



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE LA CRIOSUPERVIVENCIA Y LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA DE
ESPERMATOZOIDES DE PERRO ENFRIADOS A -5°C, PREVIO A LA CONGELACIÓN.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ

TUTOR

Dr. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.
UNAM.

COMITÉ TUTOR

DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.
UNAM.

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.
UNAM.

CUAUTITLÁN IZCALLI, NOVIEMBRE DEL 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice.....	i
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica.....	4
2.1 Características del semen canino.....	4
2.2 El espermatozoide canino.....	4
2.3 Membrana plasmática del espermatozoide.....	6
2.4 Fluidez de membrana	8
2.5 Transición de fase en las membranas.....	9
2.6 Principios básicos de la criopreservación de semen.....	10
2.7 Antecedentes de la criopreservación de espermatozoides.....	10
2.8 Refrigeración de semen.....	12
2.9 Criopreservación de semen	14
2.10 Susceptibilidad al choque frío.....	15
2.11 Uso de diluyentes y empleo de crioprotectores	16
2.12 Recolección de semen en canino.....	19
2.13 Frecuencia de recolección.....	20
2.14 Evaluación de la calidad espermática.....	20
2.15 Características del semen en la especie canina.....	21
2.16 Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen	22
Color.....	22
Volumen.....	22
Concentración espermática.....	23
Motilidad progresiva.....	23
Morfología.....	24
2.17 Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática.....	25
Eosina/Nigrosina.....	25
Prueba del hinchamiento hiposmótico (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST).....	26
Tinciones fluorescentes para determinar viabilidad.....	26
SYBR14 en combinación con yoduro de propidio (SYBR14/PI).....	27
2.18 Evaluación de la funcionalidad del acrosoma.....	28
2.19 Evaluación del estado de capacitación	29
2.20 Evaluación de la fluidez de la membrana.....	30
2.21 Enfriado pre-congelación a temperaturas bajo cero grados.....	31

3.	Hipótesis.....	32
4.	Objetivos.....	33
5.	Materiales y métodos.....	34
6.	Diseño experimental.....	42
7.	Resultados	47
8.	Discusión.....	64
9.	Conclusion.....	66
10	Bibliografía.....	67

RESUMEN

En los últimos años se ha presentado la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que se relacionan con los cambios que sufren los espermatozoides cuando se someten al proceso de crioconservación en las diferentes especies domésticas, productivas y de compañía, esto conduce a desarrollar tratamientos que mejoren la supervivencia espermática. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del enfriado pre-congelación, a temperaturas cercanas a la formación de hielo (-5°C), sobre la criosupervivencia y fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de perro. El semen se obtuvo de 7 sementales de las razas Pastor Alemán y Pastor Belga, de entre 2 y 6 años de edad, pertenecientes al Centro de Producción Canina del Ejército y fuerza Aérea de México. La colección se realizó una vez por semana (2 abril 2014 – 5 febrero 2015), posterior a ésta el semen se diluyó (1:1 v/v) y se transportó en un medio específico (TRIS- ácido cítrico- glucosa, penicilina-estreptomicina, con pH de 7.4), hacia el laboratorio; a su llegada, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en un diluyente a base de TRIS, yema de huevo y 3% de glicerol (ETY) y una concentración espermática ajustada a 400×10^6 células/ml. Los espermatozoides fueron enfriados lentamente de 22 a 5°C y posteriormente se le adicionó EYT con 7% de glicerol para obtener una concentración final de 5% de glicerol y una concentración de 200×10^6 células por ml. Posteriormente se envasaron los espermatozoides en pajillas de plástico de 0.5 ml que se mantuvieron a 5°C durante 16 horas. Para la primera etapa, que consistió en la determinación del punto de congelación, se realizaron 5 repeticiones utilizando pajillas del semen de diferentes machos ($n=47$ pajillas); se calculó la media de las 47 pajillas congeladas, determinando así el punto de congelación para el semen de perro diluido en EYT con 5 % de glicerol. En la segunda etapa experimental, las pajillas envasadas se enfriaron a diferentes temperaturas: -3 (T1), -5 (T2), y -7°C (T3), las pajillas enfriadas a $+5^{\circ}\text{C}$ fueron el grupo control; una vez que se alcanzaron las temperaturas anteriores, se tomaron dos pajillas de cada una de esas temperaturas y se recalentaron a 37°C para evaluar la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática (prueba del hinchamiento hiposmótico – HOST) y la integridad acrosomal (microscopía de contraste de fases). La tercera fase experimental consistió en enfriar las pajillas a $+5$ (T1), -3 (T2) y -5°C (T3), al alcanzar las temperaturas blanco se congelaron y almacenaron (al menos un mes); las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 37°C por 30 segundos. Se evaluó la motilidad progresiva, viabilidad (Eosina/Nigrosina), funcionalidad de la membrana plasmática (hinchamiento hiposmótico – HOST), integridad de la membrana plasmática (tinciones fluorescentes SYBR14 y Yoduro de propidio, prueba con el aparato Nucleo Counter®), integridad acrosomal (lectinas fluorescentes – PSA/FITC), el estado de capacitación (prueba de la Clortetraciclina - CTC), y la evaluación de la fluidez de la membrana plasmática (Merocianina 540). El punto de congelación fue $-13.6 \pm 0.71^{\circ}\text{C}$ (media \pm ee). El enfriado de los espermatozoides a $+5$, -3 , -5 , y -7°C no produjo diferencias significativas entre tratamientos. La congelación-descongelación de los espermatozoides enfriados a $+5$, -3 , y -5°C , previo a la congelación, tampoco produjo diferencias significativas entre tratamientos. En conclusión, el enfriado a diferentes temperaturas bajo cero de los espermatozoides de perro, previo a la congelación, no mejoró la supervivencia espermática y no tuvo efecto sobre la fluidez de la membrana plasmática.

Abstract

A standard protocol for cryopreservation of dog spermatozoa is needed because artificial insemination employing frozen-thawed semen is a demanding tool in dog breeding. Also, protocols developed in the dog are used to cryopreserve the semen from threatened wild canids. The objective of this work was to assess the effect of cooling, before freezing, at sub-zero temperatures around ice formation (-5°C) on dog sperm cryosurvival and plasma membrane fluidity. Semen was obtained from 7 dogs (German and Belgian Shepherd), 2 to 7 years of age, belonging to a breeding center located in Huehuetoca, Mexico. Semen was collected once a week (2 April 2014 to 5 February 2015); semen was diluted (1:1 v/v) in a special medium and transported to the laboratory, then diluted semen was centrifuged, supernatant was removed and sperm was resuspended in a Tris-egg yolk medium (3% glycerol, 400 x10⁶ cells/ml). Diluted sperm were slowly cooled from 22 to 5°C, and then a Tris-egg yolk medium containing 7% glycerol was added to reach a final concentration of 5% glycerol and 200 x10⁶ cells/ml. Sperm were packaged in 0.5 ml plastic straws that were kept 16 hours at 5°C before freezing. In the first stage, straws (n=47, 5 ejaculates from 4 dogs) at 5°C were exposed to nitrogen vapors to determine the freezing point of diluted dog sperm in 5% glycerol. In the second stage, straws at 5°C (control group) were further cooled to (1) -3, (2) -5, and (3) -7°C, when each group of straws reached the target temperature they were immediately rewarmed in a water bath at 37°C. Progressive motility (visual), plasma membrane functionality (HOST), and acrosome integrity (phase contrast microscopy) were assessed. In the third stage, straws at 5°C (control group) were further cooled to (1) -3, (2) -5, and frozen over nitrogen vapors; then straws from each group were plunged in liquid nitrogen and stored for one month at least. Frozen straws were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds. Progressive motility (visual), plasma membrane functionality (HOST), viability (Eosin/Nigrosine stain), plasma membrane integrity (SYB14/PI fluorescent stains, NucleoCounter®), acrosome integrity (PSA-FITC lectins), capacitation status (CTC assay), and plasma membrane fluidity (Merocyanine 540) were assessed. In the first stage, freezing point of diluted dog sperm (5% glycerol) was $-13.6 \pm 0.71^\circ\text{C}$ (mean \pm SEM). In the second stage, cooling to +5, -3, -5, and -7°C produce no differences on sperm quality between cooling treatments; although cooling to -7°C reduced the percentage of motile spermatozoa and plasma membrane functionality that reduction was non-significant. In the third stage, cooling to +5, -3, and -5, before freezing produced no differences on both sperm cryosurvival and plasma membrane fluidity. In conclusion, cooling of diluted dog spermatozoa to different sub-zero temperatures, before freezing, did not improve sperm cryosurvival and had no effect on plasma membrane fluidity.

1. INTRODUCCIÓN

El perro ha sido reconocido desde siempre como una especie animal que ha acompañado al hombre desde épocas prehistóricas; con lo que se ha establecido un vínculo hombre-perro importante, se sabe que a pesar de que el perro deriva del lobo, esta fue la primera especie domesticada por el ser humano, los restos fósiles más antiguos de los que se tiene registro fueron localizados en la cuenca del Cuervo Viejo, en Yukon, Canadá (con antigüedad de casi 30,000 años); que revelan que el lugar más probable del inicio de la domesticación comenzó en las regiones noroestes de Siberia, Alaska y Canadá, por lo que los investigadores concluyen que la domesticación de los perros bien pudo concluir hace 15 000 años o incluso antes (Vilá *et al.* 1997; Valadez, 2003).

Una vinculación y arraigo tan poderoso del perro hacia lo humano lo convierte en un elemento cultural de primer orden; cuando se trata de reconocer la propia naturaleza del ser humano. El perro es una especie que desde hace muchos milenios, es un reflejo directo de las culturas en donde existe, de la gente con las que convive, así como del ámbito familiar. De esta forma su estudio y el conocimiento que se deriva de ello se convierte en un interesante banco de información para su uso en diversas ciencias (Mendoza y Valadez, 2005).

A lo largo de la historia el perro ocupa un lugar muy importante ya que ha desempeñado no solo el papel de compañero, si no que ha sido utilizado como una especie de índole místico-religioso en diversas culturas (Valadez, 2003), con funciones zootécnicas como perros de caza, entrenamiento en distintas capacidades y destrezas para trabajos de guardia y protección, búsqueda y rescate de personas extraviadas, búsqueda y detección de enervantes y explosivos, para rastreo en contra del narcotráfico y el crimen organizado, como perros guía para invidentes, exposición de actitudes y belleza, entre otros (Payró, 2004)

En el área de la investigación el perro cumple un papel determinante ya que se utiliza para conocer más acerca de la propia especie, además de ser un ámbito de interés ya que el perro podría ser un modelo de estudio en el laboratorio para mejorar la fecundidad o preservar gametos de especies en peligro de extinción a nivel mundial; como ejemplos de esto se pueden mencionar entre otros, a el lobo ártico (*Canis lupus*), el lobo de Etiopía (*Canis simensis*), el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), o el zorro rosado de San Joaquín

(*Vulpes macrotis mutica*);(Manosalva et al. 2005). Además de ser excelentes modelos experimentales debido a la similitud en la fisiología de la reproducción con las especies silvestres y los seres humanos. La obtención de semen directamente de las colas del epidídimo y el conducto deferente es una técnica que se ha utilizado con frecuencia para los fines de reproducción asistida (Martins et al. 2009).

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera Inseminación Artificial (IA) con semen fresco en una perra de raza Spaniel en la que se produjo el nacimiento de 2 productos una hembra y un macho, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeñas especies. Ya en 1776 Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos. Fue en 1956 que Harrop logra la primera gestación con semen refrigerado en una hembra de la raza Gran Danes, abriendo las puertas a la crioconservación. Posteriormente, en 1969 Seager, reporta por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (Capanna, 1999).

