



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FUNCIONALIDAD
DE LA MEMBRANA PLÁSMATICA Y EL ESTADO DE
CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE OVINO
UTILIZANDO 5°C Y -5°C DURANTE EL PERIODO DE
EQUILIBRIO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MARIANA GURROLA LICEA

ASESORAS:

Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda
MPA. Rosa Berta Angulo Mejorada



MEXICO D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IN 206506

DEDICATORIA

El haber decidido estudiar Medicina Veterinaria no fue una decisión fácil, sin embargo, fue la mejor decisión de mi vida ya que no solo es la herramienta que me permite ser independiente el día de hoy, sino que me hizo crecer como ser humano a niveles que nunca habría imaginado.

El poder terminar mi tesis de licenciatura después de cuatro años no solo es un merito mío, también lo es de mis padres y hermanos, de mi familia, mis hijos y todas las personas que en algún momento compartieron algún evento en la realización de este trabajo.

Recuerdo las millones de veces que escuche ¿para cuando es tú examen? y mi respuesta era: PRONTO y créanlo o no este es el mejor momento, necesitaba esos cuatro años de preparación, poder vivir todo lo que viví me hace valorar mucho mas lo que representa mi titulo profesional.

En ese trayecto me enamore, me decepcioné, me levante, viaje, me volví a enamorar, tome mi propio camino y finalmente llegue a mi meta. Entraron y salieron tantas personas del camino... pero no hay duda que cada una de ellas marco mi vida de tal manera que por ellas soy como me ven ahora, espero que la luz este con ustedes donde quiera que se encuentren.

Ahora solo queda seguir creciendo, completar nuevos proyectos, trabajar como hasta ahora, en realidad muy agradecida por la oportunidad de pertenecer a la UNAM.

A todos los que con su Luz se acercaron a mi vida GRACIAS.

Carlos y Peggy: Cumplí

Gun y Charly Brown: Inténtenlo

Mis hijos, Goyo y Pimienta: Se los prometi!!!!

Abuelitos: Cada uno a su manera brindo el cariño necesario, los adoro!!!!

Mis tías: Ejemplos a seguir

Pote: Valió la pena la espera, gracias por el tiempo y el apoyo brindado, sabes que estarás siempre en mi corazón y lo agradecida que estoy contigo por el crecimiento que tuvimos juntos.

Chombis: Del dolor también se aprende y tú me enseñaste mucho...

Moyocoyo: Parece que el destino tiene un plan, en medio de la tempestad y después de varios años VUELVO A COMENZAR.

A mis amigos quiero agradecerles, estar ahí, en las buenas, las malas y las peores, hoy no sabría que hacer sin su apoyo.

Gi, princesa, eres una triunfadora gracias por tus palabras de aliento, la distancia no altera mi cariño por ti, se feliz lo mereces!!!

Trani Nemo hasta hoy no he conocido nadie con tu determinación, gracias por compartir tantos momentos conmigo, fuera los miedos que no hay nada que tú no puedas lograr.

Tatis gracias por brindarme un hogar cuando lo tenía todo perdido, mostrarme una manera mágica de ver la vida, eres grande recuérdalo, que la LUZ este en tú vida pero con restricciones por que si no duele la pancita jaja!!

Juan, Erea, Marin y Blas mis hermanitos, sin ustedes estaría perdida, gracias por levantarme de todas las veces que estaba por los suelos, muy a nuestra manera, pero para mi no hay mejor terapia, extrañando el avallaser y las UDL.

Esli y Esau Tapia son un ejemplo de hombres, su educación e integridad me han enseñado muchas cosas, gracias por su amistad, los quiero mucho.

Kaliman y Andresito mis niños, me sorprenden, hemos crecido juntos y creo que nos fue bastante bien, no creen? Sigán así, espero verlos por el resto de mi vida.

Nally, la amistad es algo que se cultiva como una plantita, pero tu sembraste una semilla hace muchos años y hoy tenemos un hermoso árbol!!!. Me da gusto formar parte importante de tu vida por que tú eres muy importante para mi.

Oscarito aunque hay veces que tienes que enseñarme con manzanitas nunca has tirado la toalla, muchas gracias por tus conocimientos y por fomentar mi curiosidad, pero no creas que te has librado de mi jaja!!!

Tiago, Mr. Presencia, Neto, Abue, Chofis, May, A. Lozada, Elihu, Cordinador, Angel, Jonthan, Omar, Marro, Aldo, Cucho, Kary, Vic, compañeros del Lab de Morfo y a todos lo que de alguna manera han cruzado mi camino, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la FMVZ de la UNAM por ser mi casa por estos 8 años y darme lo más valioso que tengo: mi educación.

A Jesús Romero Martínez por ser mi guía todo este tiempo y no permitir que me perdiera en los momentos mas oscuros, usted sabe lo mucho que agradezco su amistad, espero nunca defraudarlo.

A mi tutora la Dra. Lourdes Juárez Mosqueda por apoyarme en la realización de este trabajo, por su tiempo y conocimientos, hoy aunque me falta mucho por aprender descubrí la belleza de la Biología Celular ¿quien diría que no existe nada sin ella?

A mi tutora la MPA. Rosa Berta Angulo Mejorada, entrar al mundo de los borregos no es fácil y va haber quien te lo haga mas difícil, pero se puede y usted es el mejor ejemplo, gracias por compartir los conocimientos y el amor que usted tiene por esos animalitos que desde que son corderos hasta que se convierten en todos unos sementales nos den lecciones todos los días.

Al personal del C.E.I.E.P.O por brindarme la oportunidad de compartir y aprender lo que es la producción ovina, en especial al Doc. Martin, no hay nadie como usted su dedicación es invaluable para todos los borregos del centro.

Al personal de los Departamentos de Morfología y Rumiantes por el apoyo brindado para la realización de este proyecto

A los integrantes del jurado, por los comentarios aportados, los cuales enriquecieron el contenido de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ANTECEDENTES	4
2. GENERALIDADES	5
2.1 MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE	7
2.2 ESPERMATOGÉNESIS	9
2.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	10
2.4 REACCIÓN ACROSOMAL	13
3. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN	14
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	21
6.2 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	24
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIONES	39
CUADROS Y FIGURAS	40
BLIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

GURROLA LICEA MARIANA. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y EL ESTADO DE CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE OVINO UTILIZANDO 5°C Y -5°C DURANTE EL PERIODO DE EQUILIBRIO. (Bajo la dirección de Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y MPA Rosa Berta Angulo Mejorada).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura del periodo de equilibrio (5°C y -5°C), previo al congelamiento, sobre la viabilidad del espermatozoide ovino. Se utilizaron 8 eyaculados provenientes de 4 machos en los que se evaluó: la motilidad, la viabilidad y el estado de capacitación en el semen fresco y después del proceso de criopreservación, previo enfriado a 5°C y -5°C. La viabilidad se determinó mediante la tinción del semen con Eosina-Nigrosina, mientras que para el estado de capacitación se usó la técnica de Clortetraciclina. No se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.01$) en la motilidad progresiva entre las muestras de semen fresco y las enfriadas a 5 y -5°C (83.7, 38.1 y 53.1%, respectivamente). Existió diferencia en la integridad membranal entre las muestras de semen fresco y las enfriadas a 5° y -5°C, siendo similar en las muestras enfriadas (70.8 vs 30.87 y 38.37%, respectivamente) . Al comparar patrones de capacitación, no se encontró diferencia estadística significativa entre el semen fresco y congelado sin , en el semen enfriado, al agrupar los espermatozoides no capacitados y aquellos capacitados con y sin reacción acrosomal, existió diferencia estadística ($p \leq 0.05$) a favor del enfriado a -5°C. Se concluye que el enfriado del semen a -5°C previo a la congelación disminuye el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal al descongelamiento.

1.INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una de las técnicas de reproducción asistida más importantes, que son utilizadas para el mejoramiento genético de los animales.¹ Durante muchos años, los programas de IA se basaron fundamentalmente en el uso de semen fresco; con el descubrimiento del efecto crioprotector del glicerol durante el congelamiento,^{2,3} se ha puesto un mayor interés en el uso de semen congelado.

Al utilizar nitrógeno líquido se permite mantener el semen congelado a -196°C , logrando con esto que las reacciones metabólicas de los espermatozoides disminuyan considerablemente permitiendo su conservación por largos periodos de tiempo.^{4,5} Sin embargo, aún con las mejores técnicas de congelación, es necesario aumentar la concentración espermática en cada unidad de inseminación debido a la disminución del porcentaje de células vivas después del congelamiento.⁶

Entre las causas por las que disminuye el porcentaje de espermatozoides vivos postcongelación se encuentran: el choque térmico, la composición del diluyente utilizado y los cambios osmóticos a los que se ve expuesto el espermatozoide.⁵ Debido a que del 40% al 50% de los espermatozoides no sobreviven a la criopreservación y de este porcentaje del 20-30% presentan cambios por daño,^{7,8} se requiere incrementar el número de espermatozoides para así asegurar suficientes células viables, en el lugar y momento de la fecundación.⁵

En la especie ovina la IA transcervical con semen congelado brinda tasas de concepción muy bajas, pero si se realiza una inseminación intrauterina los resultados mejoran notablemente⁸ con respecto a esto, Maxwell *et al* (1993)⁹ reportaron que para la IA intrauterina profunda se necesitan 10 millones de

espermatozoides móviles para obtener más de un 50% de fertilidad, mientras que para la IA cervical se necesitan 10 veces más de espermatozoides.

El problema de la criopreservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a -196°C sino sortear el daño que ocurre durante el congelamiento-descongelamiento.^{7,10,11}

La reducción de la viabilidad del semen congelado es atribuida a las alteraciones que sufre la membrana, tanto en su estructura como en su funcionalidad durante este proceso.¹¹

Por ello la criopreservación exitosa de semen, requiere del mantenimiento de las características morfofisiológicas del espermatozoide que le permitan conservar su capacidad fertilizante, por ejemplo, el mantenimiento de las enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito.¹²

Para mejorar los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos en el empleo de la IA con semen congelado se ha sugerido que los estudios se enfoquen a mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides y a causar el menor daño a su estructura durante el proceso de congelado-descongelado.

El proceso de congelación se desarrolló sobre bases empíricas. Para ello, el semen diluido fue enfriado lentamente hasta que alcanzara la temperatura del refrigerador común, que es de 5°C . Sin embargo, el enfriamiento lento a temperaturas por debajo de los 0°C parece tener un efecto benéfico sobre la viabilidad e integridad de los espermatozoides, particularmente en aquellas especies en las que el espermatozoide es más sensible al choque por frío. Al continuar el enfriamiento hasta -5°C se ha logrado disminuir el daño a la membrana plasmática en el cerdo,¹³ en el ovino¹⁴ y en el caprino.¹⁵

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del enfriado a 5°C y -5°C precongelación sobre la viabilidad del espermatozoide del ovino.

