individuos, de los cuales, sus espermatozoides fallaban consistentemente en sobrevivir a los procesos de la congelación y descongelación y por otro lado, individuos que de forma alterna sobrevivían bastante bien a los mismos procesos. Aunque estos hallazgos son generalmente observaciones, se ha reportado en diferentes especies, incluyendo caninos, bovinos, porcinos, equinos y humanos (Holt, 2000b).

La demostración más clara de estas diferencias Inter-individuales se obtuvo de dos series de experimentos. En uno de ellos se realizaron trabajos de inseminación heterospérmicas utilizando muestras seminales combinadas de semen bovino, mostrando que el proceso de crioconservación cambió las proporciones de concepciones atribuidas a ciertos machos cuando el espermatozoide estaba en competencia con otros (Beatty *et al.*, 1976). Esto implica que los espermatozoides que normalmente tienen ventaja por su capacidad de alcanzar y fertilizar ovocitos no son necesariamente los más capaces de resistir la crioconservación. Esta observación fue de gran importancia ya que el diseño experimental eliminó varios factores, especialmente los relacionados a la anatomía del tracto de la hembra y el momento de ovulación. Otro experimento que reveló la importancia de diferencias individuales se obtuvo de trabajos realizados con espermatozoides de ratón, trabajando con tres cepas de ratones, se demostró que la simple exposición del espermatozoide a medios crioprotectores sin congelación, redujo las tasas de fertilización en dos cepas mientras que la tercera cepa no fue afectada (Songsasen y Leibo, 1997).

Los métodos estándar de congelación-descongelación empleados en otras especies no producen resultados equivalentes en el semen porcino debido a la susceptibilidad de cada individuo a la crioconservación. El semen de algunos cerdos sobrevive a la congelación con menor daño que el de otros, independientemente de su calidad inicial, por esta razón, a los primeros se les ha denominado buenos congeladores (good freezers) y a los segundos malos congeladores (bad freezers) (Watson, 1995).

El concepto de malos congeladores sugiere que la criosupervivencia no está relacionada necesariamente a la calidad observada en la muestra de semen, de forma que para ciertos individuos con aparentemente buenos parámetros seminales

precongelación la supervivencia al descongelado es consistentemente pobre (Curry, 2000).

En equinos, se ha notado un alto grado de variación en la criosupervivencia espermática, ya que se ha estimado que el 25% de estos produce semen que congela bien, el 50% congela aceptablemente y el 25% congela pobremente; de forma similar se han descrito grandes diferencias para porcinos. Trabajos realizados utilizando un sistema estandarizado (pellets) y criomicroscopía, demostraron la variabilidad entre individuos porcinos al proceso de congelado y descongelado (Medrano y Holt, 1998).

En cuanto a bovinos también se han reportado diferencias individuales, las cuales se han superado mediante un proceso de selección, por el cual, incluso los bovinos de forma primaria no se seleccionan en base a la fertilidad, ya que el semen de los animales que ha demostrado no ser fértil al descongelado es eliminado de los programas de congelación (Curry, 2000).

Mediante el uso de tecnología de AFLP (amplified restriction fragment length polymorphism), una herramienta que permite visualizar diferencias entre secuencias de ADN entre individuos y que permite además identificar marcadores asociados a ciertas características, se demostró que la variación individual del semen porcino al proceso de congelación y descongelación podría estar genéticamente determinada (Thurston *et al.*, 2002).

La gran variación significativa observada comúnmente entre individuos, es un gran problema muy difícil de resolver experimentalmente, ya que podría ser necesaria la revisión de trabajos realizados a nivel individual más que a nivel de especie (Holt *et al.*, 2005).

3. ANTECEDENTES

El espermatozoide fue el primer tipo celular congelado y descongelado exitosamente (Polge *et al.*, 1949). En los últimos 40 años se han desarrollado programas comerciales de criopreservación para inseminación artificial en varias especies animales. Los espermatozoides porcinos son más sensibles a los eventos asociados a la crioconservación que los de otras especies como el humano y bovino; estos efectos incluyen daño a la membrana plasmática y otros organelos celulares, como resultado de estrés osmótico, choque frío y formación intracelular de hielo (Curry y Watson, 1994).

Trabajos con eritrocitos humanos expuestos a diferentes soluciones hipertónicas para simular el efecto de la congelación, demostraron empíricamente que la concentración de solutos *per se* tiene un efecto deletéreo sobre las células (Lovelock, 1953).

La resistencia a los cambios en la osmolaridad del espermatozoide porcino se ha utilizado para medir la resistencia de éste a los procesos de congelación y descongelación (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997).

La relevancia de la hipótesis de la interacción osmótica ha sido apoyada por trabajos en los cuales los espermatozoides fueron expuestos a soluciones hipertónicas de cloruro de sodio; la extensión del daño al espermatozoide, inducido por soluciones hipertónicas no congeladas, se correlacionó con los efectos de daño observados a temperaturas por debajo de 0°C (Lovelock y Polge, 1954; Watson y Duncan, 1988).

La simulación de los cambios en osmolaridad que se presentan durante la congelación y descongelación se han utilizado para el estudio y predicción de la criosupervivencia espermática; el protocolo experimental involucra la exposición del espermatozoide a soluciones hiperosmóticas y a la restauración de las condiciones isosmóticas mediante la suspensión de las células en soluciones hiposmóticas (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Curry y Watson 1994; Gao *et al.*, 1993; Holt y North 1994).

Un espermatozoide está conformado de varios compartimentos membranosos (por ejemplo: membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial), la evaluación por separado

de estos compartimentos no es efectiva en la predicción de la fertilidad de una muestra (Graham *et al.*, 1980).

Los protocolos de crioconservación óptimos para espermatozoides de mamíferos, solo mantienen el 50% aproximadamente de supervivencia; se ha reconocido que la población sobreviviente está comprometida como resultado de cambios similares a la capacitación (Green y Watson, 2001).

Los efectos de la tasas de enfriamiento no han sido medidos comparativamente entre individuos en los que sus espermatozoides son particularmente resistentes o susceptibles a la crioconservación (llamados “buenos” y “malos” congeladores). Se han reportado mejoras en la criosupervivencia espermática cuando las tasas de enfriamiento son modificadas; tales estudios a menudo no consideran diferencias individuales de la congelabilidad espermática entre verracos como una fuente de variación. Se ha mostrado que los espermatozoides de individuos considerados como “malos congeladores” no son afectados por el ajuste de la tasa de enfriamiento (no se convierten en “buenos congeladores”); en contraste, los espermatozoides de los “buenos congeladores” mostraron una ligera mejoría en la criosupervivencia cuando se utilizaron tasas de enfriamiento más rápidas; además las evidencias indicaron que las diferencias entre eyaculados son considerablemente más bajas que las diferencias entre verracos (Medrano *et al.*, 2002),

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que los experimentos de congelación siempre incluyen los efectos de la formación de hielo *per se* en el daño celular, la exposición a soluciones hiperosmolares sin la formación de hielo, puede ser de gran ayuda en la determinación del papel que desempeña el cambio de la concentración de solutos sobre el mecanismo de daño celular (Zawlodzka y Takamatsu, 2005).

Las ventajas del semen crioconservado sobre el semen fresco o refrigerado se fundamentan en el tiempo de conservación (Bonet *et al.*, 2006).

El almacenaje del semen porcino en forma congelada, es altamente atractivo para el mantenimiento de germoplasma, lo que representa una característica de gran importancia económica para la preservación de la diversidad genética, para proveer cruzamientos más eficientes y para servir como una reserva en caso de pérdida de germoplasma por epidemias o accidentes naturales. La crioconservación del espermatozoide porcino ofrece un medio efectivo para el almacenamiento a largo plazo de material genético importante; este método elimina la dificultad asociada con el transporte de animales o del semen fresco a grandes distancias o por largos periodos de tiempo. La exitosa crioconservación del semen porcino podría mejorar la producción porcina y su valor económico internacionalmente, ya que el uso de semen porcino crioconservado a menudo involucra procedimientos incómodos y proporciona pocas dosis para inseminación artificial por eyaculado debido a la baja supervivencia celular, dando como resultado bajas tasas de fecundidad y tamaños de camada (Gilmore *et al.*, 1998).

Con los protocolos actuales de crioconservación, aproximadamente el 50% de los espermatozoides porcinos sobrevive a estos procedimientos (Johnson, 1985; Watson, 1995), la inseminación estándar con espermatozoides congelados y descongelados da como resultado un índice de fertilidad reducido en un 50% y una disminución de tres cerdos por camada al compararse con el semen fresco (Guthrie y Welch, 2004).

La identificación de animales “buenos” congeladores tendría un efecto directo sobre los métodos de conservación de semen en la industria de la inseminación artificial,

promoviendo la crioconservación como una opción viable para la inseminación artificial porcina; sin embargo, es deseable disponer de protocolos de crioconservación adaptados a los “malos” congeladores para así conservar el semen de cualquier individuo y mantener la diversidad genética.

En la actualidad es necesario el desarrollo de investigaciones en el campo de la crioconservación del material genético porcino, es conveniente ofrecer beneficios alternos que permitan incrementar la producción porcina y como consecuencia fortalecer la porcicultura en nuestro país.

5. HIPÓTESIS

Si la exposición de espermatozoides porcinos a soluciones hiper e hiposmóticas simula el estrés osmótico que ocurre durante el proceso de crioconservación, la supervivencia de los espermatozoides al proceso de congelado-descongelado tiene correlación positiva con la prueba de estrés osmótico.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Determinar si es posible predecir la criosupervivencia de semen de cerdo mediante una prueba de estrés osmótico precongelación.

6.2 Particulares

Determinar la viabilidad de los espermatozoides expuestos a diferentes soluciones hiperosmóticas y a la restauración de la isosmolaridad.

Identificar un valor de hiperosmolaridad que produzca la mayor diferencia en viabilidad espermática entre el momento hiper- y el isosmolar.

Obtener los resultados de viabilidad de la prueba de estrés precongelación y los de congelación (criosupervivencia) y analizar alguna posible correlación entre ambos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán (FES-C), Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán – Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

7.1 Diseño experimental

El trabajo experimental se dividió en 2 partes:

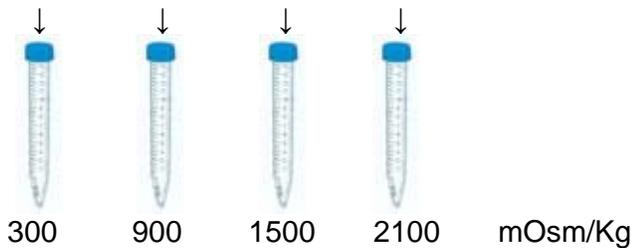
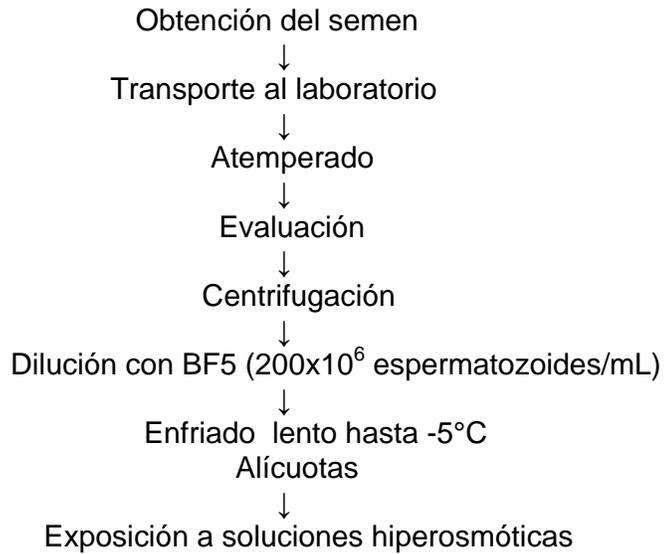
1. Desarrollo de una prueba precongelación que consistió en la exposición de los espermatozoides a soluciones hiperosmóticas con valores de: a) 300 (testigo), b) 900, c) 1500 y d) 2100 mOsm/kg, a -5°C durante 15 minutos posterior al descenso lento de temperatura, para simular el estrés osmótico que ocurre durante el proceso de congelación; enseguida, se restableció la isosmolaridad exponiendo los espermatozoides a soluciones hiposmóticas a 37°C , esto simuló el estrés osmótico que ocurre durante el proceso de descongelación.

En cada momento de la prueba (hiper- e iso-osmolaridad) se evaluó la viabilidad espermática y el estado del acrosoma; al finalizar esta primera etapa, se seleccionó un solo valor de hiperosmolaridad para integrarlo en la segunda parte del trabajo experimental.

2. Congelación del semen utilizando el método estandarizado por Pursel y Johnson (1975) modificado por Medrano (1998) y desarrollo en paralelo de la prueba de estrés osmótico. Las variables que se evaluaron tanto en el semen fresco como en el descongelado fueron: motilidad, viabilidad, estado del acrosoma y el estado de capacitación. Al finalizar esta prueba, se analizaron los datos para determinar la correlación entre la criosupervivencia espermática y su resistencia a la prueba anisosmótica.

7.2 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL

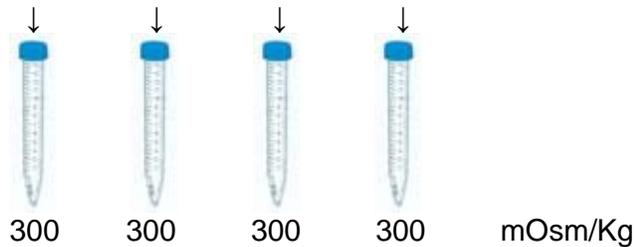
Prueba precongelación



Temperatura: -5°C
Tiempo: 15 minutos
Variables a medir: Viabilidad e integridad del acrosoma



Exposición a soluciones hiposmóticas restableciendo la isomolaridad



Temperatura: 37°C
Tiempo: 15 minutos
Variables a medir: Viabilidad e integridad del acrosoma

7.2.1 Obtención y transporte del semen

Se utilizaron los eyaculados de 5 verracos (Yorkshire-Landrace) (4 eyaculados de cada uno) cuyas edades oscilaban entre 1 y 2.5 años de edad, con una frecuencia de colección de una vez por semana. La colección se llevó a cabo por el método de la mano enguantada, obteniendo solo la fracción rica en espermatozoides en un termo precalentado a 37°C, realizando una dilución de 1:1 con el diluyente comercial BTS (Beltsville Thawing Solution (Pursel y Johnson, 1975) para su transporte al laboratorio.

El semen de dos de los machos (Yorkshire-Landrace) se obtuvo del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Jilotepec, Estado de México; el semen de los otros tres verracos se obtuvo de animales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo cuatro de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2.2 Evaluación

A su llegada al laboratorio, el semen fue atemperado a temperatura ambiente, posteriormente, se llevó a cabo una evaluación general de viabilidad, motilidad progresiva, concentración y anormalidades.

7.2.2.1 Viabilidad

Para la determinación de la viabilidad en semen fresco se utilizaron las tinciones fluorescentes SYBR-14/Ioduro de Propidio (PI). (Molecular Probes, EU). Se tomaron 100 µL de cada muestra de semen y se les adicionó 5 µL de SYBR-14 (diluido a 100 nMol en BF5), 5 µL de Ioduro de Propidio (12 µMol) y 2 µL de una solución de formaldehído (0.17 mM), utilizado para inmovilizar a los espermatozoides y poder llevar a cabo el conteo en el microscopio de fluorescencia (Harrison y Vickers, 1990). El conteo se llevó a cabo examinando por lo menos 200 células con el objetivo de 40x.

7.2.2.2 Motilidad Progresiva

Para llevar a cabo la evaluación de la motilidad progresiva, se realizó una dilución del semen 1:10 (v/v) en medio BTS, se tomó 1 mL de semen y se mezcló con 9 mL de BTS, se colocó una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C y se colocó un cubreobjetos; enseguida, se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0-100% en múltiplos de 5.

7.2.2.3 Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática del eyaculado, se llevó a cabo utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico con el objetivo de 20X., realizando una dilución de semen 1:200 (v/v) con la solución de Hancock en la pipeta de Thoma, el conteo se hizo en 5 de los 25 cuadros de cada lado de la cámara, obteniéndose un promedio.

7.2.2.4 Anormalidades

El porcentaje de anormalidades se determinó a través de la observación de un frotis, utilizando la tinción Eosina-Nigrosina (Barth y Oko, 1989). El frotis se preparó depositando una gota de semen diluido 1:10 (v/v) en BTS en el extremo de un portaobjetos donde se agregó 1 gota de la tinción, se mezclaron ambas gotas y se extendió en una capa delgada para secarlo al aire rápidamente. El frotis se observó al microscopio óptico con el aumento de 40X, contándose un mínimo de 200 espermatozoides por laminilla, expresándose el resultado de anormalidades en porcentaje (Peña-Matínez, 2004).

