



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE ESTRÉS OSMÓTICO  
EN ESPERMATOZOIDES CAPRINOS PARA SIMULAR  
EL ESTRÉS DEL PROCESO CONGELADO-DESCONGELADO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ANA RUTH RANGEL ALONSO**

**ASESOR: DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**

**COASESOR: M. en C. CÉSAR GARZÓN PÉREZ**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos  
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Validación de una prueba de estrés osmótico en espermatozoides  
caprinos para simular el estrés del proceso congelado-descongelado"

que presenta la pasante: Ana Ruth Rangel Alonso  
con número de cuenta: 09612737-1 para obtener el título de :  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en  
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Junio de 2010

PRESIDENTE	Dr. Armando Enrique Esperón Sumano	
VOCAL	MC. César Garzón Pérez	
SECRETARIO	MC. Alan Olazábal Fenochio	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Niza Karina Mendoza Cardelas	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Francisco Rodolfo González Díaz	

## AGRADECIMIENTOS:

---

*Gracias a mi asesor el Dr. Alfredo Medrano, por su tiempo, por su apoyo y por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, así como la amistad que me ha brindado.*

*Gracias a mi coasesor el M. en C. César Garzón, por la confianza, apoyó y por todo el tiempo que me brindo con mis infinitas dudas, por todos los consejos, regaños y palabras de aliento que me dio, pero sobre todo por encontrar un gran amigo en él.*

*Gracias al Dr. Francisco González, por el apoyo ofrecido en los momentos difíciles de este trabajo, haciendo mi investigación lo menos difícil posible y por su amistad brindada.*

*Gracias a la Dra. Rosalba Soto a la Dra. Angélica y a la MVZ Alicia por la amistad que me brindaron, así como las porras y palabras de aliento que me dieron ya que fueron de gran ayuda en este trabajo.*

*Gracias a la Dra. Patricia Mora y a la MVZ Niza Mendoza, por facilitar a los animales que han servido para esta investigación.*

*Gracias a Francisco, Rocío, César, Niza, Dr. Medrano, Dr. Francisco, por haber contribuido en gran medida a la obtención de muestras y que siempre estaban ahí para ayudarme.*

*Gracias a mis sinodales: Dr. Enrique Esperón, M en C. César Garzón, M en C. Alan Olazábal, MVZ. Niza Mendoza, M en C. Francisco González, por el apoyo, tiempo y consejos para que este trabajo tuviera los menos errores posibles y para que yo pudiera seguir mi camino.*

*Gracias a Mayra y a Alma, por su apoyo y haberme hecho compañía durante las largas horas de trabajo, y gracias May por lavar todo el material de cada día de práctica, fuiste de gran ayuda, sabes que parte de este trabajo es tuyo.*

*Gracias a todos los amigos que encontré en este sendero: Deyanira, Iliana, Sócrates, Gloria, Carmen, Lizbeth, Erick, Katia, Laura Palma. Laura Hdez., Maritza, Lalo, Guillermo, Diana Garduño, Mariana, y que todos juntos en buenos y malos momentos han estado. Gracias por escribir junto conmigo este capítulo que hoy se lee fin.*

*A mis "chivos", sin los cuales indudablemente no hubiese sido posible realizar este trabajo.*

*Gracias a mi Alma Mater la UNAM por ser parte de ella desde hace mucho tiempo y permitir seguir preparándome en este camino en el cual no tiene fin.*

## DEDICATORIAS:

*Al ser supremo por dejarme pertenecer a un algo, a una historia que he de escribir con cada día de mi vida.*

*A mis padres Jesús Rangel e Inés Alonso, por darme la vida y estar conmigo en cada paso que he dado, por darme una carrera para mi futuro y por apoyarme aunque el camino no se vea claro.*

*A mis hermanos Isabel y Javier, por el apoyo dado a lo largo de la vida y que juntos venceremos los obstáculos que estén frente a nosotros.*

*A mis tías María y Felipa Alonso, por estar cuidándonos y por estar siempre con nosotros.*

*A Víctor Mora, por ser una parte importante de mi vida, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, por tu amor y comprensión en las decisiones que tomo en cada paso que doy, te amo.*

*A mis primos Leobardo<sup>†</sup> y Alejandro Alonso<sup>†</sup>, mi luto eterno por ustedes.*

*En un día, en una hora, en un segundo*

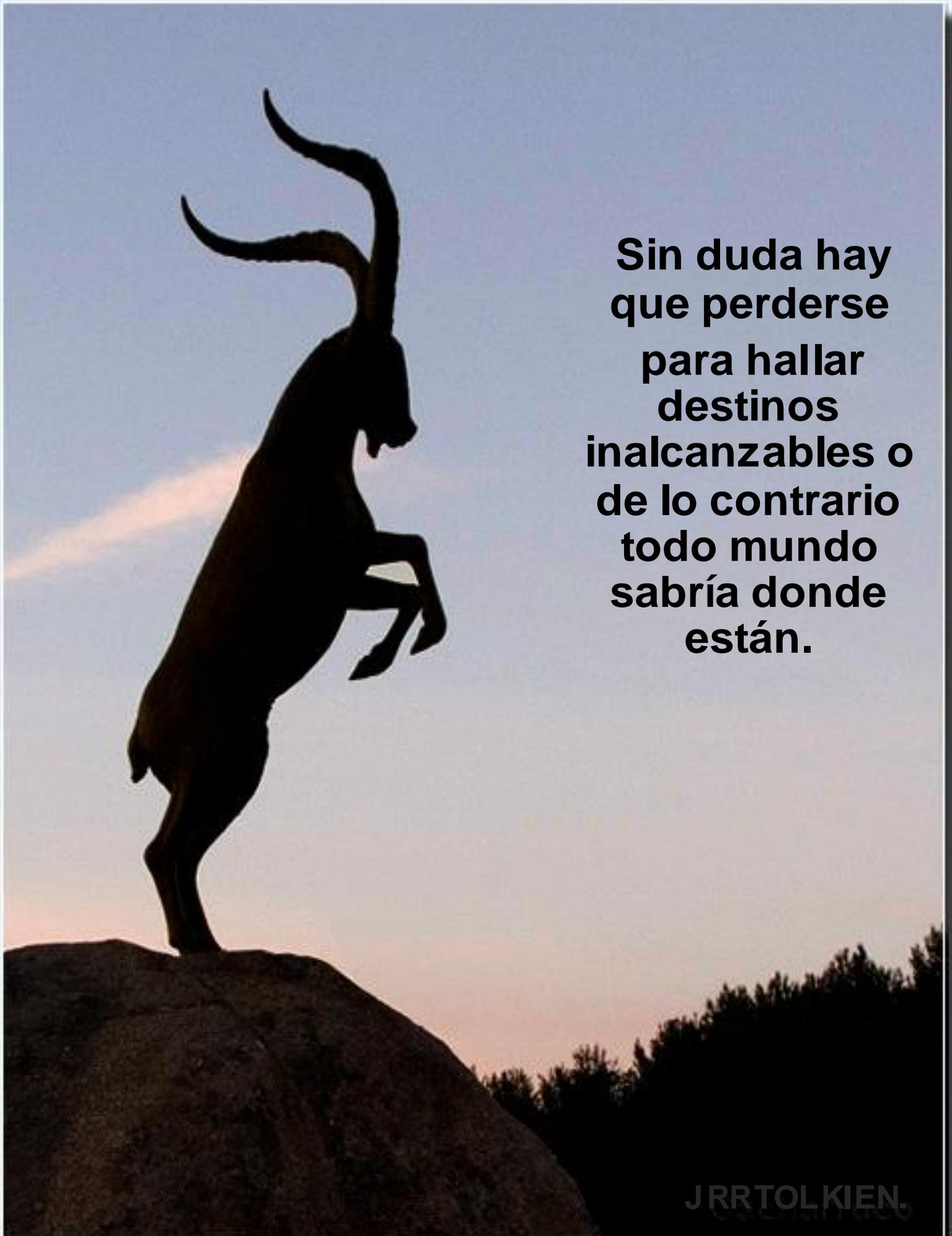
*La vida da un giro de 360°,*

*Este es mi momento y quiero compartirlo contigo,*

*Gracias por ser parte de mi presente, de mi pasado y de un futuro.....*

*Anne Du Rangel*

.....nothing else matters



**Sin duda hay  
que perderse  
para hallar  
destinos  
inalcanzables o  
de lo contrario  
todo mundo  
sabría donde  
están.**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Inseminación artificial.....	3
2.2. Crioconservación.....	6
2.3. Congelación.....	9
2.4. Descongelación.....	9
2.5. Efecto soluto y estrés osmótico.....	11
3. OBJETIVOS .....	14
3.1. Objetivos específicos.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5.1. Localización del experimento.....	15
5.2. Animales.....	15
5.3. Obtención y procesamiento del semen.....	15
5.4. Evaluación del semen.....	16
5.5. Dilución.....	19
5.6. Preparación de las soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas.....	19
6. PROCESO EXPERIMENTAL.....	23
6.1. Primer parte experimental: temperatura de cuarto (23°C).....	23
6.2. Segunda parte experimental: enfriado (5°C).....	24
6.3. Análisis estadístico.....	25
7. RESULTADOS.....	26
8. DISCUSIÓN.....	32
9. CONCLUSIÓN.....	35
10. BIBLIOGRAFÍA.....	36

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de observar la respuesta de los espermatozoides caprinos a una prueba de estrés osmótico simulando el proceso congelado-descongelado y así poder predecir la criosupervivencia de éstos. En una primer etapa del trabajo, se utilizaron los espermatozoides de diez machos cabríos (15 eyaculados) que fueron expuestos a soluciones hiperosmóticas de 300, 1200 y 2100 mOsm/Kg, durante 15 minutos a temperatura de cuarto (23°C aproximadamente), posteriormente los espermatozoides fueron expuestos a una serie de soluciones hiposmóticas de 300, 182 y 95 mOsm/kg respectivamente con el fin de restablecer la isosmolaridad. El porcentaje de espermatozoides con membrana intacta disminuyó significativamente a medida que la osmolaridad aumentaba ( $P < 0.05$ ); Observándose un aumento en la disminución posterior a la restauración de las condiciones de isosmolaridad ( $P < 0.05$ ). En caso de los espermatozoides con membrana acrosomal intacta, se observó un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) cuando la osmolaridad aumentaba y al restablecer la osmolaridad ese descenso fue similar. En una segunda etapa, los espermatozoides de diez machos cabríos (15 eyaculados) fueron sometidos a las soluciones hiperosmóticas de 300, 1200 y 2100 mOsm/kg a 5°C por 15 minutos, posteriormente los espermatozoides fueron restablecidos a la isosmolaridad en soluciones hiposmóticas durante 15 minutos a una temperatura de 37°C, observándose una disminución en el porcentaje de membranas plasmáticas intactas, así como de la integridad del acrosoma. La exposición del espermatozoide caprino a condiciones anisosmóticas produce un daño cuantificable a la membrana plasmática y acrosomal. Es posible el uso de una prueba anisosmótica como un parámetro de predicción de la supervivencia del espermatozoide caprino al proceso de congelación, sin embargo, hay que tomar en cuenta la variabilidad individual (“buenos, promedio y malos congeladores”) y otros factores que no están relacionados a los cambios osmóticos que influyan sobre la supervivencia del espermatozoide.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la cría de la especie caprina ha estado asociada a sectores marginales y a países en vías de desarrollo, especialmente de aquellos con bajos recursos económicos, la cual ofrece un pequeño pero importante suministro de proteína animal de alto valor biológico, además de minerales y vitaminas esenciales, las que son de particular importancia para los grupos más vulnerables principalmente los niños, mujeres embarazadas y lactantes. La leche de cabra tiene un alto valor nutritivo debido a su alta digestibilidad, se recomienda para personas de avanzada edad, así como para la crianza de niños que presentan alergia a la leche de vaca <sup>1,2,3</sup>.