1.1 ANTECEDENTES

La inseminación artificial (IA) se puede definir como un método reproductivo en el que las células sexuales masculinas son depositadas dentro del aparato genital femenino por medios distintos al de la cópula y su implementación ha permitido un mejor aprovechamiento del material genético de los machos.⁴

El poco éxito obtenido con las técnicas tradicionales de IA utilizando semen congelado había sido un factor importante para limitar su uso en los rebaños ovinos, sin embargo, con los recientes avances tecnológicos se ha logrado mejorar la eficacia de esta técnica obteniendo grandes ventajas como son:

- Mejora Genética: Utilizando sementales superiores e incrementando el número de crías por semental por año.
- Fácil transporte del material genético: Se reducen costos al transportar semen ya que es más económico que transportar al semental, se evita la propagación de algunas enfermedades, permite el intercambio internacional de semen.
- Conservación prolongada del semen: El semen de machos valiosos puede ser utilizado en años posteriores e incluso después de la muerte del semental, así como la creación de “bancos de germoplasma”.¹

Sin embargo, la IA también presenta importantes desventajas ya que es necesaria la presencia de técnicos especializados, es una técnica que representa cierto costo y aunado a esto, los valores de fertilidad obtenidos son menores a los obtenidos con monta natural, particularmente cuando se utiliza el semen congelado en una IA cervical.⁸ La baja fertilidad obtenida con el uso del

semen congelado después de la inseminación cervical, ha sido relacionada con la reducida motilidad de los espermatozoides congelados-descongelados, posiblemente esto impide que se alcance una población suficiente de espermatozoides para atravesar el cérvix, el útero y finalmente el oviducto; siendo un número muy reducido de células las que llegan al lugar de la fertilización. Este problema se ha tratado de corregir utilizando semen que contenga una mayor cantidad de células motiles o modificando el sitio de deposición del semen por medio de una inseminación intrauterina con la ayuda de un laparoscopio¹ (figura 1), por lo consiguiente, la IA con semen congelado-descongelado ha tenido un uso relativamente limitado en la especie ovina.¹⁶



Figura 1.- Inseminación intrauterina por laparoscopia utilizando semen congelado.

cervical.⁸ La baja fertilidad obtenida con el uso del semen congelado después de la inseminación cervical, ha sido relacionada con la reducida motilidad de los espermatozoides congelados-descongelados, posiblemente esto impide que se alcance una población suficiente de espermatozoides para atravesar el cérvix, el útero y finalmente el oviducto; siendo un número muy reducido de células las que llegan al lugar de la fertilización. Este problema se ha tratado de corregir utilizando semen que contenga una mayor cantidad de células motiles o modificando el sitio de deposición del semen por medio de una inseminación intrauterina con la ayuda de un laparoscopio¹ (figura 1), por lo consiguiente, la IA con semen congelado–descongelado ha tenido un uso relativamente limitado en la especie ovina.¹⁶



Figura 1.- Inseminación intrauterina por laparoscopia utilizando semen congelado.

2. GENERALIDADES

El espermatozoide fue descrito por primera vez por Leeuwenhoek en 1677, quien observó su forma general y describió los movimientos natatorios de la célula; pero fue hasta 1875 que Hertwig demostró la penetración del espermatozoide en el ovocito y la unión de ambos gametos.¹⁷

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula alargada con una cabeza aplanada portadora del núcleo, un cuello que une a la cabeza con el flagelo, el cual se divide en pieza media, segmento principal y terminal; la pieza media contiene la maquinaria necesaria para la motilidad celular.⁶ (figura 2)

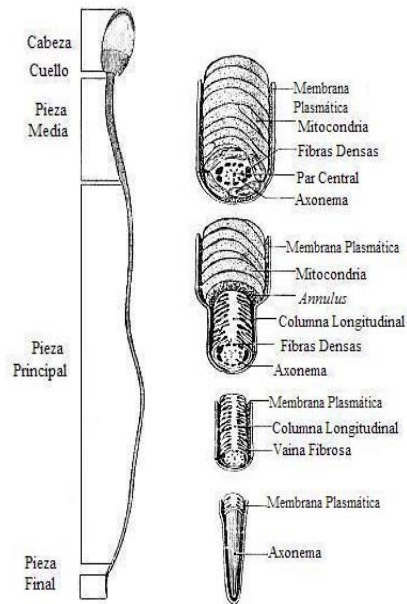


Figura 2.- Esquema de la morfología espermática

Modificado de Amann y Picket 1987¹⁸; Juhász *et al* 2000¹⁹

En la cabeza se encuentra el núcleo que contiene una cromatina altamente condensada, un contenido de DNA haploide; la teca perinuclear que se encuentra rodeando al núcleo y el acrosoma que ocupa la región anterior de la cabeza.²⁰

El acrosoma es una estructura membranosa que se origina durante la fase de espermatida a partir del complejo de Golgi, contiene enzimas como la acrosina y la hialuronidasa, que son necesarias para que el espermatozoide penetre las envolturas que recubren el ovocito.²⁰ El acrosoma consta de una membrana interna que se encuentra justo arriba de la envoltura nuclear y una membrana

externa que esta íntimamente relacionada con la membrana plasmática de la parte anterior de la cabeza espermática.²¹ (figura 3)

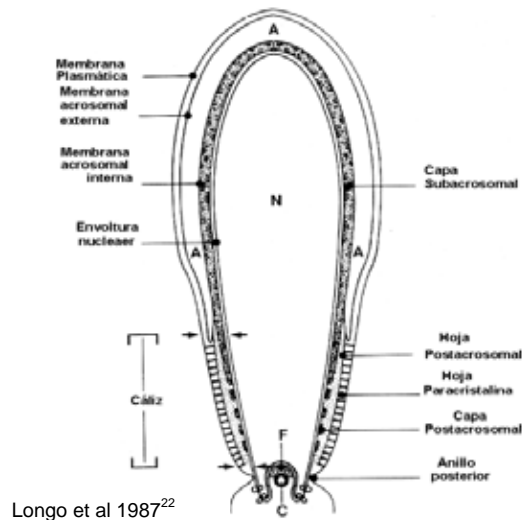


Figura 3.- Corte sagital de la cabeza

En el caso del ovino se ha reportado que el espermatozoide tiene una longitud total de 67.2 μm , de las cuales, 8.2 μm corresponden a la cabeza 14.0 μm a la pieza media y 45 μm a la pieza principal y terminal del flagelo.²³

2.1 MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide está rodeado completamente por la membrana plasmática (MP), que está organizada a manera de bicapa y constituida por lípidos, proteínas y carbohidratos. La MP es una estructura fluida, por lo que las moléculas lipídicas que la componen se mueven en el plano de la bicapa, estos movimientos se conocen como difusión lateral, rotación y flip-flop.²⁴

Los lípidos de la membrana son en su mayoría fosfolípidos, los cuales presentan regiones hidrofílicas e hidrofóbicas con interacciones bien definidas de lípido a lípido y de lípido a proteína, sin embargo la MP también contiene colesterol.²⁵

La composición lipídica de la MP es asimétrica ya que cada lado de ella está expuesto a un entorno diferente, los componentes protéicos son también asimétricos con dominios funcionales distintivos diferentes dentro de la membrana.²⁵

Se sabe que los fosfolípidos con carga neutral o positiva como la fosfatidilcolina y la esfingomielina se encuentran preferentemente en la cara extracelular de la MP y que los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina se encuentran en la cara citoplasmática de la MP.^{24,25}

La relación existente entre fosfolípidos saturados e insaturados en la MP del espermatozoide ovino es cercana al 1:3, en donde el fosfolípido más abundante es la fosfatidilcolina, seguida en orden decreciente de concentración por la esfingomielina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y los fosfoinosítidos.²⁶ (figura 4)

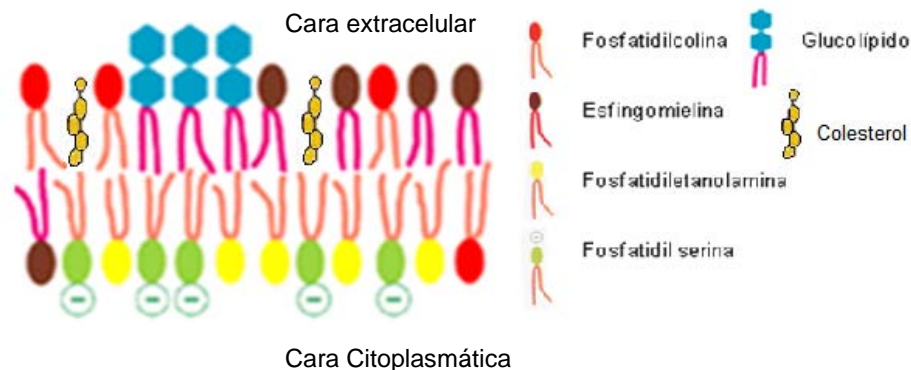


Figura 4.-Esquema de la membrana plasmática, se puede observar la distribución de los fosfolípidos, glucolípidos y colesterol que la conforman. Modificado de Alberts *et al* (2008).²⁵

El colesterol también tiene una distribución asimétrica ya que tiene una mayor afinidad por la fosfatidilcolina y la esfingomielina por lo que se encuentra en su mayoría en la cara extracelular de la MP;²⁵ manteniendo una relación colesterol:fosfolípidos cercana al 0.85:1.²⁶ El colesterol influye en el estado de

fluidez membranal ya que una mayor concentración de este se refleja en una mayor rigidez, lo cual se debe, a las características moleculares de este compuesto. Su estructura química presenta una composición espacial que le brinda una zona rígida formada por cuatro anillos cerca de su zona polar, que al interactuar con los fosfolípidos adyacentes restringe la difusión lateral, disminuyendo la fluidez en esta zona.²⁷

Debido a su naturaleza hidrófoba; la MP presenta una permeabilidad selectiva, son las cadenas hidrocarbonadas en la bicapa lipídica, las que proporcionan una barrera semipermeable a sustancias iónicas y polares, sin embargo, su movimiento a través de las membranas es permitido por proteínas específicas por ejemplo, una molécula polar debe unirse a una proteína transportadora para que le permita el paso ya sea a través de un canal acuoso o por cambios conformacionales de la misma, mientras que las sustancias pequeñas sin carga pueden difundirse simplemente a través de la bicapa lipídica a favor de su gradiente de concentración.²⁷

2.2 ESPERMATOGÉNESIS

La producción de espermatozoides es conocida como espermatogénesis, esta se realiza en el epitelio de los túbulos seminíferos de los testículos y tiene una duración de 41.2 días, con cuatro ciclos del epitelio seminífero con una duración cada uno de 10.3 días en el ovino.^{28,6} Durante la espermatogénesis las células germinales en desarrollo, experimentan una serie continua de divisiones celulares y cambios que comienzan en la periferia de los túbulos y avanzan hacia la luz de los mismos.

En una primera etapa denominada espermatocitogénesis, las espermatogonias (células madre) sufren varias divisiones mitóticas, algunas de las células

resultantes tienen la finalidad sólo de proliferar para mantener una población estable de las mismas, mientras que otras se transformarán en espermátocitos que se dividirán por meiosis para reducir su contenido de DNA y convertirse en células haploides. Las células resultantes de este último proceso son las espermátides, las cuales sufren una serie de cambios estructurales y de desarrollo para formar a los espermatozoides en una segunda etapa conocida como espermiogénesis. La última etapa del proceso es conocida como espermiación en la cual los espermatozoides son liberados hacia la luz de los túbulos seminíferos.