7.2.3 Dilución

Posterior a la determinación de la concentración espermática, el semen fue centrifugado a 300 X g por 10 minutos (Pursel y Johnson, 1975), para retirar el plasma seminal y ajustar la concentración a 200 millones/mL en medio de congelación BF5, sin glicerol, y dar un volumen total de 5 mL para iniciar el proceso de enfriado.

7.2.4 Preparación de las soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas

Para llevar a cabo la preparación de las soluciones hiperosmóticas se utilizó el medio estándar de congelación BF5 (308 mOsm/Kg) como medio básico, adicionándose glucosa para obtener 3 valores diferentes de hiperosmolaridad (Cuadro 1). Los espermatozoides en el medio BF5 estándar fueron diluidos en proporción 1:1 (v/v) con la solución hiperosmótica correspondiente para obtener la osmolaridad blanco.

La isosmolaridad fue restablecida mediante la dilución de los espermatozoides en las soluciones hiperosmóticas en proporción 1:6 (v/v) con la solución hiposmótica correspondiente que contenía los amortiguadores Tris y TES a la concentración utilizada en el BF5 más glucosa para otorgar los diferentes valores de hiposmolaridad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas utilizadas

Osmolaridad blanco (mOsm/Kg)	Solución hiperosmótica (mOsm/Kg)	Solución hiposmótica (mOsm/Kg)
300	308	308
900	1543	205
1500	2688	175
2100	3744	99

7.2.5 Enfriado lento a -5°C en dos etapas

7.2.5.1 Primera Etapa: Enfriado a 5°C

Para llevar a cabo el enfriamiento se utilizó un recipiente de vidrio (Recipiente "A") con capacidad de 560 mL, el cual contenía una solución salina al 7.85%, misma que se encontraba a temperatura ambiente al iniciar el enfriado (Figura 8).

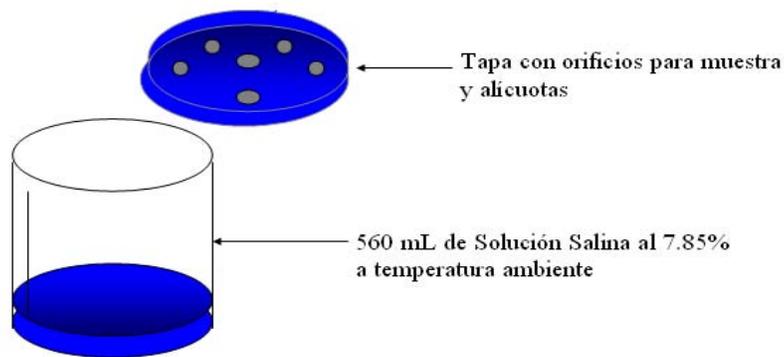


Figura 8. Recipiente "A" utilizado para llevar a cabo el enfriado lento a 5°C

El recipiente contaba con orificios en la tapa para introducir dos tubos con 5 mL cada uno con semen diluido en medio BF5 a una concentración de 200 millones por mL. A uno de los tubos se le introdujo un termómetro como control de registro del descenso de la temperatura, el otro tubo contenía la muestra a utilizar posteriormente para llevar a cabo la prueba. Además, contaba con orificios para introducir las 4 soluciones hiperosmóticas a utilizar (300, 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg) de modo que todos los tubos en conjunto experimentaran la misma velocidad de enfriado. El Recipiente "A" se colocó en un refrigerador durante tres horas, tiempo durante el cual la muestra de semen alcanzaba la temperatura de 5°C.

7.2.5.2 Segunda Etapa: Enfriado a -5°C

El recipiente "A" se introdujo en el recipiente "B" (Figura 9), el cual contenía hielo salino al 7.85% a una temperatura de -10°C; ambos fueron colocados en un refrigerador permaneciendo 75 minutos aproximadamente hasta que la muestra de semen alcanzara la temperatura de -5°C.

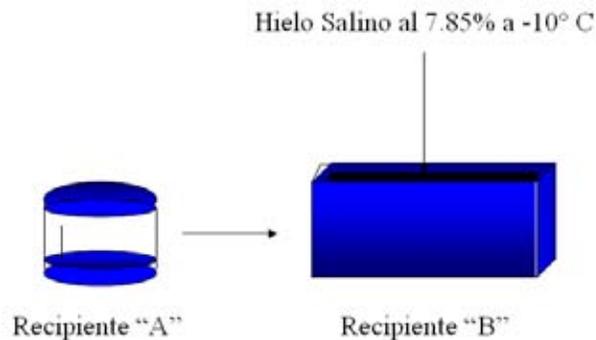


Figura 9. Recipiente "B" utilizado para llevar a cabo el enfriamiento lento a -5°C

7.2.6 Desarrollo de la prueba de estrés osmótico

7.2.6.1 Exposición a soluciones hiperosmóticas

Una vez alcanzada la temperatura de -5°C se formaron alícuotas (0.2 mL cada una) del tubo con semen en BF5 a una concentración de 200 millones/mL y se depositaron en tubos que contenían 0.2 mL de las diferentes soluciones hiperosmóticas (proporción 1:1) (Figura 10). La exposición de los espermatozoides a las soluciones hiperosmóticas tuvo una duración de 15 minutos, al cumplirse este tiempo se tomaron muestras para la determinación de la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma.

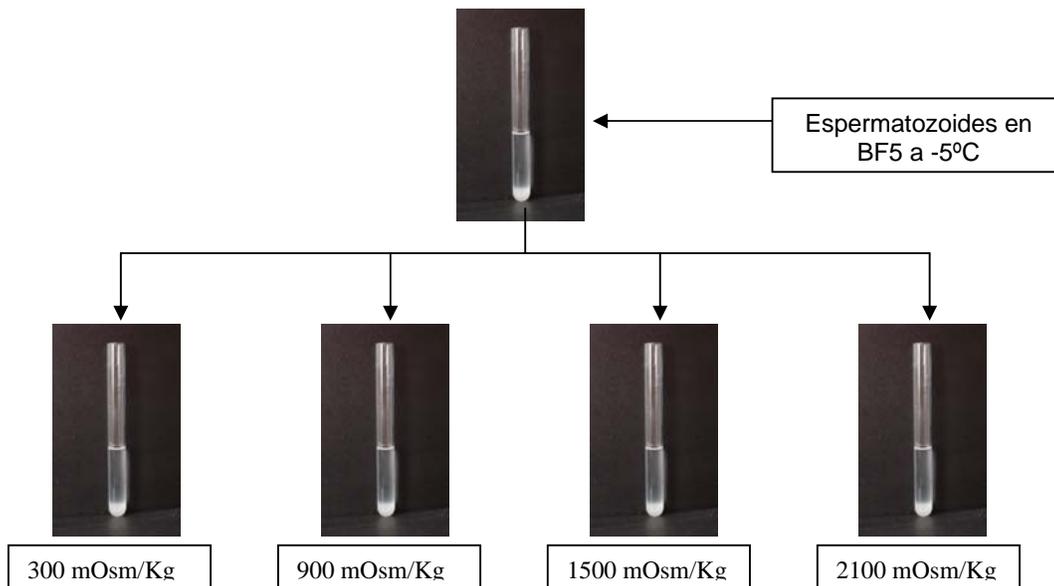


Figura 10. Exposición de espermatozoides porcinos a soluciones hiperosmóticas a -5°C

7.2.6.2 Exposición a soluciones hiposmóticas para restablecer la isosmolaridad

Una vez transcurridos los 15 minutos en las soluciones hiperosmóticas, se tomó una muestra de cada una (0.15 mL) y se agregó a su correspondiente solución hiposmótica (0.9 mL) en una proporción de 1:6 (v/v) para restablecer la isosmolaridad a una temperatura de 37°C , durante 15 minutos (Figura 11). Posteriormente se llevó a cabo la determinación de la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma.

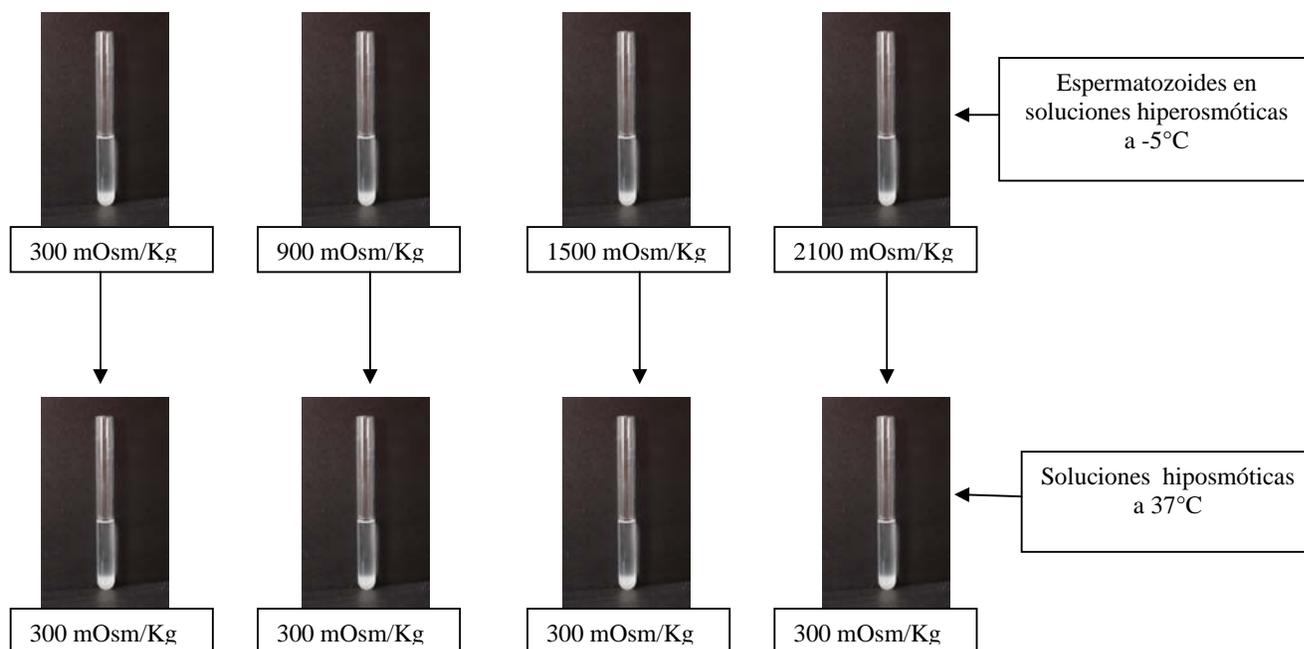


Figura 11. Restablecimiento de condiciones isosmóticas a 37°C.

7.2.7 Determinación de viabilidad espermática mediante tinciones fluorescentes: SYBR-4/PI

Para la determinación de la viabilidad se utilizaron las tinciones fluorescentes SYBR-14/PI (Molecular Probes, EU). Al cumplirse los 15 minutos de exposición a las soluciones hiper- e hipo-osmóticas se tomaron 100 μ L de cada uno de los tubos de los 4 tratamientos y se les adicionaron 5 μ L de SYBR-14 (diluido a 100 nMol en BF5), 5 μ L de Ioduro de Propidio (12 μ Mol) y 2 μ L de una solución de formaldehído (0.17 mM), utilizado para inmovilizar a los espermatozoides y poder llevar a cabo el conteo en el microscopio de fluorescencia (Harrison y Vickers, 1990). El conteo se llevó a cabo examinando por lo menos 200 células por laminilla con el objetivo de 40x.

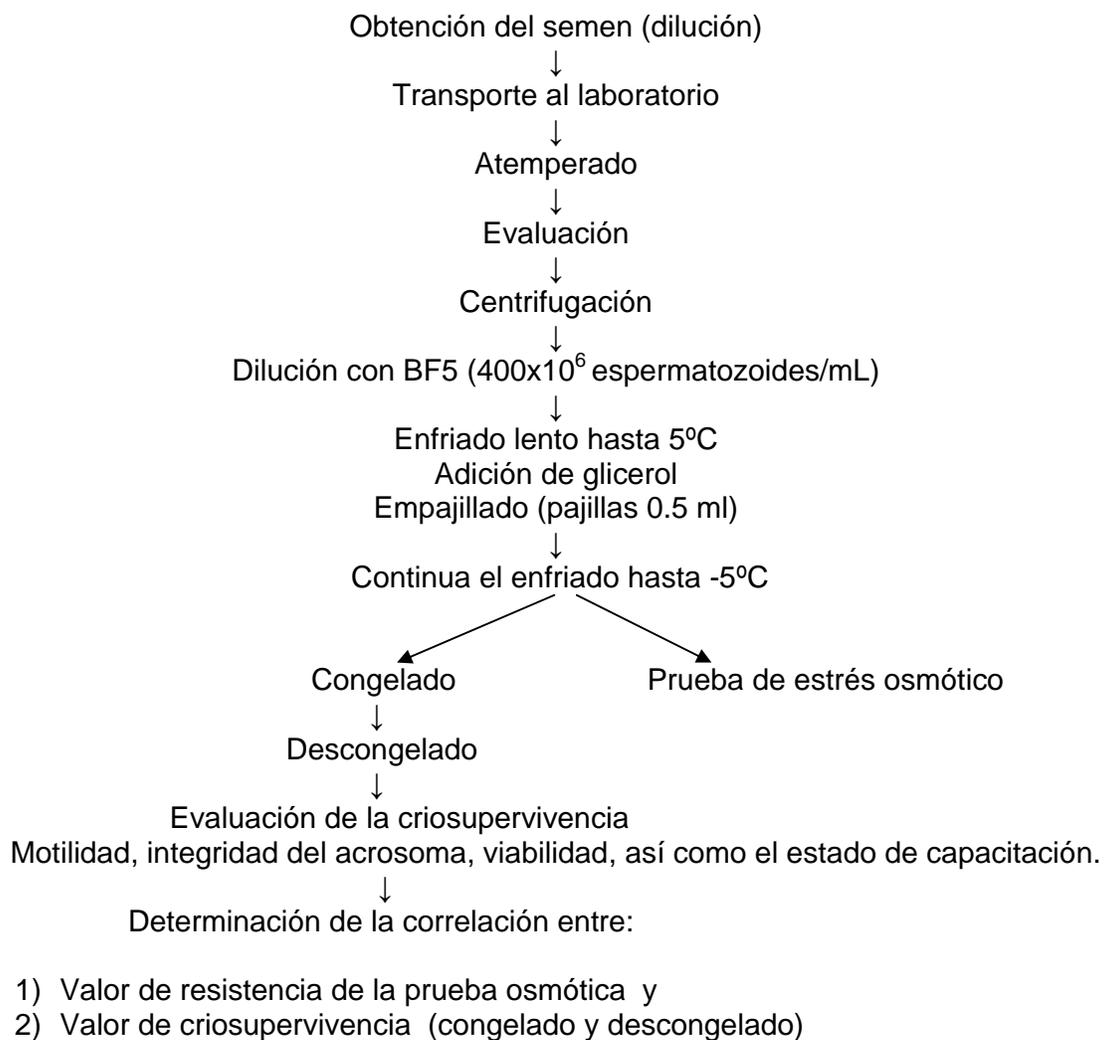
7.2.8 Determinación de la integridad acrosomal

Para la determinación de la integridad acrosomal se utilizó la lectina del chícharo (PSA-*Pisum sativum agglutinin*) unida al fluorocromo FITC (Isotiocionato de fluoresceína). Se realizaron y prepararon frotis secados al aire, los cuales fueron fijados por una hora en etanol, se agregaron 50 μ l (6.5mM) de la lectina en la superficie de cada frotis, de cada uno de los tratamientos (n=8); distribuyéndose uniformemente manteniéndose en la oscuridad por 10 minutos. Enseguida, los frotis se lavaron con agua destilada, se secaron al aire, se agregó una gota de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1)

para retardar la pérdida de fluorescencia colocándose un cubreobjetos ejerciendo presión suave, observándose al microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x; se examinaron al menos 200 células por frotis evaluando la uniformidad del borde apical.