Con el avance de la tecnología se ha presentado un creciente interés por el área de reproducción en los perros reproductores y de exposición. En la actualidad la inseminación artificial se realiza con semen fresco, refrigerado o congelado, esta práctica se ha incrementado considerablemente, usándose especialmente el semen fresco o refrigerado, mientras que con el semen congelado se busca conservar y manejar la calidad genética de razas caninas. La adecuada preservación del semen conlleva la posibilidad de transportar el material genético a grandes distancias lo que resulta de mayor utilidad (Linde-Forsberg, 1995), así como de aspectos de sobrepasar el efecto de la edad o la vida del macho, incluso la preservación de los genes en el bancos de semen, además de tener la posibilidad de aumentar la variabilidad genética. En los países desarrollados la inseminación artificial (IA) con semen congelado en caninos es aplicada cada vez más frecuentemente debido a las posibilidades que ofrece. Los programas de conservación y mejora de la cría han aumentado recientemente la demanda de semen congelado de muchas especies, incluyendo Cánidos. Sin embargo en nuestro país no se ha implementado de manera eficiente, a pesar de la creciente demanda por parte de criadores (Martins et al, 2009).

Por lo que surge la necesidad de profundizar en el conocimiento de los cambios que sufren los espermatozoides, cuando se someten al proceso de crioconservación, ya que

se sabe que este proceso puede causar daño irreversible a la membrana de los espermatozoides, e interferir con su viabilidad. Durante el proceso de crioconservación, los espermatozoides están expuestos a factores estresantes, que pueden estar vinculados a un choque térmico, durante el enfriamiento del semen, la formación de cristales de hielo intracelulares o al choque osmótico durante la congelación y la descongelación e incluso a la acción de los crioprotectores (Watson, 2000).

Lo que conduce a desarrollar tratamientos que mejoren su supervivencia. Se han empleado diferentes aproximaciones experimentales para tratar de resolver el problema de la baja criosupervivencia de los espermatozoides caninos, por ejemplo, se ha probado el uso de diferentes diluyentes comerciales (Du Bois et al. 2012), el periodo de almacenaje a 4- 5°C antes de la congelación (Hermansson y Linde Forsberg 2006; Santana et al. 2013), diferentes tasas de congelado y descongelado, y métodos de congelación (Eilts, 2005) y la congelación y descongelación de espermatozoides colectados del epidídimo (Martins et al. 2012). Uno de los problemas asociados a la congelación y descongelación del semen, es el aumento de la fluidez de la membrana espermática (capacitación prematura), esto ocasiona que la vida fértil de los espermatozoides se acorte (Rota et al. 1999). Al igual que ocurre con la mayoría de las especies domésticas, la inseminación artificial de perras con semen congelado produce resultados desalentadores (Pinto et al. 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000b). Se ha sugerido que para obtener mejores resultados de fertilidad se debe identificar los mecanismos responsables del daño que sufren los espermatozoides durante la crioconservación. Para esto se requiere una serie de pruebas *in vitro* que permitan evaluar la capacidad funcional de los espermatozoides (Rijsselaere et al. 2005a), las pruebas con sondas fluorescentes han mejorado la eficiencia de la evaluación espermática, así como la prueba del hinchamiento hiposmótico que de una manera sencilla permite evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides una variedad de especies, incluida el perro (Karger et al. 2014).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características del semen canino

El eyaculado en la especie canina presenta variaciones importantes de volumen y concentración espermática debido, principalmente, a la gran gama que existe en cuanto a tamaño y variedad de razas. El semen canino está constituido por dos componentes, uno celular conformado por los espermatozoides y uno líquido o plasma seminal constituido principalmente por la secreción de la glándula prostática. El semen es eyaculado en tres fracciones (Peña, 2004). La primera fracción o fracción preespermática presenta un aspecto acuoso, cuyo pH varía de 6,2 a 6,5 y un volumen entre 0.5 a 5 ml. La segunda fracción o fracción espermática presenta un aspecto ligeramente más viscoso que la primera fracción y su coloración varía de blanquecino a marfil, el pH se sitúa entre 6.3 y 6.6, el volumen medio varía de 1 a 4 ml (Root, 2007). La tercera y última fracción del eyaculado es de origen prostático y presenta un aspecto acuoso, su pH oscila entre 6.5 y 7. El volumen es directamente proporcional a la actividad secretoria de la glándula prostática y está entre 1 y 80 ml. Los espermatozoides son eyaculados principalmente en la segunda fracción o fracción espermática, sin embargo también es posible encontrar espermatozoides en la primera o en la tercera fracción aunque en reducidas cantidades (Threlfall, 2005).

2.2 El espermatozoide canino

El espermatozoide es una célula con una serie de características estructurales y funcionales que le proporcionan la capacidad única, de unirse al ovocito para que se lleve la recombinación de genes (Eddy, 2015). El espermatozoide, ha evolucionado originando una enorme diversidad entre especies, que no tiene comparación con ninguna otro tipo celular, considerando que se integra de una cabeza que contiene un núcleo altamente condensado y el acrosoma, una vesícula llena de enzimas cuyo contenido se libera cuando se acerca o alcanza las capas superiores del ovocito para facilitar la fertilización y un flagelo que proporciona al espermatozoide la capacidad para impulsarse a través de medio líquido (Johnson, 1996; Hafez, 2002).

Existe también una gran diversidad en los mecanismos celulares y moleculares implícitos en las funciones espermáticas. Hay diferencias en estructuras subcelulares, en la composición de membranas, por ejemplo, en la proporción de los distintos tipos de fosfolípidos, o de ácidos grasos poliinsaturados, así como en los mecanismos que regulan

el calcio intracelular, y todas ellas afectan a la señalización intracelular durante los procesos que transcurren en la vida del espermatozoide. La gran variedad de funciones que se realizan para lograr la fecundación la hace una célula altamente especializada (Eddy, 2015).

En el espermatozoide pueden identificarse 3 regiones estructurales (Figura 1): cabeza y cuello, pieza media y flagelo, todas delimitadas por la membrana plasmática. La cabeza espermática puede ser subdividida en cuatro regiones: la región apical, la región precuatorial, la región ecuatorial (figura 2), (Flesch y Gadella, 2000) posee un núcleo haploide de cromatina altamente condensada, que contiene la información genética, y un acrosoma y la membrana plasmática. La cola es un flagelo complejo y uno de los factores importantes que determinan la velocidad de propulsión del espermatozoide. Esta a su vez se divide en pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Aurich, 2005). La pieza intermedia contiene las mitocondrias que producen la energía necesaria para la motilidad. La pieza principal es la única parte donde se produce el batido flagelar. La pieza terminal es la última porción del flagelo posterior a la terminación de la vaina fibrosa y sólo contiene el axonema central que está cubierto por la membrana plasmática, que tiene la característica única de ser heterogénea (Silva y Gadella 2006; Noorafshan *et al.* 2010).

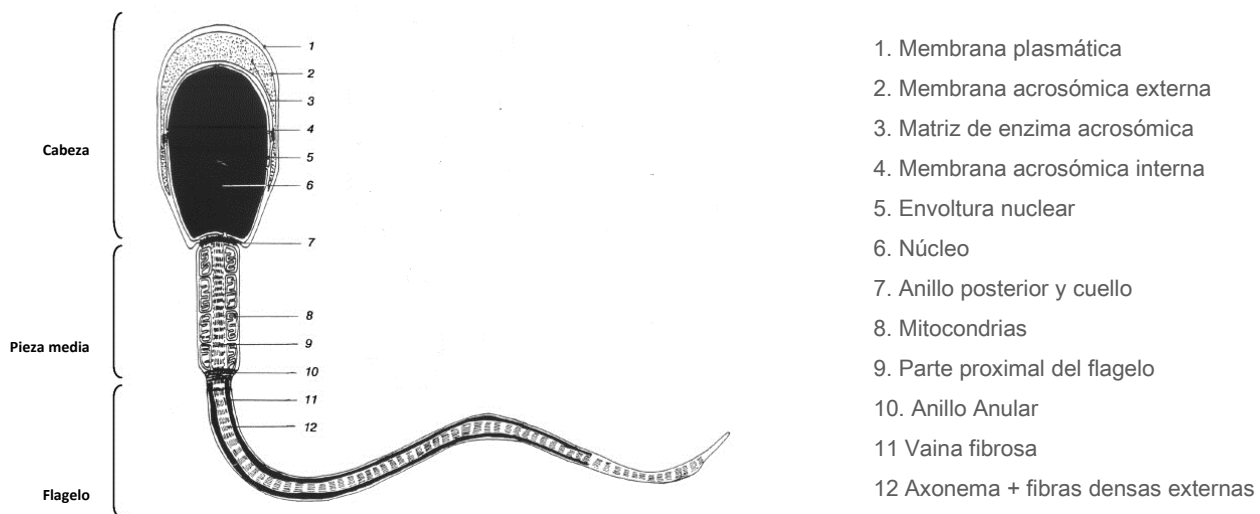
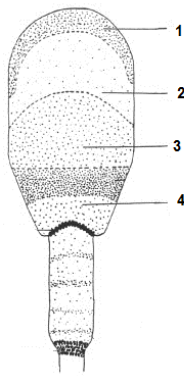


Figura 1. Regiones estructurales del espermatozoide (Adaptado de Boerke, 2008)

Para completar el proceso natural de la fecundación, los espermatozoides deben tener movilidad, capacitarse y desarrollar la reacción acrosomal para atravesar la zona pelúcida (Juárez y Valencia, 2009). El acrosoma, es un pequeño compartimento situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas hidrolíticas y desempeña una función muy importante en el momento de la fecundación ya que gracias a la reacción acrosomal el espermatozoide puede penetrar en el ovocito. El acrosoma es esencial para la función espermática (Hafez, 2002).



1. Zona de la región apical
2. Zona pre-ecuatorial,
3. Zona ecuatorial,
4. Zona post-ecuatorial.

Figura 2. Vista esquemática de la superficie de la cabeza en el espermatozoide (Adaptado de Flesch y Gadella, 2000)

Del mismo modo, la superficie de las tres regiones del espermatozoide se diferencian como estructuras integradas por proteínas transmembrana que separan la cabeza y la cola, denominados anillo posterior y anular, respectivamente. La función de estas estructuras es la de evitar la difusión lateral de los componentes de la membrana (Boerke, 2008).

2.3 Membrana plasmática del espermatozoide

El espermatozoide del canino, está rodeado por una membrana plasmática que lo delimita, del entorno externo. La membrana de los espermatozoides es extremadamente especializada en las funciones que se le atribuyen, además en el caso del espermatozoide la composición lipídica de la membrana es notablemente diferente a la de las demás células somáticas (Watson, 1995). La membrana plasmática del espermatozoide está conformada principalmente por lípidos donde se incluyen los fosfolípidos, glicolípidos y esteroides los cuales son responsables de la fluidez de las membranas; las proteínas y carbohidratos son los que conforman la parte estructural de la

membrana plasmática dando el soporte necesario para el citoesqueleto (Singer y Nicolson, 1972; Parks y Graham, 1992; Watson, 1995). El estudio detallado de la estructura y función de esta membrana plasmática es muy necesario cuando se quiere emplear con éxito biotecnologías de conservación espermática. Estudios realizados con criofactura muestran que en los espermatozoides de cobayo y de toro, la cantidad de esterol en la parte anterior del acrosoma es 4 veces mayor que la encontrada en la región postacrosomal (Frits *et al.* 2000).

En los espermatozoides la membrana plasmática tiene un papel activo en la capacidad fecundante, recibiendo señales que modificarán a la célula a lo largo del proceso de espermatogénesis así como en el tránsito y almacenamiento en el epidídimo, finalmente en la capacitación y la penetración del ovocito (Holt, 1984; Watson, 1995; Lenzi *et al.*, 1996). La membrana plasmática del espermatozoide está altamente compartimentada, y en cada compartimento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Hammerstedt *et al.* 1990). La conservación de dichos compartimentos resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada uno asume una función muy específica en la fecundación. Estos compartimentos son principalmente: la red mitocondrio-flagelar (importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide), el núcleo (necesario para el almacenamiento estable del ADN), la cabeza (de cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica) y el segmento posterior (imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito). Factores externos a los espermatozoides, tales como cambios en el pH, la temperatura y la osmolaridad del medio ambiente circundante pueden causar cambios irreversibles en la membrana plasmática que limitarían la función fecundante de los espermatozoides (Watson, 2000).

La relación entre fosfolípidos y proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo es de 0.68 en base al peso, sugiriendo que la cantidad de proteínas y lípidos en la membrana es aproximadamente la misma, aunque es posible que la relación proteínas y lípidos sea diferente en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Frits *et al.* 2000; Yanagimachi, 2015).