En México, la crianza de la cabra se remonta desde la época colonial, misma que a través del tiempo se ha consolidado como una gran tradición, la cual se ve en el consumo de sus productos como la carne y la leche, aspecto que de manera particular en la carne se ve reflejado a través de platillos típicos de las regiones de nuestro país, tales como lo son el cabrito, la birria, los chitos, mole de caderas, la barbacoa, platillos que poseen la cualidad de presentar a nivel comercial un excelente producto a buen precio<sup>4</sup>.

En los últimos 10 años la población caprina se ha mantenido estable, sin embargo desempeñan un papel indiscutible, ya que conforman la base económica de aproximadamente un millón de personas. Se estima que en México esta especie constituye la cuarta en explotación, distribuidas en el 60 por ciento del territorio nacional, principalmente en áreas marginales áridas y semiáridas; lo cual ha reflejado un comportamiento ascendente que va de 37.5 mil toneladas de producción caprina en 2005 hasta 43 mil Toneladas en el 2009 <sup>5</sup>.

## 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Inseminación artificial

Además de la importancia de la cabra en la producción de leche, actualmente surge como una alternativa el consumo de carne de cabra en diferentes partes del mundo. Todo esto ha propiciado animales con rasgos valiosos como son: resistencia a ciertas enfermedades, longevidad y adaptación a ambiente de extrema aridez, aceptable producción de leche en lugares de vegetación con escasas especies forrajeras, alta fertilidad, reducida estacionalidad reproductiva y buena maternidad, estos rasgos hacen posible la adaptación a condiciones de reducida cantidad y calidad de alimentos y sometidas a un alto estrés<sup>6</sup>.

Por lo cual los ganaderos están muy interesados en mejorar la producción de sus rebaños y seleccionar los animales de calidad superior. Como el macho produce más crías que una hembra se hace especial hincapié en la selección de éste<sup>7, 8, 9, 10, 11</sup>. Los cuales deben ser evaluados, seleccionados y comparados en su valor genético en diferentes rebaños por pruebas con machos de referencia<sup>12</sup>.

Sin embargo, la limitación en la utilización de los machos está sujeta a su disponibilidad para el corto periodo de servicios en la época reproductiva, la dispersión geográfica de los rebaños, el número de machos disponibles, la libido y la producción seminal<sup>12</sup>.

Una técnica que reduce considerablemente estos inconvenientes es la inseminación artificial (IA), debido a su simplicidad y a la relación costo – beneficio cuando se emplean machos caprinos probados<sup>13</sup>. Así mismo el semen del macho puede ser utilizado en forma fresca, refrigerada o congelada. Sin embargo, el semen en forma fresca (mantenido a 30°C sea diluido o no) debe ser utilizado inmediatamente después de su recolección, ya que la motilidad y viabilidad de los espermatozoides en estas condiciones se reduce rápidamente, debido al incremento en la concentración de ácido láctico en el eyaculado<sup>14</sup>. Lo cual no da oportunidad de trasladar el semen fresco para utilizarlo en granjas alejadas, no así el semen refrigerado ya que la viabilidad se puede mantener por más de 48 horas<sup>15</sup>.

El congelamiento de semen permite una serie de ventajas adicionales, entre las que se destacan la posibilidad de usar el semen fuera de la estación reproductiva, la extensión de la vida reproductiva de machos sobresalientes más allá de su vida y la posibilidad de comercialización de semen (nacional e internacional). Sin embargo, el uso de semen congelado en caprinos tiene algunos obstáculos en comparación a otras especies mayores como es el caso de los bovinos. En primer lugar está el hecho de que el plasma seminal caprino contiene una lipasa producida por las glándulas bulbouretrales, que interactúa con la leche y/o yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolectinas, las cuales resultan tóxicas para el espermatozoide <sup>16, 17,18</sup>.

Para evitar este efecto se ha realizado la remoción del plasma seminal por centrifugación, procedimiento conocido como lavado del semen <sup>16, 18, 19</sup>. Los beneficios de remover el plasma seminal de esta manera pueden variar; así al remover el plasma seminal se maximiza la motilidad y la integridad acrosomal del semen caprino después de la congelación <sup>20, 21,22</sup>. Pero, provoca una reducción significativa en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides en semen congelado, e incluso en el semen fresco. Además de esta disminución, también se ha encontrado que el porcentaje de espermatozoides con daño en la membrana aumenta después de la remoción del plasma seminal y se acentúa con el proceso congelado-descongelado <sup>23, 24, 25</sup>. Todo esto previo al uso de diluyentes convencionales (12% yema de huevo) <sup>19</sup> y con bajo porcentaje de yema (2%), aunque estos diluyentes pueden resultar en insuficiente protección de membranas durante la refrigeración <sup>15, 9,16</sup>.

La fertilidad obtenida con semen congelado es menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelamiento y a un trastorno letal en la proporción de espermatozoides supervivientes<sup>26</sup>. Esto se debe a los daños ocasionados en la membrana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura <sup>27</sup>.Consecuentemente, los espermatozoides sólo serían viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra y, por lo tanto, tendrían una menor oportunidad de poder fecundar los ovocitos <sup>28,29</sup>.

Cabe mencionar que las diferentes especies presentan una serie de factores de variabilidad que deben considerarse, como son la fisiología y la bioquímica de los espermatozoides, la variación en la anatomía y fisiología del transporte espermático en el aparato reproductivo de la hembra y las características de la implantación del cigoto.<sup>30</sup> Mientras que para la fecundación del ovocito en la vaca se requieren pocos millones de espermatozoides, en las cabras se necesitan cantidades sensiblemente mayores. Esta diferencia cuantitativa entre las especies constituye una desventaja cuando se utiliza semen criopreservado, ya que en ciertos casos se requiere un mayor número de espermatozoides para lograr la concepción, lo que se dificulta debido a una menor supervivencia espermática durante el proceso de congelación<sup>30, 31</sup>.

Independientemente de la técnica de congelación y descongelación de los espermatozoides, el número de células muertas aumenta en comparación con el semen fresco<sup>32</sup>. El semen criopreservado es utilizado con éxito en pocas especies y su aplicación a otras puede ser un problema. Como se mencionó, la pobre supervivencia espermática es uno de los principales problemas, por lo que el conocimiento de las características biofísicas de la membrana plasmática espermática es fundamental para proponer soluciones<sup>31</sup>. Es importante mencionar que hay diferencias entre machos en la susceptibilidad de sus espermatozoides al proceso de crioconservación y que por esto hace falta una prueba sencilla para predecir dicha susceptibilidad evitando el trabajo de hacer protocolos de congelación y descongelación largos y tediosos<sup>33</sup>.

## 2.2 Crioconservación

El fundamento de crioconservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, esto al reducir su movimiento y sus reacciones metabólicas <sup>34</sup>.

Con excepción de los bovinos, la utilización generalizada del semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas <sup>35,30</sup>; en parte porque los protocolos de congelación no proporcionaron resultados aceptables de fertilidad <sup>35</sup>. Las diferencias entre especies radican en la fisiología y la bioquímica del espermatozoide y también, a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor de la hembra que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático <sup>30</sup>.

La célula espermática es la parte más importante del semen, está diseñado para pasar a través del tracto reproductivo de la hembra, sufrir capacitación, unirse a la zona pelúcida, penetrar el ovocito y liberar un juego haploide normal de cromosomas al ovocito <sup>36</sup>.

En la evaluación de rutina del eyaculado fresco generalmente están incluidos la determinación de volumen, la concentración y el porcentaje de espermatozoides que exhiben motilidad progresiva, siendo estos los parámetros más importantes en la toma de decisiones que conciernen a un posterior procesamiento del eyaculado, como dilución y congelación <sup>37</sup>. Sin embargo, el hecho de que los individuos puedan ser clasificados como “buenos congeladores” o “malos congeladores” implica que ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas, predisponen a la supervivencia bajo el estrés de criopreservación <sup>38, 39</sup>.

Se sabe que en el proceso de dilución, refrigeración y congelación, queda particularmente afectada la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, siendo el sitio primario de daño <sup>40,41</sup>, pero se han encontrado que los parámetros de motilidad, integridad de la membrana plasmática o del acrosoma no tienen una correlación significativa con la viabilidad espermática o fertilidad del semen

crioconservado en diferentes especies, por lo que otras estructuras como la membrana de las mitocondrias, del acrosoma y el flagelo también se ven afectados. <sup>42,43</sup>.

La integridad de la membrana ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática, ya que ésta, regula el intercambio de iones y moléculas entre la célula y el medio extracelular<sup>44</sup>. De hecho, el estado de la membrana plasmática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales. También el examen a través de la microscopia electrónica de transmisión y de barrido, han proporcionado detalles de los daños en la membrana plasmática, sin embargo los resultados no siempre han estado correlacionados con el porcentaje de fertilidad, a menos que el daño presente sea muy importante <sup>45</sup>. Además las pruebas que involucran cambios osmóticos confirman los daños en la membrana plasmática que presentan las células <sup>45</sup>.

La integridad del acrosoma también se ha utilizado para predecir la capacidad fertilizante del semen congelado <sup>46</sup>. Las lesiones son más marcadas después de la congelación, pero empiezan a evidenciarse con la dilución, refrigeración y el periodo de equilibrio<sup>47</sup>. Aun así, el aumento del tamaño del acrosoma y la ruptura de la membrana acrosomal externa, no se han podido correlacionar con la disminución de la viabilidad de los espermatozoides <sup>48</sup>.