7.3 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL

Congelación de semen



7.3.1 Obtención y transporte del semen

Para la segunda parte del trabajo se utilizó el semen de 6 verracos (Yorkshire-Landrace) (5 eyaculados de c/u) cuyas edades oscilaban entre 1 y 2.5 años de edad. Sólo fue recolectada la fracción rica en espermatozoides por el método de la mano enguantada como fue descrito para la primera parte del trabajo experimental. El semen de dos de los verracos se obtuvo del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Jilotepec, Estado de México; el semen de los otros cuatro verracos se obtuvo de animales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo cuatro de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.3.2 Evaluación

A la llegada al laboratorio, el semen fue atemperado a temperatura ambiente. Posteriormente se sometió a una evaluación general: viabilidad (evaluación en paralelo con tinciones SYBR-14/PI y eosina-nigrosina), motilidad progresiva, concentración, anomalías, tal como se describe en la primera parte del trabajo.

7.3.3 Dilución

Posterior a la determinación de la concentración espermática, el semen fue centrifugado a 300 X g por 10 minutos (Pursel y Johnson, 1975), para retirar el plasma seminal y ajustar la concentración a 200 millones/mL en el medio de congelación BF5 y realizar la prueba anisomótica, el semen a utilizar para la congelación fue ajustado a una concentración de 400 millones por mL, ambos en un volumen total de 5 mL para iniciar el enfriado.

7.3.4 Enfriado lento a -5°C

Para llevar a cabo la segunda parte del trabajo se utilizó el mismo sistema de enfriado descrito anteriormente, además de que se realizaron al mismo tiempo la prueba anisomótica y la congelación del semen utilizando el semen de dos machos en cada ocasión como se describe a continuación:

7.3.4.1 Primera Etapa: enfriado a 5°C.

El recipiente "A" utilizado previamente (Figura 6), en esta etapa contaba con orificios en la tapa para introducir:

a) Tres tubos con 2.5 mL de semen diluido en BF5 a una concentración de 400 millones de espermatozoides por mL; a uno de los tubos se le introdujo un termómetro para registrar el descenso de la temperatura y los otros dos contenían la muestra de semen, uno por cada macho a utilizar posteriormente para la congelación. Una vez alcanzada la temperatura de 6.5°C se agregaron 2.5 mL de BF5 más glicerol (2%) a cada tubo, para tener una concentración final de 200 millones por mL en BF5 con 1% de glicerol. Después de quince minutos se llenaron 6 pajillas de 0.5 mL de cada eyaculado (macho) y se colocaron dentro de tubos de vidrio en el recipiente A; a una pajilla extra se le colocó una microsonda para registrar el descenso de temperatura de la pajilla.

b) Dos tubos con 5 mL, uno por cada eyaculado (macho) a una concentración de 200 millones de espermatozoides por mL para la prueba anisomótica.

c) Dos tubos con soluciones hiperosmóticas a utilizar con valores de 2100 mOsm/Kg., uno para cada eyaculado.

El Recipiente "A" se colocó en un refrigerador durante tres horas hasta que la muestra de semen alcanzara la temperatura de 5° C

7.3.4.2 Segunda Etapa: enfriado a -5°C

El Recipiente "A" se introdujo en el Recipiente "B" (Figura 7), el cual contenía hielo salino al 7.85% a una temperatura de -10°C, y permaneció ahí durante 75 minutos aproximadamente hasta que la muestra de semen alcanzara la temperatura de -5°C; a esta temperatura se llevó a cabo la primera parte de la prueba de estrés osmótico (momento hiperosmótico) y el traspaso de las pajillas a los vapores de nitrógeno.

7.3.5 Exposición a soluciones hiperosmóticas

Una vez alcanzada la temperatura de -5°C se tomaron alícuotas del semen en BF5 y se mezclaron en proporción 1:1 (v/v) con las soluciones hiperosmóticas para alcanzar el valor de osmolaridad blanco (2100 mOsm/Kg). La exposición tuvo una duración de 15 minutos, al cumplirse este periodo se tomaron muestras para la determinación de la viabilidad espermática y la integridad acrosomal.

7.3.6 Exposición a soluciones hiposmóticas para restablecer la isosmolaridad

Una vez transcurrido el periodo de exposición a las soluciones hiperosmóticas, se tomaron 150 μl de éstas y se mezclaron con 900 μl de la correspondiente solución hiposmótica en proporción 1:6 (v/v), para restablecer la isosmolaridad a una temperatura de 37°C . La exposición tuvo una duración de 15 minutos, al cumplirse este periodo se tomaron muestras para la determinación de la viabilidad espermática y la integridad acrosomal.

7.3.7 Exposición de las pajillas a los vapores de nitrógeno

Una vez que las pajillas alcanzaron la temperatura de -5°C se colocaron en una rejilla a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido quedando expuestas a los vapores durante quince minutos. Posteriormente se sumergieron totalmente en el nitrógeno y se almacenaron en el termo hasta que se llevara a cabo la descongelación.

7.3.8 Descongelación

La descongelación se llevó a cabo por lo menos un mes después de que se congelarán las muestras; para esto, las pajillas se introdujeron en agua a 37°C durante 30 segundos. La criosupervivencia se evaluó tomando en cuenta la motilidad progresiva, viabilidad espermática, integridad del acrosoma, así como, el estado de capacitación.

7.3.9 Estado de capacitación

Para la evaluación del estado de capacitación se realizó la prueba de la Clortetraciclina (CTC) utilizando el microscopio de fluorescencia. Se tomó el contenido de una pajilla (0.5 mL) y se filtró a través de una columna de sephadex G 50 (6.25% p/v) en citrato de sodio al 2.9% (p/v) para seleccionar los espermatozoides viables. La solución CTC contenía un amortiguador (NaCl 130 mM, Tris 20 mM), CTC-HCl (805 mM), Cisteína (5mM), a pH 7.8.

Se agregaron 100 μ L de solución CTC a 100 μ L de semen filtrado y se mezclaron durante 30 segundos, posteriormente se añadieron 22 μ L de solución fijadora de glutaraldehído al 0.2% (v/v). Enseguida, se preparó la laminilla con 10 μ L de la mezcla anterior y una gota de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1) y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave. Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x, examinándose un mínimo de 200 células por laminilla.

Se determinó el porcentaje de presentación de los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide de acuerdo a la clasificación utilizada por Kaneto *et al.* (2002):

Patrón F. Fluorescencia total, patrón de espermatozoides no capacitados.

Patrón B. Una banda libre de fluorescencia en el dominio postacrosomal, patrón de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.

Patrón AR. Baja fluorescencia en la totalidad de la cabeza con una banda de fluorescencia brillante a lo largo del segmento ecuatorial y otra variante consistente en la emisión de fluorescencia solo en la región postacrosomal, patrón de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal. (Figura 5)

7.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las dos partes de este trabajo fueron analizados mediante el programa estadístico Statgraphics plus versión 5.0 para determinar las diferencias entre tratamientos en general y entre machos considerándose significativos a un nivel de $P < 0.05$. Previo al análisis se realizó una transformación de los datos obtenidos y expresados en porcentaje de parámetros de calidad seminal en la prueba de congelación mediante la aplicación de la transformación de arcoseno para normalizarlos (Steel y Torrie, 1985; Siegel, 1990).

Prueba precongelación

ANOVA de medidas repetidas para el análisis de la viabilidad durante los tratamientos de hiperosmolaridad y la viabilidad al retorno a condiciones de isosmolaridad.

Pruebas pareadas Wilcoxon para el análisis de la viabilidad durante los tratamientos de hiperosmolaridad contra viabilidad al retorno de condiciones de isosmolaridad.

Congelación de semen

Los datos provenientes del experimento de congelación en pajillas expresados en porcentaje fueron analizados mediante ANOVA.

Posteriormente se determinó la correlación entre la criosupervivencia y la viabilidad a la prueba anisomótica

8. RESULTADOS

8.1 Prueba de estrés osmótico

Los valores de las diferentes variables del semen fresco para la primera parte del trabajo experimental, se presentan en el Cuadro 2. En éste se puede observar que los valores promedio de cada variable se encuentran dentro del rango normal para la especie. También, se puede observar que los valores observados para motilidad progresiva y viabilidad no presentaron diferencias significativas entre individuos; sin embargo, los valores observados para la concentración espermática, el porcentaje de anomalías y el porcentaje de acrosomas intactos presentaron diferencias entre individuos, sin salir de los parámetros establecidos como normales para la especie porcina (Bonet *et al.*,2006).

Cuadro 2. Valores promedio individuales de los parámetros evaluados en el semen fresco

Macho	Eyaculados (n)	Motilidad progresiva (%)	Concentración (millones/mL)	Anormalidades (%)	Viabilidad (%)	Acrosomas Intactos (%)
1	4	75.0 ± 5.8 ^a	485 ± 175 ^a	4.6 ± 1.1 ^{ab}	91.6 ± 2.2 ^a	87.6 ± 6.9 ^a
2	4	72.5 ± 5.0 ^a	285 ± 49 ^b	4.2 ± 1.3 ^{ab}	84.3 ± 8.1 ^a	79.7 ± 2.8 ^b
3	4	70.0 ± 0.0 ^a	498 ± 48 ^a	5.7 ± 1.7 ^a	90.8 ± 5.8 ^a	81.2 ± 4.7 ^{abc}
4	4	72.5 ± 5.0 ^a	492 ± 109 ^a	3.3 ± 1.3 ^b	89.8 ± 6.2 ^a	78.0 ± 5.4 ^{bc}
5	4	75.0 ± 5.8 ^a	731 ± 163 ^c	3.7 ± 0.9 ^{ab}	91.4 ± 2.5 ^a	83.5 ± 3.0 ^{abc}
Promedio	n=20	73.0 ± 4.7	498 ± 180	4.3 ± 1.4	89.6 ± 5.6	82.0 ± 5.5

Los valores representan medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas dentro de las columnas son diferentes significativamente (P < 0.05).

8.1.1 Viabilidad espermática

En el Cuadro 3 se presentan los porcentajes generales de viabilidad espermática, posterior a los tratamientos de hiperosmolaridad (300, 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg) a -5°C por 15 minutos y posterior a la restauración de la isosmolaridad a 37°C por 15 minutos. Asimismo, en la Figura 12 se representan las gráficas de ambas pruebas.

Al comparar la respuesta entre los diferentes tratamientos de hiperosmolaridad y se observó que los tratamientos de 1500 y 2100 mOsm/Kg mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con los tratamientos de 300 y 900 mOsm/Kg, mismos que no fueron diferentes entre sí. En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad se observó diferencia significativa entre todos los tratamientos ($P < 0.05$).

Por otro lado, al comparar la diferencia entre el tratamiento de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada uno de los valores utilizados se observó una diferencia significativa para los valores de 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg, no así para el testigo.

En el Cuadro 4 se presentan los valores de viabilidad de cada macho de la prueba de hiperosmolaridad. En este tratamiento al comparar la diferencia entre individuos, se observó que hubo diferencias significativas en todos los tratamientos incluyendo el testigo ($P < 0.05$) no así para el semen fresco. Comparando la diferencia entre respuestas del mismo macho a los tratamientos, se observaron diferencias entre los tratamientos incluyendo los valores de semen fresco ($P < 0.05$).

En el Cuadro 5 se presentan los valores de viabilidad por cada individuo de la prueba de isosmolaridad. Al comparar la diferencia entre machos al mismo tratamiento, se observó que hubo diferencias significativas en todos los tratamientos ($P < 0.05$); en la comparación de las respuestas del mismo macho a los diferentes tratamientos, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Valores generales de Viabilidad espermática (%) en los tratamientos de Hiperosmolaridad e Isosmolaridad

Tratamiento	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
Hiperosmolaridad	70.8 ± 11.7 ^{a x}	64.5 ± 10.4 ^{a x}	49.8 ± 12.3 ^{a y}	34.9 ± 8.3 ^{a z}
Isosmolaridad	63.4 ± 13.7 ^{a w}	55.8 ± 12.6 ^{b x}	38.0 ± 11.5 ^{b y}	15.8 ± 7.7 ^{b z}

Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a, b, c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w, x, y, z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P< 0.05).

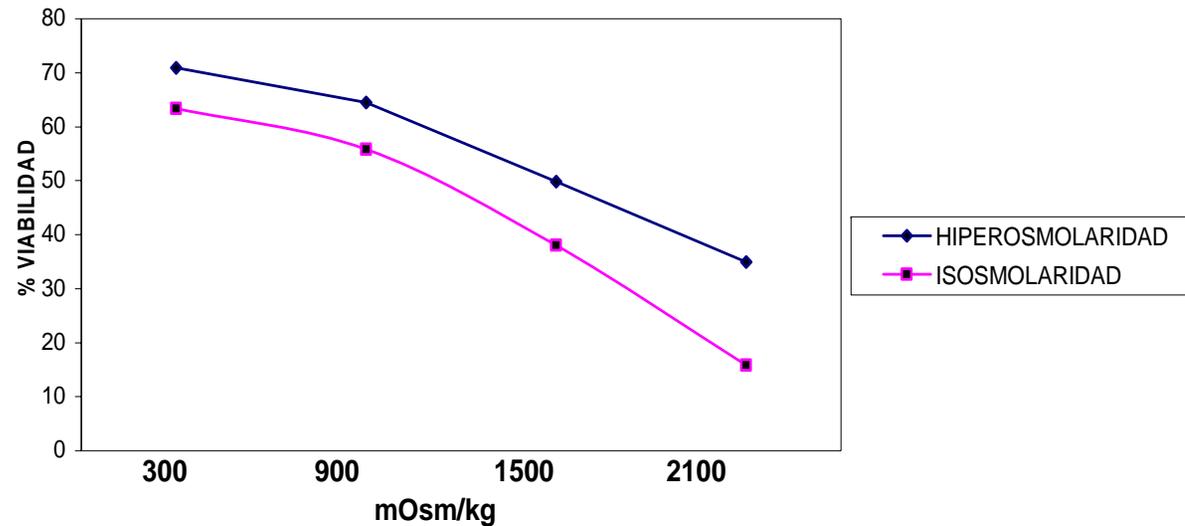


Figura 12. Viabilidad espermática en los tratamientos de hiperosmolaridad (300, 900, 1500 y 2100 mOsm/kg) a -5° C por 15 minutos y al retorno a la isosmolaridad a 37°C por 15 minutos.

Cuadro 4. Valores individuales de Viabilidad espermática (%) en la prueba de Hiperosmolaridad

Macho	Eyaculados (n)	Semen fresco	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
1	4	91.6 ± 2.2 ^{a w}	82.7 ± 1.3 ^{a x}	74.7 ± 1.7 ^{a x}	55.9 ± 16.4 ^{ab y}	37.8 ± 8.0 ^{ab z}
2	4	84.3 ± 8.1 ^{a x}	81.7 ± 5.0 ^{a x}	75.4 ± 2.4 ^{a x}	63.9 ± 5.8 ^{b y}	39.5 ± 10.6 ^{a z}
3	4	90.8 ± 5.8 ^{a w}	63.1 ± 7.5 ^{b x}	58.5 ± 4.6 ^{b x}	40.7 ± 5.2 ^{c y}	26.5 ± 4.9 ^{b z}
4	4	89.8 ± 6.2 ^{a x}	65.5 ± 8.7 ^{b y}	57.1 ± 6.0 ^{b y}	43.6 ± 5.5 ^{ac z}	36.2 ± 2.8 ^{ab z}
5	4	91.4 ± 2.5 ^{a w}	61.2 ± 11.3 ^{b x}	56.9 ± 11.1 ^{b xy}	45.0 ± 9.9 ^{ac yz}	34.5 ± 9.4 ^{ab z}

Los valores representan medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P< 0.05).

Cuadro 5. Valores individuales de Viabilidad espermática (%) en la prueba de Isosmolaridad

Macho	Eyaculados (n)	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
1	4	73.8 ± 8.7 ^{ab x}	69.0 ± 7.6 ^{a x}	47.5 ± 8.2 ^{a y}	21.8 ± 6.2 ^{a z}
2	4	77.7 ± 5.3 ^{a w}	65.7 ± 10.6 ^{a x}	47.3 ± 1.6 ^{a y}	18.1 ± 6.9 ^{a z}
3	4	52.9 ± 11.7 ^{c x}	43.5 ± 6.9 ^{b x}	27.5 ± 13 ^{b y}	7.3 ± 4.2 ^{b z}
4	4	60.4 ± 10 ^{bc x}	53.0 ± 7.6 ^{b x}	35.2 ± 7.8 ^{ab y}	14.1 ± 3.6 ^{ab z}
5	4	52.0 ± 10.2 ^{c x}	47.5 ± 8.4 ^{b xy}	32.7 ± 10.2 ^{b y}	17.8 ± 9.9 ^{a z}

Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P < 0.05).

8.1.2 Espermatozoides con acrosoma intacto

En el Cuadro 6 se presentan los valores generales de espermatozoides con acrosoma intacto posterior a la exposición a los tratamientos de hiperosmolaridad (300, 900, 1500 y 2100 mOsm/Kg) a -5°C por 15 minutos y a la restauración de la isosmolaridad a 37°C por 15 minutos. Asimismo, en la Figura 13 se representan las gráficas de ambas pruebas.