La composición y organización de los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide le confieren propiedades características. Aunque hay variación considerable entre las diferentes especies de mamíferos, la membrana plasmática

contiene en promedio 70% fosfolípidos, 25 % lípidos neutros y 5 % de glicolípidos (en base molar) (Frits *et al.* 2000).

Existen variaciones entre espermatozoides de diferentes especies, en cuanto a la concentración de lípidos neutros que componen su membrana plasmática, hay diferencias entre espermatozoides del mismo individuo. El principal componente que varía, es el colesterol. El espermatozoide humano contiene una alta concentración de colesterol (40% del total de lípidos en base molar), sin embargo el cerdo contiene mucho menor cantidad (22% del total de lípidos base molar). Además de colesterol, el demosterol, sulfato de colesterol y ésteres de colesterol también están presentes en la membrana (Frits *et al.* 2000, Espinoza *et al.* 2009).

La cantidad de colesterol, relativo al fosfolípido, determina la fluidez de la membrana y guarda una relación indirecta. El colesterol, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma (Davies, 1999). Todos los lípidos pasan por una fase de transición, desde un estado fluido o líquido-cristalino, (cadenas desordenadas), a un estado de gel, (cadenas de ácidos grasos que están cada vez más rígidas y paralelas) a medida que la temperatura disminuye. Para una apropiada función se requiere que la membrana se encuentre en estado fluido. El promedio de colesterol varía entre 280 a 560 *ng* dependiendo de la especie. La temperatura de transición para fosfolípidos en equinos es de 20,7° C, en verraco 24°C, toro 25,4° C y gallo 24,5° C. Es posible que estas diferencias reflejen las distintas tolerancias de los espermatozoides a las rápidas disminuciones de temperatura en procesos de crioconservación (Barroso *et al.* 2002; Orozco *et al.* 2008).

2.4 Fluidez de membrana

El concepto de fluidez se refiere específicamente a las propiedades de la región hidrófoba de la membrana. Por lo que una descripción cuantitativa de la fluidez debe comprender los movimientos de los lípidos en cuanto a velocidad de movimiento de las cadenas y la orientación de estas con respecto al plano de la bicapa, sin que se considere el movimiento de las cabezas polares. Una membrana muy fluida permite mayor movimiento dentro de ella (Harper, 1995).

2.5 Transición de fase en las membranas

Los lípidos en membranas biológicas pueden existir en un estado menos ordenado de viscosidad variable (líquido cristalino) o en un estado de alto orden cristalino (estado gel). El paso de un estado al otro se denomina transición de fase y ocurre a una temperatura fija para cada fosfolípido en particular. En el estado líquido-cristalino las cadenas hidrocarbonadas adquieren considerablemente más movilidad. Aunque el glicerol y la cabeza polar mantienen un arreglo regular, existe evidencia de incremento en la movilidad del grupo polar y de una reorganización del agua alrededor de este grupo durante el cambio de fase. La temperatura a la que ocurre el cambio de líquido-cristalino a gel, se llama temperatura de transición (figura 3) (Hanzel, 1995; Hidalgo, 1996).

A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (Hidalgo, 1996). Se sabe que algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los *lípidos no-bicapa*, asumen una disposición hexagonal, estando implicados en la formación de un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). Así que, la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen. Éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a agregarse (Hanzel, 1995). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas; como se ha demostrado mediante microscopía electrónica (De Leeuw *et al.*, 1990). Tras la refrigeración y principalmente tras el calentamiento, los micro-dominios de lípidos bicapa no restablecen las asociaciones con los restantes componentes de membrana y las regiones resultantes de agregados hexagonales pueden potencialmente desestabilizar la membrana (Hanzel, 1995).

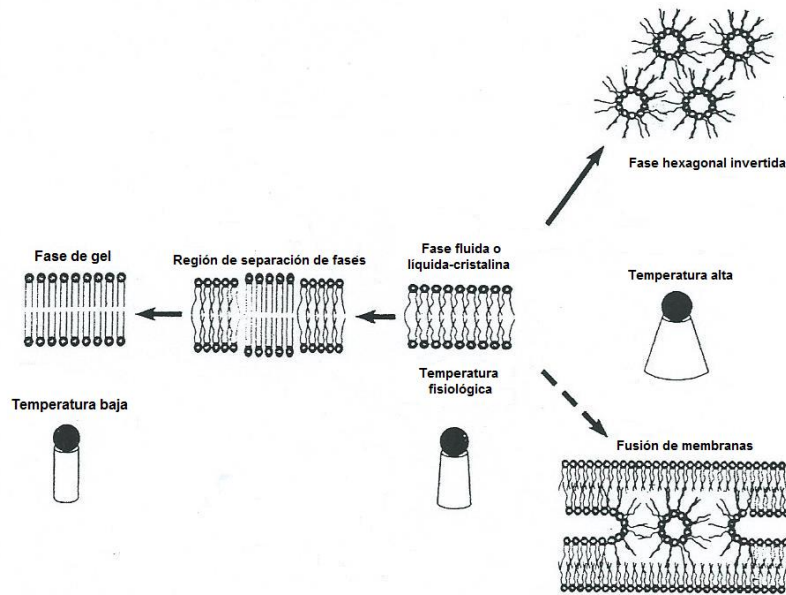


Figura 3. Las flechas continuas indican el efecto de un aumento o descenso de la temperatura en el comportamiento de la fase y de la geometría molecular de los fosfolípidos de membrana. La temperatura fisiológica se refiere a la temperatura a la que un organismo se adapta. La flecha punteada ilustra la supuesta participación de la fase hexagonal invertida en la fusión de membranas.

2.6 Principios básicos de la crioconservación de semen

Crioconservación. Etimológicamente, crioconservación es la forma prefija de la voz griega *kryós*, que significa frío glacial y el latín *conservatio* que habla de mantener y cuidar algo en cierto estado. En criobiología, la crioconservación es la técnica de conservación de las células en nitrógeno líquido (-196°C) manteniéndolas vivas, deteniendo su crecimiento pero conservando la viabilidad y la estabilidad genética y fisiológica. El proceso debe ser reversible y debe mantener la integridad celular con el daño mínimo con temperaturas por debajo del punto de congelación (Rios, 2005). Es una técnica que presenta excelentes perspectivas, pues permite almacenar, por periodos indefinidos, células de cualquier especie, que toleren y sobrevivan al congelamiento (Bensona, 2012).

2.7 Antecedentes de la crioconservación de espermatozoides

Los efectos de las temperaturas bajo cero sobre la viabilidad de los espermatozoides tiene su origen desde 1776, se sabe que en este año, Lázaro Spallanzani, congeló semen de mamíferos contenidos en viales utilizando nieve, observó al recalentar

espermatozoides móviles. Se sabe que antes del invento de la refrigeración, los investigadores veían limitados sus experimentos ya que los realizaban con bajas temperaturas que podían conseguirse en la naturaleza. Por lo tanto, otros investigadores durante muchos años (de 1840 a 1897) experimentaron con la exposición de los espermatozoides a temperaturas por debajo de los 0°C, pero por encima de -30°C. Durante el siglo XX, enfriar y congelar medios, tuvo avances por las posibilidades que brindaba el uso de refrigeradores, que permitían utilizar temperaturas aún más bajas. Los primeros ensayos de "congelación" no tuvieron éxito; más tarde Jahnel en 1938 demostró que el semen humano podría ser congelado utilizando diferentes sustancias con temperaturas muy alejadas de los 0°C; en hielo seco (-79°C -20°C), nitrógeno líquido (-196°C) o helio líquido (-296°C) y que al descongelado los espermatozoides eran móviles, incluso después de 40 días almacenados a estas temperaturas (Salamon y Maxwell 1995). A fin de proteger los espermatozoides durante la congelación y descongelación, algunos de los primeros investigadores utilizaron medios que contenían altas concentraciones de azúcares. Así Luyet y Hodapp en 1938 observaron que después de la vitrificación de espermatozoides de rana, al descongelar éstos eran móviles, esto fue posible ya que mezclaron el semen con una solución de sacarosa concentrada al 40% previo a la inmersión en nitrógeno líquido (-196°C). Posteriormente, Bernstein y Petropavlovsky en 1937 utilizado con éxito solución de glicerol (1 M, 9. 2%) congelaron semen de algunos mamíferos (conejo, cuyos, toro, carnero, jabalí,) y de aves (incluido el pato) -21°C; sin embargo también reconocieron el efecto toxico del glicerol, si se utiliza en altas concentraciones. El descubrimiento de las propiedades crioprotectores de glicerol dio un gran impulso a la investigación sobre la crioconservación de semen de mamíferos (Salamon y Maxwell 1995).

Desde entonces, se inició la congelación de semen de algunos animales domésticos de forma rutinaria. La especie bovina fue la que recibió la mayor atención de los investigadores y el mayor beneficio con el uso del semen congelado en la I.A. Actualmente, en algunos países, la industria de producción de leche bovina depende casi en su totalidad de la I.A. con semen congelado-descongelado. El desarrollo de la tecnología de la crioconservación representa considerables progresos prácticos y económicos de la aplicación de la I.A. Sin embargo, algunos factores pueden afectar el mantenimiento de la función de los espermatozoides durante el proceso de congelado-descongelado; entre ellos se encuentran el método de congelación, la composición del

diluyente y la tasa de dilución. Por esto, la motilidad y viabilidad del espermatozoide son muy variables al descongelado y una gran cantidad de dosis se tienen que descartar (Alessandro *et al.* 2001).

La crioconservación de semen ha sido vista, como un medio para beneficiar la cría de animales de importancia agrícola, y se ha reconocido como una contribución a la conservación de especies en peligro de extinción y para la superación de los aspectos de la infertilidad masculina en humanos. Sin embargo, con la posible excepción de semen de toro, una menor fertilidad es generalmente aceptada como una consecuencia de la crioconservación. El semen preservado de diversas especies, es de suma importancia en el área de la investigación, que da lugar a varias posibilidades de reproducir a diferentes individuos, además de salvaguardar características genéticas que se encaminan a mejorar las especies (Flesch y Gadella, 2000; Andrade 2005).

2.8 Refrigeración de semen

Se sabe, que el proceso de refrigeración forma parte del protocolo de congelación de semen (Silva, 2003). Sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo si se utiliza diluyentes adecuados es decir con componentes específicos que para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo. A diferencia de la refrigeración del semen, el proceso de congelación necesita también del empleo de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura. Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de crioconservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial. Sin embargo y con excepción de los bovinos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas, en parte porque los protocolos de congelación no proporcionaron resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992). Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias en la fisiología y la bioquímica del espermatozoide, también a las variaciones en la anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente, de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60°C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Con el enfriamiento celular por debajo de los 0°C, se producen una serie de procesos nocivos para la célula que comienzan con la formación de hielo en el compartimento extra-celular. La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intra-celular (Johnson, 2000). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extra-celular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987). Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992). Cuando las células están sujetas a temperaturas inferiores a 0°C, inicialmente se “sobre-enfrían”. El modo en que recuperan el equilibrio depende del ritmo de refrigeración y de su permeabilidad al agua. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intra-celular hacia el hielo externo, o sea, se equilibran por deshidratación; pero si son refrigeradas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van equilibrar, en parte, por congelación intracelular (Mazur, 1970). El ritmo de enfriamiento debe, por tanto, tener en cuenta estos fenómenos (Amann y Pickett, 1987).

La presencia de hielo extra-celular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles (Johnson, 2000). Por el contrario, la formación intracelular de cristales de hielo provoca lesión y muerte de la célula. Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de

congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular. Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intracelular constituye micro-cristales y los daños derivados son muy reducidos (Amann y Pickett, 1987).

El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso de descongelación. Si el ritmo de enfriamiento es rápido, el de calentamiento también lo debe ser; alternativamente, si el ritmo de enfriamiento es lento también debe serlo el de calentamiento. Las células que contienen microcristales de hielo intracelulares deben ser recalentadas muy rápidamente a fin de evitar la recristalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

2.9 Crioconservación de semen

El proceso de crioconservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990); que puede ocasionar que el espermatozoide pierda su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 1995). Por otra parte, dichas etapas del protocolo de congelación se influyen mutuamente, así que los ritmos de cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente (Hammerstedt *et al.* 1990). Es por tanto que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Holt, 2000).