Los espermatozoides que provienen del testículo durante su transporte por el epidídimo experimentan una serie de cambios conocidos como maduración epididimal que incluyen cambios funcionales, como el desarrollo del potencial para la motilidad sostenida, la modificación de los patrones metabólicos y estructurales como la estabilización de estructuras, entre ellas, la cromatina nuclear, cambios en la superficie de la membrana plasmática y la pérdida de la gota citoplasmática.⁶ Además, durante este trayecto los espermatozoides entran en contacto con los fluidos epididimales siendo cubiertos por una capa de proteínas y carbohidratos conocida como factor descapacitante;²⁸ en el carnero el transporte de los espermatozoides por el epidídimo tiene una duración de 16 días. Si bien los espermatozoides desarrollan la capacidad de fecundar al óvulo durante su transporte por el epidídimo, dicha capacidad se considera parcial ya que los espermatozoides deben experimentar el proceso de capacitación que los habilita para interactuar con el óvulo, llevar a cabo la reacción acrosomal y penetrar al mismo.^{6, 29}

2.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides eyaculados no tienen la capacidad inmediata de fecundar ya que requieren de una fase adicional de maduración en el aparato reproductor de la hembra, que los prepara para fertilizar, la cual es conocida como capacitación y es un prerrequisito para que el espermatozoide pueda sufrir la reacción acrosomal.^{21, 30} En el caso del carnero los espermatozoides sobreviven en el aparato genital de la borrega de 30-48 hrs,⁶ mientras que para la capacitación sólo se requiere alrededor de 1.5 horas en promedio.^{31, 32}

Durante el coito el semen es depositado en la vagina de las borregas y es en este punto donde se inicia la capacitación, con la remoción del factor discapacitante, esto por parte de los fluidos del aparato reproductor de la hembra²⁸ lo que se continúa en las regiones más craneales, donde los espermatozoides permanecen adheridos a la superficie de las células epiteliales del oviducto. Sin embargo la capacitación no es específica de un órgano.⁶ Tampoco todos los espermatozoides se capacitan en el mismo momento ya que este proceso depende de la respuesta individual de la célula.²⁸

Los eventos principales de la capacitación conducentes a la reacción acrosomal incluyen:

- I. El retiro de partículas intramembranas del área de la membrana plasmática asociada con el acrosoma.
- II. La disminución de la rigidez de la membrana plasmática.
- III. El aumento de la concentración del calcio libre intracelular.
- IV. El aumento del metabolismo energético y de la motilidad del gameto.³¹

Se sabe que durante la capacitación los componentes superficiales que recubren al espermatozoide (ej. factor descapacitante) son modificados o eliminados por las secreciones del aparato reproductor femenino, lo que desestabiliza la membrana plasmática y permite la reacción acrosomal. Este proceso de desestabilización también se ve favorecido por una disminución del contenido de colesterol y una modificación de los glucosaminoglicanos, de la superficie espermática además de cambios iónicos, a medida de que el espermatozoide avanza por el aparato reproductor de la hembra. La capacitación causa los cambios acrosomales necesarios para que el espermatozoide penetre en las estructuras del óvulo, por lo que el proceso de capacitación impide la activación acrosomal prematura, retardándola hasta que los espermatozoides llegan al sitio de fecundación y entren en contacto con el óvulo.⁶

Al igual que otros tipos celulares, los espermatozoides mantienen gradientes iónicos a través de la membrana plasmática; para mantener una concentración mayor de K^+ y menor de Na^+ en el espacio intracitoplasmático interviniendo la bomba de sodio/potasio.²¹

Se sabe que durante la capacitación la concentración intracelular de K^+ se reduce significativamente y al mismo tiempo de manera opuesta la concentración de Na^+ se incrementa dramáticamente, reflejando un decremento en la actividad de la bomba de sodio potasio.²¹

No se sabe mucho acerca del papel del calcio intracelular durante la capacitación. Se ha comprobado que la concentración de Ca^{2+} en el espermatozoide es baja, tanto en la cabeza como en el flagelo, y aunque se desconoce la verdadera manera en que este se halla almacenado, se han

propuesto a las mitocondrias y algunas proteínas como reservorios. La regulación de Ca^{2+} intracelular se justifica por la detección de bombas de calcio, la existencia de un sistema antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, en la membrana plasmática del espermatozoide.²¹

El requerimiento de calcio para la capacitación es posiblemente un reflejo de la dependencia de calcio de la adenilato ciclasa espermática. Esto debido a que se ha observado que durante la capacitación existe una elevación en los niveles de AMPc y en la fosforilación de proteínas espermáticas. Una de las proteínas fosforiladas durante la capacitación es la fosfolipasa C, que cataliza la conversión del fosfatidilinositol trifosfato (PIP_3) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3), los cuales han sido involucrados en el incremento de la fluidez de la membrana plasmática y también en el aumento de su capacidad fusogénica.³¹

Muchos investigadores han utilizado a la reacción acrosomal como un indicador de una capacitación completa, ya que para que se lleve a cabo la reacción acrosomal es necesario que el espermatozoide esté completamente capacitado.

2.4 REACCIÓN ACROSOMAL

El espermatozoide capacitado modifica su patrón de motilidad, cambiando de una forma progresiva lineal a un movimiento poco controlado no lineal con movimientos agitados en una sólo área, a este cambio se le conoce como hipermotilidad, el cual ocurre por lo general en el ámpula del oviducto y se sabe que esta modificación en los patrones de movimiento ayudan al contacto del espermatozoide con el óvulo.²⁸

La reacción acrosomal (RA) consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa sobre el segmento anterior del acrosoma seguida por la vesiculación de ambas membranas y la liberación de enzimas contenidas en el acrosoma mediante un proceso de exocitosis regulada; la falsa RA ocurre por el envejecimiento o degeneración de los espermatozoides, donde se presenta la pérdida del acrosoma.⁶

En una RA verdadera la zona pelúcida induce la reacción acrosomal a través de señales (glicoproteínas) que son acopladas a receptores (proteínas) que se encuentran en la región acrosomal del espermatozoide, estos receptores son expuestos durante el proceso de capacitación.

La zona pelúcida del ovocito contiene tres glicoproteínas que reciben el nombre de proteínas de zona 1, 2 y 3 (respectivamente ZP1, ZP2 y ZP3). La ZP1 y la ZP2 son proteínas estructurales, mientras que la ZP3 interactúa con receptores de membrana del espermatozoide. Se conocen dos sitios de unión en el espermatozoide: la región primaria de unión (ZBR) que es la responsable de la adherencia del espermatozoide con la zona pelúcida; y la región en donde se encuentran los ligandos promotores de la RA (ARPR) que al unirse con la ZP3 desencadenan una cascada de señalización dando inicio a la RA.²⁸

La única porción del acrosoma que se conserva después de la RA es el segmento ecuatorial, en el cual se establece un nuevo dominio de membrana que le permitirá al espermatozoide fusionarse con el óvulo.

En esta característica también se difiere de la falsa RA ya que en esta última se produce un daño irreversible de las membranas del espermatozoide causando una pérdida prematura del contenido acrosomal y por lo tanto la incapacidad de completar la fertilización.²⁸

La zona pelúcida del ovocito contiene tres glicoproteínas que reciben el nombre de proteínas de zona 1, 2 y 3 (respectivamente ZP1, ZP2 y ZP3). La ZP1 y la ZP2 son proteínas estructurales, mientras que la ZP3 interactúa con receptores de membrana del espermatozoide. Se conocen dos sitios de unión en el espermatozoide: la región primaria de unión (ZBR) que es la responsable de la adherencia del espermatozoide con la zona pelúcida; y la región en donde se encuentran los ligandos promotores de la RA (ARPR) que al unirse con la ZP3 desencadenan una cascada de señalización dando inicio a la RA.²⁸

La única porción del acrosoma que se conserva después de la RA es el segmento ecuatorial, en el cual se establece un nuevo dominio de membrana que le permitirá al espermatozoide fusionarse con el óvulo.

En esta característica también se difiere de la falsa RA ya que en esta última se produce un daño irreversible de las membranas del espermatozoide causando una pérdida prematura del contenido acrosomal y por lo tanto la incapacidad de completar la fertilización.²⁸

3. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

El proceso de congelamiento del semen es conocido como criopresevación, como consecuencia de este proceso, el metabolismo de las células espermáticas se disminuye al mínimo, quedando activo únicamente el necesario para sobrevivir sin perder su capacidad fertilizante.³³

La IA utilizando semen criopreservado de carnero se ha visto limitada por las bajas tasas de fertilidad (25 al 45%) obtenidas.¹

El proceso de criopreservación causa diversos daños a la célula espermática, los cuales son provocados por los cambios de temperatura, el estrés osmótico

y tóxico que ejerce el crioprotector en la célula y la formación o disolución de hielo tanto fuera como dentro del espermatozoide.⁷

Se ha comprobado que existen varios rangos de temperatura que se consideran zonas críticas de temperatura, cuando se reduce la temperatura por debajo de los 20°C, el espermatozoide comienza a presentar cambios físicos a nivel de la membrana plasmática, y entre los -15°C y -60°C, se producen fenómenos como la formación de cristales de agua (sobreenfriamiento), la distorsión y desestabilización de la membrana y el estrés osmótico entre otros.^{11,16} De forma particular el semen de carnero sufre estos daños por congelación en el rango de temperatura de -10°C a -25°C.³⁴

El sobreenfriamiento es el fenómeno que ocurre cuando la suspensión de células es enfriada más allá de su punto de congelación sin que se forme hielo;³ por lo tanto el sobreenfriamiento, ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0° C y el agua extracelular se congela mientras que la intracelular no lo hace al mismo tiempo; ello debido a que la membrana funciona como una barrera que impide que el cristal extracelular crezca hacia el interior de manera continua.¹⁰

Cuando los espermatozoides son enfriados a una velocidad lenta se permite la deshidratación, logrando que el agua intracelular salga, formándose los cristales de hielo en los compartimentos extracelulares y evitándose así que la célula se dañe por efecto mecánico, sin embargo cuando la célula se deshidrata se eleva la osmolaridad por la alta concentración de solutos intracelulares, causándose un estrés osmótico.^{16,33}

Se ha comprobado que entre más rápido sea el proceso de congelación existirá una mayor probabilidad de que ocurra el fenómeno de choque frío y en consecuencia la muerte celular.^{10,34}

Thurston *et al* (2003)³³ observó que las curvas de congelación eran interrumpidas por un incremento de la temperatura a los -5°C , seguido de un periodo de rápido enfriamiento hasta alcanzar la temperatura de la cámara de congelación, por lo que concluyó que esta fluctuación de temperatura correspondía a la liberación del calor latente de fusión por la formación de hielo dentro de la muestra y que este recalentamiento y el subsecuente congelamiento rápido tenían un efecto detrimental sobre las células.

Por otra parte se ha observado que los espermatozoides que resisten el proceso de congelación y descongelación presentan modificaciones en la membrana plasmática similares a los que se producen durante la capacitación y la reacción acrosomal, como, la pérdida de fosfolípidos y colesterol o fracciones de estos.³⁵ La membrana del espermatozoide se daña durante la criopreservación y el descongelado, por lo que es más permeable, y los iones que se encuentran en altas concentraciones en el medio extracelular como el Ca^{2+} y Na^{+} entran a la célula estimulando los eventos dependientes del calcio, como lo es la capacitación y la reacción acrosomal.³⁶

Estos efectos han sido evaluados por la técnica de Clortetraciclina (CTC), un antibiótico, que tiene la capacidad de unirse al calcio presente en la membrana plasmática y seguir los cambios en su distribución durante la capacitación a través del uso de un microscopio de fluorescencia.^{37,38}

Grasa (2006)³² realizó un experimento para validar la tinción de CTC en el ovino, induciendo la capacitación a espermatozoides recién eyaculados con

diferentes medios capacitantes, se observó que a las 0 hrs de incubación las células presentaban un 71.6% del patrón correspondiente a “sin capacitar”, pero transcurridas 4hr de incubación, los patrones presentes en las muestra cambiaban a un 55.6% presentando el patrón correspondiente a “capacitado”. Con esto la técnica de CTC quedó validada para determinar el estado de capacitación del espermatozoide ovino.

Algunos autores han propuesto que durante la etapa de enfriamiento del semen, la membrana plasmática sufre cambios en el estado físico de los lípidos que la componen, que ocasiona que se presente una transición entre la fase del estado líquido-semicristalino al estado de gel.³⁶ Este fenómeno hace que la membrana se vuelva rígida y pierda elasticidad, por ello, algunos investigadores han prolongando el tiempo de enfriado del semen hasta temperaturas cercanas a 0°C^{13,14} antes de congelarlo, con lo que se ha logrado mejorar la viabilidad de los espermatozoides.

Por ello se puede suponer que si el semen se enfría durante un periodo de tiempo más largo, hasta alcanzar temperaturas más bajas, se permitirá el reacomodo transversal de los fosfolípidos y de los dominios de la estructura tridimensional lipídica de la membrana plasmática y se evitará la formación de hielo intracelular, manteniendo así su estabilidad y función.

Además se ha reportado que el citoesqueleto es otra estructura que sufre alteraciones por la criopreservación. Watson (1995),¹⁰ menciona que las proteínas del citoesqueleto espermático que soportan las membranas plasmáticas y acrosomal, pueden presentar despolimerización y repolimerización dependiente de temperatura, lo cual también sería un reflejo

de los rápidos cambios de volumen que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación.