Al comparar la respuesta entre los diferentes tratamientos de hiperosmolaridad y se observó que el tratamiento de 300 mOsm/Kg mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con los tratamientos de 1500 y 2100 mOsm/Kg. En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad, también se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el tratamiento de 300 mOsm/Kg con los tratamientos de 1500 y 2100 mOsm/Kg ($P < 0.05$).

Por otro lado, se comparó la diferencia entre el tratamiento de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada uno de los valores utilizados, observándose una diferencia significativa sólo para 2100 mOsm/Kg ($P < 0.05$).

En el Cuadro 7 se presentan los porcentajes individuales de espermatozoides con acrosoma intacto de la prueba de hiperosmolaridad. Para la diferencia entre machos al mismo tratamiento, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los tratamientos de 900 y 1500 mOsm/Kg así como para el semen fresco. La respuesta de cada individuo a los diferentes tratamientos sólo mostró diferencias significativas en 2 machos ($P < 0.05$).

En el Cuadro 8 se presentan los valores por individuo de la variable espermatozoides con acrosoma intacto en la prueba de isosmolaridad. Se observó que sólo hubo diferencias significativas en el tratamiento de 300 mOsm/Kg ($P < 0.05$). En cuanto a la respuesta del mismo macho a los diferentes tratamientos, se observaron diferencias significativas en 4 machos de los 6 utilizados ($P < 0.05$).

Cuadro 6. Valores generales de espermatozoides con acrosoma intacto (%) en los tratamientos de Hiperosmolaridad e Isosmolaridad

Tratamiento	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
Hiperosmolaridad	83.7 ± 6.0 ^{a x}	79.8 ± 5.5 ^{a xy}	79.2 ± 7.6 ^{a y}	79.6 ± 7.6 ^{a y}
Isosmolaridad	80.7 ± 4.4 ^{a x}	78.5 ± 7.1 ^{a xy}	75.3 ± 7.3 ^{a yz}	70.2 ± 8.6 ^{b z}

Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P < 0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P < 0.05).

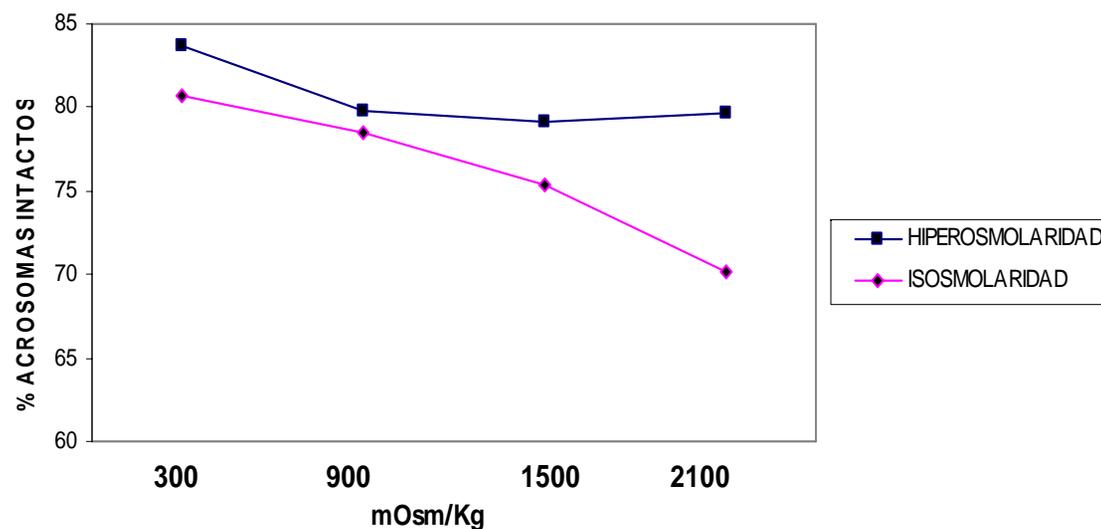


Figura 13. Espermatozoides con acrosoma intacto en los tratamientos de hiperosmolaridad (300, 900, 1500 y 2100 mOsm/kg) a -5° C por 15 minutos y al retorno a la isosmolaridad a 37°C por 15 minutos.

Cuadro 7. Espermatozoides con acrosoma Intacto (%) por individuo en la prueba de Hiperosmolaridad

Macho	Eyaculados (n)	Semen fresco	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
1	4	87.6 ± 6.9 ^{a x}	82.2 ± 12.9 ^{a x}	77.6 ± 6.7 ^{ab x}	82.1 ± 5.7 ^{a x}	83.3 ± 4.6 ^{a x}
2	4	79.7 ± 2.8 ^{b xy}	81.6 ± 1.2 ^{a x}	75.9 ± 4.1 ^{a xy}	69.7 ± 9.7 ^{b y}	78.6 ± 10.9 ^{a xy}
3	4	81.2 ± 4.7 ^{ab x}	84.0 ± 3.8 ^{a x}	81.5 ± 2.7 ^{ab x}	81.7 ± 2.7 ^{a x}	82.6 ± 4.3 ^{a x}
4	4	78.0 ± 5.3 ^{bc xz}	85.7 ± 3.2 ^{a y}	84.5 ± 1.7 ^{b xy}	82.3 ± 6.1 ^{a xyz}	76.3 ± 5.5 ^{a z}
5	4	83.5 ± 3.0 ^{ab x}	84.8 ± 4.9 ^{a x}	79.3 ± 7.6 ^{ab x}	80.1 ± 6.2 ^{a x}	76.9 ± 10.9 ^{a x}

Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P<0.05).

Cuadro 8. Espermatozoides con acrosoma Intacto (%) por individuo en la prueba de Isosmolaridad

Macho	Eyaculados (n)	300 mOsm/Kg	900 mOsm/Kg	1500 mOsm/Kg	2100 mOsm/Kg
1	4	86.3 ± 2.2 ^{a x}	81.2 ± 2.5 ^{a xy}	76.1 ± 7.5 ^{a yz}	69.7 ± 11.1 ^{a z}
2	4	76.1 ± 1.2 ^{b x}	72.8 ± 12.6 ^{a x}	73.5 ± 8.3 ^{a x}	69.1 ± 4.2 ^{a x}
3	4	78.9 ± 4.4 ^{bc x}	75.9 ± 3.4 ^{a xy}	72.6 ± 6.3 ^{a xy}	70.4 ± 2.8 ^{a y}
4	4	83.1 ± 2.7 ^{ac x}	80.4 ± 3.2 ^{a xy}	74.1 ± 7.9 ^{a yz}	69.4 ± 2.5 ^{a z}
5	4	79.3 ± 2.9 ^{bc x}	82.3 ± 6.8 ^{a x}	80.0 ± 7.9 ^{a x}	72.6 ± 17.4 ^{a x}

Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P< 0.05).

8.2 Congelación de semen y prueba de estrés osmótico

Los valores de las diferentes variables del semen fresco se presentan en el Cuadro 9; se puede observar que los valores promedio obtenidos se encuentran dentro del rango normal para la especie.

Los valores observados para espermatozoides capacitados no presentaron diferencias significativas entre individuos; sin embargo, en relación a la motilidad progresiva, la concentración espermática, el porcentaje de anormalidades, el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de acrosomas intactos presentaron diferencias significativas entre individuos, sin salir de los parámetros establecidos como normales para la especie porcina (Bonet *et al.*, 2006).

Cuadro 9. Valores promedio individuales de los parámetros evaluados en el semen fresco

Macho	Eyaculados (n)	Motilidad progresiva (%)	Concentración (millones/mL)	Anormalidades (%)	Viabilidad (%)	Acrosomas Intactos (%)	Espermatozoides Capacitados (%)
1	5	72.0 ± 2.7 ^a	435 ± 68 ^a	4.3 ± 1.3 ^a	90.8 ± 2.7 ^{ab}	90.3 ± 2.6 ^{abc}	17.3 ± 5.3 ^a
2	5	74.0 ± 4.2 ^{ab}	173 ± 63 ^{bc}	4.6 ± 1.0 ^{ab}	92.9 ± 1.6 ^a	89.8 ± 3.4 ^{abc}	13.0 ± 3.0 ^a
3	5	71.0 ± 2.2 ^a	309 ± 79 ^{acd}	4.6 ± 1.5 ^{ab}	89.9 ± 2.9 ^{ab}	92.3 ± 2.2 ^b	16.5 ± 3.0 ^a
4	5	77.0 ± 4.5 ^b	378 ± 74 ^{ad}	5.9 ± 4.2 ^{ab}	89.9 ± 4.5 ^{ab}	88.3 ± 2.8 ^{cde}	14.6 ± 4.3 ^a
5	5	73.0 ± 2.7 ^{ab}	593 ± 198 ^e	4.6 ± 2.6 ^{ab}	90.9 ± 1.9 ^{ab}	84.7 ± 3.0 ^e	18.1 ± 12.4 ^a
6	5	75.0 ± 3.5 ^{ab}	157 ± 83 ^{bf}	7.4 ± 1.6 ^b	88.7 ± 1.7 ^b	88.8 ± 2.0 ^{ad}	16.0 ± 5.9 ^a
Promedio	n=30	73.7 ± 3.7	341 ± 181	5.2 ± 2.4	90.5 ± 2.8	89.0 ± 3.2	15.9 ± 6.2

Los valores representan medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas dentro de las columnas son diferentes significativamente (P < 0.05).

8.2.1 Viabilidad espermática

En el Cuadro 10 se presentan los valores promedio e individuales de viabilidad del semen fresco determinados por SYBR-14/PI (Figura 14), posterior a los tratamientos de hiperosmolaridad (2100 mOsm/Kg), a la restauración de la isosmolaridad y al descongelado.

Los valores de viabilidad en el semen fresco fue estadísticamente diferente a los demás tratamientos ($P < 0.05$), asimismo la viabilidad del semen al restaurar la isosmolaridad fue diferente a los demás tratamientos ($P < 0.05$). Sin embargo, la viabilidad en el momento hiperosmótico y la viabilidad al descongelado se comportaron en forma similar, ya que no mostraron diferencias entre ambas ($P > 0.05$) (Figura 15).

Al comparar la respuesta entre machos dentro de tratamiento, se detectaron diferencias significativas en el semen fresco, en el momento de hiperosmolaridad y al descongelado ($P < 0.05$); no así para la prueba de isosmolaridad. Al comparar las respuestas del mismo macho en el semen fresco y en los diferentes tratamientos, se observó que en 4 machos no hubo diferencia entre los valores al momento de hiperosmolaridad y al descongelado.

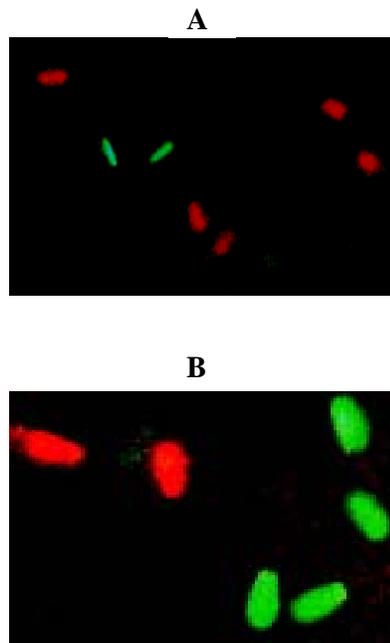


Figura 14. Fotografías de espermatozoides teñidos con SYBR-14/PI que muestran fluorescencia verde, los espermatozoides muertos muestran fluorescencia roja. A) 40x y B) 100x.

Cuadro 10. Viabilidad (%) en el semen fresco, en estrés osmótico y al descongelado

Macho	Eyaculados (n)	Viabilidad en Semen Fresco(%)	Viabilidad en Hiperosmolaridad (%)	Viabilidad en Isosmolaridad (%)	Viabilidad al Descongelado(%)
1	5	90.8 ± 2.7 ^{ab x}	35.8 ± 7.9 ^{ab y}	14.5 ± 10.1 ^{az}	33.2 ± 4.0 ^{ay}
2	5	92.9 ± 1.6 ^{aw}	29.3 ± 4.3 ^{ax}	16.9 ± 8.8 ^{ay}	39.9 ± 9.0 ^{abz}
3	5	89.9 ± 2.9 ^{abw}	35.9 ± 4.8 ^{abx}	11.2 ± 3.3 ^{ay}	22.6 ± 1.4 ^{cz}
4	5	89.9 ± 4.5 ^{abx}	38.1 ± 6.2 ^{aby}	16.5 ± 6.9 ^{az}	34.9 ± 5.1 ^{aby}
5	5	90.9 ± 1.9 ^{abx}	38.1 ± 7.9 ^{aby}	13.0 ± 6.6 ^{az}	37.0 ± 6.6 ^{aby}
6	5	88.7 ± 1.7 ^{bx}	38.4 ± 9.3 ^{by}	9.4 ± 1.8 ^{az}	42.1 ± 8.1 ^{by}
Promedio	n=30	90.5 ± 2.8^x	35.9 ± 7.1^y	13.6 ± 6.8^z	34.9 ± 8.6^y

Los valores representan medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas son diferentes significativamente (P<0.05). Los valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P<0.05).

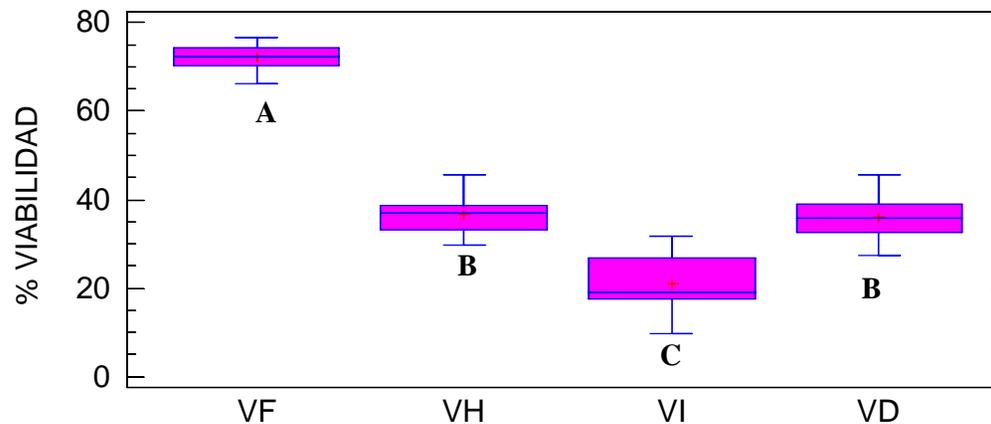


Figura 15. Viabilidad en semen fresco (VF), momento de hiperosmolaridad (VH), isosmolaridad (VI) y al descongelado (VD). Letras diferentes indican diferencias estadísticas (P<0.05).

8.2.2 Acrosomas intactos

En el Cuadro 11 se presentan los valores promedio y por individuo de los espermatozoides con acrosoma intacto determinados por PSA-FITC (Figura 16) en el semen fresco, posterior a los tratamientos de hiperosmolaridad (2100 mOsm/Kg), posterior a la restauración de la isosmolaridad y al descongelado. La comparación entre tratamientos reveló que los valores obtenidos en la prueba de hiperosmolaridad y los obtenidos al descongelado fueron similares, es decir que no hubo diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, el valor en el semen fresco fue diferente a todos los demás así como el valor en el semen al restaurar la isosmolaridad fue diferente a todos los demás ($P < 0.05$) (Figura 17).

Al comparar la respuesta entre machos dentro de tratamiento, se observaron diferencias significativas solo en el semen fresco ($P < 0.05$); no así para los valores en la prueba de hiperosmolaridad, isosmolaridad y al descongelado. Al comparar las respuestas del mismo macho en semen fresco y a los diferentes tratamientos, se observó que en 5 de los 6 machos no hubo diferencia entre los valores de la prueba hiperosmótica y al descongelado ($P > 0.05$).