El resultado de un protocolo de crioconservación depende de una serie de factores como la composición del diluyente y la concentración del crioprotector, el ritmo de refrigeración y de congelación, y el ritmo de descongelación (Watson, 1995). Idealmente, estos pasos deberían reducir al mínimo los daños celulares y asegurar una adecuada longevidad *in vivo e in vitro* (Farstad, 1996). No obstante y a pesar de los progresos en los protocolos de crioconservación, los datos de motilidad y de integridad de la membrana indican que solo cerca del 50% de las células sobreviven al proceso de congelación (Curry, 2000).

La refrigeración y la congelación son acontecimientos que pueden conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide. Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos orgánulos del espermatozoide derivan de dos de los principales motivos de estrés de la crioconservación: -las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo. Además de la cristalización, también están implicadas alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes (Watson, 1995).

Cuando las células se congelan se someten a tensiones que resultan de las interacciones soluto-agua que surgen a través de cristalización del hielo. La exposición de las células a la solución hiperosmótica, todavía no congelada, provoca la captación de agua intracelular, el encogimiento celular consecuente y la posible afluencia de iones (Watson, 1995). Descongelar implica una reversión de estos efectos, el consiguiente flujo de agua hacia el interior puede causar disrupción de la membrana celular. Los efectos perjudiciales de la congelación lenta y la exposición prolongada de las células, a las condiciones hiperosmolares, han sido vistos como el equilibrio de las consecuencias perjudiciales de la congelación rápida que fomentan la cristalización de hielo intracelular. La interrupción citoplasmática a través de la formación de hielo intracelular puede ser agravada por el crecimiento de cristales de hielo durante la descongelación (recristalización). Se ha sugerido que existe una velocidad de congelado donde los efectos perjudiciales de estas dos fuentes diferentes (formación de hielo, efecto soluto) de daño se pueden minimizar (Watson, 1995).

2. 10 Susceptibilidad al choque frío

Uno de los problemas que ha presentado la crioconservación de semen, son las alteraciones en el espermatozoide durante el proceso, conocidas como "choque frío". Estas alteraciones son evidentes ya que se ocasiona una pérdida irreversible de la viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0°C, reflejándose por la pérdida de motilidad tras el recalentamiento (Watson, 1995). Para tratar de evitar este fenómeno una de las alternativas es la refrigeración lenta previa a la congelación, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000). Se sabe que el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto,

durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico (White, 1993). Existen evidencias de que el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis *et al.*, 1993).

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, se considera que los espermatozoides de toro y de cerdo se encuentran entre los más sensibles y por el contrario en el hombre, aves, perro y conejo no se evidencian alteraciones tan marcadas (Watson, 1995). Algunos constituyentes de la membrana espermática como los fosfolípidos y los ácidos grasos, son altamente importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico (Darin-Bennett *et al.*, 1974). Algunos estudios han demostrado que la causa de esto se debe a que en el toro, cerdo y carnero, se presenta una alta tasa de ácidos grasos poliinsaturados y saturados en su membrana, lo que se correlaciona con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Gadea, 2005). Mientras que si se compara la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos de la membrana espermática de animales considerados como relativamente resistentes al choque térmico, como es el caso del perro y del gallo, se han observado también algunas diferencias en las proporciones relativas de estos componentes (Darin- Bennett *et al.* 1974).

Otro factor también correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico es la relación colesterol/fosfolípidos, habiéndose observado que una tasa superior a 0.5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. Dadas las propiedades de colesterol en la estabilidad e impermeabilidad de la membrana y en el control de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, éste proporciona una estructura cohesionada en un determinado rango de temperaturas. El colesterol existente en el espermatozoide de toro y de carnero es la mitad del existente en el espermatozoide del conejo o del hombre, lo que dificulta el establecimiento de generalizaciones (Holt, 1984).

2.11 Uso de diluyentes y empleo de crioprotectores

Inmediatamente después de colectado el semen, el primer paso en el proceso es su dilución en un medio que lo proteja adecuadamente durante el proceso de crioconservación, a este medio se le denomina diluyente; dentro de las características que

éstos deben mantener está la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones, además de aportar una fuente de energía para proteger a los espermatozoides de cualquier efecto nocivo causado en el proceso de congelación y descongelación (England, 1993). Los avances en las técnicas de evaluación del semen, así como también en los equipos utilizados, han posibilitado analizar y conocer más ampliamente el impacto de los diluyentes en relación con la longevidad, motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la refrigeración y la congelación (Rota *et al.*, 1997).

El TRIS es utilizado en la crioconservación de semen por su capacidad amortiguadora de pH, osmótica y ser muy poco toxico aún en altas concentraciones; además neutraliza los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides y particularmente al ácido láctico (Salamon y Maxwell, 1995). Para proveer de energía al espermatozoide, los diluyentes deben contener azúcares del tipo monosacáridos. La principal fuente de energía para los espermatozoides es la fructosa, sin embargo, este también es capaz de metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Rota *et al.* 1997). La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío la porción lipídica de la yema constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico, también se le atribuye la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con los fosfolípidos de la membrana plasmática (Hammerstedt *et al.*, 1990). Las lipoproteínas de baja densidad que contiene la yema consigue un efecto, evitando el choque térmico, previniendo el daño peroxidativo y preservando la integridad de la membrana (Silva *et al.*, 2006).

La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de congelación; el papel de los crioprotectores es fundamental en el proceso de congelación y descongelación de células vivas pues proporciona protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras intra-celulares, extra-celulares y en la composición química. Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico del semen diluido (Fahy *et. al.*, 1990).

Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana en penetrantes, como el glicerol, DMSO, etilenglicol, y en no-penetrantes incluyendo determinados azúcares como la trehalosa, sacarosa y lactosa (Hammerstedt *et al.* 1990).

El glicerol es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación del semen de perro, y prácticamente en todas las especies domésticas (Silva *et al.*, 2002; Hermansson, 2006). El glicerol es de bajo peso molecular y penetra a la célula y reemplaza osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento, esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta reduce la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxell, 2000). La función del glicerol consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución” (Watson, 1995); además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intracelular disponible para congelarse y formar cristales. Sin embargo a pesar de sus propiedades crioprotectoras el glicerol también tiene un efecto tóxico a nivel de la membrana plasmática (Hammerstedt *et al.*, 1990).

En los protocolos de crioconservación de semen canino, generalmente el glicerol se agrega al semen junto con el diluyente en dos pasos, es decir se utiliza dos fracciones de diluyente, que se diferencian básicamente porque la primera fracción tiene poco o nada del glicerol y la segunda fracción tiene la mayor concentración del mismo para evitar un efecto nocivo sobre la calidad espermática cuando es agregado a temperaturas entre 30°C y 37°C (Holt, 2000b); algunos autores adicionan una fracción del glicerol (3%) a temperaturas por encima de los 30°C y el resto a los 5°C (Peña *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2006b). En contraste, en otros protocolos se adiciona todo el glicerol en la segunda fracción del diluyente a los 5°C (Linde-Forsberg, 1995; Petrunkina *et al.*, 2004; Hermansson, 2006).

2. 12 Recolección de semen en canino.

La recolección se hace mediante manipulación manual (masturbación), ya que en el perro el mayor estímulo es la presión, en general este manejo no causa estrés en la mayoría de los machos, lo que ha reportado tener grandes ventajas, además de no requerir materiales especializados (Bruce et al., 2005; Christensen et al., 2011). En el momento de la recolección se debe tener en cuenta la libido y facilidad de maniobra; los beneficios de utilizar una perra en estro para la obtención del semen canino facilitan la eyaculación y por lo tanto, la recolección del mismo. Sin embargo, muchos de los machos tendrán que eyacular sin la presencia de una perra; por un lado el macho se puede entrenar paulatinamente para que acepte la manipulación (Rijsselaere *et al.*, 2003), y esto no le cause estrés hasta que este procedimiento lo adopte como parte del manejo. Otro sistema es utilizar feromonas comerciales ya que se ha podido identificar químicamente el metil p- hidroxibenzoato compuesto presente en las hembras en estro, que se utiliza para mejorar la libido de los perros sean renuentes a la manipulación (Root, 2005). El equipo que se requiere es mínimo, básicamente guantes de vinilo o látex, embudo de vidrio o plástico, copa de vidrio o cono de látex, tubos de vidrio o de plástico, se recomienda la utilización de lubricantes no espermicidas (Kutzler, 2005).

Antes de tomar la muestra se recomienda que se realice en un lugar tranquilo, de preferencia cerrado evitar en la medida de lo posible ruidos fuertes o factores que puedan distraer al macho; en caso de machos acostumbrados a este manejo no es necesaria la hembra en estro o la utilización de otras sustancias estimulantes. Para la recolección manual Inicialmente se toma el pene y es masajeador vigorosamente a través del prepucio por detrás del bulbo del glande sosteniéndolo con presión moderada pero constante hasta que se desarrolle una erección parcial con engrosamiento del bulbo del glande, en este momento el prepucio es rápidamente retraído caudalmente por detrás del bulbo del glande, dirigir el pene hacia ventral hasta un Angulo de 45° y realizar presión pulsátil sobre el bulbo. Otra forma es realizar un movimiento rápido y rítmico de atrás hacia delante sobre la zona del bulbo. Las pulsaciones uretrales comienzan casi en forma inmediata y algunos perros muestran movimientos de empuje mientras se desarrolla la erección completa, una vez esto ocurra el pene completamente erecto es rotado 180° manteniendo el pene en orientación dorsal, el recolector debe continuar aplicando una ligera presión por detrás del bulbo del pene para que con esto la eyaculación comenzara inmediatamente después que el pene esté posicionado (figura 4). Finalizada la

recolección manual, se recomienda la aplicación del lubricante no espermicida para proteger el pene de lesiones hasta que pierda la erección (Albarracín *et al.*, 2004; Kutzler, 2005).

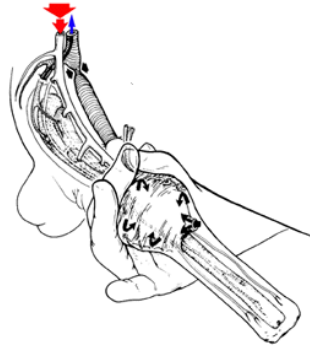


Figura 4. La imagen muestra el pene de perro posicionado para la eyaculación (Kutzler, 2005).

2. 13 Frecuencia de recolección

Hasta el momento la información de la frecuencia es muy variable por lo que no se ha podido establecer los patrones para la recolección seminal en el perro. Hay autores que realizan 2 o 3 recolecciones por semana (Rigau *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros trabajos se defiende que es posible mantener una frecuencia de recogida de 2 eyaculados por perro cada 2 días, sin que se observe un marcado descenso de la calidad seminal (England, 1999). La mayoría de los autores recomiendan utilizar sólo el primer eyaculado, tanto para inseminar como para la refrigeración o congelación. Sin embargo, hay estudios en los que se trabaja con los dos eyaculados, con un intervalo de tiempo de 45-75 minutos entre el primer y el segundo eyaculado, sin observar un descenso evidente de la calidad seminal (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

2. 14 Evaluación de la calidad espermática

Principios generales. Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática (Amann *et al.*, 1993; Larson *et al.*, 2000).

La evaluación del semen antes, durante y después de los procesos de conservación ha sido la base del desarrollo de los métodos de preservación seminal en los laboratorios de investigación (Nagy *et al.*, 1999). Las pruebas de laboratorio tienen por objeto la evaluación *in vitro* de la fertilidad seminal y la apreciación de los daños que se producen en el espermatozoide, derivados del proceso de conservación previo a la inseminación, crean la necesidad de técnicas rápidas y exactas (Smith y Murray, 1997).

Varios de los investigadores se han cuestionado si una prueba o una serie de pruebas combinadas de laboratorio pueden predecir la fertilidad del semen de una determinada muestra o de un macho. De un modo general, los datos obtenidos tienen un valor muy limitado en el establecimiento de correlaciones entre pruebas de laboratorio y fertilidad. Para que dicha correlación pueda establecerse es fundamental disponer de sistemas de análisis precisos, específicos y rigurosos así como datos de la fertilidad precisos y exactos. Todas las pruebas de laboratorio implicadas en la evaluación de la calidad seminal deben ser cuidadosamente validadas y, una vez establecidas, su precisión debe ser monitorizada continuamente (Amann, 1989).