Cuando los espermatozoides son sometidos a un proceso de congelación y descongelación, estos sufren daño resultado del estrés osmótico, choque frío y la formación intracelular de hielo <sup>49</sup>.

Trabajos con eritrocitos humanos expuestos a diferentes soluciones hipertónicas para simular el efecto de la congelación, demostraron que la concentración de solutos *per se* tiene un efecto dañino sobre las células<sup>50</sup>.

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 del espermatozoide; 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<sup>49,51 52,53, 54</sup>.

El proceso de congelación consta de diferentes etapas como enfriado, deshidratación celular, congelación, descongelación y rehidratación celular entre otras<sup>55</sup>. Aun cuando en este proceso ocurren cambios que modifican y/o alteran al espermatozoide, se menciona que la mayor desestabilización ocurre durante el proceso de congelación-descongelación, esto debido a que en la membrana plasmática se lleva a cabo una transición de fases<sup>56</sup>. La transición de fases es el cambio físico que sufren los lípidos de la membrana plasmática, la cual se encuentra en un estado líquido, pero al congelarse la membrana plasmática se vuelve más rígida y poco elástica al adoptar un estado de gel<sup>31,57</sup>. Este evento puede dañar la membrana plasmática de manera irreversible<sup>58</sup>.

## 2.3 Congelación

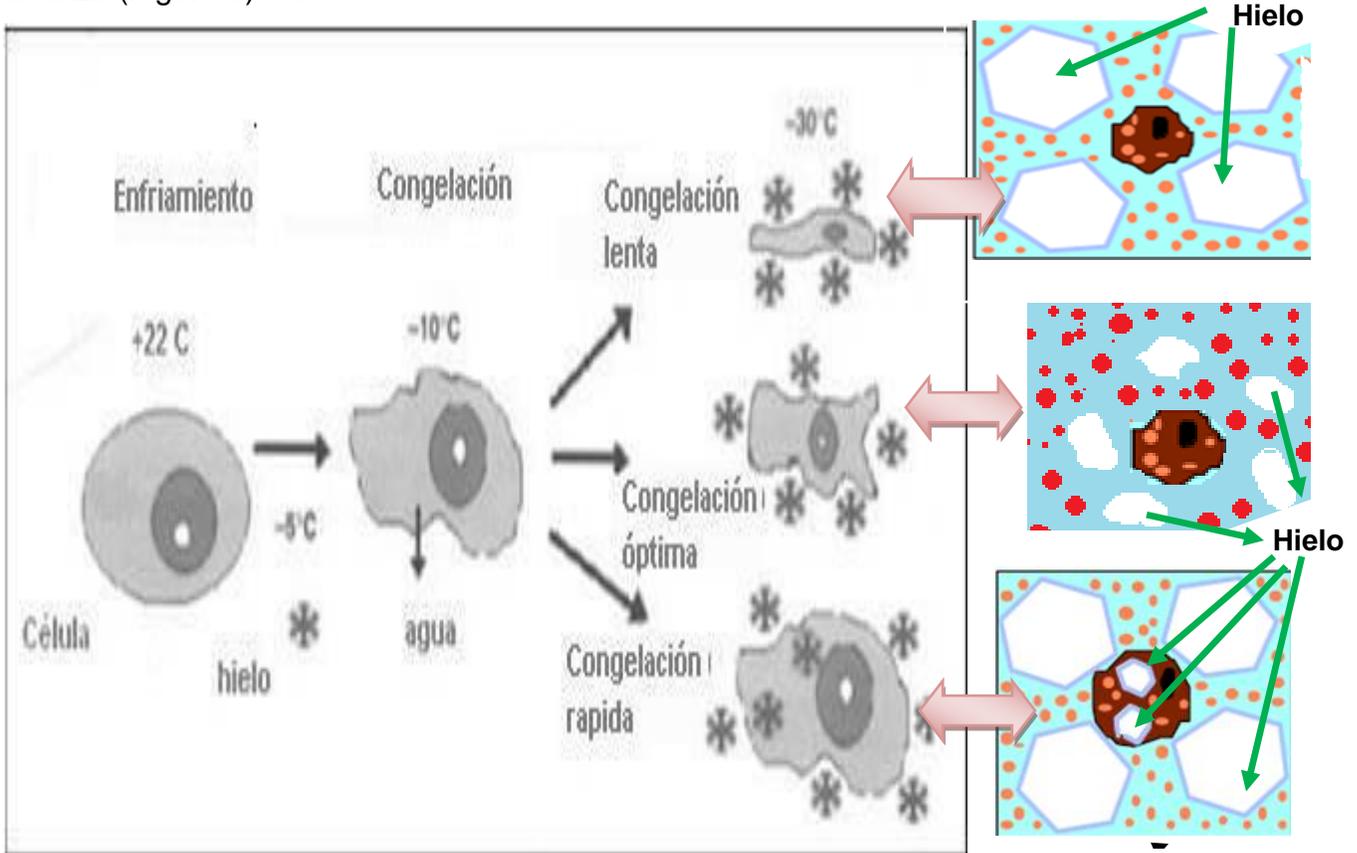
Durante la congelación se producen diversos cambios fisicoquímicos en el espacio extracelular, las células responden a estos cambios actuando como osmómetros (se hidratan y deshidratan). Entre los 4°C y -10°C, las células son sometidas a temperaturas menores que las de congelación de la solución que las rodea, pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar (sobre-enfriados). En el momento de la aparición de hielo, 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 <sup>59</sup>.

El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular, 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 intentan revertir el desequilibrio; en consecuencia, las células se deshidratan a medida que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo el agua que sale se congela, así las concentraciones de sales aumentan pudiendo ser tóxicas; los eventos físicos subsecuentes dependen de la tasa de enfriamiento <sup>60</sup>.

## 2.4 Descongelado

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación; es decir 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 <sup>60</sup>.

Los daños producidos en los espermatozoides durante este proceso, podrían ser prevenidos si conocemos la tolerancia osmótica de esta célula. Este daño se explica por una hipótesis, la cual menciona que cuando las células son congeladas, la cristalización del agua genera zonas hiperosmóticas no congeladas, con una gran cantidad de solutos. A tasas de congelación óptima, se forman regiones hiperosmóticas en el ambiente extracelular, esto induce la remoción de agua intracelular con la consecuentemente crenación celular y exposición de la membrana celular a condiciones anisomóticas. Un congelamiento rápido puede causar nucleación letal de hielo intracelular si la suficiente agua congelable permanece en el citoplasma cuando la temperatura de nucleación se alcanza (Figura 1) <sup>54</sup>.



**Figura 1.** Representación esquemática de eventos físicos celulares durante el enfriamiento (tomada de Gao y Critser y modificada por Garzón, 2008)<sup>69</sup>.

Después de la formación de hielo, la concentración de solutos excede su solubilidad y se precipitan, fenómeno conocido como punto eutéctico (temperatura a la cual la concentración de solutos excede su solubilidad y dejan de ser solubles precipitándose), provocando cambios en la osmolaridad y acortando la membrana plasmática <sup>61</sup>.

## **2.5 Efecto soluto y estrés osmótico**

La criopreservación expone a los espermatozoides a variaciones de temperatura y osmolaridad; la formación de hielo extracelular provoca un incremento en la concentración de solutos, por lo cual para equilibrar las concentraciones de solutos entre los compartimentos intra y extracelular la célula pierde agua y disminuye su volumen <sup>54,61</sup>.

De forma contraria, cuando las células son expuestas al ambiente extracelular hipotónico, como en el caso de la descongelación, el volumen celular es aumentado por difusión pasiva de agua en balance con las  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  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 de volumen celular está determinado por varios factores entre ellos la composición fosfolipídica, permeabilidad al agua, temperatura de transición de fase lipídica, actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, canales de agua y canales iónicos <sup>62</sup>.

Sin embargo, la optimización de los protocolos de congelación no han podido explicar las causas actuales del daño durante el proceso de congelación y descongelación. Siendo el estrés osmótico uno de los factores más importantes durante la criopreservación de las células. El cual también se asocia a la adición y remoción de los crioprotectores como el glicerol <sup>42</sup>.

Estos cambios osmóticos pueden ocurrir gradual o rápidamente dependiendo de la tasa de enfriamiento, si es o no inducida la nucleación de hielo y del método de adición del crioprotector, lo que involucra la confusión de dos factores de estrés:(i) la osmolaridad final alcanzada por las células y (ii) la diferencia osmótica entre la osmolaridad intra y

extracelular, las cuales, junto con la conductibilidad hidráulica, gobiernan la tasa a la cual el agua se mueve dentro y fuera de la célula. 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 solo experimentan una pequeña y controlada diferencia osmótica a través de sus membranas <sup>49</sup>.

El estrés osmótico es un mecanismo importante involucrado en la resistencia espermática a la congelación y descongelación. El criodañó está relacionado con los cambios mayores de la presión osmótica ( $\pi$ ) 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<sup>52, 63</sup>.

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 enfriado 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 <sup>64</sup>, 2) Aumenta la deshidratación provocando una interposición de estructuras intracelulares<sup>65</sup>, y 3) debilitan los complejos de proteínas y lípidos en la membrana celular incrementado la pérdida de fosfolípidos <sup>60</sup>.

Estos mecanismos son potencialmente letales para la viabilidad celular. Los posibles efectos resultado de la concentración de los solutos han sido caracterizados como "efectos de solución"<sup>61</sup>. Critser sugiere que estos efectos de solución son intensificados por un proceso de enfriamiento lento, ya que el tiempo de exposición de la célula a una solución concentrada es prolongado. En adición a los efectos de solución en la 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 adicción de CPA's a las células antes del enfriamiento y la subsiguiente remoción de ellos de la célula después de la descongelación <sup>66</sup>.

De esta manera 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 al flujo de agua para mantener su potencial químico <sup>67</sup>.

Para poder evitar el daño osmótico de las células durante la crioconservación es necesario conocer la tolerancia osmótica de las células en función a: 1) tiempo, 2) temperatura, 3) tipo de solutos y 4) concentración de solutos. La tolerancia osmótica varía entre tipos celulares y el tipo celular entre especies <sup>53</sup>.

El espermatozoide caprino tolera un rango relativo de osmolaridad entre 425 y 525 mOsm/kg; parece ser que un medio hipertónico ofrece una mejor conservación de la capacidad fertilizante, que un medio hipotónico <sup>68</sup>.