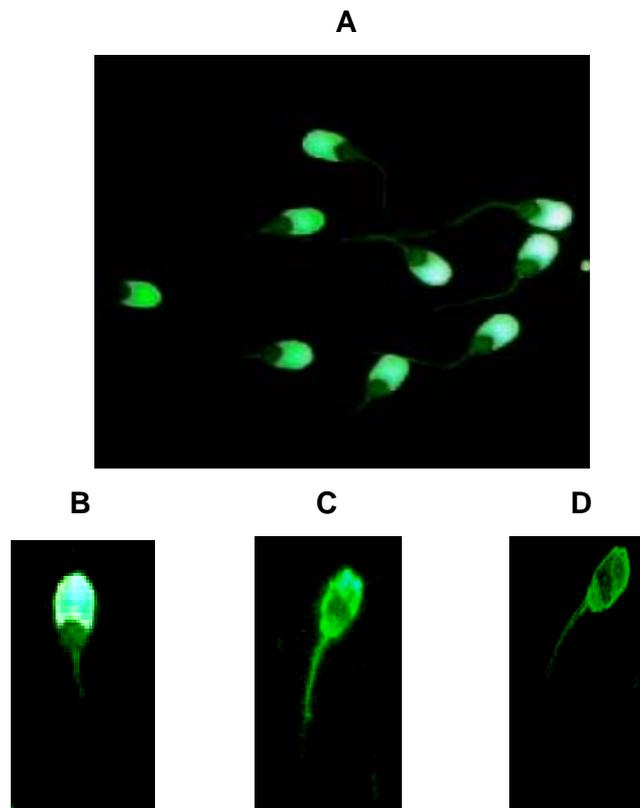


Figura 16. Fotografías de espermatozoides teñidos con PSA-FITC para determinar el estado del acrosoma. A) Vista general a 100x. B) Acrosoma intacto con borde apical definido. C) Acrosoma dañado con pérdida de continuidad del borde apical. D) E spermatozoide con reacción acrosomal.

Cuadro 11. Espermatozoides con acrosoma intacto (%) en semen fresco, en estrés osmótico y al descongelado

Macho	Eyaculados (n)	Acrosomas Intactos Semen Fresco (%)	Acrosomas Intactos Hiperosmolaridad (%)	Acrosomas Intactos Isosmolaridad (%)	Acrosomas Intactos Descongelado (%)
1	5	90.3 ± 2.6 ^{abc x}	82.5 ± 2.7 ^{ay}	72.5 ± 7.0 ^{az}	81.8 ± 1.9 ^{ay}
2	5	89.8 ± 3.4 ^{abc x}	75.8 ± 10.7 ^{ay}	65.7 ± 15.3 ^{ay}	77.1 ± 9.0 ^{ay}
3	5	92.3 ± 2.2 ^{b x}	81.3 ± 3.1 ^{ay}	69.9 ± 10.0 ^{az}	81.1 ± 4.8 ^{ay}
4	5	88.3 ± 0.3 ^{cde (x)}	81.0 ± 4.6 ^{ay}	68.4 ± 3.2 ^{az}	79.0 ± 1.3 ^{ay}
5	5	84.7 ± 3.0 ^{e (x)}	81.0 ± 5.2 ^{axy}	70.9 ± 5.8 ^{az}	78.8 ± 3.2 ^{ay}
6	5	88.9 ± 2.0 ^{ad (x)}	79.4 ± 1.7 ^{ay}	68.0 ± 8.8 ^{az}	78.8 ± 3.6 ^{ay}
X	5	89.0 ± 3.2^x	80.1 ± 5.5^y	69.2 ± 8.6^z	79.5 ± 4.6^y

Los valores representan medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas difieren estadísticamente (P< 0.05). Los Valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente (P< 0.05).

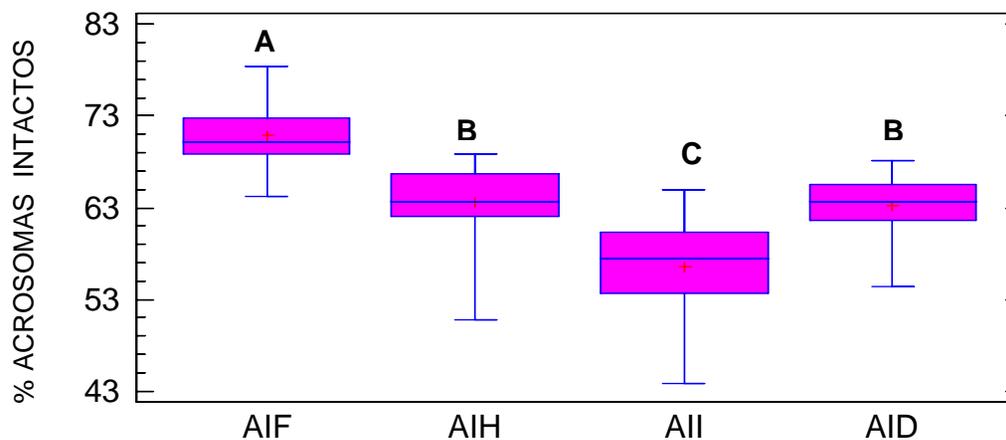


Figura 17. Espermatozoides con acrosoma intacto en semen fresco (AIF), en hiperosmolaridad (AIH), isosmolaridad (AII) y al descongelado (AID). Letras diferentes indican diferencias estadísticas (P<0.05)

8.2.3 Motilidad progresiva

En el Cuadro 12 se presentan los valores promedio y por individuo de la motilidad progresiva del semen fresco y al descongelado. Al comparar los valores del semen fresco y al descongelado se observaron diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$) (Figura 18).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores promedio y los valores individuales de motilidad en el semen fresco y al descongelado, asimismo al comparar las respuestas entre machos en el semen fresco y al descongelado se observaron diferencias entre todos estos ($P < 0.05$) (Figura 19).

Cuadro 12. Motilidad Progresiva (%) en semen fresco y al descongelado

Macho	Eyaculados (n)	Motilidad Progresiva en Semen Fresco (%)	Motilidad Progresiva al Descongelado (%)
1	5	72.0 ± 2.7 ^{a x}	45.0 ± 7.6 ^{a y}
2	5	74.0 ± 4.2 ^{ab x}	50.0 ± 8.7 ^{a y}
3	5	71.0 ± 2.2 ^{a x}	29.7 ± 6.0 ^{b y}
4	5	77.0 ± 4.5 ^{b x}	50.7 ± 16.7 ^{a y}
5	5	73.0 ± 2.7 ^{ab x}	42.0 ± 8.5 ^{ab y}
6	5	75.0 ± 3.5 ^{ab x}	53.7 ± 5.7 ^{a y}
X	5	73.7 ± 3.7^x	45.2 ± 11.9^y

Los valores representan medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas difieren significativamente ($P < 0.05$). Valores con literales distintas (w,x,y,z) dentro de las filas son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

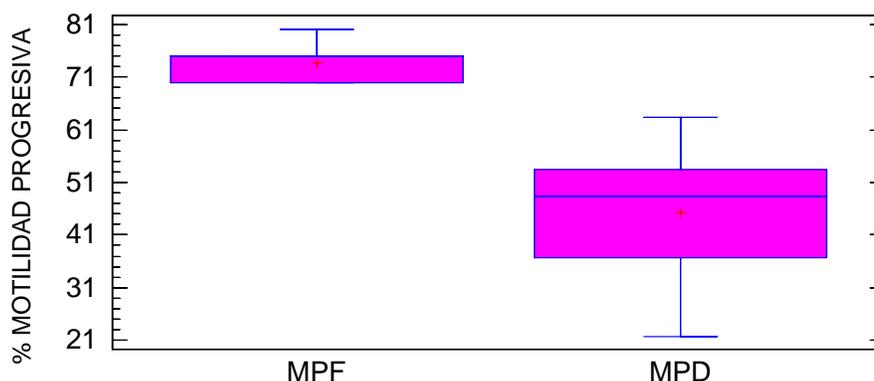


Figura 18. Motilidad progresiva en el semen fresco (MPF), y al descongelado (MPD). Estos valores difieren significativamente ($P < 0.05$).

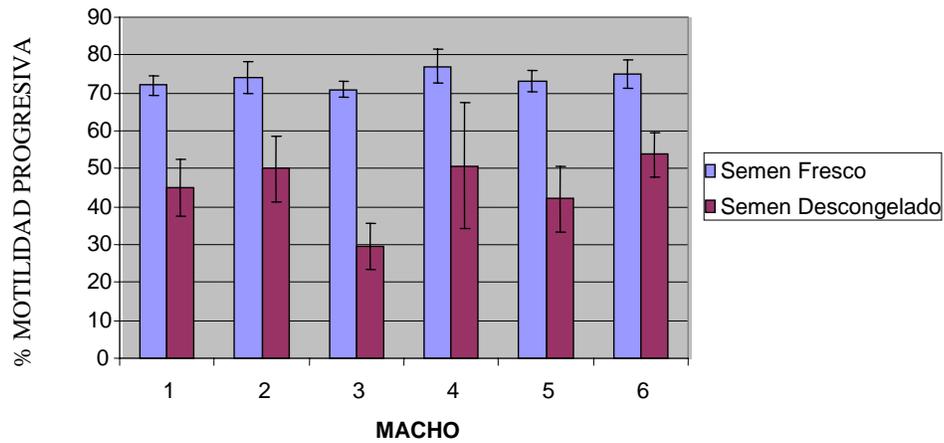


Figura 19. Motilidad progresiva en el semen fresco y al descongelado por individuo, Las cuales difieren significativamente ($P < 0.05$).

8.2.4 Estado de capacitación

Se determinó el estado de capacitación espermática de acuerdo a los patrones de fluorescencia de la prueba de la clortetraciclina (CTC) (Figura 20). En el Cuadro 13 se presentan los valores promedio y por cada individuo de los patrones de la prueba de la clortetraciclina en el semen fresco (Figura 21); en el Cuadro 14 se presentan los valores al descongelado (Figura 22). No se observaron diferencias significativas entre machos en semen fresco y al descongelado.

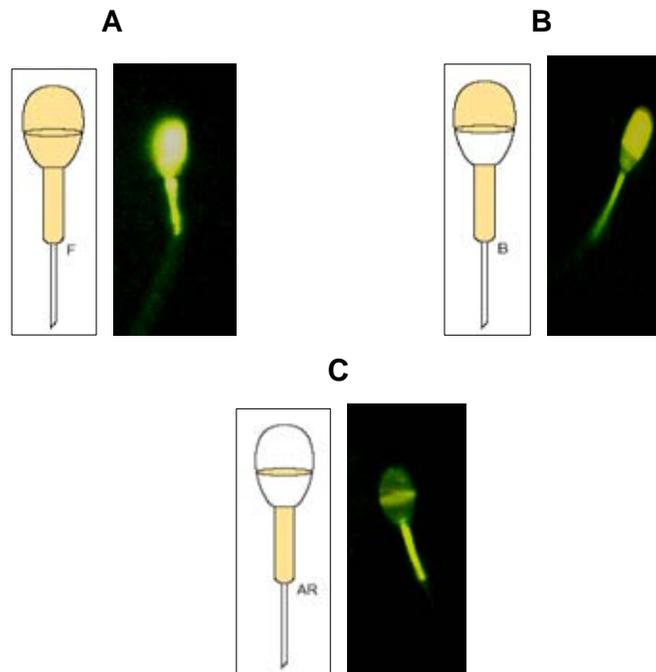


Figura 20. Espermatozoides mostrando los patrones de fluorescencia obtenidos (CTC) para determinar el estado de capacitación. Se muestra la representación esquemática de cada uno de ellos: Espermatozoides no capacitados (Patrón F), capacitados con acrosoma intacto (Patrón B) y capacitados con reacción acrosomal (Patrón AR).

Cuadro 13. Patrones de la prueba de clortetraciclina (%) en semen fresco

Macho	Eyaculados (n)	Espermatozoides Patrón F (%)	Espermatozoides Patrón B (%)	Espermatozoides Patrón AR (%)
1	5	82.8 ± 5.4	9.5 ± 6.5	7.7 ± 4.0
2	5	87.0 ± 3.0	8.0 ± 1.6	5.0 ± 3.7
3	5	83.5 ± 3.0	9.5 ± 3.7	6.9 ± 3.2
4	5	83.4 ± 4.5	8.5 ± 3.1	6.1 ± 3.7
5	5	80.7 ± 11.8	9.4 ± 8.7	8.8 ± 5.2
6	5	84.0 ± 5.9	6.8 ± 2.6	9.2 ± 4.3
X	5	83.6 ± 6.1	8.6 ± 4.7	7.3 ± 3.9

Los valores representan medias ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas entre machos para cada patrón.

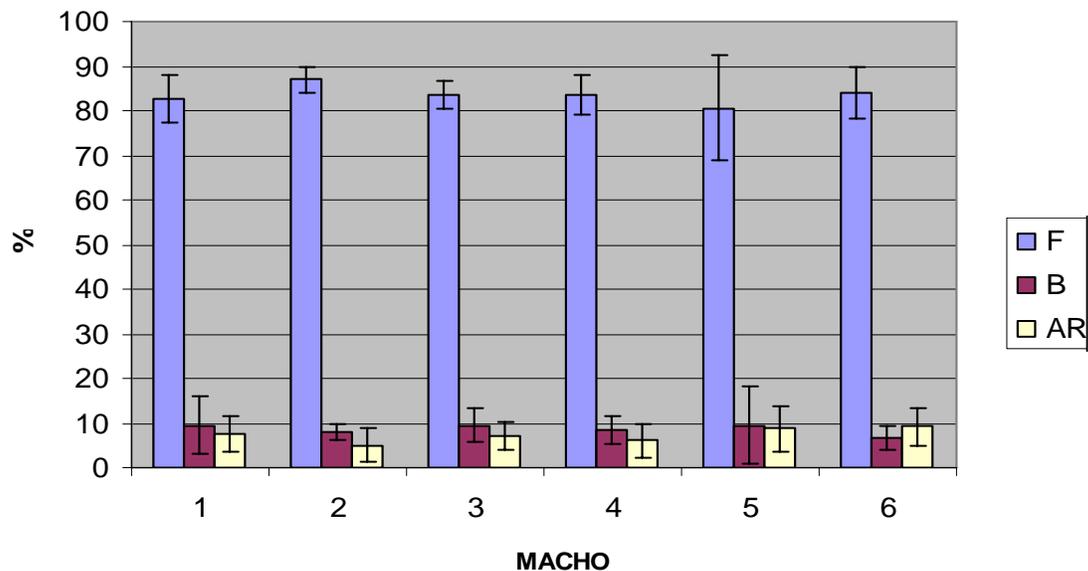


Figura 21. Estado fisiológico de los espermatozoides en semen fresco determinado por CTC. Espermatozoides no capacitados (Patrón F), capacitados con acrosoma intacto (Patrón B) y capacitados con reacción acrosomal (Patrón AR).

Cuadro 14. Patrones de la prueba de clortetraciclina (%) en semen descongelado

Macho	Eyaculados (n)	Espermatozoides Patrón F (%)	Espermatozoides Patrón B (%)	Espermatozoides Patrón AR (%)
1	5	25.6 ± 8.7	61.8 ± 11.4	12.6 ± 3.9
2	5	24.8 ± 1.7	57.2 ± 4.8	14.4 ± 5.2
3	5	27.6 ± 1.8	59.4 ± 5.6	13.0 ± 4.0
4	5	27.8 ± 6.4	58.3 ± 7.1	13.9 ± 3.5
5	5	25.0 ± 4.7	60.3 ± 6.7	14.7 ± 5.3
6	5	25.6 ± 11.2	59.6 ± 13.4	14.8 ± 4.1
X	5	26.7 ± 6.2	59.4 ± 8.1	13.9 ± 4.1

Los valores representan medias ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas entre machos para cada patrón.

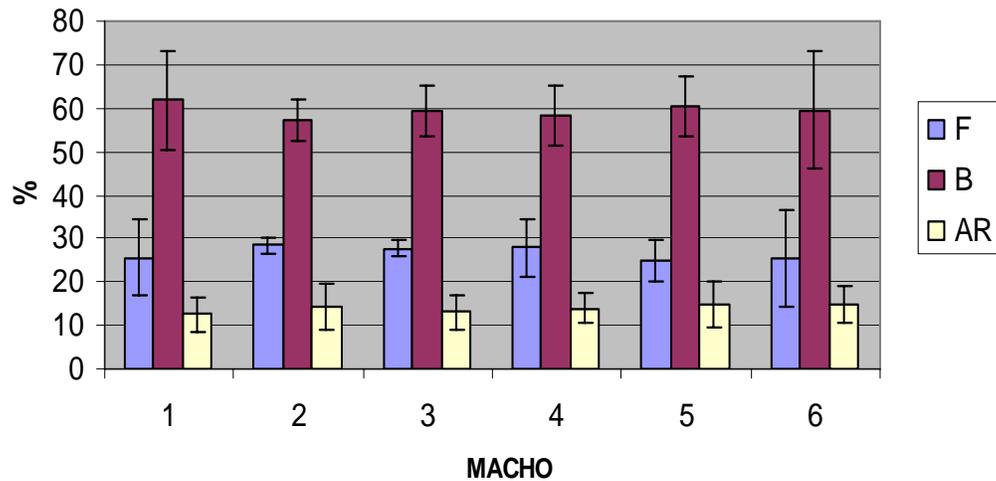


Figura 22. Estado fisiológico de los espermatozoides en semen descongelado determinado por CTC. descongelado. Espermatozoides no capacitados (Patrón F), capacitados con acrosoma intacto (Patrón B) y con reacción acrosomal (Patrón AR). No se observaron diferencias significativas entre machos para cada patrón.