2. 15 Características del semen en la especie canina

La evaluación inicial de una muestra de semen, incluye de manera inmediata las características generales del eyaculado como son la determinación del volumen, la concentración y el porcentaje de espermatozoides que exhiben motilidad progresiva. Se considera que estos parámetros son los más importantes en la toma de decisiones que conciernen a un posterior procesamiento del eyaculado, como la dilución y congelación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996). Otros parámetros también analizados son la morfología, el pH seminal, y el tiempo que duran móviles los espermatozoides (Malmgren, 1997). Pese a que estas pruebas proporcionan una cantidad apreciable de información, sus correlaciones con la fertilidad no son definitivas (Linford *et al.*, 1976; Malmgren, 1997). Sin embargo, estos autores evidenciaron que era posible establecer límites, fuera de los cuales las muestras de semen pueden ser consideradas de mala calidad y descartadas. También la determinación de la concentración y el estudio de la morfología espermática permite, dado su valor diagnóstico, la eliminación de eyaculados de sementales con una fertilidad potencialmente baja antes de la preservación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996). De un modo general, el espermiograma facilita la detección de eyaculados con una capacidad fecundante posiblemente baja, pero no es capaz de predecir el resultado de

algunos sementales cuyos parámetros seminales están dentro de los límites normales, especialmente en la congelación (Rodríguez-Martínez *et al.* 1996).

En el perro, la mayoría de los investigadores defienden que solo eyaculados con un mínimo de 85-90% de motilidad o 75-85% de motilidad progresiva deben ser considerados útiles para congelación, y que las muestras con menos de 70% de motilidad son malas candidatas a la congelación (Concannon y Battista, 1989). Sin embargo, en esta especie la información sobre la relación entre la calidad seminal y fertilidad es escasa (Morton y Bruce, 1989; Linde-Forsberg, 1995). La mayoría de los estudios de las variables en la congelación han estado limitados en esta especie por la falta de indicadores concretos de fertilidad (Concannon y Battista, 1989). Tampoco existe mucha información relativa a las variaciones en la calidad de semen fresco de perros fértiles, pero parece ser que el rango de valores seminales compatibles con la fertilidad es mayor que el esperado y, por otra parte, que los perros con mala calidad seminal pueden ser fértiles, en determinadas circunstancias (England y Allen, 1989).

2. 16 Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen

Color. Un semen de buena calidad presenta un color blanco lechoso; si se observara un color amarillento denotaría la presencia de orina, mientras que si es rojo o marrón sería indicativo de presencia de sangre fresca o hemolizada. Esta prueba se hace mediante la observación directa del semen en el tubo graduado (vidrio o plástico) utilizado para la recogida (Kutzler, 2005; Threlfall, 2005).

Volumen. Este parámetro varía en función de la especie y raza, edad, estado fisiológico del individuo, método de recolección, estado nutricional, frecuencia de la recolección, libido, época del año y peso del macho. El volumen del eyaculado se valora por observación directa en el tubo colector graduado que se utiliza en el momento de la recolección (Farstad, 2000). Los valores promedio para un perro de raza mediana son de aproximadamente 1 a 2 mL para la primera fracción, 1 a 2 mL en la segunda y finalmente unos 4-8 mL para la tercera (Freshman, 2002). Sin embargo, lo más frecuente es que en función de la raza y el perro, se obtengan volúmenes de entre 0.1-2 mL en la primera fracción, 0.2-4 mL para la segunda y 1-30 mL para la tercera fracción (Threlfall, 2005).

Concentración espermática. Los valores descritos en el perro de la concentración espermática tiene una variación enorme ya que no se puede comparar entre las razas, por lo que esta tiene un valor promedio que oscila entre $300-2000 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro (esp/mL), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300×10^6 . Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000×10^6 esp/mL (Farstad, 2000; Threlfall, 2005).

Motilidad progresiva. La motilidad es considerada el criterio más importante en la evaluación de la fertilidad del macho, el objeto de su estimación es determinar la proporción de espermatozoides móviles y la proporción de los que se mueven progresivamente. La motilidad del espermatozoide es un factor crítico en el proceso de interacción de los gametos; una disminución en la velocidad y en la proporción de células móviles progresivas refleja lesiones celulares que pueden reducir las posibilidades de fecundación (Kjaestad *et al.*, 1993). La motilidad y velocidad espermáticas muestran dos aspectos distintos de la actividad flagelar, pero ambos dependen de la función del axonema, por tanto se espera una correlación entre estos parámetros (Malmgren, 1997). El valor normal de la motilidad del semen fresco en la especie canina se considera de entre 85-95%. Se considera que un valor por debajo del 80% de motilidad en semen fresco sería indicativo de una reducción de la fertilidad (Threlfall, 2005). Sin embargo, la mayoría de los autores indican que en un eyaculado con buena motilidad los valores son de entre el 70 y 90% (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Albarracín *et al.*, 2004).

Cuando el semen ha sido sometido a un procedimiento de refrigeración, la motilidad puede oscilar entre 20 y 80% (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), Otros trabajos reportan valores del 79 al 93% (Rota *et al.*, 1995). Se considera que la motilidad después de un periodo de refrigeración es aceptable cuando presenta valores de entre el 60 y 70% (Rota *et al.*, 1995). En referencia a la motilidad seminal post-congelación se describen valores entre 10 y 80%, pero la calidad seminal se considera como buena cuando el valor de motilidad se sitúa por encima del 60% (Silva *et al.*, 1996; Yildiz *et al.*, 2000; Alamo *et al.*, 2005); aun así en algunos trabajos se describe que, para considerarse de buena calidad, el valor mínimo de motilidad del semen descongelado debe ser del 50%. Finalmente, algunos autores hacen referencia a inseminaciones realizadas con semen congelado que presentaba una motilidad ligeramente por encima del 35% (Farstad, 2000).

Morfología. Como se ha señalado en el apartado anterior, la tinción habitualmente utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. La realización de esta técnica puede afectar a la morfología, por lo que las extensiones no deben realizarse de forma brusca para evitar roturas en las cabezas, así como provocar la aparición de posturas anormales de los espermatozoides que enmascaran el resultado real, generando un número anormalmente alto de morfoanomalías. Además hay que asegurar que la muestra no ha sufrido ninguna modificación tras la recolección (Silva *et al.*, 1996; Peña y Linde-Forsberg, 2000a). Otras causas que pueden provocar la aparición de morfoanomalías son el estrés asociado a inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del aparato reproductor, disminución de la secreción de LH y testosterona o alteraciones iatrogénicas (Paramo *et al.*, 1993; Kawakami *et al.*, 1998; England, 1999). Es frecuente el uso combinado de tinciones para valorar la vitalidad, con colorantes que permitan diferenciar el estado del acrosoma, como por ejemplo el uso combinado de azul Trypan y Giemsa o café Bismarck y rosa de Bengala, consiguiendo así valorar tanto la vitalidad, como las morfoanomalías y la integridad del acrosoma (Peña, 2004). En el caso concreto de las acrosomías, es posible el uso del Spermac®, pero no es posible establecer diferencias entre células vivas y muertas (Farstad, 2000; Peña, 2004).

Por otro lado, mediante el uso de tinciones fluorescentes es posible realizar la valoración de la integridad de membrana tanto en semen fresco como congelado (Peña, 2004; Rijsselaere *et al.* 2005b). La utilidad de estas tinciones se centra principalmente en las muestras congeladas, ya que de esta forma no se observan tantos artefactos como con las técnicas tradicionales. Se utilizan por ejemplo, diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI) conjuntamente con citometría de flujo (Peña, 2004). No se obtienen buenos resultados a la hora de evaluar la integridad del acrosoma, ya que muchas de estas tinciones se basan en la unión específica de antígeno-anticuerpo entre el colorante fluorescente y receptores presentes en la membrana del acrosoma (Peña, 2004). Las morfoanomalías que se pueden encontrar se clasifican en primarias, que son aquellas que aparecen como consecuencia de una alteración de la espermatogénesis (malformaciones de la cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo), y las secundarias que son debidas a un fallo en la espermiogénesis o a una inadecuada manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). En el caso de la gota citoplasmática proximal se ha visto que en la

especie canina afecta a la fertilidad; sin embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece tener efecto sobre la fertilidad en el perro (Peña, 2004; Threlfall, 2005).

De manera general, nos encontramos con los siguientes tipos de morfoanomalías: anomalías en la cabeza, en el cuello, en la pieza intermedia y en la cola del espermatozoide. Independientemente de la tinción empleada, algunos autores sostienen que la determinación de las morfoanomalías se basa en criterios subjetivos, por tanto se propone la utilización del sistema CASA para conseguir una medida más objetiva (Peña, 2004; Rijsselaere *et al.*, 2005a). El porcentaje de morfoanomalías aceptable en una muestra de semen en fresco debería situarse como máximo en un 20-25% (Peña, 2004), encontrando normalmente un 10-20% de anomalías secundarias y 10-15% de primarias (Burke, 1986; Iguer-Ouada, 2001). Puede ser indicativo de una reducción de la fertilidad si la muestra presenta valores por debajo del 80% de espermatozoides normales vivos, aunque algunos autores aceptan valores de 65-70% (Concannon, 1993).

2. 17 Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática

Eosina/Nigrosina. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática proporciona una valiosa información sobre los métodos de procesamiento del semen y la identificación de los puntos del proceso que más contribuyen a las alteraciones en la membrana del espermatozoide (Johnson *et al.*, 1996). El grado de lesión de las membranas plasmática y acrosomal está relacionado con la fertilidad de la muestra procesada, pero solamente en los casos en que el daño sea extenso (Rodríguez-Martínez, 2006).

El uso de tinciones supravitales como la Eosina/Nigrosina para la evaluación de la viabilidad espermática (Smith y Murray, 1997) se basan en el principio de que los espermatozoides con la membrana plasmática intacta (vivos) presentan mecanismos de permeabilidad selectiva que impiden la entrada del colorante, mientras que en aquellos donde existe ruptura de la membrana, y no existan estos mecanismos, el colorante penetrará y la célula se tiñe rosa por la eosina (muerto), mientras que los vivos permanecerán blancos sobre el fondo oscuro de nigrosina. Por ello se denominan "técnicas de evaluación de vivos y muertos", estas tinciones permiten valorar al mismo tiempo la morfología y la viabilidad (Barth y Oko, 1989).

Prueba del hinchamiento hiposmótico (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST). Esta prueba permite evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides basándose en la semipermeabilidad de las membranas celulares intactas (Forouzanfar *et al.*, 2010; Quintela *et al.*, 2010). Durante la eyaculación, los espermatozoides son transportados desde un ambiente hiperosmótico en la cola del epidídimo (420 mmol/kg) a un ambiente isosmótico del plasma seminal y del aparato reproductor de la hembra (330 mmol/kg) (Yeung *et al.*, 2000). La funcionalidad de la membrana está estrechamente relacionada con la función del espermatozoide, por lo que los espermatozoides intactos son capaces de adaptarse en y soportar estos desafíos osmóticos ya que son capaces de regular los cambios de volumen por el ajuste de la concentración de ion intracelular (Jeyendran *et al.*, 1984; Petrunkina *et al.*, 2004). Al realizar la prueba HOST, los espermatozoides están expuestos a soluciones hiposmóticas. En estas condiciones, los espermatozoides se hinchan debido a la entrada de agua, hasta que se alcanza el equilibrio, esto debido a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Rodríguez-Gil *et al.*, 1994; Karger, 2014). En condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hiposmótica es un indicador más preciso que las coloraciones supravitales (Karger, 2014).

Tinciones fluorescentes para determinar viabilidad. Estas técnicas son en la actualidad ampliamente utilizadas a pesar de requerir un equipamiento sofisticado, ya que a pesar de requerir de un microscopio de fluorescencia esto no representa una limitante para la utilización de estas tinciones. Además, en las últimas décadas el uso de tecnologías de fluorescencia ha crecido junto con una amplia gama de fluorocromos (Petrunkina y Harrison, 2013).