Recientemente se ha demostrado que la TP del espermatozoide del bovino se daña durante la criopreservación; observándose que el porcentaje de espermatozoides con TP ausente se incrementa mientras que el número de espermatozoides vivos disminuye. Por lo que se ha inferido que el daño a la TP podría contribuir a la reducción de la viabilidad del semen congelado-descongelado.³⁹

El presente trabajo pretende estudiar algunos de los procesos que ocurren en el espermatozoide cuando se expone a bajas temperaturas, para poder diseñar protocolos de congelación que permitan mantener la viabilidad de las células y con esto dar un impulso al uso de la IA en los ovinos.

4. HIPÓTESIS

El daño a la membrana plasmática y a la funcionalidad del espermatozoide ovino disminuirá si el semen es enfriado lentamente hasta -5°C previo a la congelación.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del enfriado a 5°C y -5°C precongelación sobre la viabilidad del espermatozoide del ovino.

Objetivos específicos

1. Valorar el efecto del enfriado a 5°C y -5°C precongelación sobre la motilidad y la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide ovino.
2. Determinar el efecto del enfriado hasta 5°C y -5°C precongelación sobre el estado de capacitación espermática.
3. Comparar el efecto de ambas temperaturas sobre la viabilidad del espermatozoide ovino.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (C.E.I.E.P.O.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, ubicado en el poblado de Tres Marías, municipio de Huitzilac, Estado de Morelos, entre los meses de enero y febrero del 2006.

El centro se encuentra a una altura de 2810 m.s.n.m., el clima de la región es Cb (m) (w), con una precipitación pluvial de 1724.6 mm y una temperatura media anual de 9.9° C.

Se utilizó el semen de 2 carneros de la raza Suffolk y 2 de la raza Dorset, con una edad entre los 2 y 6 años, los animales presentaban buena condición corporal y estaban físicamente sanos.

La recolección del semen se realizó una vez por semana, colectando dos eyaculados por macho con el uso de la técnica de vagina artificial.¹

Los eyaculados recién colectados fueron mantenidos en un termo conteniendo agua a 30°C y enseguida se evaluaron macroscópicamente, tomando en cuenta el volumen, el color (cualquier cambio en la coloración fue motivo de descarte) y la presencia de cuerpos extraños.

Posteriormente se realizó la evaluación microscópica tomando en consideración la motilidad de los espermatozoides (movimiento en masa y el porcentaje de motilidad progresiva) y la concentración espermática del eyaculado.

Motilidad en masa

Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos limpio, seco y a 37°C, se observó con un microscopio fotónico (Ernst Leitz GmbH Wetzlar 490678) a un

aumento total de 100X. La estimación de la motilidad se basó en el vigor o potencia de la onda espermática, valorándose entre 0 y 5. Eyaculados con una valoración menor o igual a 3 fueron desechados para no ver comprometida las pruebas.¹

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas y remolinos de movimiento muy rápidos
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son rápidos
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No se aprecian ondas pero si movimiento de la muestra
1	Muy pobre	Muy poco movimiento
0	Muertos	Ningún movimiento

Adaptado de Salamon *et al* (1990).

Motilidad progresiva

Se utilizó una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica sobre un portaobjetos limpio, seco y a 37°C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio fotónico (Ernst Leitz GmbH Wetzlar 490678) a un aumento total de 400X. Se observaron varios campos y se valoró el porcentaje de espermatozoides motiles entre 0 y 100%,¹ desechando los eyaculados con un porcentaje menor al 60%.

Concentración del eyaculado

Se determinó el número de espermatozoides por mililitro con el uso de un hemocitómetro, utilizando la técnica descrita por Salamon *et al* (1990).¹

6.1 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Se empleó la tinción de Eosina-Nigrosina para evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, utilizando para ello un frotis

espermático que fue observado en el microscopio fotónico (Ernst Leitz GmbH Wetzlar 490678) a un aumento total de 1000X. Para realizar el frotis se colocó una pequeña gota de semen sin diluir en un extremo del portaobjetos y se agregó el colorante en una proporción de 1:2 respectivamente, mezclando perfectamente para poder extender el frotis, dejando secar al aire, una vez seco se aplicó resina para montar el cubreobjetos. Posteriormente, se procedió a la evaluación en el microscopio fotónico (Ernst Leitz GmbH Wetzlar 490678) a un aumento total de 400X, se observaron 100 células por muestra, diferenciándose las células que tuvieran la membrana plasmática alterada, por permitir que el colorante penetrara al interior de las mismas, tiñéndose totalmente o parcialmente de un color púrpura, mientras que aquellas células con membrana intacta no permitieron la penetración del colorante y por lo tanto no se tiñeron (transparentes).⁴⁰

En la práctica los términos “viable” o “vivo” son utilizados para describir a las células que presentan la membrana plasmática intacta.⁴¹

Algunos autores reportan que en los frotis teñidos con EN, los espermatozoides pueden observarse parcialmente teñidos y esto es considerado como un indicador de daño sobre la membrana, ya que hay una clara correspondencia de la porción no teñida con la región acrosomal de la cabeza, es posible que la yuxtaposición de la membrana plasmática con la membrana nuclear justo después de la porción posterior del acrosoma en la región ecuatorial evite la difusión del colorante en esa porción de la cabeza.⁴²

Dilución del semen

El semen fue diluido en un medio comercial* a base de glicerol, tris, ácido cítrico, fructuosa y antibióticos (según la norma europea vigente) adicionado

* Triladyl® Minitube

con yema de huevo y agua bidestilada en una relación 1:1:3 respectivamente; ajustando a una concentración de 800×10^6 células por mililitro.

Posteriormente, fue dividido en dos fracciones, una de ellas se empleó como semen fresco y la otra se sometió a un enfriamiento a dos diferentes temperaturas (5° y -5°) antes de congelar las muestras.

La muestra a congelar se almacenó en pajillas tipo francés de 0.25 ml^{43} a una concentración final espermática de 200×10^6 por dosis, fueron selladas con alcohol polivinilo, obteniendo diez pajillas por eyaculado (cinco pajillas para cada tratamiento de temperatura).

Periodo de equilibrio

El enfriado inició a una temperatura de 22°C (temperatura ambiente), la mitad de las pajillas fueron llevadas hasta alcanzar 5°C (~ 2 horas) y la otra mitad hasta llegar a -5°C (~ 1 hora más) utilizando para ello un recipiente de aluminio con capacidad de 350 ml conteniendo alcohol de 96° logrando con esto alcanzar temperaturas por debajo de 0°C en un refrigerador-congelador de uso doméstico. La temperatura interior de las pajillas fue monitoreada por medio de un termómetro digital cada 10 minutos.

La muestra de semen fresco fue conservada en un tubo de ensaye protegido de la luz en un termo cerrado que contenía agua a 30°C permitiendo que la temperatura descendiera lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente, en estas condiciones la muestra se transportó al Laboratorio del Departamento de Morfología de la FMVZ de la UNAM para continuar con su evaluación.

Congelación del semen

Una vez alcanzadas las temperaturas (5°C y -5°C) se congelaron las muestras, se colocó a las pajillas sobre una rejilla dentro de una hielera exponiéndolas a los vapores de nitrógeno líquido, a una altura de 4 cm sobre la superficie del nitrógeno para alcanzar una temperatura entre -130°C a -150°C, durante 15 minutos, finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196°C.¹

Las pajillas se conservaron por un periodo de 15 días en un termo contenedor de nitrógeno líquido⁴⁴ en el que fueron transportadas al Laboratorio del Departamento de Morfología para su evaluación.

Descongelación de semen

Se descongelaron dos pajillas por tratamiento en un baño maría a 37°C por 30 segundos,⁴⁵ el contenido se depositó en tubos de ensaye previamente atemperados e inmediatamente se realizó la evaluación microscópica de las células, así como la evaluación de la integridad de la membrana plasmática por medio de la tinción de Eosina-Nigrosina.

6.2 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La evaluación del estado de capacitación espermática para ambas muestras (fresca y congelada) se realizó por medio de la prueba de Clortetraciclina (CTC, Sigma) empleando para su observación un microscopio de fluorescencia (Leica 020-518.500 DM/LS) utilizando un filtro azul (excitación 405-455 nm).³⁷

Para eliminar el diluyente de congelación, las muestras, se lavaron por centrifugación en 3.5 ml de amortiguador de fosfato salino (PBS pH 7.4), a 1500 rpm por 10 minutos, este procedimiento se repitió cuantas veces fuera necesario hasta que el sobrenadante tuviera una apariencia cristalina,

posteriormente las muestras se resuspendieron en PBS ajustando a una concentración de 100×10^6 por ml.³⁷

Procedimiento:

1.- Agregar 45 μ l de solución de CTC a 45 μ l de muestra y mezclar por 30 segundos en oscuridad.

2.- Fijar la muestra con 10 μ l de solución de glutaraldehído al 1% (en Tris-HCl 0.5 M pH 7.4).

3.- Montar las muestras en portaobjetos previamente desengrasados, colocando 4 μ l de la muestra cubriéndola con una gota de solución de montaje, Glicerol:PBS (9:1).

4.- Colocar las laminillas al resguardo de la luz y en refrigeración hasta la observación en el microscopio de fluorescencia.

La solución de CTC se prepara antes de cada experimento utilizando la fórmula propuesta por Gillan *et al* (1997)³⁷:

Amortiguador para 10ml

Compuesto	Concentración	Gramos
NaCl	130mM	0.0759gr
Tris-HCl	20mM	0.0315gr
L-Cisteína	5mM	0.0087gr
CTC	750 μ M	0.00386gr

c.b.p. Agua destilada pH 7.8

La solución se debe de resguardar de la luz y estar en refrigeración hasta su uso.

Se evaluaron 100 células para determinar el porcentaje de los patrones de fluorescencia presentes. (figura 5)

Interpretación de la prueba de CTC:

Patrón	Descripción
Patrón F	Fluorescencia uniforme en toda la cabeza, o con un incremento en la fluorescencia en la zona de la protuberancia acrosomal, característico de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.
Patrón B	Fluorescencia en la región acrosomal, característico de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto
Patrón RA	Banda fluorescente en el segmento ecuatorial o fluorescencia en la región posacrosomal característico de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal

Modificado de Gillan *et al* (1997).³⁷

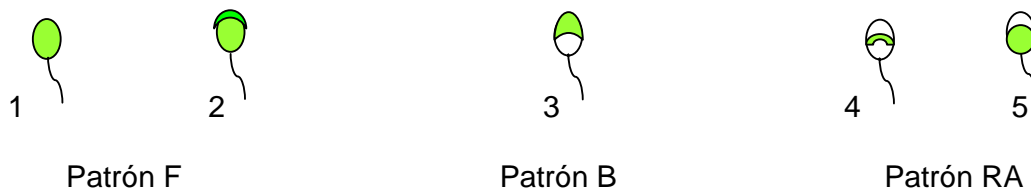


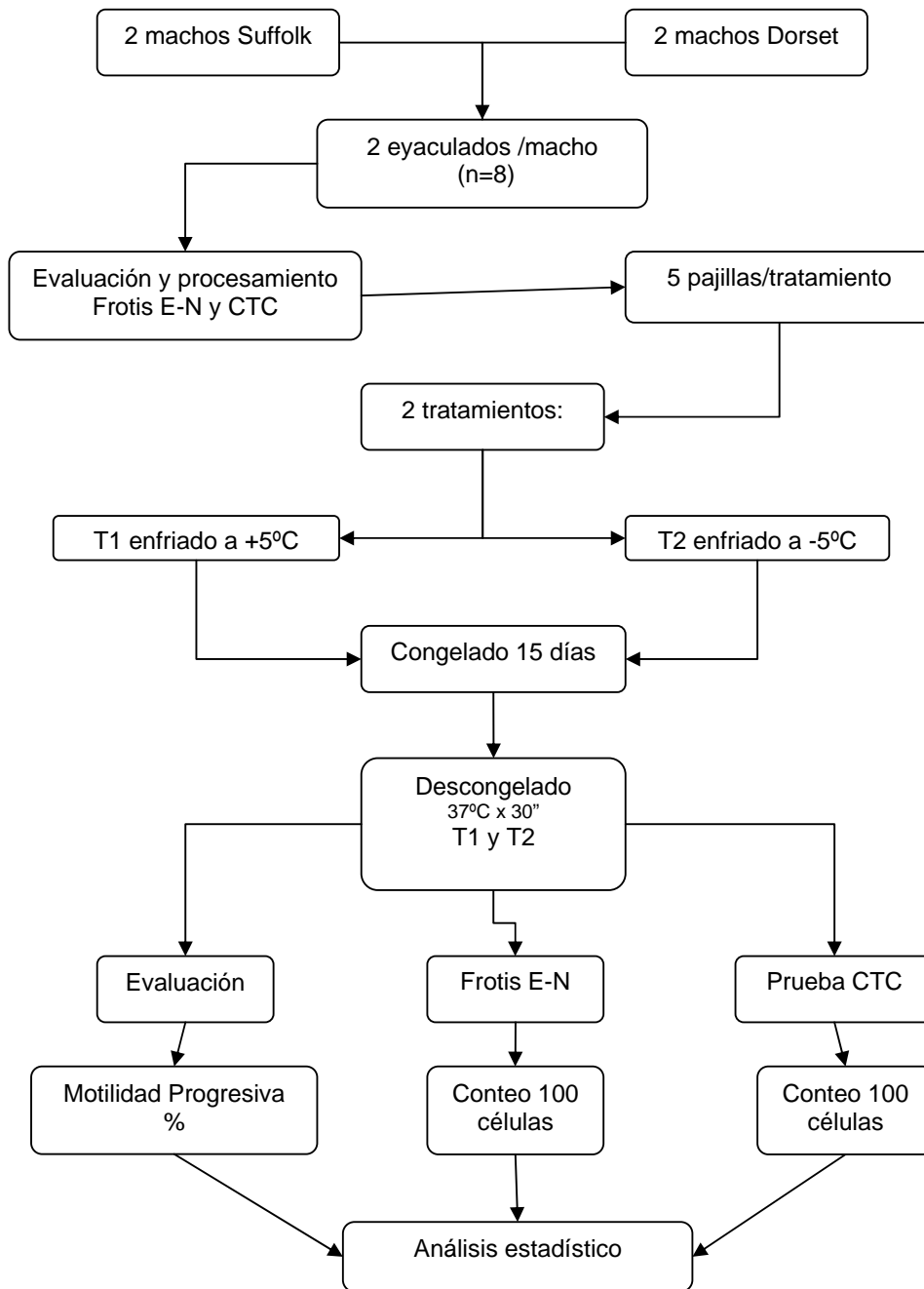
Figura 5.- Patrones de fluorescencia observados en el espermatozoide ovino, agrupados en tres categorías.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó una prueba de T pareada y Chi-cuadrada para comparar las diferencias entre medias; así como la prueba de Dunnett's, para comparar las medias de los tratamientos contra el grupo control.

Todo el procedimiento se resume en el siguiente cuadro:

Diseño experimental



8. RESULTADOS

I. Estandarización del sistema de enfriado

El enfriado de las muestras inició a una temperatura aproximada de 22°C, registrando un descenso de temperatura máxima de 0.29°C por minuto al inicio del enfriado, sin embargo conforme avanzó el descenso de la temperatura la velocidad de enfriado fue más lenta registrando en promedio de 0.05°C por minuto para alcanzar los 5°C en 2 horas aproximadamente.

La segunda fase del enfriado inició a los 5°C con un promedio en el descenso de temperatura de 0.13°C por minuto, logrando alcanzar los -5°C en una hora más aproximadamente.

Las curvas de tiempo – temperatura obtenidas de este sistema de enfriado fueron repetibles y tuvieron una variación mínima entre cada día de prueba (figura 6 y 7).

II. Motilidad, integridad de la membrana plasmática y estado de capacitación de los espermatozoides enfriados a 5°C y -5°C.

Motilidad

La motilidad progresiva en los eyaculados recién obtenidos fue entre un 60-90%, sin embargo en el macho 1 se presentaron de manera constante valores de motilidad inferiores a la de los demás machos (cuadro 1).

Se presentó una diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre las muestras de espermatozoides frescos y las muestras de espermatozoides congelados-descongelados a 5°C y -5°C (83.75, 38.12 y 53.12% respectivamente) (cuadro 1), sin embargo no se presentó diferencia entre tratamientos, los espermatozoides enfriados a -5°C presentaron una tendencia favorable en

cuanto al porcentaje de motilidad progresiva con respecto a los enfriados a 5°C. (figura 8).

Integridad de la membrana plasmática

Al comparar las medias de los espermatozoides con membrana plasmática intacta (MI), se observan diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0.01$), mostrándose una disminución de los espermatozoides con MI en las muestras congeladas-descongeladas; entre los dos tratamientos de enfriado precongelación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en la integridad membranal, siendo 30.87 y de 38.37% para los enfriados a 5°C y -5°C, respectivamente. (figura 9)

Estado de capacitación espermática

Los patrones de fluorescencia obtenidos por la prueba de CTC en las diferentes muestras se presentan en la figura 5.

Como se puede observar cinco patrones diferentes fueron identificados, el 1 y el 2 corresponderían a espermatozoides no capacitados (patrón F), el 3 a espermatozoides capacitados (patrón B) y los patrones 4 y 5 a espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (patrón RA).

Al comparar los patrones de fluorescencia entre la muestra proveniente de semen fresco y las criopreservadas enfriadas a las dos diferentes temperaturas no se encontró diferencia significativa entre ellas. (cuadro 2)

Sin embargo, al evaluar las diferencias numéricas por patrón correspondiente a capacitación prematura (patrones B y RA), el tratamiento de enfriado a -5°C mostró un menor número de estos (84, 53 y 59) con respecto al tratamiento a 5°C (119, 70 y 71), el número de células con estos patrones fue menor en las muestras provenientes de semen fresco (66,33 y 32). (figura 10)

Un cambio en el estado fisiológico de los espermatozoides fue notorio cuando se comparó la proporción de espermatozoides no capacitados "Patrón F" entre el semen fresco (83.62%) y el descongelado (5°C: 67.5% y -5°C: 75.5%) ; después de la criopreservación, disminuyó la presentación del patrón F, aumentando el número de espermatozoides capacitados con o sin reacción acrosomal "Patrón B + RA", encontrándose una diferencia estadísticamente representativa ($p \leq 0.05$) entre las muestras en fresco y las enfriadas a 5°C (cuadro 3) (figura 10).

Un cambio en el estado fisiológico de los espermatozoides fue notorio cuando se comparó la proporción de espermatozoides no capacitados "Patrón F" entre el semen fresco (83.62%) y el descongelado (5°C: 67.5% y -5°C: 75.5%) ; después de la criopreservación, disminuyó la presentación del patrón F, aumentando el número de espermatozoides capacitados con o sin reacción acrosomal "Patrón B + RA", encontrándose una diferencia estadísticamente representativa ($p \leq 0.05$) entre las muestras en fresco y las enfriadas a 5°C (cuadro 3) (figura 10).

9. DISCUSIÓN

I. Estandarización del sistema de enfriado

Durante la realización de este estudio se estandarizó una curva de enfriamiento en dos fases, la primera fase de 22°C a 5°C con una velocidad máxima de 0.29°C/min en aproximadamente dos horas y la segunda fase de 0.13°C/min desde 5°C a -5°C en una hora más. El protocolo de una curva de enfriamiento en dos fases se basa en el trabajo de Thurston *et al.* (2003)³³ donde proponen enfriar la muestra a 5°C en una primera fase y posteriormente hasta -5°C en una segunda fase, seguida de la congelación de la muestra.

La velocidad de enfriado alcanzada en la primera fase de la curva de enfriamiento en este trabajo corresponde a la velocidad utilizada por varios autores como "curva óptima de enfriamiento", esta curva puede estar expresada en grados centígrados por minuto o en el tiempo total que se requiere para lograr la temperatura deseada; Thurston *et al.* (2003)³³ en la especie porcina, propone una velocidad de enfriamiento de 0.2°C/min para llevar la muestra desde 39°C hasta 5°C; Bucak *et al.* (2007)⁴⁶ en la especie ovina obtiene una curva de enfriamiento desde temperatura ambiente hasta

5°C en dos horas, así como Kumar *et al* (2003)⁴¹ en las especies bovina, ovina y porcina, disminuye la temperatura desde 22°C hasta 5°C en dos horas a una velocidad de enfriamiento de 0.2°C/min, en este caso el presente trabajo coincide con el tiempo y la velocidad que se necesita para obtener la temperatura de 5°C.

Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo difieren con los reportados por Ríos (2004)¹⁴ en ovinos y Flores (2005)¹³ en porcinos ya que aunque ellos proponen velocidades de 0.2°C/min a partir de 22°C hasta 5°C, el sistema de enfriado a base de un doble envase utilizando solución salina hipertónica (7.85%p/v) que utilizaron, requiere de 3 hr para alcanzar los 5°C, lo cual difiere con el presente trabajo y todos los demás autores ya que si la temperatura desciende a velocidades de 0.2°C/min a partir de 23°C se requerirían 1.8 hrs para alcanzar la temperatura de 5°C, ante esto el sistema de enfriado utilizado en este trabajo presenta una mejoría ya que mantiene la velocidad necesaria para una “curva de enfriamiento óptima” en un menor tiempo (2 hrs) y esto representa, un ahorro en tiempo, en recursos técnicos y humanos que se verá reflejado en una disminución de costos.

La segunda fase de la curva de enfriamiento en este trabajo desciende a una velocidad de 0.13°C desde una temperatura de 5°C hasta -5°C (1.2 horas), esto concuerda con lo reportado por Rios (2004)¹⁴ y Flores (2005)¹³ ya que ellos proponen una velocidad promedio de 0.12°C/min en donde alcanzan temperaturas de -2°C en 30 minutos y de -5°C en 1.2 horas.

Estos resultados difieren con lo reportado por otros autores, Thurston *et al* (2003)³³ propone una curva de enfriamiento óptima desde 5°C a -5°C a una velocidad de 6°C/min, Kumar *et al* (2003)⁴¹ propone velocidades de 5°C/min y

Sereno *et al* (2004)⁴⁷ propone velocidades de 1°C/min, todas estas curvas de enfriamiento se encuentran por arriba de la velocidad manejada en este trabajo (0.13°C/min).

Por otra parte, cabe resaltar que las velocidades logradas por estos autores requieren de la utilización de cámaras congeladoras, en comparación al método utilizado en el presente estudio donde se obtuvieron temperaturas bajo cero utilizando un congelador doméstico, desde un principio esto muestra una ventaja en cuanto a la accesibilidad del sistema de enfriado.

Se ha sugerido que una causa parcial de la reducción en la calidad del semen descongelado es el uso de curvas de congelamiento subóptimas, siendo estas demasiado rápidas o muy lentas.

Aunado a esto, las curvas de congelación sufren variaciones de temperatura durante su desarrollo, ya que, durante la criopreservación las muestras de semen liberan calor latente de fusión al transformar de líquido a hielo la muestra,⁴⁸ causando un marcado incremento en la temperatura que interfiere en la curva de enfriamiento “óptima”,^{49,50} el inicial incremento de temperatura es seguido por un periodo de rápido enfriamiento al disipar el calor latente de fusión, con este enfriado rápido la muestra de semen se equilibra con la temperatura que la rodea dentro de la cámara de congelación.