La relevancia de esta hipótesis ha sido apoyada con varias investigaciones en las que los espermatozoides han sido expuestos a soluciones de cloruro de sodio hipertónicas; en trabajos similares se ha observado que la exposición de semen de cerdo a condiciones hiperosmóticas a 5°C y el restablecimiento de la isosmolaridad a 37°C produjo una disminución del porcentaje de membrana plasmática intacta, conforme se incrementó el valor de la osmolaridad en ambas condiciones, pero el efecto más drástico se observó al restablecer la osmolaridad <sup>69,70</sup>, esto mismo fue observado en semen de ovino<sup>71</sup> y de cabra <sup>33</sup>.

De lo anterior se desprende la importancia de investigar las alteraciones en la morfología espermática relacionadas con la viabilidad que ocurren después del proceso de congelación y descongelación en el semen. El conocimiento de todos estos aspectos es fundamental para poder elaborar protocolos de congelación que puedan proporcionar a los espermatozoides las mejores condiciones de sobrevivencia, el primer paso de ésta investigación es identificar el valor de una osmolaridad crítica que produzca un daño medible en la membrana plasmática y acrosomal.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Identificar un valor de osmolaridad suficiente para inducir cambios marcados en la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, similares al proceso congelación-descongelación.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- 1) Evaluar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal en espermatozoides sometidos a condiciones hiperosmóticas (simulación de la congelación) a 22°C y a 5°C.
- 2) Evaluar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal en espermatozoides sometidos a condiciones hiposmóticas para restablecer la isosmolaridad (simulación de la descongelación) a 22°C y a 37°C.

### **4. HIPÓTESIS**

La exposición de espermatozoides caprinos a condiciones hiperosmóticas y su posterior retorno a condiciones isosmóticas, aunado a diferentes temperaturas, permite simular el estrés osmótico que enfrentan las células durante el proceso de crioconservación.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Localización del experimento**

El presente trabajo se realizó en el Módulo de Caprinos (Centro de Enseñanza Agropecuaria) y en el laboratorio de Reproducción y Comportamiento Animal de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, Campo 4, ubicado en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán – Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 2,450 msnm, a 19 grados 43 minutos de latitud norte, y a 99 grados 14 minutos de longitud poniente<sup>72</sup>.

### **5.2 Animales**

Se emplearon los eyaculados de 10 machos cabríos, adultos, encastados con Alpino, con una edad de 18 meses en promedio, todos ellos alojados en un corral comunitario techado de 16 m<sup>2</sup>, bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación a base de alfalfa fresca, pasto, trébol, paja de avena, concentrado comercial y agua *ad libitum*. Los machos fueron identificados mediante aretes de plástico, fotografías y número en el flanco derecho del animal.

### **5.3 Obtención y procesamiento del semen**

La recolección del semen se realizó 3 días a la semana en donde se ocupaban 3 diferentes machos cada sesión (un solo eyaculado por macho). El semen se colectó mediante la técnica de la vagina artificial empleando a una hembra sujeta a un potro de monta, la muestra que se empleó se obtuvo en el segundo intento de monta del animal. Una vez obtenido el semen se realizó una dilución 1:1 (v/v) con un medio de transporte modificado por Evans y Maxwell y se trasladó al laboratorio en una caja térmica, la cual contenía una bolsa de solución salina fisiológica previamente calentada para mantener una temperatura aproximada de 37° C durante su traslado<sup>73</sup>. Las muestras llegaron al laboratorio en un periodo máximo de 20 minutos.

## 5.4 Evaluación

A su llegada al laboratorio, el semen fue evaluado tomando los siguientes puntos:

### a) Evaluación macroscópica

1. Volumen
2. Color
3. Consistencia
4. Presencia de cuerpos extraños

### b) Evaluación microscópica

- A. Motilidad masal
- B. Motilidad progresiva (semen diluido 1:200 (v/v) en solución salina fisiológica (0.9% p/v)
- C. Integridad de la membrana plasmática (tinción de eosina-nigrosina)
- D. Anormalidades (tinción de eosina-nigrosina)
- E. Integridad de la membrana acrosomal (microscopía de contraste de fases)
- F. Concentración espermática (cámara de Neubauer)

### a) Volumen

Se evaluó en el mismo tubo colector graduado donde fue obtenido, expresándose en mililitros(ml), en forma paralela se observaron posibles anormalidades en cuanto al color, olor o aspecto que pudiera presentar el eyaculado, procediéndose a la eliminación de la muestra obtenida.

### b) Motilidad masal (MM)

Para esta determinación se colocó una gota de semen, mediante una Pipeta Pasteur sobre un portaobjetos colocado sobre la platina térmica a 37° C. Posteriormente y sin colocar un cubreobjetos se observó con el objetivo de 10 x los bordes de la gota, observando el movimiento de oleaje del semen. La evaluación se hizo con una escala de 0-3, en donde el valor de 3 es de una motilidad de oleaje excelente (rápido y denso), 2 buena (rápido pero no muy denso), 1 mala (densidad variable, lento) y 0 nula<sup>73,10</sup>.

### **c) Motilidad progresiva (MP)**

Para estimar el porcentaje de espermatozoides en movimiento se tomaron 200  $\mu$ l del semen recolectado y se agregaron a 9.8 ml de una Solución Salina Fisiológica (SSF), realizando la dilución 1:100 v/v. Posteriormente agregamos una gota sobre un portaobjetos cubriéndolo con un cubreobjetos atemperado a 37°C sobre una platina térmica, y la observación se llevó a cabo en un microscopio óptico con el objetivo de 20 x, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0 -100% en múltiplos de 5<sup>73,10</sup>.

### **d) Viabilidad**

Para la viabilidad del semen se utilizó la tinción Eosina-Nigrosina. El frotis se realizó depositando una gota de semen diluido (1:200, v/v) en un portaobjetos, agregándole una gota de la tinción antes mencionada y mezclando ambas gotas extendiéndolas en una capa delgada y secándola con aire rápidamente. La laminilla con la muestra se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40 x, contándose 200 espermatozoides por laminilla de manera aleatoria y el resultado se expresó como porcentaje de células vivas. Los espermatozoides sin teñir (blancos) se consideran vivos y los teñidos (rosa) total o parcialmente se consideran muertos<sup>73,10</sup>.

### **e) 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 40 x, utilizando la dilución de semen (1:200) (v/v) y realizando una dilución (1:1) (v/v) con solución salina formolada al 0.9%, la cámara se llenó colocando el extremo de una pipeta Pasteur en el borde del cubreobjetos y dejando que se cargue por capilaridad, dejando reposar 5 minutos para que los espermatozoides sedimenten. Para evitar errores de omisión o duplicación en el conteo, se contaron los espermatozoides situados en los cuadrados y los situados sobre las líneas limitantes izquierdas e

inferiores y contándose 5 de los 25 cuadros de cada lado de la cámara. Una vez realizado el conteo se adiciona un cero para obtener la concentración de millones de espermatozoides por mililitro <sup>73</sup>.

## **F) Anormalidades**

El porcentaje de anormalidades se determinó a través de la observación del frotis con la tinción Eosina-Nigrosina. Este frotis se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40x, contándose 200 espermatozoides por laminilla expresando el resultado de anormalidades primarias y secundarias en porcentaje <sup>73,10</sup>.

## **g) Acrosoma**

Para establecer el grado de integridad del acrosoma las alícuotas de las muestras fueron diluidas en tres partes de glutaraldehído por una parte de la dilución correspondiente (300 µl de glutaraldehído por 100 µl de la dilución), la mezcla fue colocada en tubos de ensayo con tapa para evitar contaminación, alteraciones no deseadas o evaporación. Posteriormente, se examinó colocando una gota de esta solución en un portaobjetos y colocando un cubreobjetos sobre la gota se observó en el microscopio de contraste de fases con el objetivo de 100x, aplicando una gota de aceite de inmersión para así observar el contorno de los acrosomas y determinar si se hallaba intacto o dañado; revisando 100 espermatozoides para sacar un porcentaje de cada tratamiento usado.

## 6.5 Dilución

Posterior a la evaluación del semen recolectado este se diluyó en un volumen de 1:4 v/v con solución de lavado<sup>19</sup> (cuadro 1) empleado para el lavado seminal y se centrifugó a 700 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, esto con el fin de retirar el plasma seminal, tras la separación de la pastilla se añadió nuevamente la solución de lavado en proporción 1:5 v/v con la solución base y una vez que el plasma fue retirado se aforó con diluyente yema de huevo (cuadro 2) hasta 2ml y se ajustó a una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides /ml.

## 6.6 Preparación de las soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas

Las soluciones hiperosmóticas se prepararon tomando la solución de lavado para semen caprino como base adicionándole glucosa para obtener cada uno de los valores deseados (cuadro 3), según las fórmulas reportadas por Medrano (1998)<sup>70</sup>. Las soluciones hiposmóticas (cuadro 4) se prepararon tomando agua desionizada y adicionando Tris y glucosa.

**Cuadro 1. Solución de lavado**

Componente	Cantidad
Tris (Hidroximetil aminometano)	6.058g
Glucosa	1.0g
Acido cítrico	3.98g
Penicilina	500 UI
Estreptomicina	0.05 %
Agua destilada aforar a	200 ml

**Cuadro 2. Diluyente yema de huevo**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Solución base	44 ml
Yema de huevo al 12%	6 ml
Antibiótico	0.04 UI

**Cuadro 3. Preparación de las soluciones hiperosmóticas**

<b>Solución mOsm/kg</b>	<b>Diluyente base (ml)</b>	<b>Glucosa (g)</b>
<b>300 (testigo)</b>	10	-----
<b>1200</b>	10	2.615
<b>2100</b>	10	5.57

**Cuadro 4. Preparación de las soluciones hiposmóticas**

<b>Solución mOsm/kg</b>	<b>Agua desionizada(ml)</b>	<b>Tris (g)</b>	<b>Glucosa (g)</b>
<b>300 (testigo)</b>	10	0.44	0.38
<b>182</b>	10	0.44	0.21
<b>95</b>	10	0.44	0.051

Figura 2. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL 1: TEMPERATURA A 23° C.