Se han descrito una gran variedad de fluorocromos para evaluar la integridad de la membrana plasmática tales como el diacetato de carboxifluoresceína (Cardozo *et al.*, 2006), Hoechst 33258, Ioduro de Propidio (IP), homodímero de etidio (Bonet *et al.*, 2006; Martínez-Pastor *et al.*, 2010), Yo-Pro 1 (Peña *et al.*, 2005), 7-amino-actinomicina D (7-

AAD) (Petrunkina y Harrison, 2013). Sin embargo, el método más extendido hoy día es la combinación de SYBR-14 con yoduro de propidio (Garner y Johnson, 1995; Yániz *et al.*, 2013). Estas sondas tienen afinidad por el ADN, lo que asegura que solo se tiñen los espermatozoides o alguna otra célula presente, pero no componentes del diluyente o el plasma seminal (Bonet *et al.*, 2006). Estas sondas presentan diferente capacidad para penetrar la membrana espermática.

SYBR14 en combinación con yoduro de propidio (SYBR14/PI). La integridad de la membrana plasmática es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina y su determinación es útil para predecir *in vitro* la capacidad fecundante del espermatozoide (Rijsselaere *et al.*, 2005a). Diferentes tinciones son utilizadas en el análisis seminal de caninos para evaluar las funciones celulares del espermatozoide, tanto estructural como bioquímicas (Kim *et al.*, 2010a). Las tinciones específicas de fluorocromos proveen información cuantitativa, relativa a la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática, que discrimina entre un espermatozoide funcional de otro no-funcional, aumentando así la precisión de la estimación de la muestra. El SYBR-14 es un colorante de membrana acilado, no fluorescente, permeable tanto en membranas intactas como membranas dañadas de los espermatozoides (Medrano, 1998), siendo desacilado por las esterasas intracelulares, convirtiéndose en un fluoróforo verde que es retenido intracelularmente por las membranas plasmáticas intactas (Silva y Gadella 2006; Peña *et al.*, 1999).

Una vez que ocurre la muerte de la célula, ésta pierde la capacidad para resistir el influjo de tinción fluorescente roja del yoduro de propidio (PI), reemplazando de esta manera al SYBR-14 (Garner y Johnson, 1995). Los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta exhibirán fluorescencia verde (SYBR14+), mientras que los espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) se teñirán rojos por el PI (Garner y Johnson, 1995). De esta manera, siempre los espermatozoides se unirán a una de las dos sondas de unión al ADN (PI o SYBR-14) permitiendo predecir su condición de viabilidad por medio de su emisión fluorescente (Nagy *et al.*, 2003). La combinación de SYBR-14 y PI se ha utilizado para la determinación de las proporciones de espermatozoides vivos y muertos en varias especies (Johnson *et al.*, 2000; Silva y Gadella, 2006; Yániz *et al.*, 2013).

2. 18 Evaluación de la funcionalidad del acrosoma

La integridad estructural del acrosoma es un requisito indispensable para que el espermatozoide sea capaz de unirse de forma efectiva al ovocito y se lleve a cabo la fecundación (Yanagimachi, 2015). La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis que involucra múltiples sitios de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, con la subsecuente vesiculación y liberación de enzimas acrosomales requeridas para la fertilización (Sukardi *et al.*, 1997). Se dispone de una amplia batería de técnicas para detectar el daño a nivel acrosomal como son las que se han descrito anteriormente para la valoración morfológica de las células espermáticas: la observación al microscopio electrónico (Yanagimachi, 2015), la microscopía de contraste de fases (Woelders *et al.* 1996), y la microscopía de contraste diferencial de interferencia (Peláez, 2003).

En el caso de las tinciones convencionales, la asociación entre un marcador fluorescente de integridad de membrana y una lectina indicadora de integridad acrosomal es una práctica común, que permite evaluar de forma conjunta estos dos parámetros espermáticos (Graham, 2001). Hay dos clases de pruebas fluorescentes para la determinación del estado acrosomal; las que detectan material asociado al acrosoma (intracelular) y por lo tanto requieren que la célula sea permeabilizada antes de realizar la tinción, y las que pueden ser usadas en células vivas no permeabilizadas. En la primera categoría se encuentran las lectinas y anticuerpos para los antígenos intracelulares acrosomales; en la segunda categoría se encuentra la clortetraciclina y los anticuerpos para los antígenos expuestos en el exterior de la célula (Cross y Meizel, 1989). La integridad del acrosoma se determina comúnmente con lectinas conjugadas fluorescentes, estas lectinas conjugadas se unen a carbohidratos específicos de las glicoproteínas que se encuentran localizados exclusivamente en el acrosoma. Dependiendo de las especies de mamíferos, los conjugados de lectinas más comúnmente usadas son *Pisum sativum* (obtenida del chícharo verde; PSA) o *Arachis hypogaea* (obtenida del cacahuate, PNA), aunque para el espermatozoide humano puede ser usada la Conavalina A (Con A) (Silva y Gadella, 2006). La aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), es una lectina que se une a los glucoconjugados de la matriz acrosomal, esta lectina tiene afinidad por la terminación α -D-

glucosil y α -D-manosil residuales de glicoproteínas, y se une específicamente al azúcar α -manósido de la matriz acrosomal (Bucci *et al.*, 2014).

Para espermatozoides de porcino, equino y canino la PNA fue específica para la membrana acrosomal externa, mientras que PSA se une a las glicoproteínas de la matriz acrosomal (Graham, 2001). La determinación del estado acrosomal puede ser realizada en espermatozoides vivos, la ausencia de fluorescencia es indicativa de un acrosoma intacto y la fluorescencia es indicativa de daño o reacción acrosomal; esta técnica es comúnmente usada en citometría de flujo. Cuando la determinación se lleva a cabo en espermatozoides fijados y permeabilizados, la fluorescencia completa del acrosoma nos indica que esta estructura está intacta, mientras que los acrosomas con baja fluorescencia o una banda de fluorescencia ecuatorial muestra daño al acrosoma o reacción acrosomal (Silva y Gadella, 2006).

2. 19 Evaluación del estado de capacitación

Para poder llevar a cabo la fecundación el espermatozoide eyaculado debe sufrir una serie de transformaciones necesarias para alcanzar la capacidad de unirse a la ZP del ovocito de forma efectiva (Harkema *et al.*, 1998). Este proceso se denomina capacitación, en él ocurre la modificación de la arquitectura de la membrana espermática, mediante la promoción de desórdenes lipídicos (Rathi *et al.*, 2001; Gadella y Harrison, 2002). Además, los espermatozoides adquieren un patrón de movimiento hiperactivado caracterizado por amplios batidos flagelares y escasa progresividad (Yanagimachi, 2015; Mortimer, 1997). Estos fenómenos preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal, indispensable para la unión al ovocito; sin embargo, también acorta drásticamente la vida útil del espermatozoide (Watson, 1995). En el proceso de congelación-descongelación se observan una serie de cambios similares a los que se producen en las células capacitadas, reduciéndose drásticamente su longevidad (Watson, 1995).

Las técnicas utilizadas en la determinación del estado de capacitación se basan en la identificación de las alteraciones asociadas al mismo; así, la técnica más ampliamente aplicada se basa en el uso del antibiótico clortetraciclina (CTC), éste se liga con el Ca^{2+} y el complejo formado se une a zonas hidrófobas, como la membrana produciéndose un aumento de la fluorescencia de la CTC (Gillan *et al.*, 2005).

En función del estado del espermatozoide se distinguen tres patrones: 1) F, presenta fluorescencia uniforme en toda la cabeza, identifica a los espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto; 2) B, presenta fluorescencia disminuida en la parte posterior de la cabeza, identifica a los espermatozoides capacitados con el acrosoma íntegro; 3) AR, presenta fluorescencia disminuida en toda el área acrosomal, el segmento ecuatorial es visible, identifica a los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal (Gillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006).

2. 20 Evaluación de la fluidez de la membrana

La merocianina 540 es una sonda fluorescente hidrófoba útil para el embalaje de lípidos, ya que se une preferentemente a membranas con lípidos altamente desordenados (Williamson *et al.*, 1983). Es también sensible a los cambios inducidos por el calor en la organización de los lípidos de membrana, permitiendo así el seguimiento de alteraciones en la arquitectura de los lípidos de las células (Harrison y Miller, 2000). Se considera que la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides de perro así como la detección temprana de los cambios relacionados a la capacitación son indicadores útiles del potencial fertilizante del semen fresco o conservado. La tinción de los espermatozoides con merocianina 540 indica estados tempranos de capacitación; a medida que se incrementa la fluidez de la membrana, una mayor cantidad de merocianina se intercala entre los lípidos que la conforman, de esta manera actúa como un marcador de la desestabilización de la membrana (Steckler *et al.*, 2015). La merocianina 540 puede detectar los cambios ocasionados por el bicarbonato en la organización y distribución de los lípidos en la membrana plasmática de los espermatozoides; estos cambios se consideran indicios tempranos del proceso de capacitación. Harrison y Miller (2000) observaron en espermatozoides de cerdo activados con bicarbonato que, después de 9 minutos de incubación, el 35% de los espermatozoides mostraron fijación alta de merocianina; este porcentaje se incrementó a 52% después de 25 minutos de incubación.

2. 21 Enfriado pre-congelación a temperaturas bajo cero grados

El enfriado a temperaturas bajo cero grados, cercanas al punto de congelación de los espermatozoides en diluyentes para congelación, tiene como finalidad dar a la célula el tiempo suficiente para reacomodar los cambios en su estructura ocasionados por la transición de fase de los lípidos que conforman la membrana plasmática, sin que la célula pierda su permeabilidad selectiva. Esta aproximación experimental se ha empleado en varias especies, los resultados han sido contrastantes. El enfriado pre-congelación en el rango de -2 a -5°C ha mejorado la criosupervivencia de los espermatozoides de caprino (Medrano *et al.*, 2001), ovino (Ríos, 2005) y porcino (Garzon-Perez, 2010). En contraste, el enfriado a -3°C no produjo ningún efecto sobre la criosupervivencia de espermatozoides de equino (Contreras-Mendez y Medrano, 2015). Las variaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de las distintas especies animales (Parks y Lynch, 1992) podrían explicar estos resultados.

3. HIPÓTESIS

Al realizar el enfriado lento precongelación del semen de perro, a temperaturas cercanas a la formación del hielo (-5°C), se lograrán cambios favorables sobre la criosupervivencia de los espermatozoides y la fluidez de la membrana plasmática.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del enfriado lento precongelación, a temperaturas cercanas a la formación de hielo (-5°C), sobre la criosupervivencia de los espermatozoides: motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma, estado de capacitación, y la fluidez de la membrana plasmática.

Particulares

1. Determinar el punto de congelación del semen de perro diluido en diluyente Tris-yema de huevo (EYT con 5% de glicerol).
2. Comparar el efecto de 4 temperaturas de enfriado sobre la viabilidad espermática e integridad de la membrana plasmática en semen de perro recalentado a 37°C .
3. Comparar el efecto de 3 distintas temperaturas blanco de enfriado precongelación sobre la criosupervivencia espermática de semen de perro.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio 2 de Reproducción Animal de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en el Km. 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Obtención y transporte del semen

El semen de perro se obtuvo de 7 sementales de las razas Pastor Alemán y Pastor Belga, de entre 2 y 6 años de edad, pertenecientes al Centro de Producción Canina del Ejército y fuerza Aérea de México, uno de los más grandes y modernos de América Latina, reconocido como el mejor centro de producción gracias a sus instalaciones, cuidado y control de calidad en la obtención de canes de pureza racial y de trabajo, con óptimas capacidades físicas, psicológicas y genéticas. Ubicado en el Campo Militar 37-C San Miguel de los Jagüeyes, Huehuetoca, Estado de México.

La colección se realizó una vez por semana (2 abril 2014 – 5 febrero 2015) mediante la técnica de “manipulación digital”, posterior a ésta el semen se diluyó (1:1 v/v) con un diluyente a base de TRIS- ácido cítrico- glucosa, al que se le adicionó penicilina-estreptomicina; para su transporte (30 minutos aproximadamente) se utilizó un contenedor aislado (termo) con cama de gel a una temperatura de entre 30 y 32°C para evitar cambios en la temperatura durante el traslado de la muestra, la temperatura fue monitorizada con un termómetro digital.