En el presente estudio se utilizó un sistema de enfriado lento a temperaturas cercanas a cero grados empleando recipientes de aluminio y alcohol de 96°, este es un sistema que puede utilizarse fácilmente, que proporciona curvas de enfriado constantes y repetibles, lo que nos permite utilizarla como alternativa para prescindir de sistemas especializados, sofisticados y de alto costo para la congelación de semen.

Durante el desarrollo de las curvas de congelación, se presenta la liberación del calor latente por parte de la muestra, con su consecuente enfriado rápido para poder mantener un equilibrio con la cámara de congelación, si la cámara de congelación disminuye rápidamente la temperatura, los espermatozoides de la muestra tendrán menos tiempo para realizar los cambios necesarios y adecuarse a temperaturas mas bajas, esto se vera reflejado en un mayor daño celular, por lo que un enfriado a velocidades más lentas entre 5°C y -5°C como el que se presenta en este trabajo, nos dará la oportunidad de que al momento de la liberación de calor latente sea más fácil (menos tiempo y temperatura) para la muestra alcanzar el equilibrio con la cámara. Al disminuir las fluctuaciones de temperatura en este punto y permitir que la membrana plasmática tenga suficiente tiempo para reorganizar su estructura tridimensional después de la transición de fases,¹⁵ se disminuirá el daño al espermatozoide.

Después de alcanzar las temperaturas deseadas (5°C y -5°C) en este experimento, las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno liquido por 15 minutos; Kumar *et al* (2003)⁴¹ reporta en su experimento que la mejor velocidad para disminuir la temperatura de las pajillas de semen desde -5°C hasta -50°C es de -30°C/min para después sumergirlas en nitrógeno liquido y que esta velocidad se alcanza utilizando un gradilla que mantenga a las pajillas a una altura de 4-5 cm sobre la superficie del nitrógeno liquido; esto corresponde a lo realizado en este trabajo, con lo que se valida por completo el proceso de congelación de las muestras.

II. Motilidad, integridad de la membrana plasmática y estado de capacitación de los espermatozoides enfriados a 5°C y -5°C.

La viabilidad de la célula espermática decrece rápidamente luego de la eyaculación, aunque la criopreservación permite conservar a las células por largo tiempo, este proceso ocasiona un daño sobre la membrana plasmática, que al ser irreversible causa la muerte celular o cambios parecidos a los que se observan durante la capacitación espermática.^{6,36}

En el presente trabajo se utilizaron muestras de semen que presentaron del 67.5% al 90% de motilidad progresiva. Es importante tomar en cuenta que el macho "1" presentó valores constantemente menores, aunque aceptables para la congelación, a los de los otros machos.

Holt (2000)³ propone que existe una variación importante entre individuos en la susceptibilidad a la criopreservación, viéndose implicado un componente genético que se manifiesta probablemente en la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática del espermatozoide y puede presentarse como una característica racial esto explicaría el por que el macho "1" presenta valores de motilidad menores a los de los otros machos.

Los resultados del presente trabajo presentan un tendencia positiva hacia el tratamiento a -5°C, siendo mayor el porcentaje de células motiles al descongelado en el tratamiento de -5°C (53.12%) con respecto al tratamiento a 5°C (38.12%), con una diferencia porcentual a favor de 15% de motilidad progresiva en el tratamiento a -5°C esto coincide con lo reportado por Flores (2005)¹³ en semen porcino, con Ríos (2005)¹⁴ en semen ovino y con Medrano *et al* (2003)¹⁵ en semen caprino, sus resultados demuestran una mejora en la

motilidad progresiva al llevar las muestras de semen a temperaturas debajo de los 0°C antes de ser expuestas a los vapores de nitrógeno para congelarlas.

Flores (2005)¹³ obtiene una diferencia estadística entre sus tratamientos, ya que llevando la muestra hasta 5°C obtiene un 34.7% de motilidad progresiva post-descongelado y con el tratamiento a -5°C un 36.9% la diferencia porcentual entre sus tratamientos es de un 2.2% a favor del tratamiento a -5°C.

Ríos (2005)¹⁴ obtiene resultados similares habiendo una diferencia estadística entre sus tratamientos para la variable de motilidad progresiva, donde a -2°C presenta el 43.8% de células motiles y a 5°C el 40.1% teniendo una diferencia porcentual de 3.7%. Medrano (2003)¹⁵ no obtuvo diferencias estadísticas entre sus tratamientos obteniendo para el tratamiento a 5°C un 37.4% contra un 40.1% para el tratamiento a -5°C, presentando una diferencia de 2.7% entre tratamientos.

Por otro parte Kumar *et al* (2003)⁴¹ reporta motilidades al descongelado de 31.7%, esto representa 21.42% por debajo de las motilidades presentadas en este trabajo.

Se ha mencionado que esta mejora esta relacionada a un enfriamiento lento en temperaturas cercanas a 0°C ya que permite la deshidratación celular previa a la formación de cristales de hielo, formándose estos en su mayoría en el compartimiento extracelular y al disminuir la velocidad de enfriamiento en este rango de temperatura (5°C a -5°C), se disminuirá el fenómeno de choque frío.^{13,14}

Aunque se ha considerado que la correlación de la motilidad espermática con la fertilidad es baja, existen trabajos donde se ha identificado a ésta como un indicador consistente de la fertilidad obtenida en granja,⁵¹ y en un estudio de

FIV con semen criopreservado realizado en humanos se encontró que tanto motilidad progresiva como vigor eran factores relacionados estrechamente con la fertilidad⁵² por lo que al presentar un incremento del 15% en la motilidad progresiva en el tratamiento a -5°C se podría repercutir en un incremento en la fertilidad.

El presente trabajo utilizó la tinción de E-N para obtener los valores de integridad de membrana plasmática, no se presentó diferencia estadística entre tratamientos, sin embargo existe una tendencia numérica que refleja un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra utilizando el tratamiento de -5°C (38.37%) en contra del tratamiento a 5°C (30.87%) existiendo una diferencia de 7.5% entre tratamientos.

En este punto es importante señalar que los estudios recientes utilizan para evaluar la viabilidad espermática, colorantes fluorescentes como el yoduro de propidio (PI) el cual se une, tiñe el DNA celular, y sólo logra penetrar al espermatozoide cuando la MP está dañada sin sufrir interferencia por el medio extracelular,^{53,54} se ha comprobado que esta tinción fluorescente presenta mejores resultados al detectar espermatozoides con membrana plasmática dañada “muertos” que con el uso de tinciones de E-N.⁵⁵

Los resultados de este estudio contrastan con lo reportado por Ríos (2005)¹⁴ y Medrano *et al* (2003)¹⁵ ya que reportan una diferencia estadística entre los tratamientos utilizados; Ríos (2005)¹⁴ obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana íntacta con la utilización de un enfriado hasta -2°C (78.3%) siendo mayor en un 2.7% al tratamiento a 5°C (75.6%), Medrano *et al* (2003)¹⁵ reporta un 50.6% de espermatozoides con membrana plasmática íntacta en el tratamiento de 5°C y un 58.3% en -5°C, existiendo una diferencia

de 7.7% entre tratamientos. La diferencia entre estos trabajos y el aquí expuesto podrían atribuirse a que la muestra con la que se trabajo es muy pequeña (n=8), ya que Ríos (2005)¹⁴ utilizo un total de 20 eyaculados de ovino, aun así, los resultados de este trabajo mantienen una tendencia numérica similar, donde el enfriado por debajo de 0°C mejora la viabilidad.

Kumar *et al* (2003)⁴¹ reporta un 46% de espermatozoides “viables” después del descongelado, esto representa un incremento del 7.63% en células con membrana plasmática intacta, esta diferencia puede atribuirse a que en el experimento de Kumar se utilizó una tinción combinada de diacetato de carboxyfluoresceína y ioduro de propidio siendo estas pruebas mas sensibles para detectar el daño en membrana.

Sin embargo los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Flores (2005)¹³ donde no se presentó diferencia estadística, pero, se observa un 57.5% en el tratamiento a 5°C y 61.3% a -5°C teniendo una mejora de 3.8% a favor de este ultimo, esto coincide con la hipótesis de que la desestabilización y daño a la membrana asociada a la criopreservación puede ser atribuida en mayor proporción al proceso de enfriado, que al congelado y descongelado, y que esta integridad se ve comprometida si no se realiza un enfriado de forma lenta alrededor de los 0°C.⁴²

La capacitación espermática ha sido relacionada con cambios espermáticos en la concentración de iones intracelulares, en la fluidez de la membrana plasmática, en la motilidad, en el metabolismo y en la fosforilación de proteínas.³⁰

Se sabe que los espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación presentan una desestabilización de la MP lo que altera la concentración iónica

de la célula por un aumento de fluidez de la membrana, esto a su vez, hace susceptibles a los espermatozoides a presentar una RA prematura, acortando considerablemente su periodo de vida.³⁶

En el presente trabajo se utilizó la tinción de CTC para valorar el estado de capacitación de los espermatozoides de ovino, esto respaldado por el trabajo de Grasa (2006).³² Los resultados no muestran una diferencia estadística al comparar los patrones obtenidos en el semen fresco (F=83.62%, B=8.25% y RA=8.12%) contra los del semen enfriado a 5°C (F=67.5%, B=14.87% y RA=17.62%) y a -5°C (F=75.5%, B=10.50% y RA=13.99%); al agrupar los patrones para obtener dos categorías “no capacitados” (Patrón F) y “alterados” (Patrón B + RA) se obtiene una diferencia estadística ($P \leq 0.05$) al comparar el semen fresco (F: 83.62%, B+RA: 16.37%) contra el semen enfriado a 5°C (F: 67.5%, B+RA: 32.49%), lo cual refleja un menor daño fisiológico al espermatozoide al llevar el enfriado hasta -5°C.

Guillan (1997)³⁷ y Pérez-Pé (2002)⁵⁶ reportan una diferencia estadística entre los patrones presentes en el semen fresco contra los del semen descongelado, esto corresponde con los resultados de nuestro trabajo.

En nuestro estudio el porcentaje de espermatozoides con capacitación prematura fue menor en el tratamiento de enfriado a -5°C (24.49%), con respecto a el tratamiento a 5°C (32.49%) esto coincide con lo reportado por Flores (2005)¹³, Ríos (2005)¹⁴ ellos reportan un menor porcentaje de células capacitadas con y sin RA en las muestras que fueron enfriadas hasta temperaturas bajo 0°C, por lo que este tratamiento podría estar disminuyendo el proceso de desestabilización de la membrana plasmática evitando así la entrada de calcio y por lo tanto la capacitación prematura.

Estos resultados podrían indicar que existe un menor daño a la membrana plasmática en los espermatozoides enfriados hasta -5°C ya que se presenta una mayor proporción de espermatozoides no capacitados (patrón F) debido al mantenimiento de la integridad y funcionalidad de su membrana.

Jiménez (2007)⁵⁷ menciona que la criopreservación altera la teca perinuclear (TP) del espermatozoide ovino, sin embargo los espermatozoides enfriados a -5°C previo a la congelación presentan un mayor porcentaje de TP integra con respecto a la temperatura de enfriado a 5°C , por lo que, tomando en cuenta que la baja fertilidad del semen criopreservado podría ser atribuida no solo al daño primario de la membrana plasmática sino también a daños en otras estructuras como la TP, el enfriado lento hasta -5°C representaría una mejora sobre esta estructura y por lo tanto en la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.