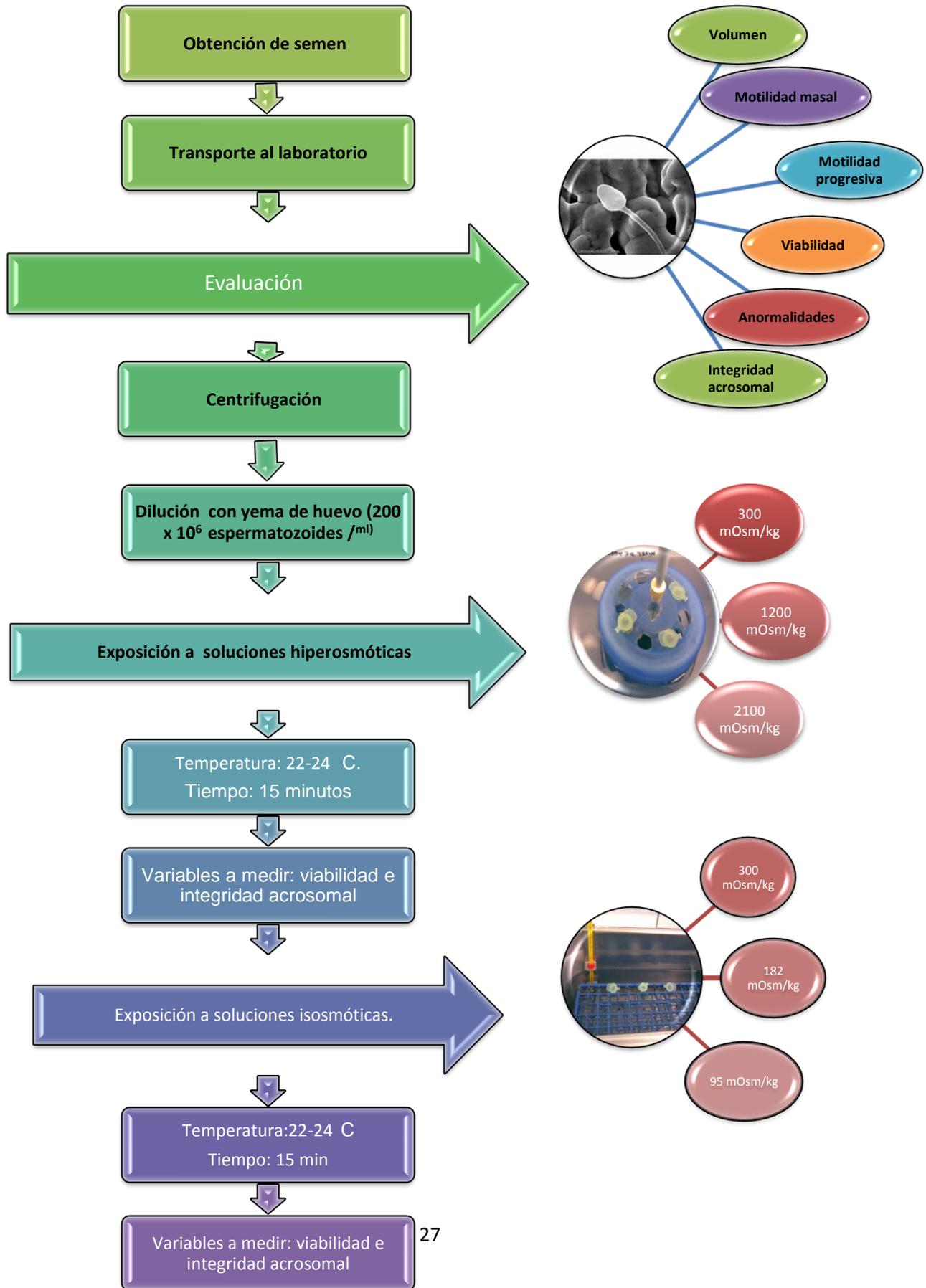
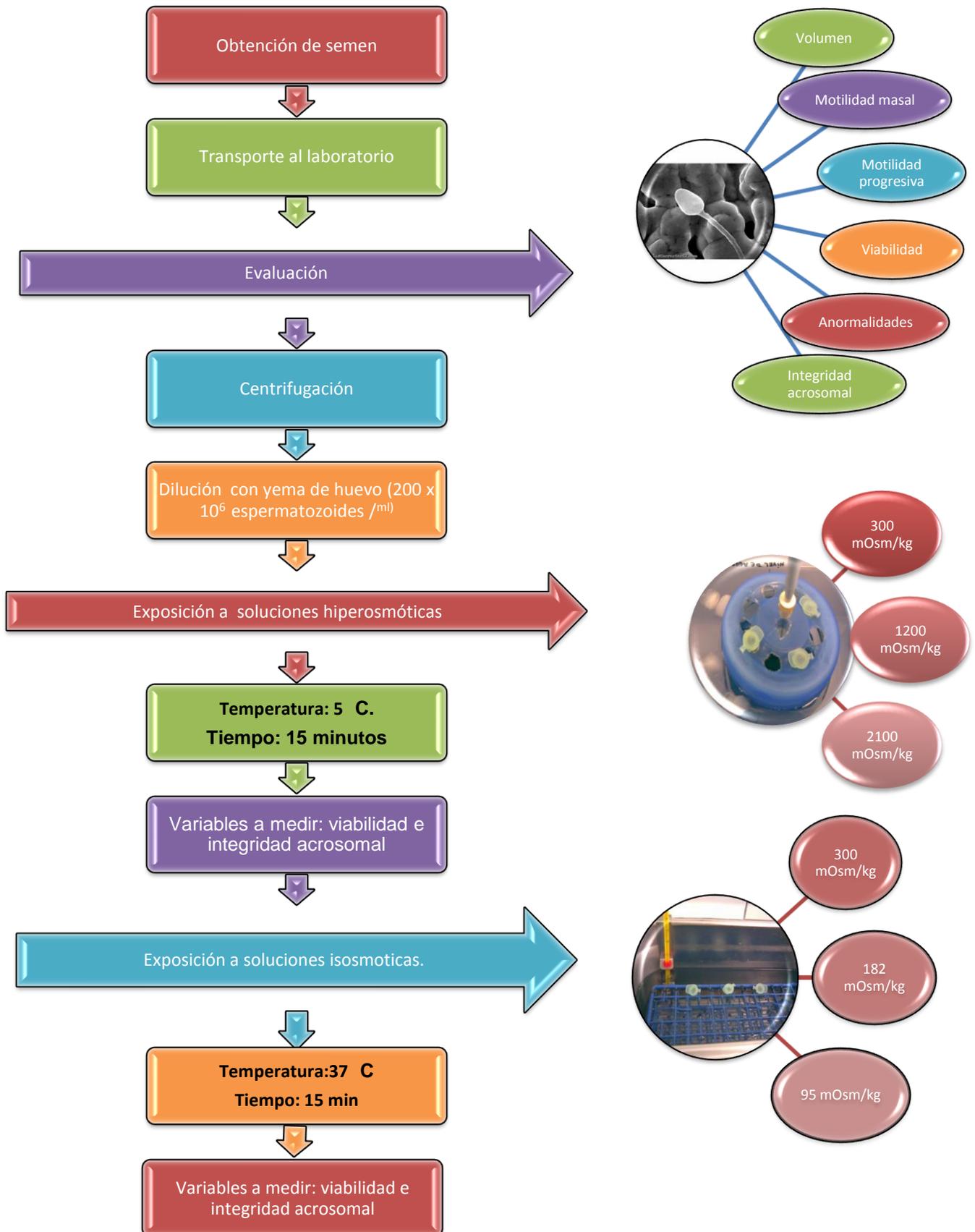


Figura 3. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL 2: TEMPERATURA A 5°C.



## **6. PROCESO EXPERIMENTAL**

Una vez obtenidos los eyaculados (1 eyaculado/macho) y tras una primera valoración seminal, se tomó el eyaculado con mejores características seminales y se procedió a diluir el eyaculado con solución de lavado en proporción 1:4 v/v, posteriormente se centrifugó a 700 g x 15 minutos a temperatura de cuarto. Tras la separación del sobrenadante se rediluyó el sedimento hasta su volumen inicial con la solución de lavado en una proporción de 1:5 y se procedió a una segunda centrifugación, esto con el fin de eliminar el plasma seminal. Después de remover el sobrenadante se aforó a 2 ml con diluyente yema de huevo al 12 % para ajustar a una concentración de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml con la cámara de Neubauer para proceder con los tratamientos de osmolaridad, para simular el proceso congelado-descongelado.

### **6.1 Parte experimental 1: temperatura a 23 °C**

Una vez que la concentración fue ajustada a  $200 \times 10^6$  espermatozoides por ml, se formaron alícuotas (0.2 ml cada una) y se depositaron en tubos Eppendorf que contenían 0.2 ml de las soluciones hiperosmóticas (1:1 v/v), la exposición de los espermatozoides a las soluciones hiperosmóticas tuvo una duración de 15 minutos a temperatura de cuarto (23°C), al terminar el tiempo se tomaron muestras para la determinación de la integridad de la membrana plasmática e integridad acrosomal.

Posteriormente al finalizar el periodo de exposición se realizó un pase de 200µl de cada una de las mezclas anteriores a 1.2 ml (1:6 v/v) de la correspondiente solución hiposmótica para restablecer la isosmolaridad durante 15 minutos a temperatura de cuarto (23° C aprox.) midiendo las variables de integridad de la membrana plasmática e integridad acrosomal.

## 6. 2 Parte experimental 2: enfriado a 5 °C

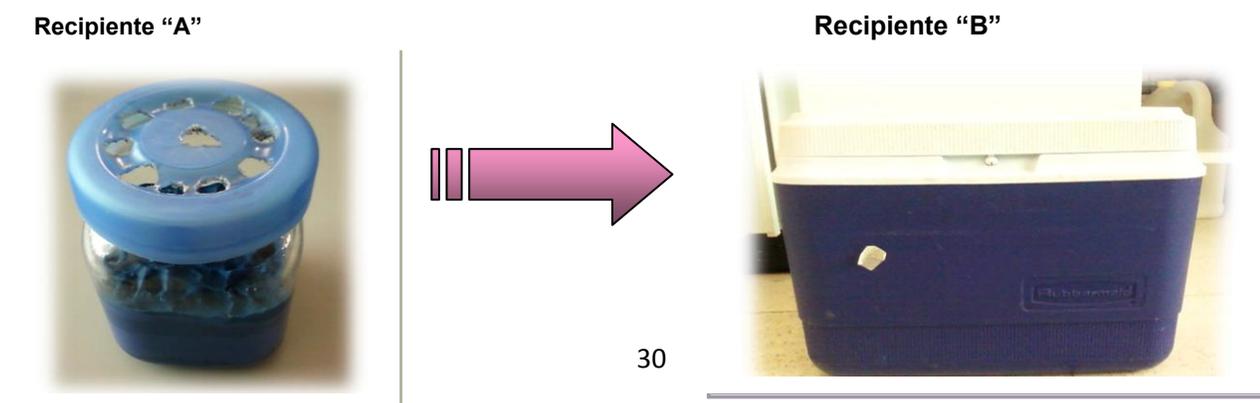
Para llevar a cabo el enfriamiento se utilizó un recipiente de vidrio adaptado (recipiente "A") para introducir un tubo con 5 ml de semen diluido, mismo que se encontraba a temperatura ambiente para iniciar el enfriado, de forma simultánea se sumergieron los tubos eppendorf con las soluciones hiperosmóticas (300,1200 y 2100 mOsm/kg) y un termómetro para tener un control del descenso de la temperatura y de esta manera las soluciones experimentan la misma velocidad de enfriado. (Figura 4)

**Figura 4. Recipiente "A" utilizado para llevar a cabo el enfriado lento a 5°C.**



Este recipiente fue introducido en un recipiente cuadrado (recipiente "B") el cual contenía agua con hielo a una temperatura de 4° C, permaneciendo 2 horas aproximadamente hasta que la muestra en el recipiente "A" alcanzara la temperatura de 5° C. (Figura 5)

**Figura 5. Recipiente "B" utilizado para llevar a cabo el enfriado a 5° C.**



Una vez alcanzada la temperatura de 5° C se formaron alícuotas (0.2ml cada una) del tubo con semen a una concentración de semen de 200 millones/ml, y se depositaron en los tubos que contenían 0.2 ml de las diferentes soluciones hiperosmóticas. Esta exposición duró 15 minutos donde se tomaron alícuotas para observar si hay daño en la membrana plasmática y en la integridad del acrosoma.