Evaluación de semen

Las muestras de semen al llegar al laboratorio se sometían a un periodo de reposo para que alcanzaran la temperatura de cuarto (aproximadamente 23°C), pasado este periodo se procedía a la evaluación como se describe a continuación.

Evaluación macroscópica

Se realizó considerando las siguientes variables:

- a) Volumen
- b) Color
- c) Consistencia (cremoso, lechoso, acuoso)
- d) Apariencia (presencia de partículas extrañas)

Evaluación microscópica

i) Motilidad masal

Para realizar esta prueba se colocó una gota de semen en el centro de un portaobjetos previamente atemperado a 37°C, en una platina térmica, y se observó en el microscopio la orilla de la gota con el objetivo de 10x.

Para su interpretación se utilizó la siguiente tabla de valores:

Valor	Características
3	Formación de ondas que se forman rápidamente y son vigorosas
2	Formación de ondas, pero con poca vitalidad
1	Espermatozoides móviles, con la característica de no formar ondas
0	Ondas inexistentes, espermatozoides inmóviles

(Modificado de González-Urdiales *et. al*, 2006).

Concentración espermática

Esta prueba se realizó para determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen. Se colocaron en un tubo de ensaye 1990 µL de solución salina formolada al 3% (v/v) y se adicionaron 10 µL del semen diluido (1:1 v/v) para finalmente tener una dilución de 1:200; se mezcló perfectamente y posteriormente se procedió a llenar la cámara de Neubauer, se dejó reposar por 5 minutos en una superficie plana, esto con la finalidad de que se sedimentaran las células y facilitar así la observación en el microscopio óptico con aumento de 40x.

Se realizó el conteo de la siguiente manera:

- Se localiza la cuadrícula central que está dividida en 25 cuadros, que a su vez están subdivididos en 16 cuadros cada uno.
- Se realiza el conteo de los espermatozoides (cabezas) contenidos en 5 de los 25 cuadros; los cuadros elegidos fueron las cuatro esquinas y el central.
- Los espermatozoides que tocan alguna de las tres líneas de la izquierda y de arriba de cada cuadro elegido se cuentan, los que tocan alguna de las tres líneas de abajo y derecha no se contabilizan.

Se contaron los espermatozoides de ambos lados de la cámara, posteriormente se calculó el promedio de ambas cuadrículas, este valor se multiplicó por 10 millones y así se obtuvo la concentración de espermatozoides por ml.

Dilución

Posterior a la determinación de la concentración espermática el semen se centrifugó para separar las células del líquido seminal y del medio de transporte; para esto se colocó el semen diluido (1:1 v/v) en tubos para centrifuga en volúmenes iguales y se centrifugó a 750 gravedades durante 5 minutos.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se desechó, cuidando de no tocar el botón del fondo para mantenerlo intacto.

Posteriormente este botón se resuspendió con el diluyente Tris- Yema de huevo (EYT) con 3% de glicerol, previamente descongelado a 37°C en baño maría, hasta un volumen de 2 ml. Antes de adicionar el diluyente se dejó atemperar a 23°C. Enseguida se mezcló perfectamente y se hizo otro conteo espermático para ajustar la concentración a 400×10^6 espermatozoides por ml.

Una vez ajustada la concentración, se tomaron 500 μ L para realizar diversas pruebas:

- i) Motilidad progresiva
- ii) Vivos y muertos con la tinción de eosina-nigrosina
- iii) Viabilidad con un aparato (Nucleo Counter) que emplea yoduro de propidio
- iv) Integridad de la membrana plasmática con tinciones fluorescentes – SYBR14/PI
- v) Funcionalidad de la membrana plasmática mediante la prueba de la hinchazón hiposmótica (HOST)
- vi) Morfoanomalías de los espermatozoides empleando el frotis de eosina/nigrosina
- vii) Integridad del acrosoma empleando lectinas fluorescentes – PSA/FITC
- viii) Integridad del acrosoma empleando microscopía de contraste de fases
- ix) Estado de capacitación mediante la prueba de la clortetraciclina (CTC)

El resto de los espermatozoides diluidos con EYT (3% de glicerol) se sometió al proceso de enfriado.

i) Motilidad progresiva

Se tomaron 200 μ l del semen con diluyente EYT (3% de glicerol) y se mezclaron con 1.0 mL de solución salina fosfatada (PBS); esta mezcla se dejó durante 10 minutos en el baño maría como un periodo de equilibrio, pasado este tiempo se colocó una gota de esta mezcla en un portaobjetos, se colocó encima un cubreobjetos, ambos previamente calentados a 37°C, y se observó con el objetivo 10x. Este movimiento se evaluó

estimando, visualmente, la proporción de espermatozoides con movimiento progresivo y rectilíneo asignándoles valores del 0 - 100%.

ii) Viabilidad con tinción de Eosina/Nigrosina

En un porta objetos calentado a 37°C en platina térmica se colocó una gota de los espermatozoides diluidos en PBS y a un lado una gota de eosina-nigrosina a 37°C, se mezclaron ambas gotas y con ayuda de otro porta objetos se hizo el frotis; se secó bajo un ventilador y se observó al microscopio con el objetivo de 100x, se contaron 200 células. Los espermatozoides vivos son aquellos que no se tiñen, se observan blancos; los muertos si se tiñen porque tienen la membrana plasmática dañada y la tinción penetra, se observan de color rosa (Barth y Oko, 1989).

iii) Integridad de la membrana plasmática con un aparato (Nucleo Counter) que emplea yoduro de propidio.

El aparato Nucleo Counter realizaba la prueba en 2 pasos(); el primero para determinar el número total de células espermáticas, para ello se colocaba una muestra de semen y se añadía una solución caustica que rompe las membranas Plasmáticas, lo que le permitía al aparato contar solo los núcleos, mientras que en el segundo paso, la muestra de semen se mezclaba con PBS atemperado a 37°C en el baño maría, para evitar un choque de frío, en los espermatozoides no viables el yoduro de propidio penetraba al interior de la célula y así el aparato los contabilizaba. Finalmente el programa expresaba el resultado basándose entre el primer resultado que era el número total de células espermáticas (núcleos), menos la cantidad de espermatozoides no viables (muertos) para así determinar por diferencia el total de espermatozoides viables (vivos) de manera cuantitativa.

iv) Integridad de la membrana plasmática con tinciones fluorescentes – SYBR14/PI

La determinación de la viabilidad del semen fresco se realizó utilizando las tinciones fluorescentes SYBR14/Ioduro de Propidio (PI) (Molecular Probes, EU). Se tomaron 50 µL de la muestra de semen y se le adicionaron 5 µL de SYBR14 (diluido a 100 nMol en EYT 3% glicerol), enseguida se le agregaron 5 µL de Ioduro de Propidio (12 µMol) y 5 µL de glutaraldehído al 0.4%, esto último con la finalidad de inmovilizar a los espermatozoides y poder llevar a cabo el conteo en el microscopio de fluorescencia. Se realizó el conteo de

200 células (verdes – vivos, rojos – muertos) con el objetivo 100x y el resultado se expresó en porcentaje (Pursel y Johnson, 1995).

v) Funcionalidad de la membrana plasmática mediante la prueba de la hinchazón hiposmótica (HOST)

En un tubo tipo eppendorf se colocaron 100 μ L de una solución hiposmótica (150mOsm/kg) a 37°C, enseguida se le agregaron 100 μ L de la mezcla de espermatozoides en PBS, se mezclaron y se mantuvieron en baño maría por 30 minutos; pasado este tiempo se fijaron con una gota de solución de glutaraldehído al 0.4 %, se colocó una gota en un portaobjetos y encima un cubreobjetos ambos previamente calentados y se hizo la evaluación contando 200 células en el microscopio óptico con el aumento de 100x. Los espermatozoides cuya membrana plasmática es funcional son aquellos que presentan hinchazón en la cola, es decir enroscamiento de la parte terminal; los espermatozoides cuya membrana plasmática no es funcional no presentan ningún enroscamiento, la cola se ve recta. El resultado se expresa en porcentaje (Goericke-Pesch y Failing, 2013).

vi) Morfoanomalías de los espermatozoides empleando el frotis de eosina/nigrosina

Para esta prueba se utilizó un frotis teñido con eosina/nigrosina (el mismo que se utilizó para distinguir vivos y muertos). Los espermatozoides se clasificaron en: 1) normales, 2) anormalidades primarias, como por ejemplo macrocéfalos, microcéfalos, cola doble, etc., 3) anormalidades secundarias, como gota citoplasmática, colas ganchudas, colas en ángulo, etc. Se contabilizaron 200 células y se expresó el resultado en porcentaje (Barth y Oko, 1989).

vii) Integridad del acrosoma empleando lectinas fluorescentes – PSA/FITC

Para evaluar la integridad del acrosoma se utilizó la aglutinina del chícharo (*Pisum sativum* - PSA), ligada al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). En primer lugar se prepararon frotis de la mezcla de espermatozoides en PBS que se secaron al aire, enseguida se sumergieron durante una hora en alcohol de 96° para su fijación, una vez transcurrido este tiempo se secaron al aire para su posterior tinción.

Se agregaron 50 μL de la lectina (6.5 mM) sobre cada frotis, se distribuyó de manera uniforme y se mantuvieron en una cámara húmeda y protegidos de la oscuridad durante 10 minutos, pasado este tiempo los frotis se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se les agregó una gota de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1) para retardar la pérdida de fluorescencia. Enseguida, se colocó un cubreobjetos encima y con la ayuda de papel absorbente se ejerció presión suave para eliminar el exceso; se observó al microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x y se contabilizaron 200 células de cada frotis. Los acrosomas que se veían bien definidos y lisos se consideraron como acrosoma intacto, mientras que los que presentaban el acrosoma irregular se consideraron como acrosoma dañado, el resultado se expresó en porcentaje (Medrano, 1998).

viii) Integridad del acrosoma empleando microscopía de contraste de fases

Se mezclaron 100 μL de los espermatozoides en PBS con 100 μL de glutaraldehído al 0.4%, posteriormente se colocó una gota de esta mezcla en un portaobjetos y encima un cubreobjetos; se observó en un microscopio equipado con contraste de fases con el objetivo de 100x. Se contabilizaron 200 células considerando que las que contaban con un borde apical liso, bien definido se consideran células con acrosoma intacto, mientras que las que presentaban el borde apical rugoso, craterizado, incompleto o ausente, se consideraban células con acrosoma dañado, el resultado se expresó en porcentaje (Barth y Oko, 1989).


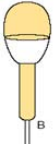

ix) Estado de capacitación mediante la prueba de la clortetraciclina (CTC)

Previo a la realización de esta prueba se preparó una solución amortiguadora de CTC (Tris 20 mM, NaCl 130 mM,.) que se conservó en refrigeración hasta ser utilizada. Poco antes de realizar la prueba del estado de capacitación se preparó la solución de CTC: CTC-HCl (805 mM), Cisteína (5mM) en 5ml de solución amortiguadora de CTC, el pH se ajustó a 7.8.

Se tomaron 100 μL de solución CTC y se mezclaron con 100 μL de los espermatozoides en PBS durante 30 segundos, posteriormente se adicionaron 22 μL de solución fijadora de glutaraldehído al 0.2% (v/v). Se preparó la laminilla con 10 μL de la mezcla anterior y una gota de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1) y se colocó un cubreobjetos. Para retirar el exceso de líquido se ejerció presión suave con papel absorbente;

inmediatamente después las laminillas fueron observadas al microscopio de fluorescencia, se contabilizaron 200 células, utilizando para su observación el objetivo 100x. Los espermatozoides se clasificaron como: 1) patrón F, 2) patrón B, y 3) patrón AR, las características de cada patrón se describen en el siguiente cuadro (Hewitt y England, 1998)

Cuadro 1. Características de cada patrón de clortetraciclina.

Patrón	Descripción	Determinación
F	Espermatozoide que presenta Fluorescencia brillante y uniforme de la cabeza	 No capacitado y acrosoma intacto
B	Fluorescencia tenue en la región post-acrosómica y brillante en la región acrosomal	 Capacitado y con acrosoma intacto
AR	Fluorescencia tenue en toda la cabeza, excepto en el segmento ecuatorial, en el que existe una banda fluorescente brillante	 Capacitado y con reacción acrosomal

x) Determinación de la fluidez de la membrana plasmática mediante la prueba de Merocianina (MC540).