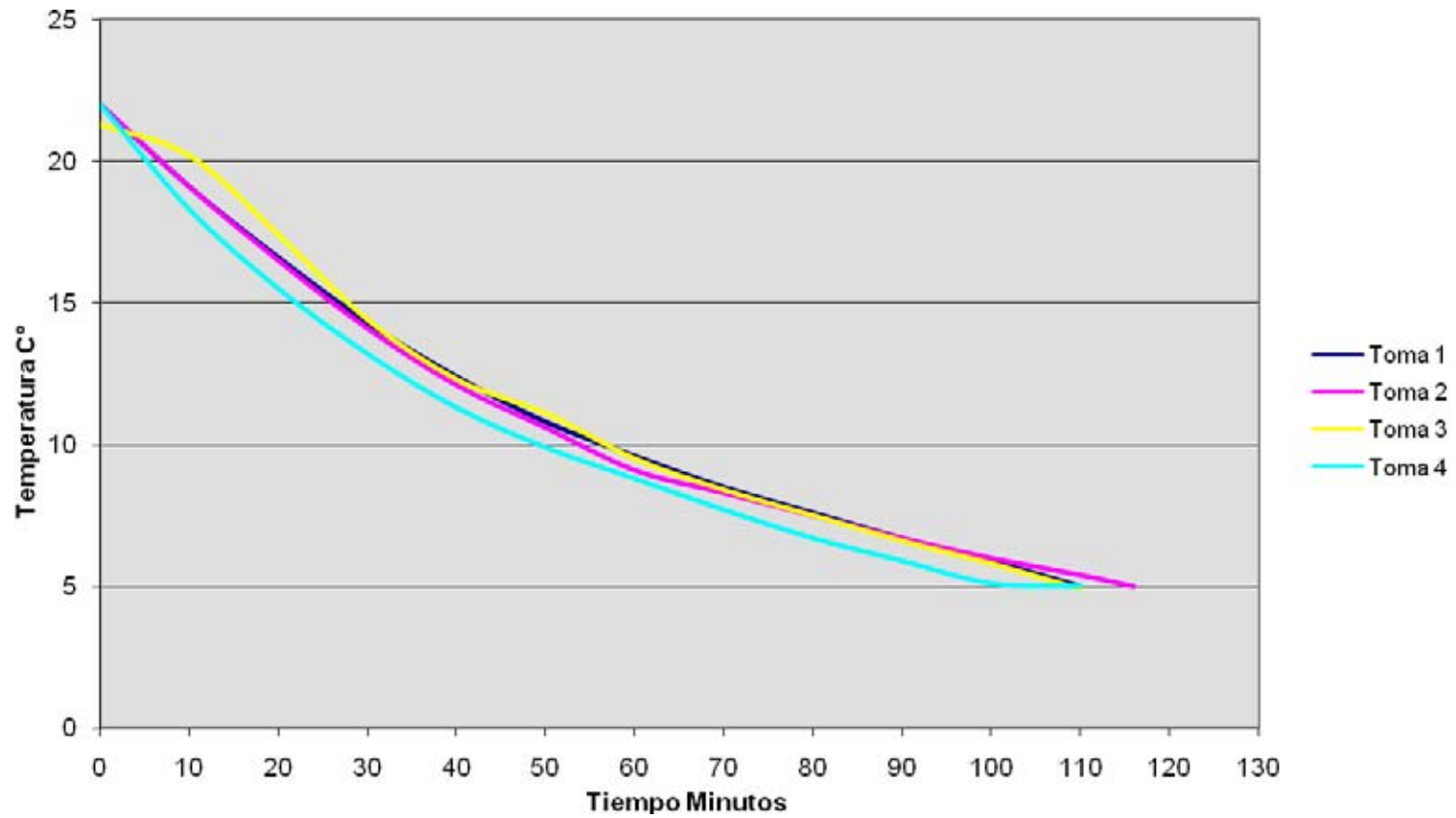
Jiménez (2007)⁵⁷ menciona que la criopreservación altera la teca perinuclear (TP) del espermatozoide ovino, sin embargo los espermatozoides enfriados a -5°C previo a la congelación presentan un mayor porcentaje de TP integra con respecto a la temperatura de enfriado a 5°C, por lo que, tomando en cuenta que la baja fertilidad del semen criopreservado podría ser atribuida no solo al daño primario de la membrana plasmática sino también a daños en otras estructuras como la TP, el enfriado lento hasta -5°C representaría una mejora sobre esta estructura y por lo tanto en la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.

10. CONCLUSIONES

Se concluye que el enfriado del semen a -5°C previo a la congelación disminuye el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal al descongelamiento

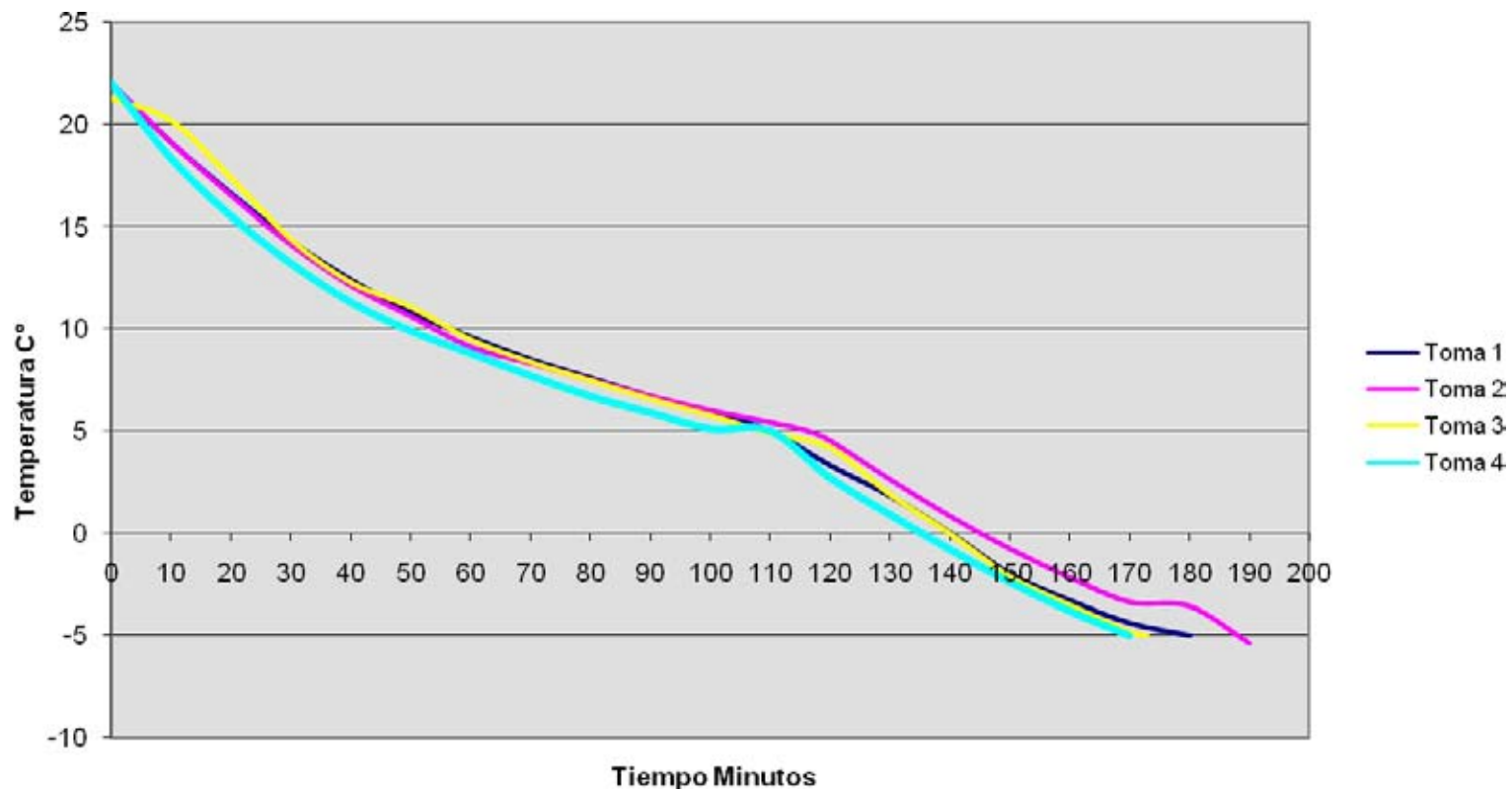
Se recomienda seguir esta línea de investigación aumentando el número de machos analizados, así como el número de eyaculados por macho y comparar los hallazgos de laboratorio contra los resultados de fertilidad y prolificidad *in vivo* en borregas inseminadas artificialmente.

Figura 6. Curva de enfriamiento de las muestras desde 22°C hasta 5°C.



* Para la construcción de la curva la temperatura se registró cada 10 minutos y se realizaron 4 repeticiones.

Figura 7. Curva de enfriamiento de las muestras desde 22°C hasta -5°C.



* Para la construcción de la curva la temperatura se registró cada 10 minutos y se realizaron 4 repeticiones.

Cuadro 1. Motilidad progresiva de los espermatozoides enfriados a 5°C y -5°C en fresco y después del proceso descongelado.

	Fresco	5°C	-5°C
Macho	%	%	%
1	67.5	22.5	32.5
2	90	32.5	40
3	87.5	42.5	65
4	90	55	75
Media	83.75±10.88 ^a	38.12±13.9 ^b	53.12±20.14 ^b

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

Figura 8. Medias de motilidad progresiva de los espermatozoides en el semen fresco y al descongelado con los distintos tratamientos de enfriado precongelación (5°C y -5°C).

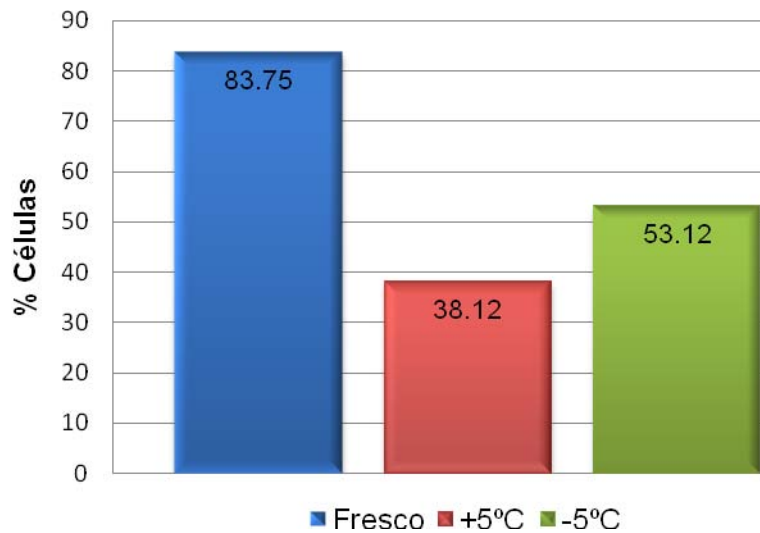
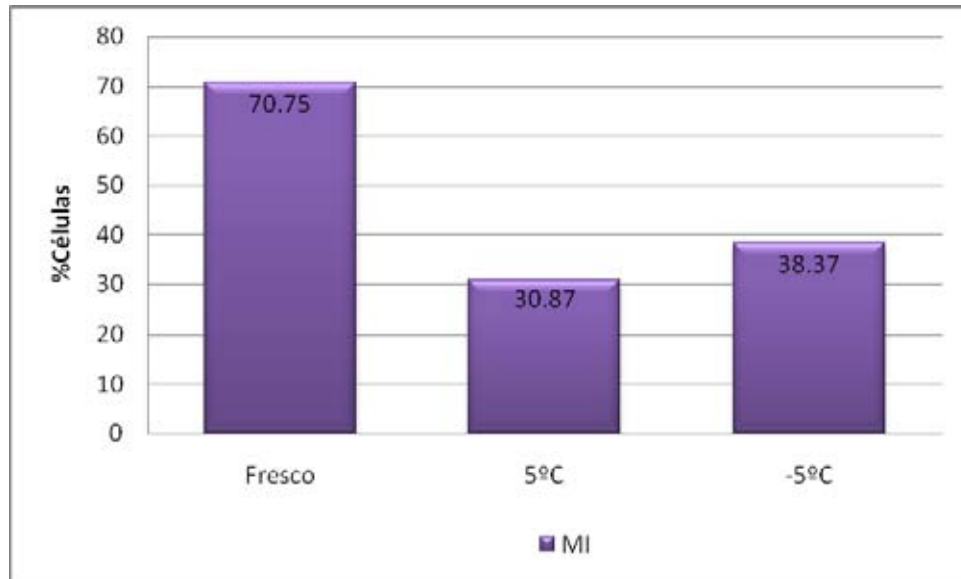


Figura 9. Medias y porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (MI) en el semen fresco y descongelado en los distintos tratamientos de enfriado precongelación (5°C y -5°C).