Una vez transcurridos los 15 minutos en las soluciones hiperosmóticas, se tomó una alícuota de cada una (0.2ml) y se agregó a su correspondiente solución hiposmótica (1.2 ml) en una proporción de 1:6 (v: v) para restablecer la isosmolaridad a una temperatura de 37° C en baño María durante 15 minutos. Posteriormente se llevo a cabo la determinación de la integridad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma.

### **6.3. Análisis Estadístico**

Los datos de las características del semen fresco se analizarán mediante estadística descriptiva solamente; los datos de integridad de la membrana plasmática y acrosomal se analizarán mediante pruebas no paramétricas, dentro de tratamiento mediante la ANOVA de Friedman, entre tratamientos mediante la prueba pareada de Wilcoxon <sup>74</sup>.

## 7. RESULTADOS

En el Cuadro 5 se muestran las características iniciales de los eyaculados que se tomaron de los diferentes machos. En el cual se puede observar que los valores promedio de cada variable se encuentran dentro de los parámetros normales mismos de la especie Caprina<sup>75</sup> (cuadro 6).

Variables	Valores
<b>Volumen (ml)</b>	<b>0.71 ± 0.291</b>
<b>Motilidad masal</b>	<b>2.83 ± 0.303</b>
<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>85.83 ± 4.93</b>
<b>Concentración (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>4315.3 ± 1490.72</b>
<b>Viabilidad (%)</b>	<b>85.11 ± 5.53</b>
<b>Normales (%)</b>	<b>80.97 ± 15.79</b>
<b>Anormalidades primarias (%)</b>	<b>3.67 ± 3.32</b>
<b>Anormalidades secundarias (%)</b>	<b>15.47 ± 17.27</b>

**Cuadro 5.** Valores iniciales de las variables de calidad del semen caprino. Los valores son Medias ± Desviación estándar

<i>Variables</i>	<i>Valores</i>
<b>Volumen (ml)</b>	<b>0.5-1.5</b>
<b>Motilidad masal</b>	<b>1.53 - 2.92</b>
<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>56 - 88</b>
<b>Concentración (x 10<sup>6</sup>)</b>	<b>1000-5000</b>
<b>Viabilidad (%)</b>	<b>73- 95</b>
<b>Normales (%)</b>	<b>70-85</b>
<b>Anormalidades primarias (%)</b>	<b>1.3-5</b>
<b>Anormalidades secundarias (%)</b>	<b>5-24</b>

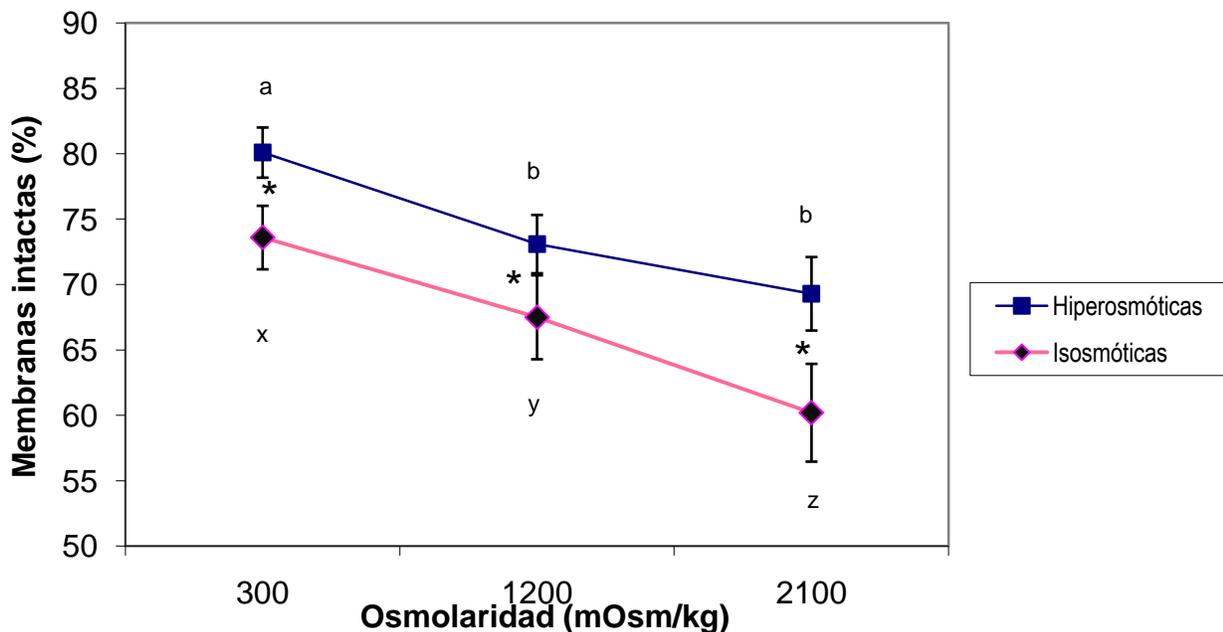
**Cuadro 6.** Valores aproximados de las variables de calidad de semen caprino raza Alpina <sup>75</sup>.

## 7.1 Prueba de estrés osmótico a temperatura ambiente

Como se puede apreciar en la gráfica 1 el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta disminuyó de manera significativa a medida que aumentó el valor de osmolaridad; cuando se restableció la isosmolaridad ocurrió otra disminución en esta variable. Se puede observar que el tratamiento de hiperosmolaridad de 300 mOsm/kg mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con los tratamientos 1200 y 2100 mOsm/kg, mientras que entre estos no hubo diferencia significativa. En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad se observó diferencia significativa entre todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

Al comparar la diferencia entre ambos tratamientos de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada uno de los valores utilizados se pudo observar que en todos hubo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### Membrana Plasmática intacta a temperatura ambiente

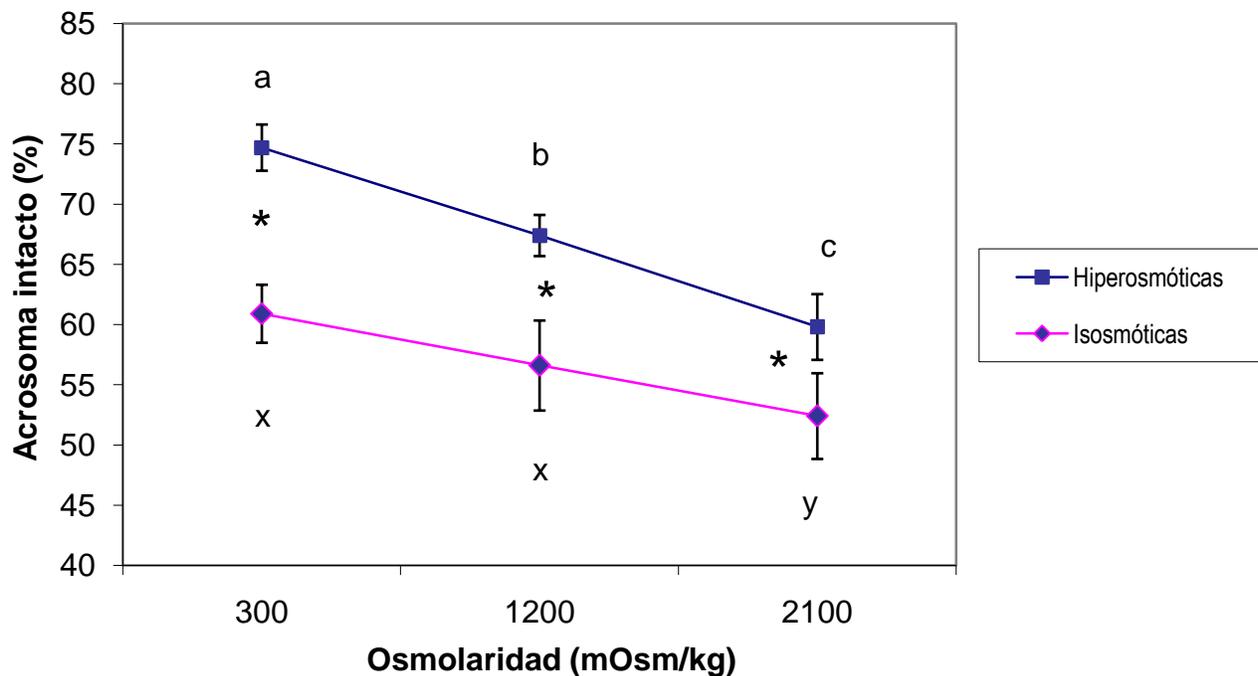


Gráfica 1. Integridad de la membrana plasmática a temperatura ambiente. (Condición hiperosmótica e hiposmótica) Letras diferentes dentro de tratamiento (a, b; x, y, z) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los asteriscos indican diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

En la gráfica 2, se muestran los porcentajes obtenidos de acrosomas intactos en los tratamientos de hiperosmolaridad, donde hubo un descenso en los acrosomas intactos conforme la osmolaridad aumenta, posterior a su regreso a la isosmolaridad se pudo observar un aumento en el daño. Al comparar la respuesta entre los tratamientos de hiperosmolaridad se observó que en todos los valores hubo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento de 1200 y 2100 mOsm/kg.

Al comparar la diferencia entre el tratamiento de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada valor utilizado, se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) solo entre los tratamientos de 300 y 1200 mOsm/kg.