En el Cuadro 15 se presentan los valores promedio y por cada individuo del estado de capacitación espermática en el semen fresco y al descongelado. Al comparar el porcentaje de espermatozoides capacitados (Patrones B+AR) en el semen fresco y al descongelado se observaron diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$) (Figura 23).

Cuadro 15. Espermatozoides capacitados (%) en semen fresco y al descongelado (Patrones B+AR)

Macho	Eyaculados (n)	Espermatozoides Capacitados Semen Fresco (%)	Espermatozoides Capacitados al descongelado (%)
1	5	17.3 ± 5.3 ^{a x}	74.4 ± 8.7 ^{a y}
2	5	13.0 ± 3.0 ^{a x}	71.6 ± 1.7 ^{a y}
3	5	16.5 ± 3.0 ^{a x}	72.4 ± 1.8 ^{a y}
4	5	14.6 ± 4.3 ^{a x}	72.2 ± 6.4 ^{a y}
5	5	18.1 ± 12.4 ^{a x}	75.0 ± 4.7 ^{a y}
6	5	16.0 ± 6.0 ^{a x}	74.4 ± 11.2 ^{a y}
Promedio	n=30	15.9 ± 6.2^x	73.3 ± 6.2^y

Los valores representan medias ± desviación estándar. Valores con literales distintas (a,b,c) dentro de las columnas difieren significativamente ($P < 0.05$). Valores con literales distintas (x,y) dentro de las filas son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

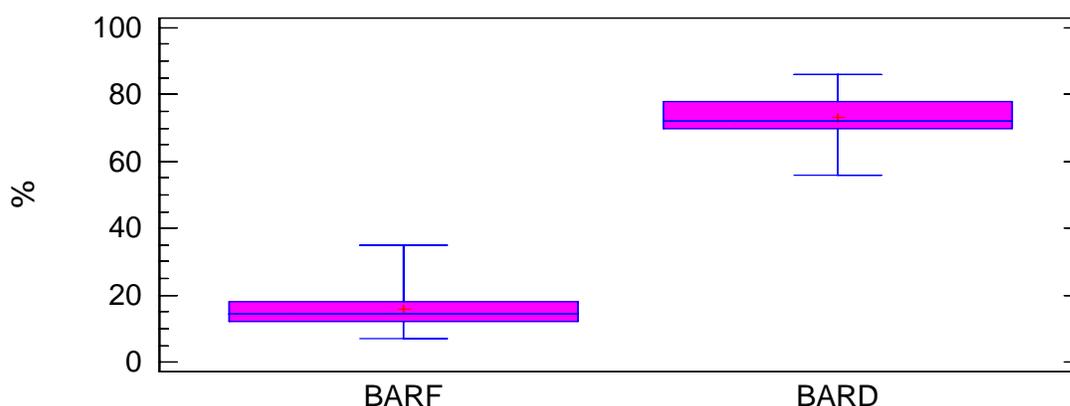


Figura 23. Espermatozoides Capacitados en semen fresco (BARF) y al descongelado (BARD). Estos valores difieren significativamente ($P < 0.05$).

8.3 Correlaciones

En el Cuadro 16 se presentan los valores de correlación entre algunas de las variables estudiadas. Los valores de correlaciones entre la viabilidad en el momento hiperosmótico y la viabilidad al descongelado, y entre la viabilidad al restablecer la isosmolaridad y la viabilidad al descongelado fueron pequeños y no significativos. En contraste, se obtuvo un valor de correlación significativo para acrosomas intactos en el momento hiperosmótico y acrosomas intactos al descongelado ($r=0.81$. $P<0.01$) (Figura 24); asimismo, para acrosomas intactos al restablecer la isosmolaridad y acrosomas intactos al descongelado ($r=0.90$. $P<0.01$) (Figura 25). Además, se obtuvo un valor de correlación significativo entre la viabilidad al descongelado y la motilidad progresiva al descongelado ($r=0.66$. $P<0.01$) (Figura 26).

Cuadro 16. Correlaciones entre variables de calidad espermática obtenidas de la prueba de estrés osmótico y del proceso de crioconservación

Variabes	Correlación	Nivel de significancia
Viabilidad en Hiperosmolaridad Viabilidad al Descongelado	$r = 0.20$	ns
Viabilidad en Isosmolaridad Viabilidad al Descongelado	$r = 0.12$	ns
Acrosomas Intactos en Hiperosmolaridad Acrosomas Intactos al Descongelado	$r = 0.81$	$P<0.01$
Acrosomas Intactos en Isosmolaridad Acrosomas Intactos al Descongelado	$r = 0.90$	$P<0.01$
Viabilidad al Descongelado Motilidad Progresiva al Descongelado	$r = 0.66$	$P<0.01$

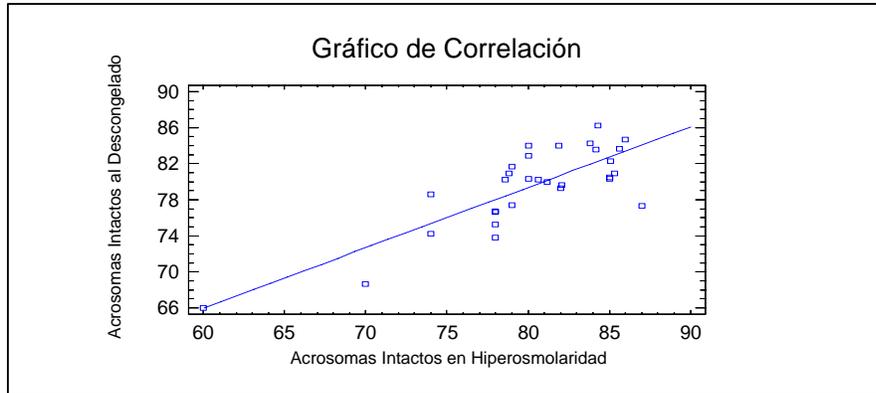


Figura 24. Correlación entre acrosomas intactos en el momento hiperosmótico y acrosomas intactos al descongelado ($r = 0.81$, $P < 0.01$).

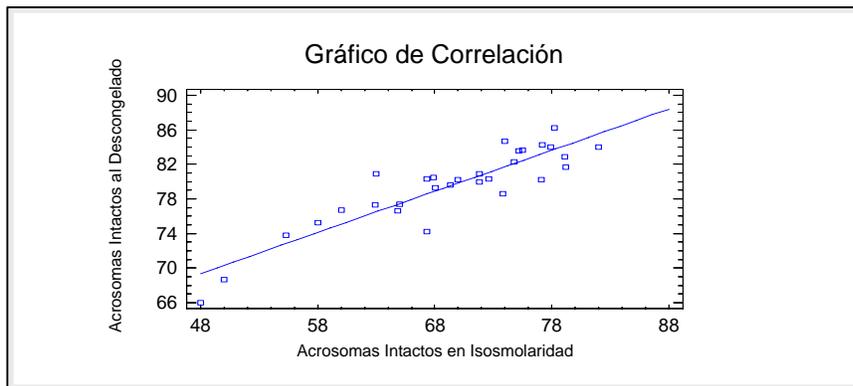


Figura 25. Correlación entre acrosomas intactos al restablecer la isosmolaridad y acrosomas intactos al descongelado ($r = 0.90$, $P < 0.01$).

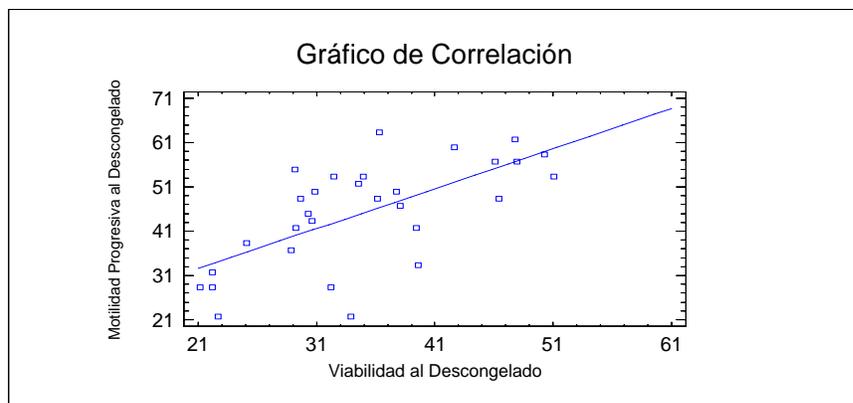


Figura 26. Correlación entre la motilidad progresiva al descongelado y la viabilidad al descongelado ($r = 0.66$, $P < 0.01$).

8.4 Comparativo de la determinación de la viabilidad espermática por SYBR-14 y Eosina-Nigrosina

En el Cuadro 17 se presenta la comparación de la determinación de viabilidad en semen fresco y semen descongelado mediante tinciones fluorescentes (SYBR-14/PI) y con la tinción Eosina-Nigrosina. Los valores obtenidos de ambas técnicas fueron diferentes en el semen descongelado ($P < 0.05$), no así en el semen en fresco.

Cuadro 17. Comparativo de la viabilidad espermática determinada con la tinción fluorescente SYBR-14/PI y con tinción Eosina-Nigrosina

Tinción	Viabilidad en Semen Fresco (%)	Viabilidad al Descongelado (%)
SYBR-14/PI	90.5 ± 2.8 ^a	34.9 ± 8.6 ^a
Eosina-Nigrosina	90.3 ± 4.6 ^a	66.0 ± 7.8 ^b

Los valores representan medias ± desviación estándar. Los valores con literales distintas dentro de las columnas son diferentes significativamente ($P < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

La incubación de los espermatozoides en soluciones hiperosmóticas se realizó con la intención de simular el estrés osmótico que sufre la célula durante el proceso de congelación; la posterior incubación en soluciones hiposmóticas para el restablecimiento de las condiciones de isosmolaridad se realizó para simular el proceso de descongelación.

9.1 Incubación en soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que cuando los espermatozoides porcinos son incubados en soluciones hiperosmóticas, se observa una disminución en la viabilidad espermática y un aumento en la proporción de acrosomas alterados conforme aumenta la osmolaridad, siendo más intensos estos efectos cuanto los espermatozoides son incubados en condiciones de isosmolaridad.

Con respecto a la observación anterior parece ser que el espermatozoide mantiene la integridad de la membrana en soluciones hiperosmóticas siempre y cuando no sea retornado a la isosmolaridad, pero en cuanto esto sucede se muestra una disminución significativa sobre la viabilidad; este fenómeno también se ha observado en espermatozoides de humano (Gao *et al.*, 1993; Curry y Watson, 1994), de carnero (Holt y North 1994), de cerdo (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Medrano, 1998), de equino (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Pommer *et al.*, 2002), además de otros tipos celulares como eritrocitos de humano (Zade-Oppen, 1968; Farrant y Woolgar, 1972), granulocitos de humano (Armitage y Mazur, 1981) y en células de adenocarcinoma prostático humano (Zawlodzka y Takamatsu, 2005); debido a lo anterior, a este tipo de daño se le ha definido como “daño posthipertónico”.

Cabe mencionar que en los trabajos mencionados anteriormente la incubación en las soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas se llevó a cabo a una temperatura siempre superior a 0°C, a diferencia del presente trabajo en el que la incubación en hiperosmolaridad se realizó a -5°C y la incubación en isosmolaridad a 37°C, a las cuales también se observó un comportamiento similar.

Con respecto al factor de la temperatura, se ha observado un efecto dependiente de la temperatura sobre el daño posthipertónico, lo que quiere decir que este tipo de daño se reduce con una disminución de la temperatura. Gao *et al.* (1993) observaron un daño menor en el espermatozoide humano posterior al estrés hiperosmótico a 0°C en comparación con 8 y 22°C. En este mismo sentido, Caiza de la Cueva *et al.* (1997) observaron que la incubación a 37°C provocó mayor daño sobre la viabilidad y el estado del acrosoma porcino que cuando se realizó a 4 y 16°C. En el presente trabajo se utilizó una temperatura de -5°C para llevar a cabo la incubación en soluciones hiperosmóticas, con la intención de imitar la temperatura a que se forma el hielo en los diluyentes de uso común.

Por lo anterior, se han dado razones para explicar el efecto de la temperatura y se ha demostrado que los espermatozoides sometidos al proceso de osmoregulación en ausencia de temperatura baja, presentan cambios notables en la integridad de la membrana plasmática, desorden y empaquetamiento lipídico, viabilidad celular y motilidad; también se demostró que hay detrimento de los mecanismos de señalización; por lo que se ha sugerido que el estrés del medio al espermatozoide, particularmente el estrés osmótico, dirige la respuesta celular en varias formas las cuales incluyen dinámicas de membrana, función mitocondrial, estructura y difusión de la membrana plasmática y señalización celular (Meyers, 2005).

Por otro lado, posiblemente el efecto de la temperatura puede ser una consecuencia de la diferencia del grado de fluidez de la membrana plasmática, a la modificación de la temperatura del medio, lo cual podría cambiar la capacidad del espermatozoide para la regulación de la osmolaridad y del volumen celular (Watson y Duncan, 1988; Lingrel y Kuntzweiler, 1994).

Finalmente, con respecto a la temperatura, si el daño post-hipertónico se reduce con la disminución de ésta, esto podría explicar parcialmente la razón por la cuál el proceso de enfriado lento es usado en la actualidad en la crioconservación de células espermáticas, ya que durante el proceso de enfriado lento, las células pueden experimentar más de 8000 mOsm/Kg de estrés hipertónico por un largo periodo a temperaturas bajas debido a la precipitación del agua extracelular como hielo (Mazur *et*

al., 1981); en contraste, para los granulocitos humanos se ha observado que un descenso de temperatura aumenta el daño post-hipertónico, por lo que se entendería el poco éxito obtenido para su crioconservación (Armitage y Mazur, 1981).

Otro factor a tomar en cuenta son los elementos utilizados para la elaboración de las soluciones, en el presente trabajo se utilizó glucosa adicionada en el medio de congelación BF5 para obtener los diferentes valores de osmolaridad. Mediante la utilización de soluciones hiperosmóticas preparadas con glicerol, cloruro de sodio y glucosa se obtuvieron los valores más altos en viabilidad y acrosomas intactos para porcinos con las soluciones preparadas con glucosa (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997) y para humanos con glicerol (Gao *et al.*, 1993), valores muy similares a los obtenidos en este trabajo.

Con respecto a los efectos de la glucosa Crowe *et al.* (1990), mencionan que la glucosa puede estabilizar las membranas mediante la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato o los fosfolípidos de membrana y por lo tanto podría otorgar protección adicional al espermatozoide durante la disminución y aumento de volumen.

En cuanto a la variación en los resultados obtenidos en el comportamiento espermático entre especies, posiblemente se deba al grado de permeabilidad al glicerol entre éstas, siendo no la única diferencia, ya que el porcentaje de agua osmóticamente inactiva en el espermatozoide porcino es casi el doble del espermatozoide humano, bovino o de ratón (Du *et al.*, 1994); esto implica que el proceso de deshidratación del espermatozoide porcino a niveles no letales durante el proceso de enfriamiento es mucho más complicado que en el humano. Ambos factores pueden ser incluidos entre las posibles explicaciones de la baja tasa de criosupervivencia del espermatozoide porcino.

Otro aspecto a tomarse en cuenta y de gran importancia de la diferencia entre especies es la observación de que el espermatozoide porcino es altamente sensible a los cambios osmóticos; sólo puede tolerar un aumento de volumen y de crenación de 1.02 y 0.97 veces su volumen celular isosmótico, respectivamente, manteniendo más de 70% de motilidad (Gilmore *et al.*, 1998), cuyo volumen isosmótico se ha determinado y

es de $26.3 \mu\text{m}^3$ y volumen celular osmóticamente inactivo del 67.4% (Gilmore *et al.*, 1996). En comparación con el espermatozoide porcino, se ha demostrado que el espermatozoide humano tolera un aumento de volumen celular de 1.1 veces y de crenación 0.75 veces su volumen isosmótico, manteniendo el 90% de motilidad (Gao *et al.*, 1995) mientras que el espermatozoide de ratón puede crenar y aumentar su volumen celular 0.76 y 1.24 veces su volumen celular isosmótico respectivamente, manteniendo un 80% de motilidad (Willoughby *et al.*, 1996).