E-N	Fresco		5°C		-5°C	
	# Células	%	# Células	%	# Células	%
MI	566 ^a	70.75	247 ^b	30.87	307 ^b	38.37

Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P \leq 0.01$) E-N o Eosina-Nigrosina.

Cuadro 2. Medias y porcentajes de patrones de fluorescencia de CTC, en espermatozoides frescos y descongelados en los distintos tratamientos de enfriado precongelación (5°C y -5°C).

Patrón	Fresco		5°C		-5°C	
	# Células	%	# Células	%	# Células	%
1	218 ^a	27.25	276 ^a	34.50	336 ^a	42.00
2	451 ^a	56.37	264 ^a	33.00	268 ^a	33.50
3	66 ^a	8.25	119 ^a	14.87	84 ^a	10.50
4	33 ^a	4.12	70 ^a	8.75	53 ^a	6.62
5	32 ^a	4.00	71 ^a	8.87	59 ^a	7.37
Totales	800	100	800	100	800	100
	Patrón F= 1 y 2		Patrón B= 3		Patrón RA= 4 y 5	

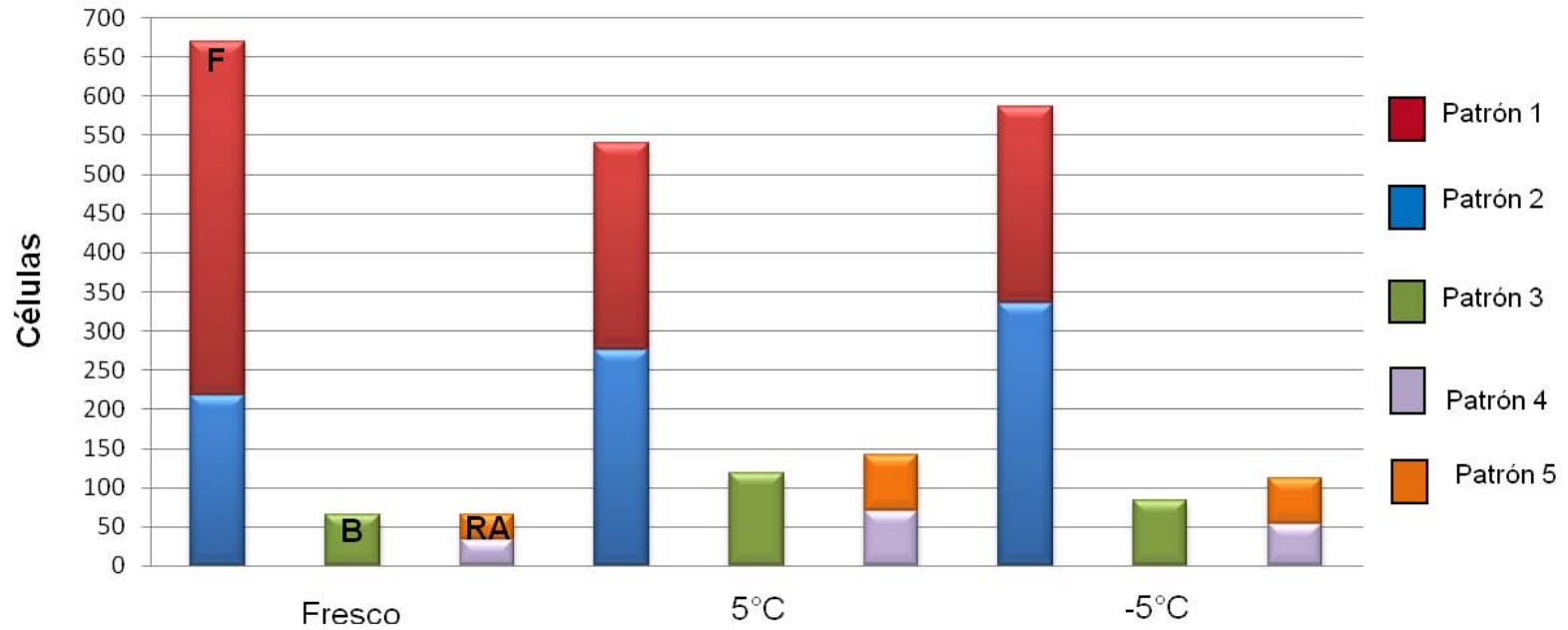
Literales diferentes indican por línea diferencia significativa. (P≤0.01)

Cuadro 3. Medias y porcentajes de espermatozoides “no capacitados” y “capacitados” en semen fresco y descongelado en los distintos tratamientos de enfriado (5°C y -5°C).

	Fresco		5°C		-5°C	
	%	Media	%	Media	%	Media
No capacitados	83.62	87.71±9.75 ^a	67.50	67.5±14.60 ^b	75.50	72.57±9.71 ^a
Capacitados	16.37	12.28±9.76 ^a	32.49	32.5±14.60 ^b	24.49	27.43±9.71 ^a

Literales diferentes por línea indican diferencia estadística (p≤0.05)

Figura 10. Número de espermatozoides por patrón de CTC* presentes en el semen antes y después de la criopreservación



* Prueba de Clortetraciclina

Patrón 1 y 2: Espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto.

Patrón 3: Espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.

Patrón 4 y 5: Espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salamon S. Evans G. Maxwell W. M. C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1ª ed. España: Acribia, 1990.
2. Polge C. Smith A.U. Parkes A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949; 164:666.
3. Holt M. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53:47-58.
4. Ortíz A. Antecedentes sobre el uso de la inseminación artificial. *Memorias del curso de inseminación artificial en ovinos* 2005; 27-28.
5. Salamon S. Maxwell W. M. C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62:77-111.
6. Hafez E. S.E. Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. 7ª ed. México: Interamericana-Mc Graw-Hill, 2002.
7. Watson P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:481-492. Página: 46
8. Salamon S. Maxwell W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 38:1-36.
9. Maxwell W. M. Evans G. Rhodes S. L. Hillard M. A. Bindon B. M. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993 5 (1):57-63.

10. Página: 47

Watson P. F. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7:871-891.

11. Palacios A. A. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet. Méx.* 1994; 25:207-210.

12. Buhr M. Canvin A. Bauley L. Effects of Semen Preservation on Boar Spermatozoa Head Membranas. *Gamete Research.* 1990; 23:441-449.

13. Flores G. H. F. 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. Fac. de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2005.

14. Ríos G. E. 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. Fac. de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2005.

15. Medrano A. Cabrera F. González F. Batista M. Calero P. Quesada E. Gracia A. Slow Cooling to -5°C before Freezing Improves Buck Sperm Cryosurvival. Abstracts 38th Annual Meeting. 2003.

16. Salomon S. Maxwell W. M. C. Frozen storage of ram semen I. progressing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 3-4 (37):185-249.

17. Fawcett D. W. The Mammalian Spermatozoon. *Developmental Biology.* 1975; 44:394-436.

- 18.** Amann R. P. Picket B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine. Vet. Sci.* 1987; 7:145-171.
- 19.** Juhász J. Nagy P. Kulcsár M. Huszenicza G. Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion. *Acta. Vet. Brno.* 2000; 69:247-250.
- 20.** Garde J. G^a Artiga C. Gutierrez A. Vázquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Medicina Veterinaria*, 1992; 9:107-114.
- 21.** Página: 48
Knobil. *Physiology of Reproduction*. Vol 1. 3 ed. Elsevier. USA. 2006. 56-65.
- 22.** Longo F. J. Krohne G. Franke W. W. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biol.* 1987; 105 (3):1105-20.
- 23.** Cummins J. M. Woodall P.F. On mamalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 75 (1):153-75.
- 24.** Parks J. E. Graham J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992; 38(2):209-22.
- 25.** Alberts B. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. Garland Science. USA. 2008.
- 26.** Holt W. V. North R.D. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 73(1):285-94.
- 27.** McKee T. McKee R. *Bioquímica Las base molecular de la vida*. 3^{era} ed. McGraw Hill. España. 2003.

28. Senger P. L. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. Current Conceptions, Inc. USA. 2003.
29. Curry M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Reviews of Reproduction. 2000; 5:46-52.
30. Visconti P. E. Bailey J. L. Moore G. D. Pan D. Olds-Clarke P. Kopf G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Development. 1995; 121 (4):1129-37.
31. Galina C. Valencia J. Reproducción de Animales Domésticos, 3^{da} ed. Limusa, D.F. México, 2008.
32. Grasa P. Cebrián-Pérez J. A. Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. Reproduction. 2006; 132:721-732.
33. Thurston L. M. Holt W. V. Watson P. F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. Theriogenology. 2003; 60:101-113.
34. Byrne G. P. Lonergan P. Wade M. Duffy P. Donovan A. Hanrahan J. P. Boland M. P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 2000; 62:265-275.
35. Holt W. V. North R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol. Reprod. 1994; 51 (3):414-24.
36. Watson P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. Reprod. Dom. Anim. 1996; 31:135-140.

37. Gillan L. Evans G. Maxwell W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997; 9:481-487.
38. Pérez L. J. Valcárcel A. de las Heras M. A. Moses D. Baldassarre H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology.* 1996; 46:131-140.
39. Martínez O. C. Juárez-Mosqueda M de L. Hernández J. Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology.* 2006; 66:1969-1975.
40. Dott H. M. Foster G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "Live/Dead" stain. *J. Reprod. Fert.* 1972; 29:443-445.
41. Kumar S. Millar J. D. Watson P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 2003; 46(3):246-53.
42. Maxwell W. M. Johnson L. A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology.* 1997; 48(2):209-19.
43. Heiko P. Lennart S. Tormod Å. Anne N. Bjørn G. Kjell A. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology.* 2004.61(9):1719-1727.
44. Gosálvez L. F. Vidal A. Valdelvira J. Babot D. Influencia del tiempo de crioconservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heteroespermáticas con baja calidad. *Arch. Zootec.* 2003; 52:81-84.

- 45.**Angulo M. R. B. Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen ovino. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F., 1988.
- 46.**Bucak M. N. Ateşşahin A. Varişli O. Yüce A. Tekin N. Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 2007; 67(5):1060-7.
- 47.**Sereno J. R. B. Delgado J. V. Sereno F. T. P. S. Barba C. Cabello A. Criopreservación de espermatozoides porcinos. *Biodiversidad Porcina Iberoamericana: Caracterización y uso sustentable*. Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba. España. 2004; 273-279.
- 48.**Fiser P. S. Ainsworth L. Fairfull R. W. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 1987; 28(5):599-607.
- 49.**Bwanga C. O. Einarsson S. Rodriguez-Martinez H. Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta. Vet. Scand*. 1991; 32(4):455-61.
- 50.**Medrano A. Watson P. F. Holt W. V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*. 2002; 123(2):315-22.
- 51.**Holt C. Holt W. V. Moore H. D. Reed H. C. Curnock R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl*. 1997; 18(3):312-23.

- 52.** Kelly M. P. Corson S. L. Gocial B. Batzer F. R. Gutmann J. N. Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination: determinants for success. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 2682 - 2686.
- 53.** Harrison R. A. Vickers S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 88:343 - 352.
- 54.** Peña A. I. Quintela L. A. Herradón P. G. Flow Cytometric Assessment of Acrosomal Status and Viability of Dog Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1999; 34:495-502.
- 55.** Chalah T. Brillard J. P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology.* 1998; 50(3):487-93.
- 56.** Pérez-Pé R, Grasa P, Fernández-Juan M, Peleato ML, Cebrián-Pérez JA, Muño-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61(2):226-33.