### Acrosoma intacto a temperatura ambiente



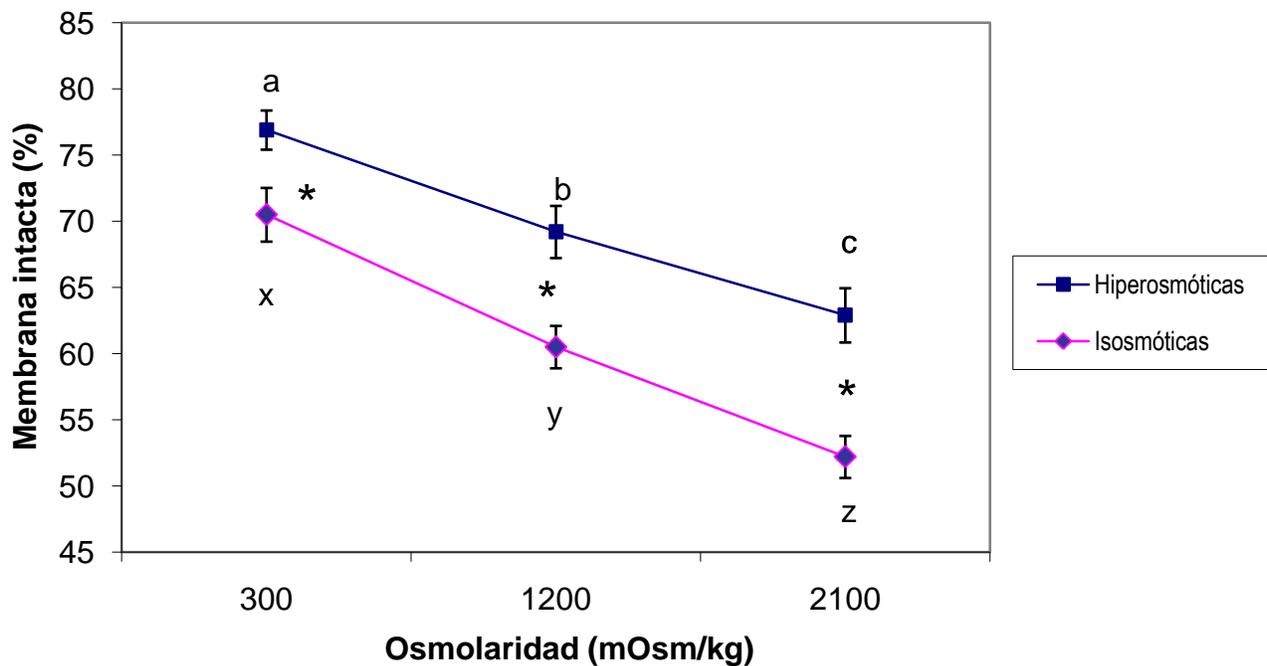
Gráfica 2. Integridad de la membrana acrosomal a temperatura de cuarto. (Condición hiperosmótica e hiposmótica). Letras diferentes dentro de tratamiento (a, b, c; x, y) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los asteriscos indican diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ )

## 7.2 Prueba de estrés osmótico a temperatura de refrigeración

En la gráfica 3 se puede observar el resultado de la membrana plasmática intactas con los tratamientos a diferentes temperaturas, al comparar la respuesta entre los diferentes tratamientos de hiperosmolaridad se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre estos. En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad, también se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento de 300 mOsm/kg con los tratamientos de 1200 y 2100 mOsm/kg (Gráfica 3).

Por otro lado, se comparó la diferencia entre el tratamiento de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada valor utilizado, observándose una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los valores utilizados.

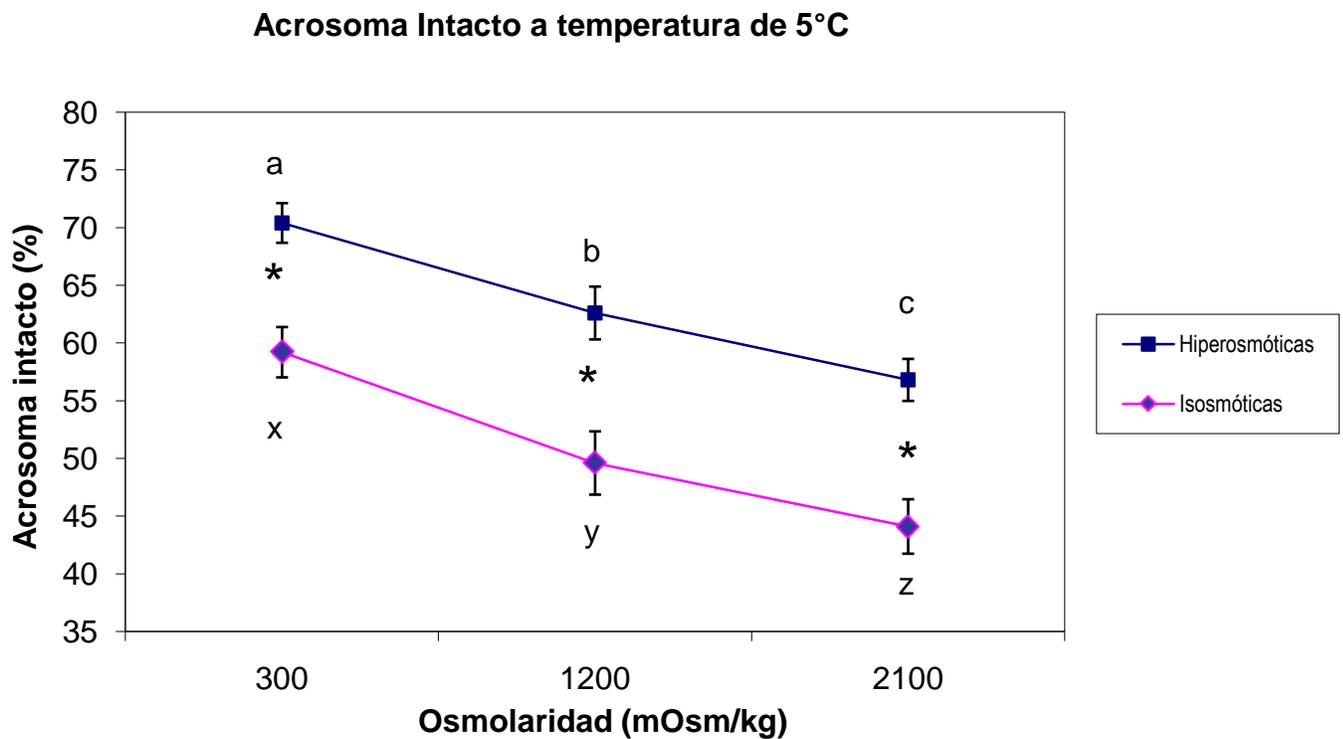
### Membrana Intacta a temperatura de 5° C



Gráfica 3. Integridad de la membrana plasmática a 5° C. (Condición Hiperosmótica) y a 37°C (Condición hiposmótica). Letras diferentes dentro de tratamiento (a, b, c; x, y) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los asteriscos indican diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

En la gráfica 4 se observa el porcentaje de acrosomas intactos con temperatura diferente, al comparar la respuesta entre los tratamientos de hiperosmolaridad, se observó que hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ). En cuanto a los tratamientos de retorno a la isosmolaridad se observó una diferencia significativa entre todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

Así mismo, al comparar la diferencia entre el tratamiento de hiperosmolaridad e isosmolaridad en cada valor utilizado, se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre todos los valores utilizados.



**Gráfica 4. Integridad de la membrana acrosomal a 5°C (Condición Hiperosmótica) y a 37°C (Condición hiposmótica). Letras diferentes dentro de tratamiento (a, b, c; x, y) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Los asteriscos indican diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).**

Como se observó en las gráficas anteriores, cuando los espermatozoides caprinos fueron sometidos a condiciones de hiperosmolaridad el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta disminuyó de forma significativa. En el caso del experimento a temperatura ambiente, la disminución fue de 14% y para el experimento a temperatura de refrigeración fue de 18%, considerando la disminución en esta variable de 300 a 2100 mOsm/kg. En relación a la disminución de esta variable cuando se retorna a la isosmolaridad, se observó un descenso más pronunciado a 37°C que a Temperatura ambiente: 26 vs. 18%.

A su vez, el porcentaje de acrosomas intactos en condiciones de hiperosmolaridad disminuyó de manera similar (de 300 a 2100 mOsm/kg) a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración: 20 y 19% respectivamente. En relación a la disminución de esta variable cuando se retornó a la isosmolaridad, se observó un descenso más pronunciado a 37°C que a temperatura ambiente: 26 vs. 14%.

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizaron 2 partes experimentales: en la primer parte, tanto el tratamiento hiperosmótico como el retorno a la isosmolaridad se llevó a cabo a temperatura de cuarto (22°C). En la segunda parte el tratamiento hiperosmótico se llevó a cabo a 5°C, mientras que el retorno a la isosmolaridad se hizo a 37°C. Aunque en ambos experimentos se observó la misma tendencia en los resultados de integridad de la membrana plasmática y acrosomal, en el segundo se observó una mayor severidad de daño en estas estructuras.

Los resultados de este trabajo sugieren que cuando los espermatozoides caprinos son expuestos a soluciones hiperosmóticas, se observa un descenso tanto en la viabilidad como en la integridad acrosomal conforme aumenta la osmolaridad; siendo estos resultados más pronunciados cuando los espermatozoides son expuestos a las soluciones de isosmolaridad. Similar a lo reportado para espermatozoides de otras especies como el humano<sup>53, 49</sup>, de ovino<sup>71</sup>, de verraco<sup>69, 70, 52</sup>, de chimpancé<sup>67</sup>, de equino<sup>51</sup> y la rata<sup>82</sup> en soluciones con diferente osmolaridad y a una temperatura de 37° C, en los cuales el porcentaje de espermatozoides viables así como el porcentaje de acrosomas intactos disminuyó conforme la osmolaridad aumentaba.

Por otro lado, se ha sugerido que los espermatozoides pueden ser más sensibles a los efectos perjudiciales de pH bajo, a temperatura ambiente en lugar de 5°C o cuando son congelados<sup>76, 78</sup>, ya que se ha observado un efecto dependiente de la temperatura, al que se le ha denominado “daño posthipertónico”, lo que quiere decir que este tipo de daño se ve reducido con una disminución de la temperatura. Estudios han comprobado un daño menor en el espermatozoide humano posterior al estrés hiperosmótico a 0°C esto en comparación de 8 y 22°C<sup>53</sup>.