De acuerdo con Meyers (2005), la capacidad del espermatozoide para responder al cambio del volumen celular está determinado por varios factores incluyendo la composición fosfolipídica de la membrana plasmática, permeabilidad al agua, temperatura de transición de fase lipídica, actividad Na^+/K^+ ATPasa, canales de agua, canales iónicos y elementos del citoesqueleto.

Otro factor de gran importancia, es el tiempo de exposición, ya que se ha visto que el daño posthipertónico se presenta en función del tiempo de exposición al ambiente hiperosmótico previo al retorno a condiciones isosmóticas. Gao *et al.* (1993) obtuvieron los mejores valores de supervivencia con el menor tiempo de exposición a soluciones hiperosmóticas. Se ha demostrado que el daño provocado por la rehidratación aumenta conforme aumenta el tiempo de exposición a soluciones hiperosmóticas, esto es posible debido a que el daño por rehidratación se considera es el resultado del daño ultraestructural de la membrana provocado por la deshidratación y contracción.

Han y Bischof (2004) mencionan que una de las principales razones por la que es difícil determinar el daño por efecto de los solutos, se debe a que este efecto es muy complejo, ya que involucra el comportamiento de cambio de fase de soluciones fisiológicas, las cuales son mezclas de agua, electrolitos (principalmente NaCl), proteínas y muchos otros solutos.

Es de gran importancia hacer notar que mediante la utilización de criomicroscopía de fluorescencia en espermatozoides de carnero (Holt *et al.*, 1992) y porcino (Medrano *et al.*, 2002), se ha notado que la viabilidad del espermatozoide se mantiene durante el proceso de congelación pero disminuye significativamente durante el proceso de descongelación, de forma similar al daño posthipertónico observado en la primera parte del presente trabajo.

9.2 Proceso de congelación-descongelación

9.2.1 Viabilidad

En el presente trabajo se observó una disminución significativa del porcentaje de viabilidad, entre lo observado en semen fresco (90.5%) y posterior al descongelado (34.9%). Cerolini *et al.* (2001) reportaron una disminución de la viabilidad de aproximadamente 50% al descongelado; resultados obtenidos por Medrano (1998) indican que la viabilidad al descongelado varió entre 4 y 36%, en ambos trabajos la viabilidad se determinó mediante compuestos fluorescentes (SYBR-14/PI).

Se observaron diferencias entre los porcentajes de viabilidad en semen fresco y al descongelado, notándose que los machos que presentaron los valores más elevados en fresco no son precisamente los que obtuvieron los valores más altos al descongelado y viceversa; al respecto, Woelders *et al.* (1996) mencionan que la calidad espermática en el semen fresco y al descongelado no están relacionadas, mientras que, por el contrario Cerolini *et al.* (2001) mencionan que una viabilidad espermática elevada antes del proceso de congelación es indicativa de una elevada viabilidad al descongelado. Estos resultados indican variaciones de la resistencia entre machos al proceso de congelación-descongelación; de acuerdo con Medrano *et al.* (2002) la viabilidad al descongelado en algunos machos tiende a ser superior que otros, independientemente de las tasas de enfriamiento utilizadas.

9.2.2 Acrosoma

En el presente trabajo se observó una disminución de acrosomas intactos en el semen descongelado (79.5%) en comparación con los valores observados en el semen fresco (89%) valores muy similares a los obtenidos por Flores (2005) de 77,9% al descongelado utilizando el tratamiento de enfriado pre-congelación de -°5C. No se observaron diferencias significativas al descongelado entre machos.

Debido a que la integridad acrosomal no necesariamente refleja la integridad de la membrana plasmática, la combinación de las dos pruebas otorga una medición más adecuada de ambos que una por sí sola (Holt, 2000).

A este respecto, Valcárcel *et al.* (1996) determinaron que cerca del 18% de los espermatozoide ovinos sometidos a la congelación y descongelación y con membrana plasmática dañada presentaron acrosomas intactos; por otra parte Sukardi *et al.* (1997) y Guthrie y Welch (2005) observaron mediante el uso de yoduro de propidio y lectinas que un espermatozoide puede presentar daño a la membrana plasmática y mantener un acrosoma intacto; por lo que en el presente trabajo la determinación del estado acrosomal se llevó a cabo en células permeabilizadas mediante la utilización de la lectina aglutinina *Pisum sativum* conjugada con isotiocionato de fluoresceína (PSA-FITC) que se ha utilizado como tinción selectiva del acrosoma (Cross y Meizel, 1989); y que muestra afinidad por los residuos terminales alfa-D-glucosil y alfa-D-manosil de glicoproteínas uniéndose específicamente al alfa-manosido que se encuentra en el contenido acrosomal (Cross *et al.*, 1986).

9.2.3 Motilidad

La evaluación de la motilidad espermática post-descongelación se utiliza ampliamente como referencia de la supervivencia espermática (Holt, 2000). En el presente trabajo, el porcentaje de motilidad progresiva en el semen fresco (73.7%), disminuyó significativamente posterior al proceso de congelación y descongelación (45.2%), con una reducción de aproximadamente 40%, lo que concuerda con resultados obtenidos por Cerolini *et al.* (2001) con una disminución similar para espermatozoides porcinos; mientras que Medrano (1998) reportó porcentajes de motilidad al descongelado entre 1 y 38%.

No se observaron diferencias estadísticas entre los porcentajes de motilidad en semen fresco y al descongelado entre verracos, el macho con el porcentaje más alto en semen fresco obtuvo el porcentaje mas alto al descongelado, así como el macho con el porcentaje más bajo de igual manera obtuvo el porcentaje más bajo al descongelado, Cerolini *et al.* (2001) obtuvieron resultados similares; sin embargo, Woelders *et al.* (1996) mencionan que la motilidad antes y después de la congelación no están relacionadas.

9.2.4 Capacitación

Previo a la prueba de la clortetraciclina (CTC) se suele determinar la viabilidad celular evitando de esta forma examinar espermatozoides muertos y células con reacción acrosomal (Hewitt y England, 1998). Mediante el uso de yoduro de propidio se ha confirmado que el flujo de calcio al interior y exterior celular solo ocurre en la población de células vivas, por lo que la detección de cambios en la población completa probablemente daría como resultado concentraciones exageradas de calcio intracelular como resultado de la disfunción de las membranas de células no viables (Green y Watson, 2001). En el presente trabajo se utilizó fibra de vidrio y el Sephadex, que es un método que incluye sustancias adhesivas, para eliminar los espermatozoides muertos y otras impurezas del eyaculado (Bonet *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que durante la incubación de espermatozoides en medios de capacitación, se ha observado un aumento gradual en el número de espermatozoides clasificados en el patrón B de la prueba de la clortetraciclina, sugiriendo que este patrón es un marcador que indica capacitación (Kaneto *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se observó un aumento del porcentaje de células mostrando el patrón B en el semen descongelado (59.4%) en relación con el semen fresco (8.6%), este efecto también se ha observado después de la crioconservación por Maxwell y Johnson (1997) y Flores (2005) en espermatozoides porcinos; por Pérez *et al.* (1996), Gillan *et al.*, (1997) y Ríos (2005) en espermatozoides ovinos y por Cormier *et al.* (1997) en espermatozoides bovinos; en adición, el mismo efecto se ha observado cuando los espermatozoides son enfriados y posteriormente sufren un proceso de calentamiento; en espermatozoides de porcino enfriados a 5°C (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997) en espermatozoides de bovino a 4°C (Cormier *et al.*, 1997) y espermatozoides de ratón a 4°C (Fuller y Whittingham, 1996; 1997).

En adición a lo anterior, Green y Watson (2001), observaron que al someter espermatozoides de porcino a 4°C, se presenta un aumento en el patrón B, sólo al calentamiento a 39°C, y no así cuando se calentó a 22°C o en espermatozoides mantenidos a temperatura ambiente y recalentados a 39°C, indicando posiblemente mecanismos enzimáticos en los cuales la temperatura de 22°C no es capaz de inducir los cambios similares a la capacitación; al respecto, Harrison y Gadella (2005)

mencionan que la inducción de la capacitación por medio de la actividad de la escramblasa mediada por bicarbonato en la membrana plasmática, sólo se lleva a cabo a temperaturas fisiológicas, y no se observa a temperatura ambiente en medios de conservación que contienen bicarbonato como el BTS.

Debido a lo mencionado anteriormente, es de gran importancia el entendimiento de los procesos y determinar si los cambios observados posterior al enfriamiento y crioconservación son los mismos a los observados *in vivo* o incluso *in vitro* (Curry, 2000). A este respecto, hay evidencia de diferencias en espermatozoides porcinos entre los intermediarios fosforilados que pueden determinarse después de la capacitación *in vitro* y los intermediarios determinados después del enfriamiento lento; en particular se ha notado que una proteína de 32 kDa (p32) es autofosforilada en la capacitación del espermatozoide porcino (Tardif *et al.*, 2001; Kaneto *et al.*, 2002), misma proteína que fue detectada posterior a un tratamiento de enfriamiento lento a 4°C de semen porcino (Kaneto *et al.*, 2002), incluso en ausencia de factores de capacitación como calcio, bicarbonato y albúmina.

Por otra parte, Green y Watson (2001) concluyen que el espermatozoide enfriado a 5°C tiene características similares a la capacitación en cuanto a cambios de membrana y el incremento en las concentraciones intracelulares de calcio, sin embargo, en cuanto a los patrones de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas se mostró que no son procesos idénticos e involucran rutas alternativas de activación que conducen a un punto final: la desestabilización de membranas que sufrirá una reacción acrosomal.

Sin embargo, Anzar *et al.* (2002) mencionan que cuando se trabaja con espermatozoides descongelados los patrones de cambios similares a la capacitación pertenecen casi exclusivamente a los espermatozoides dañados. A este respecto, Silva y Gadella (2002) mencionan que el proceso de congelación y descongelación provocan una distorsión y colapso de las membranas plasmáticas conforme la bicapa lipídica se vuelve inestable por las temperaturas bajas.

Finalmente, Cerolini *et al.* (2001) determinaron que los cambios en la composición lipídica y calidad espermática en el semen porcino sometido a la crioconservación,

favorecen la pérdida general de colesterol libre, mismo que conduciría a los eventos similares a la capacitación observados.

9.3 Correlación entre la prueba de estrés osmótico precongelación y la supervivencia espermática al proceso de congelado-descongelado

En el presente trabajo, al comparar los resultados obtenidos se observó que no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos para el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de acrosomas intactos en la prueba de hiperosmolaridad y los valores para estas mismas variables posterior al proceso de congelación – descongelación, ($P > 0.05$), sugiriendo que ambos procesos, de alguna forma, podrían ser similares.

Las variables en las que se obtuvo correlaciones positivas fueron el porcentaje de acrosomas intactos en el momento de hiperosmolaridad y de acrosomas intactos en el momento de isosmolaridad con el porcentaje de acrosomas intactos al descongelado.

Resultados obtenidos por Caiza de la Cueva *et al.* (1997), mostraron bajas correlaciones en todas las variables seminales observadas, aunque cabe hacer notar que las muestras utilizadas por estos autores no fueron utilizadas simultáneamente para la prueba anisomótica y para la evaluación de la criosupervivencia, de tal forma que los resultados obtenidos fueron independientes. Se menciona también que las correlaciones en los medios que contenían glucosa fueron mejores a las observadas con medios que contenían glicerol o cloruro de sodio, indicando que la composición del medio es un factor importante en la modulación de la respuesta a los cambios de osmolaridad del espermatozoide porcino. En contraste, en el presente trabajo se utilizaron muestras del mismo eyaculado (alícuotas) para la realización de la prueba anisomótica y para el proceso de congelado-descongelado, tomando en cuenta que existen diferencias entre eyaculados y podrían responder de diferente forma a ambos procesos.

Tomando en cuenta los factores antes mencionados, la simulación del proceso de congelado-descongelado, combinando los elementos más cercanos a la realidad utilizados en la crioconservación, podría otorgar un mejor resultado. Factores como el sometimiento a condiciones hiperosmóticas a temperaturas bajas, solutos empleados

para la preparación de las soluciones hiperosmóticas mismos que son empleados como crioprotectores tal como la glucosa y el glicerol, la temperatura a la cual se reestablecen las condiciones de isosmolaridad, tiempos de exposición a las soluciones, entre otros.

En este trabajo, se obtuvo una correlación positiva de la viabilidad al descongelado con la motilidad progresiva al descongelado ($r=0.66$ $P<0.01$). Garner *et al.* (1986) demostraron una correlación negativa entre la población celular teñida con yoduro de propidio y el porcentaje de células móviles. Sin embargo, Medrano (1998) utilizando el protocolo de Pursel y Jonson (1975) no encontró correlación entre los dos parámetros.

9.4 Comparación entre SYBR-14/PI y eosina-nigrosina para la determinación de la viabilidad espermática

Aunque la tinción eosina-nigrosina todavía se utiliza en muchos laboratorios como medio de evaluación de viabilidad, las tinciones fluorescentes han ido desplazándola (Johnson *et al.*, 1996), por lo que se realizó un comparativo entre la viabilidad determinada con la eosina-nigrosina y la viabilidad determinada con SYBR-14/PI.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demostraron que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad obtenidos en el semen fresco, mediante la utilización de eosina-nigrosina (90.4%) y con SYBR-14/PI (90.5%); en contraste, los porcentajes de viabilidad en semen descongelado fueron mas bajos con SYBR-14 (34.9%) que con la eosina-nigrosina (66%), mostrando diferencia significativa ($P<0.05$).

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Chalah y Brillard (1998) y Chalah *et al.* (1999) quienes compararon las dos técnicas para la determinación de viabilidad en semen fresco y en semen descongelado de aves, no observándose diferencias entre los valores de viabilidad determinados en semen fresco por ambas técnicas, sin embargo, obtuvieron una mayor viabilidad al descongelado determinada con eosina-nigrosina en comparación con SYBR-14/PI. Estos autores concluyeron que la tinción fluorescente SYBR-14/PI es más discriminatoria en la determinación de viabilidad al descongelado.

Brito *et al.* (2003) determinaron la viabilidad del semen bovino al descongelado, observando que las proporciones de espermatozoides viables determinadas por las tinciones eosina-nigrosina y tripan azul fueron mayores significativamente que las proporciones determinadas por CFDA/PI y SYBR-14/PI; argumentando que las diferencias en el peso molecular podrían ser las responsables de las diferencias observadas entre las tinciones de la eosina-nigrosina o tripan azul y las tinciones basadas en yoduro de propidio, aunque el tripan azul tiene un peso molecular relativamente alto (961 Da), la eosina y el yoduro de propidio tienen pesos similares (692 y 668 Da respectivamente).

Por otro lado, una posible explicación para la diferencia entre las determinaciones con la eosina-nigrosina o tripan azul y el yoduro de propidio, es el tiempo de exposición a la tinción el cual es de solo unos segundos para eosina-nigrosina o tripan azul y de 10 a 30 minutos para el yoduro de propidio. Talbot y Chacon (1981) observaron que la proporción de espermatozoides teñidos con tripan azul aumentó significativamente después de 15 minutos de exposición a la tinción.

En el presente trabajo, la diferencia entre determinaciones sólo se observó en semen descongelado y no en semen fresco, por lo que posiblemente algunos de los componentes adicionados a los medios de crioconservación como por ejemplo glicerol o yema de huevo, interfieran con el proceso de tinción al descongelado.

9.5 Variaciones individuales

La clasificación de machos porcinos como buenos, promedio y malos congeladores se ha basado en los valores obtenidos al descongelado, Cerolini *et al.* (2001), mencionan como valores de buenos congeladores: viabilidad 42%, motilidad 44%; congeladores promedio: viabilidad 34%, motilidad 42%; malos congeladores: viabilidad 19%, motilidad 27%. Thurston *et al.* (2002) menciona valores de buenos congeladores: viabilidad 37%, motilidad 54.1%, acrosomas intactos 90%; congeladores promedio: viabilidad 28%, motilidad 22%, acrosomas intactos 82%; malos congeladores: viabilidad 17%, motilidad 17%, acrosomas intactos 88%. Tomando en cuenta estas referencias, con los valores

obtenidos en el presente trabajo, podríamos clasificar a 5 machos como buenos congeladores y un macho como congelador promedio.