Para explicar el efecto de la temperatura se ha demostrado que los espermatozoides sometidos al proceso de osmorregulación en ausencia de temperatura baja, presentan cambios notables en la integridad de la membrana plasmática, desorden y

empaquetamiento lipídico, viabilidad celular y motilidad.<sup>62</sup> 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<sup>79,80</sup>. Si el daño post-hipertónico se reduce con la disminución de la temperatura, esto podría explicar la razón por lo que actualmente el proceso de enfriado lento es el más utilizado en la crioconservación de células espermáticas<sup>81</sup>, Sin embargo, nuestros resultados difieren a los reportados en otras especies, ya que se observó una tendencia similar a la que se ha reportado para los granulocitos humanos, en los que la disminución de temperatura provoca un descenso más pronunciado sobre la viabilidad<sup>77</sup>.

Otro factor de importancia, es el tiempo de exposición, ya que se ha visto que el daño post-hipertónico se presenta en función del tiempo de exposición a las soluciones hiperosmóticas previo al retorno a la isosmolaridad. Algunos autores obtuvieron los mejores valores de supervivencia con el menor tiempo de exposición a soluciones hiperosmóticas<sup>53</sup>; ya que se ha demostrado que el daño provocado por la rehidratación se incrementa conforme el tiempo de exposición a las soluciones hiperosmóticas sea mayor, posiblemente porque el daño de rehidratación se deba al daño ultraestructural de la membrana provocado por la deshidratación y contracción<sup>78,79</sup>; sin embargo, se ha observado que en forma contrastante, 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<sup>81</sup>.

Tomando en cuenta los factores presentados en este trabajo (temperatura, osmolaridad variable y tiempo de exposición), la simulación parcial del proceso de congelado-descongelado, posiblemente permita obtener un panorama que podría simular al que ocurre en realidad. Sin embargo, se debe considerar que otros factores no relacionados con los cambios osmóticos también tienen influencia sobre la tasa de supervivencia de los espermatozoides caprinos en el proceso de crioconservación; Sin dejar de lado la existencia de una variación importante entre individuos en la susceptibilidad a la

crioconservación, viéndose implicado un componente genético que se manifiesta probablemente en la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática del espermatozoide y que puede presentarse como una característica racial <sup>31</sup>

En un futuro se recomienda que para poder concretar que esta prueba de estrés osmótico en los espermatozoides caprinos podría simular parcialmente el proceso congelación-descongelación, se sugiere trabajar con la segunda etapa (en paralelo a la primera) que consiste en someter a los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación, esto con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en ambas pruebas y poder determinar si existe una correlación entre ellas y poder determinar si se podría predecir la "congelabilidad" de los espermatozoides mediante una prueba de este tipo.

## **10. CONCLUSIÓN**

Las Soluciones hiperosmóticas con valores 1200 y 2100 mOsm/kg pueden inducir cambios marcados sobre la viabilidad e integridad del acrosoma caprino, siendo estos más intensos a una temperatura de 5° C en comparación con 22° C.

La utilización de Soluciones hiposmóticas para restablecer la isosmolaridad posterior al estrés hiperosmótico, incrementó el daño sobre la integridad plasmática e integridad del acrosoma caprino, siendo éstos más pronunciados a una temperatura de 37° C en comparación con 22° C.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ceiro F., Batista R., Maria Grimon., Odelin B., Sara N. Evaluación de las características seminales del semental cabrio y su respuesta ante la crioconservación. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. VII, Nº 07, Julio/2006. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
2. Jandal JM. Comparative aspects of goat and sheep milk. Small Rumin Res. 22: 177-185, 1996.
3. Park WY, Mahoney AW y Hendricks DC. Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anaemic rats. J Dairy Sci. 69: 2608-2015, 1986.
4. Arbiza A., SI. Producción de caprinos. México DF. A.G.T. Editor S.A. 1986.
5. SIAP 2010 Informe anual de producción y ganadería.
6. Mellado M. La cabra criolla en México. ACPA. Vol. 3. 1991, Editorial 25 aniversario. p49.
7. Bearden HJ y Fuquay J. Reproducción animal aplicada. Manual Moderno. 1982. México D. F. pp. 135-250.
8. Salamón S. 1990. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia. España, 1-171.
9. Chemineau P., Vandaele E., Brice G. y Jardon C. 1991. Utilisation des implants de melatonine pour l'amélioration des performances de reproduction chez la brebis. *Rech. Méd Vét.*, 167(3/4): 227-239.
10. Hafez ESE. y Hafez B., 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7ª ed. México, D.F.
11. Foote RH. 2002 the history of artificial insemination: Selected notes and notables. J. Animal. Sci.: 1-10.
12. Gibbons A. 2002 Inseminación Artificial con semen congelado en cabras de raza Angora. Taurus año 4 Nº 16. pp 24-32.
13. Baldassarre H. y Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 255-266.

14. Vivanco MHW. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *In: Memorias del Seminario Internacional: Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Chapingo, Edo. de Méx., México. pp: 135-194.
15. Evans G y Maxwell MCW. 1990. Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
16. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141..
17. Salamon S Y Maxwell WMC. (1995) Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37 185-249.
18. Roy A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 179: 318-319.
19. Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A and Gracia A. The Effect of Removal of Seminal Plasma, Egg Yolk Level and Season on Sperm Freezability of Canary Buck (*Capra hircus*). *Reprod Dom Anim* 40, 191–195 (2005).
20. Memon MA, Bretzlaff KN. and Ott RS. 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozenthawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 46 (2): 473-475.
21. Rota J. Carrizosa JA., Campos I, Lafuente A, Vazquez JM, Martinez E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25 (1997) 147-153.
22. Ritar AJ, and Salamon S. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 305-312.
23. Azerêdo GA, Esper CR, Resende KT. Evaluation of plasma membrana integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *2001 Small Ruminant Research* 41, 257-263.
24. Tuli RK, Holtz W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and goat-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42, 547-555.

25. Eiman M.-E. Aboagla, T. Terada. (2004) Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1160–1172.
26. Watson PF. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61,481-492.
27. Maxwell WMC. Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 55–65.
28. Gillan L. Skovgold K. Watson PF. Evans G. Maxwell WMC. 1999 Fate and functional integrity of fresh and frozen–thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1999, 11, 309–315.
29. Gillan L. Maxwell WMC. 1999 The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 54, pp. 271-283.
30. Holt WV. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*; 62: 3-22.
31. Holt WV. 2000b. Fundamental aspects as sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53(1), 47-58.
32. 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.
33. Medrano A, Terrazas A, Soto R. 2010, Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small Ruminant Research* 89, 140–143.
34. Watson PF. 1996 Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31, 135-140.
35. Parks JE. Graham JK. 1992 Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*; 38:209-222.
36. Foote RH. 2003 Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, 75: 119-139.
37. Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. 1993 Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod fert suppl*; 47: 279-285.

38. 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.
39. Leibo SP, Bradley L. 1999 Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon, C. (Eds) *The male gamete*. McGill University; 46: 502-517.
40. Locksley E, Yang H, Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 1988; 25:178-185.
41. De Leeuw F, Chen H, Colenberd L. 1990 Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*; 27: 171-183.
42. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990 Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*; 11:73-88.
43. Oestermeier G, Saitor R, Susko JK, Parrish JJ, 2000. Bull fertility and sperm nuclear shape. *AgBiotheNet*; 2: September ABN055.
44. De Robertis E, *Biología celular y molecular*. 12<sup>a</sup> edición. Ed. El Ateneo. Argentina, 1998.
45. Rodriguez-Martinez H, Larson B, Pertof H. 1997 Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean. *Reprod. Fertil. Dev.*; 9:297-308.
46. Buhr M, Canvin A, Bauley L. 1989 Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research*; 23: 441-449.
47. Oetlé EE. 1986 Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*, 12: 145-150.
48. Heras M, Valcarcel A, Furnus C, Pérez L, Moses D, Baldassarre H. 1996 Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Anim Reprod Sci* 45:81- 89.
49. Curry MR y Watson PF. 1994 Osmotic effects of ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Criobiology* 31: 39-46.
50. 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.
51. Caiza de la Cueva F, Pujol MR, Rigau T, Bonet S, Mirci J, Briz M, Rodriguez-Gill J. 1997 Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48: 947-968.

52. Caiza de la Cueva F, Rigau T, Pujol R, Piedrahita J, Rodríguez-Gil J. 1997 Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship with cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 48: 301-315.
53. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of reproduction* 49: 112-123.
54. Holt WV, 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.
55. Eriksson B, Rodríguez-Martínez H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatbacks and maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 63:205-220.
56. Graham JK, Mocé E. 2005 Fertility evaluation on frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64:492-504.
57. Chen T, Bhowmick S, Sutteck A, Fowler A, Toner M. 2002 The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 44:301-306.
58. Patist A, Zoerb H. 2005 Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces* 40: 107-113.
59. Rodríguez GL, 2005 Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina.
60. Gao D, Critser JK 2000 Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *Cryobiology of Embryos, Germ Cells, and Ovaries*. Volume (4) 41.
61. 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.
62. Meyers SA, 2005 Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci* 89: 57-64.
63. Mazur P. 1984 Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 C125-C142.

64. Fishbein WM, Winkert JM. 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.
65. Levitt JA, 1962 Sulfhydryl disulphide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J Theor Biol* 3: 355-368.
66. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. 1988 Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril.* 50:314-320.
67. Agca Y, Liu J, Mullen S, Jonson-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.
68. Purdy PH. 2006 A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63 215–225.
69. Garzón PC. 2008 Desarrollo y Validación de una prueba de estrés osmótico precongelación para predecir la Criosupervivencia de semen de cerdo. (Tesis de Maestría). Cuautitlán Izcalli, México. UNAM.
70. Medrano A. 1998. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Ph.D. thesis. University of London.
71. Pérez Castillo T. 2007 Desarrollo y Validación de una prueba osmótica para evaluar la resistencia de la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, México. UNAM.
72. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI) 2010.
73. Herrera PJ. 2000 Inseminación Artificial con semen fresco y sincronización del estro en ovejas comerciales importadas de Australia. Editorial Imprenta Mexico: El autor, pp: 18-22.
74. Siegel S. Estadística no paramétrica. ED. Trillas, México, DF. 1991.
75. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. 1992 Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Research*, 9 (1992) 47-59.
76. Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intraocular freezing. *J Gen Physiol* 47,347-369.

77. Armitage WJ y Mazur P. 1981 Osmotic tolerance of human granulocytes. *Am J Physiol* 274,373-381.
78. Jeyendran y Graham, 1982 Sulfhydryl disulphide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *J Theor Biol* 3: 355-368
79. Watson PF, Duncan AE, 1981 Effect of salt Concentration and Unfrozen Water fraction of the Viability of slowly frozen Ram Spermatozoa. *Cryobiology* 25, 131-142.
80. Lingrel JB, Kuntzweiler T. 1994 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATP-ase. *J. Biol. Chem.* 269, 19659-19662.
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. Wei S, James DB, Hongsheng M, Critser JK. 2006 Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology* 53 (2006) 336–348.