Se ha sugerido que a nivel genético existen diferencias entre machos con respecto a la criosupervivencia, sin embargo, la congelación espermática no es un fenómeno biológico natural, de tal forma que no es probable que hubiera un gen que controle o regule la crioconservación. Los genes que podrían estar involucrados en la criosupervivencia indudablemente controlarían o regularían características de la estructura espermática o de desarrollo, mismas que tienen influencia sobre la respuesta del espermatozoide al protocolo de crioconservación (Thurston *et al*, 2002).

Finalmente, es importante remarcar lo siguiente:

La incubación del espermatozoide porcino en condiciones anisomóticas produce daño cuantificable a la membrana plasmática y al acrosoma.

La mejor comprensión de los efectos del enfriamiento y crioconservación sobre la viabilidad, capacitación y el estado acrosomal podría conducir al mejoramiento de los métodos de conservación líquida y crioconservación del espermatozoide porcino.

Es posible el uso de una prueba anisomótica precongelación, como parámetro de predicción de la calidad del semen porcino al descongelado, utilizando un protocolo estándar de congelación; sin embargo, es de gran importancia tomar en cuenta la variabilidad entre individuos (“buenos, promedio y malos congeladores”).

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente depende de un número suficiente de espermatozoides normales viables y funcionalmente competentes que alcancen la tuba uterina, lleven a cabo una fertilización normal y contribuyan al desarrollo embrionario. En la evaluación espermática *in vitro* como valor de predicción de fertilidad *in vivo* se debería incluir la determinación de varias características morfológicas y funcionales como sea posible, especialmente cuando se lleva a cabo la evaluación de espermatozoides sometidos al proceso de congelación y descongelación.

Los verracos reproductores comerciales, todavía no han sido seleccionados por su congelabilidad espermática, por lo tanto es razonable asumir que diferentes razas seleccionadas para características especiales como la calidad de carne magra podrían exhibir diversidad genética considerable con relación a la característica de congelabilidad heredada.

10. CONCLUSIONES

La prueba de estrés osmótico sobre los espermatozoides porcinos mediante la utilización de una solución hiperosmótica de 2100 mOsm/Kg a -5°C y el retorno a la isosmolaridad (300 mOsm/Kg) a 37°C simula en cierta forma el proceso de crioconservación.

Esta prueba de estrés osmótico permitiría la predicción de la criosupervivencia espermática, especialmente los valores de viabilidad y acrosomas intactos, de una manera sencilla y rápida. Sin embargo, no se debe dejar de lado otros factores no directamente relacionados a los cambios osmóticos que tienen influencia sobre la tasa de supervivencia del espermatozoide porcino al proceso de crioconservación.

Se sugiere para experimentos futuros, la evaluación de la fertilidad y prolificidad de los espermatozoides sometidos a esta prueba y la posterior evaluación y comparación con los valores obtenidos con semen sometido al proceso de crioconservación.

11. LITERATURA CITADA

1. Acker JP y McGann LE (2003) Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology* 46, 197-202.
2. Agca Y, Liu J, Mullen S, Jhonson-Ward J, Gould K, Chan A, Critser J (2005) Chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa osmotic tolerance and cryoprotectant permeability characteristics. *Journal of andrology*, Vol 26, No 4, 470-477.
3. Alberts BJ, L, Julian, R Martin, R, Keith. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th edit. New York and London: Garland Publishing.
4. Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP (2002) Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction* 66, 354-360.
5. Armitage WJ, Mazur P (1984) Osmotic tolerance of human granulocytes. *Am J Physiol* 274, 373-381.
6. Aurich C. (2005) Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89, 65-75
7. Bailey JL, Burh MM (1994) The impact of cryoconservation on Ca-2+ regulation by bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci* 74, 45-52
8. Bailey JL, Tardif S, Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Lefievre L, Leclere P (2004) Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm kinase activity and capacitation. *Theriogenology* 63, 599-614
9. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G (1996) Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontiers In Bioscience* 1, 189-205
10. Barth AD, Oko RJ (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*, Iowa State University Press, Iowa, United States of America, 8-16
11. Baust JM. (2002) Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol* 1, 17-31
12. Beatty RA, Stewart DL, Spooner RL, Hancock JL (1976) Evaluation by heterospermic insemination technique of the differential effect of freezing at -196°C on the fertility of individual bull semen. *J. Reprod Fertil* 47, 377-379.
13. Bonet S., Martínez E., Rodríguez JE., Barrera J. (2006) *Biología de la Reproducción Porcina. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. España.

14. Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP (2003) Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60, 1539-1551
15. Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. (1991) Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau of boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32, 455-461.
16. Caiza de la Cueva F., Rigau T., Pujol R., Piedrahita J., Rodríguez-Gil J. (1997) Resistance to hiperosmotic stress in boar spermatozoa: The role of the ion pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 48, 301-315.
17. Caiza de la Cueva F, Pujol R, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M.,, Rodríguez-Gil J. (1997) Resistance to osmotic stress of horse Spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48, 947-968.
18. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM (2001) Changes in sperm quality and lipid composition during Cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121, 393-401
19. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL (1997) Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology* 18, 461-468
20. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. (1988) Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectans on motility. *Fertil. Steril.* 50, 314-320.
21. Cross N, Morales P, Overstreet J, Hanson F (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226
22. Cross N, Meizel S (1989) Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41, 635-641
23. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ, Drobnis E (1989) Lipid phase transitions measured in intact cells with fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26, 76-84.
24. Crowe LM, Crowe JH, Carpenter JF, Rudolph AS, Aurrel Wistrom C, Spargo PJ, Anchordoguy TJ. (1990) Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys Acta* 947, 736-384
25. Curry MR y Watson PF. (1994) Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing Injury. *Cryobiology* 31, 39-46.
26. Curry MR (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5, 46-52

27. Chalah T, Brillard P (1998) Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* 50, 487-493
28. Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard P (1999) In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Criobiology* 39, 185-191
29. Chandler DE, Williams JA (1978). Intracellular divalent cation release in pancreatic acinar cells during stimulus secretion coupling I. Use of chlortetracycline as fluorescent probe. *Journal of Cell Biology* 76, 371-385
30. De Leeuw, FE, Colenbrander, B, Verkeij, AJ, (1990). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim. (Suppl. 1)*, 95-104.
31. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Bischof JC (1999) Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. *Biology of Reproduction* 61, 764-775
32. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool* 265 , 432 – 437.
33. Du J, Tao J, Kleinhans FW, Peter AT, Critse JK. (1994) Determination of boar spermatozoa water volume and osmotic response. *Theriogenology* 42, 1183-1191
34. Farrant J, Woolgar AE. (1972). Human red cells under hypertonic conditions; a model system for investigating freezing damage, 1. sodium chloride. *Cryobiology* 9, 9-15.
35. Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV (1999) Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biology of Reproduction* 60, 879-886
36. Fishbein WM y Winkert JW. (1978). Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase II demonstration of an optimal recovery cooling rate curve in a membraneless system. *Cryobiology* 15, 168-179.
37. Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, Van Golde LM, Gadella BM (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biology of Reproduction* 59, 1530-1539
38. Flesch FM, Gadella BM (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469, 197-235.
39. Flores HF. (2005). Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del

espermatozoide porcino. Tesis de maestría. FES - Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

40. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995). Ca^{2+} -regulating mechanism that modulate bull spermatozoa capacitation and acrosomal exocytosis as determined by CTC analysis. *Mol. Reprod. Dev* 40, 233-241
41. Fuller SJ, Whittingham DG (1996). Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *Journal of Reproduction and Fertility* 108, 139-145
42. Fuller SJ, Whittingham DG (1997) Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperature. *Molecular reproduction and Development* 46, 318-324
43. Gadella, BM y Harrison RAP (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3' 5' monophosphate dependent but apoptosis unrelated exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 67, 340-350
44. Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Harrison RAP. (2000) Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipids analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol. Reprod Dev* 53, 108-25.
45. Gao DY, Ashworth E., Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, y Critser JK. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction* 49, 112-123.
46. Gao D. y Critser JK. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *Cryobiology of Embryos, Germ Cells, and Ovaries*. Volume 41 (4).
47. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann E, Watson P, Keinhans FW, Mazur P, Critser JK (1995) Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10, 109-112
48. Garner DL, Pinket D, Johnson LA, Pace MM (1986) Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction* 34, 127-138
49. Garner DL y Johnson LA (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of reproduction* 53, 276-284
50. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction fertility and development* 9, 481-487
51. Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK (1996). Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fertl.* 107, 87-95

52. Gilmore JA, Liu J, Peter AT y Critser JK. (1998) Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction* 58, 28-36.
53. Green CE, Watson PF (2001) Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122, 889-898
54. Grobfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell W, Rath D. (2007) New aspects of boar semen freezing strategies. Plenary session 3. VI International Conference on boar semen preservation. Alliston. Ontario, Canada.
55. Guthrie HD y Welch GR. (2004). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*. Volume 63 Issue 2. 396-410.
56. Han B. y Bischof JC. (2004) Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* 48, 8-21
57. Hammerstedt RH, Graham JK. y Nolan JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73-88.
58. Harrison RAP, Vickers SE. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88, 343-352
59. Harrison RAP, Gadella BM (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351
60. Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, Rudenko S. (2001) Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipids vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology* 42 (2), 88-102.
61. Hewitt DA, England GCW (1998). An investigation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science* 51, 321-332
62. Holt WV, Head MF, North RD (1992) Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifest after thawing: Observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* 46, 1086-1094
63. Holt WV, y North RD. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the Induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction* 51, 414-424
64. Holt WV. (2000a) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci* 62, 3-22
65. Holt WV (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.

66. Holt WV, Medrano A. (1997) Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J. Reprod Fertil* 52, (Suppl), 213-222
67. Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm Cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63, 370-382
68. Hunter RHF (1983) Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct. *Journal of Reproduction and fertility* 63, 109-117
69. Johnson LA. (1985). Fertility Results using Frozen Boar Spermatozoa: 1970-1985. Deep freezing of Boar Semen. *Swedish Univ Agric Sci, Uppsola*, 199-222.
70. Johnson LA. Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. (1996) Staining sperm for viability assessment. *Reprod Domest. Anim.* 31, 37-47
71. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Science* 62, 143-172
72. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S. (2002). Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 197-209.
73. Karlsson JOM y Toner M. (1996). Long-term storage of tissues by Cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17, 243-256.
74. Kumar S, Millar JD, Watson PF. (2003) The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246-253
75. Levitt JA. (1962). Sulfhydryl disulphide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J. Theor Biol* 3, 355-368.
76. Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T., 1994. Na⁺/K⁺-ATP-ase. *J. Biol. Chem.* 269, 19659-19662.
77. Lovelock JE y Polge C. (1954). The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J.* 58, 618-622.
78. Maxwell WMC, Johnson LA (1997) Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after maturation, flow cytometric sorting, cooling or cyopreservation. *Molecular Reproduction and Development* 46, 408-418
79. Mazur P. (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intraocular freezing. *J Gen Physiol* 47, 347-369
80. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. (1972). A Two-Factor Hypotesis of Freezing Injury. *Exp Cell Res.* 71, 345-352.

81. Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N. (1981) Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys J.* 36, 653-675
82. Mazur P. (1984). Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *Am. J. Physiol.* 247, C125-C142.
83. Medrano A, Holt WV. (1996). Protective effects of glycerol during cold shock in boar spermatozoa. A cryomicroscope study using propidium iodide and SYBR-14. *Reprod. Domest. Anim.* 31, 281-282
84. Medrano A, Holt WV. (1998). Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zootec* 47, 319-327
85. Medrano A. (1998) The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Ph.D. thesis. University of London.
86. Medrano A, Watson PF; Holt WV. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm Cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction* 123, 315-322
87. Meyers SA (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science* 89, 57-64
88. Morris GJ, Acton E y Avery S. (1999). A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction* 14, 4, 1013-1021
89. Muldrew K y McGann LE. (1994). The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical journal* 66, 532-541
90. Noiles EE, Mazur P, Benker FW, Lleinhaus FW, Amann RP, Critser JK (1992) Critical osmolarity, water and glycerol permeability coefficient determination for equine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 46 (Suppl 1), 95.
91. Parks JE, Lynch DV (1992). Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
92. Peña Martínez AI (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science* 82-83, 209-224
93. Pérez LJ, Valcarcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldasarre H. (1996) Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131-140
94. Peris S, Solanes D, Peña A, Rodríguez-Gil J., y Rigau T. (2000). Ion-Mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: The role of amiloride and ouabain. *Theriogenology* 54, 1453-1467.
95. Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze K F and Toöpfer-Petersen E (2004). Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar

spermatozoa. Society for Reproduction and Fertility ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899

96. Polge C, Smith AV y Parkes AS. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)* 164, 666.
97. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA (2002). The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58, 1373-1384
98. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction* 68, 1208-1214
99. Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram sperm. *Cryobiology* 26, 341-354.
100. Pursel VG y Johnson LA. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science* 40, 99-102
101. Ramalo-Santos J, Schatten G, Moreno RD (2002) Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 67, 1043-1051
102. Naz RK, Rajes PB (2004) Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2,75
103. Rodríguez GL. (2005) Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina.
104. Rios Granillo E. (2005) Comparación del enfriado tradicional a +5°C vs el enfriado a +2°C y -2°C sobre la criosupervivencia y la capacitación prematura del semen de carnero. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
105. Santymire RM, Marinari PE, Kreeger JS, Wildt DE, Howard J (2006) Sperm viability in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) is influenced by seminal and medium osmolality. *Cryobiology* 53, 37-50
106. Siegel S. (1990). Estadística no paramétrica. Editorial Trillas.
107. Silva PFN, Gadella BM (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978
108. Songsasen N and Leibo SP. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa II. Relationship between survival after Cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 35, 255-269

109. Steel G, Torrie J. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Editorial Mc Graw-Hill.
110. Sukardi S, Curry MR, Watson PF (1997). Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science* 46, 89-96
111. Talbot P, Chacon RS (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosoma reactions of human sperm. *Journal Exp Zool* 215, 201-208
112. Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol. Reprod.* 65, 784-792
113. Thurston LM, Siggins K, Mileh AJ, Watson PF, Holt WV. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following Cryopreservation. *Biology of Reproduction* 66, 545-554
114. Vazquez J, Roca J, Gil M, Cuello C, Parrilla I, Vazquez J, Martínez E. (2007) New developments in low dose insemination technology. Session plenary 2. VI international conference on boar semen preservation. Alliston. Ontario, Canada.
115. Visconti PE, Kopf GS (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 59, 1-6
116. Vishwanath R, Swan MA, White IG. (1986). Effect of Triton X-100 on Ultrastructure, Reactivation, and Motility Characteristics of Ram Spermatozoa. *Gamete Res.* 15, 361-371.
117. Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolina-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src Kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 276, 8094-8103.
118. Watson PF, Duncan AE. (1988). Effect of Salt Concentration and Unfrozen Water Fraction on the Viability of Slowly Frozen Ram Spermatozoa. *Cryobiology* 25, 131-142.
119. Watson PF, Kunze E, Cramer P, Hammerstedt RH. (1992). A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *J. Andrology* 13, 131-138
120. Watson PF. (1995). Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of spermatozoa and the Assessment of their Post-Thawing Function. *Reprod Fertil Dev.* 871-891.
121. Watson PF (1996) Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31, 135-140.

122. Watson PF. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 481- 492
123. Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RK. (2003) Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 148, 1-80
124. Weitze KF, Stampa E, Richter L, Willmen T, Waberski D. (1991). Fertility of frozen boar semen: influence of packing, number of inseminations and seminal plasma. *Reprod Domest. Anim. (Suppl 1)*, 139-142.
125. Willoughby CE, Mazur P, Peter AT, Critser JK. (1996) Osmotic Tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biol Reprod* 55, 715-727
126. Woelders H, Matthijs A, Den Besten M. (1996). Boar variation in freezability of the semen. *Proceedings III Conference on Boar semen Preservation. Reproduction in Domestic Animals* 31: 153-159.
127. Wolfe J, Bryant G (2001). Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 24, 438-450
128. Wolley DM, Richardson DW. (1978). Ultrastructural injury in human spermatozoa after freezing and thawing. *J. reprod Fertil* 53, 389-394.
129. Woods EJ, James DB, Yuksel A y Critser JK (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 146-156
130. Yoshida M (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* 60-61, 349-355.
131. Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. (2006). Physiological volume regulation by spermatozoa. *Molecular and cellular Endocrinology* 250, 98-105.
132. Zade-Oppen AMM. (1968) Posthypertonic hemolysis in sodium chloride systems. *Acta Physiol Scand* 73, 341-364.
133. Zawlodzka S y Takamatsu H.(2005). Osmotic injury of PC-3 cells by hypertonic NaCl solutions at temperatures above 0°C. *Cryobiology* 50, 58-70.
134. Zeng WX, Shimada M, Isobe N, Terada T. (2001) Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology* 56, 447-458.