Para la prueba se preparó una solución stock de Merocianina en DMSO (5mM), se colocó en un frasco color ambar y se protegió de la luz hasta su utilización.

Antes de cada prueba previamente se preparó una solución de trabajo de Merocianina MC540, para preparar 500 μ L de 40 mM, en un tubo eppendof se colocaron 495 μ L de PBS más 5 μ L de la solución stock Merocianina en DMSO (5mM).

Se tomaron 140 μ L de los espermatozoides en PBS y se mezclaron con 10 μ L de solución trabajo de Merocianina, se dejó reposar durante 1 minuto, posteriormente se adicionaron 22 μ L de solución fijadora de glutaraldehído al 0.4 %, se mezcló y se colocó

una gota en un cubreobjetos previamente calentado en la platina térmica, se les agregó una gota de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1) para retardar la pérdida de fluorescencia. Enseguida, se colocó un cubreobjetos encima y con la ayuda de papel absorbente se ejerció presión suave para eliminar el exceso; se observó al microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x y se contabilizaron 200 células de cada frotis.

Refrigeración de los espermatozoides diluidos con TRIS-Yema de huevo (EYT)

1. El tubo con los espermatozoides diluidos con EYT (3% de glicerol) a una concentración de 400×10^6 espermatozoides/ mL, se colocó dentro de un recipiente de cristal (500 mL aprox.) que contenía agua salina al 10% (p/v) a temperatura de cuarto, la tapa de dicho recipiente tenía cuatro orificios para colocar tubos de centrifuga de 15 mL.
2. Simultáneamente se colocó en otro tubo el diluyente EYT con 7% de glicerol, para que se enfriara de igual manera que los espermatozoides diluidos.
3. En otro tubo se colocó EYT con glicerol (5% glicerol) que se empleó para monitorizar la temperatura, en este tubo se colocó la sonda de un termómetro digital (**VWR**).
4. Un cuarto tubo contenía EYT con glicerol (5%) que se utilizó para llenar algunas pajillas que se utilizaron como monitor.
4. Cuando se alcanzó la temperatura de 7°C se agregó la fracción de EYT con 7% de glicerol a los espermatozoides diluidos en EYT con 3% de glicerol; esto se hizo en tres momentos, cada uno de ellos con un periodo de equilibrio de 10 minutos, y se mezcló perfectamente. La concentración final fue de 200×10^6 células/mL con 5% de glicerol.
5. Finalmente se envasaron los espermatozoides en pajillas de 0.5 mL, previamente enfriadas e identificadas.
6. Se llenaron algunas pajillas monitor, que dentro de la etapa de enfriado se utilizaron para saber la temperatura exacta en el interior de la pajilla ya que se dejaban abiertas para así poder introducir la sonda de un termómetro digital (**VWR**).
7. Las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico y se colocaron en un recipiente enfriador de 16 huecos (una pajilla por espacio, con la característica de no tener contacto con el agua salina al 10%) y se dejaron enfriar hasta 5°C (ver anexo X).

6. Diseño experimental

El trabajo experimental se dividió en 3 etapas:

Primera etapa: Determinación del punto de congelación del semen de perro diluido en EYT con 5% de glicerol

En esta etapa se realizó el envasado de las pajillas, con la característica de que no se llenaron en su totalidad, dejando un espacio de 4 cm, con el fin de evitar que el líquido se derramara de las pajillas al momento de introducir la sonda de un termómetro digital (VWR).

El protocolo para determinar el punto de congelación fue el siguiente:

1. En una caja de unicel con una capacidad de 6 litros se vertió nitrógeno líquido quedando una cama de 8 cm de altura.
2. En la caja de unicel se colocaron unas varillas de alambre para sostener las pajillas sobre los vapores de nitrógeno, a las varillas se les colocaron separaciones para evitar que las pajillas quedaran muy juntas entre sí; estas varillas mantienen las pajillas a una distancia de 4 cm sobre el nitrógeno líquido. Bajo estas condiciones, los vapores de nitrógeno están a una temperatura de -100°C .
3. Las pajillas se identificaron con un número y a cada una se les introdujo la sonda del termómetro digital ya mencionado. De esta manera se registraron y almacenaron los datos en un programa de computadora propio del termómetro; se registró la temperatura de inicio, la temperatura de congelación de los espermatozoides diluidos, el salto que da la temperatura cuando se libera el calor latente de cristalización y el momento cuando éste se disipa.
4. En este procedimiento se realizaron 5 repeticiones utilizando pajillas del semen de diferentes machos ($n=47$ pajillas). Posteriormente, se calculó la media de las 47 pajillas congeladas, determinando así el punto de congelación para el semen de perro diluido en EYT con 5 % de glicerol.

Segunda etapa: Enfriado de semen de perro diluido en EYT con 5% glicerol, a diferentes temperaturas blanco.

En esta etapa se procedió a enfriar los espermatozoides diluidos en EYT (5% glicerol) a las siguientes temperaturas blanco:

- i) +5°C (temperatura del refrigerador, tratamiento testigo),
- ii) -3°C,
- iii) -5°C,
- iv) -7°C,
- v) -9°C.

Una vez que las pajillas alcanzaron su respectiva temperatura blanco se llevaron al baño maría (37°C), se recalentaron durante 30 segundos y posteriormente su contenido se depositó en tubos de vidrio vacíos.

Se utilizaron 2 pajillas para cada tratamiento, otras 3 se emplearon para introducir la sonda del termómetro. Las pajillas se colocaron en el recipiente enfriador de 16 huecos que ya se encontraba en el refrigerador. Se utilizaron 6 eyaculados de diferentes machos.

Procedimiento:

1. Se sacaron las primeras 2 pajillas del refrigerador (+5°C), se registró la hora y la temperatura, se llevaron al baño maría en una caja de unigel para evitar cambios en la temperatura de las pajillas; se colocó el contenido de las 2 pajillas en un tubo de ensaye vacío que se encontraba sumergido en el baño maría para hacer un pool.
2. El pool se dejó reposar durante 10 minutos, enseguida se hizo una dilución 1+3 (100 µL de semen + 300 µL de PBS a 37°C). Inmediatamente después se evaluó la motilidad progresiva, se hizo la prueba de HOST y la integridad acrosomal (contraste de fases).
3. Para los siguientes tratamientos de enfriado (-3, -5,-7 y -9°C) se utilizó un recipiente aislado (termo) que contenía hielo salino al 10% a una temperatura de -12°C, en el que se introdujo el recipiente enfriador de 16 huecos con las pajillas enfriadas, el hielo salino tenía una consistencia de agua nieve para facilitar la introducción del recipiente enfriador.
4. Cuando se sumergió el aparato enfriador de 16 huecos con las pajillas en el hielo salino, se registró la hora y temperatura de las pajillas y se monitorizó el descenso hasta las temperaturas blanco; una vez alcanzada cada una de las temperaturas esperadas se retiraron las 2 pajillas correspondientes y se la evaluación de las tres variables antes mencionadas.

Tercera etapa: congelación y descongelación de semen de perro diluido en EYT con 5% de glicerol con tres diferentes temperaturas de enfriado.

Con base en la etapa anterior, en esta se realizó el enfriado pre-congelación a las siguientes temperaturas blanco:

- i) +5°C (testigo),
- ii) -3°C,
- iii) -5°C.

El semen utilizado en esta etapa se sometió al mismo procedimiento de recolección, evaluación, envasado y enfriado lento hasta +5°C que se describió anteriormente.

El número de pajillas que se congeló fue variable por eyaculado, se buscó que se tuvieran por lo menos 3 pajillas para cada tratamiento, y una pajilla más para utilizarla como monitor donde se introdujo la sonda del termómetro digital para observar el descenso de la temperatura. Cada pajilla se identificó con la fecha de congelación y el nombre del macho y a cada tratamiento se le asignó un patrón de color para su fácil reconocimiento al momento de ser manipuladas ya fuera para su congelación, almacenamiento o descongelación (tabla 1).

Tratamiento	Temperatura	Patrón
1	+5°C	Color rojo
2	-3°C	Color negro
3	-5°C	Color azul

Una vez selladas, se colocaron en un recipiente enfriador que se diseñó y construyó específicamente para este trabajo experimental, el que cuenta con 16 huecos, donde cada pajilla era introducida de manera individual y con la característica que no se mojaba con el agua salina al 10%, lo que facilitaba su manejo y evitaba que se tuvieran que secar al momento de sacarlas del recipiente (imagen en el anexo); las pajillas se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente.

Para el procedimiento de congelación de las pajillas, se preparó el contenedor aislado (termo) con el hielo salino al 10% a -12°C y una caja de unicel la cual tenía 17cm de profundidad en la que se colocó una cama de nitrógeno líquido de 8 cm, con unas varillas que tenían una separación de 4 cm entre el nitrógeno líquido y éstas; donde se colocaron las pajillas al momento de exponerlas a los vapores de nitrógeno.

Procedimiento para la congelación:

1. Se sacaron del refrigerador las pajillas del tratamiento 1 (+5°C), éstas se manejaban con ayuda de unas pinzas, tomándolas de un extremo e inmediatamente se colocaron en las varillas que se encontraban colocadas en la caja de unicel que contenía el nitrógeno, la caja se tapó y las pajillas estuvieron expuestas a los vapores de nitrógeno (-100°C) durante 15 minutos.
2. Una vez transcurrido ese tiempo se sumergieron rápidamente en el nitrógeno líquido (-196°C) con la ayuda de unas pinzas previamente enfriadas a la temperatura del nitrógeno, esto se logró sumergiéndolas en el nitrógeno 1 minuto antes de que transcurrieran los 15 minutos evitando con ello un choque térmico al tomar las pajillas.
3. En el caso de los tratamientos 2 (-3°C) y 3 (-5°C), se sacó el recipiente enfriador del refrigerador y se sumergió inmediatamente en el hielo salino a -12°C; una vez alcanzada la temperatura blanco correspondiente, las pajillas se expusieron a los vapores de nitrógeno durante 15 minutos.
4. Se sumergió en el nitrógeno un gobelete ancho que en su interior contiene 5 gobeletes de menor diámetro identificados con números, se fijó a la caja mediante un gancho para evitar que se moviera y se salieran las pajillas.
5. Para su almacenamiento, las pajillas de los diferentes tratamientos se agruparon y se colocaron en los gobeletes; enseguida los gobeletes se colocaron en la canastilla correspondiente del termo de nitrógeno, la cual estaba identificada con un color y un número. Se llevó un registro de la fecha, hora y ubicación de todos los eyaculados dentro del termo para facilitar su identificación al momento de la descongelación.

Procedimiento para la descongelación:

Las pajillas se descongelaron en el mismo orden en que fueron congeladas.

1. Para la descongelación se acercaba el termo de nitrógeno al baño maría; el baño y el material de vidrio se mantuvieron listos a una temperatura de 37°C para hacer las evaluaciones al semen descongelado.
2. Una vez identificadas las pajillas a descongelar, considerando el color, número y la canastilla y gobelete donde se ubicaban, se sacaban 3 pajillas (una por una) de cada tratamiento pasándolas rápidamente al baño maría y dejándolas ahí por 30 segundos.

3. Posterior a este tiempo se sacaron las pajillas del baño maría y se colocaron en papel secándolas suavemente y sin frotar, se cortó el tapón de alcohol polivinílico y el contenido se vació en un tubo de vidrio colocado en el baño maría.

4. Una vez que se descongelaron todas las pajillas, se hizo una dilución 1:5 en PBS (100µl de semen + 400µl de PBS) y se le dejó durante 10 minutos como periodo de equilibrio.

5. Mientras transcurría este tiempo se evaluó la motilidad masal de cada pajilla, registrando el valor asignado después de la observación al microscopio óptico con el objetivo 10x.

6. Después de los 10 minutos de equilibrio se realizaron las siguientes pruebas:

a) Motilidad progresiva

b) Vivos y muertos con la tinción de eosina-nigrosina

c) Prueba de hinchamiento hiposmótico (HOST)

d) Determinación de la integridad acrosomal con lectinas fluorescentes

e) Determinación de viabilidad con las tinciones fluorescentes SYBR14/PI

f) Determinación del estado de capacitación mediante la prueba Clortetraciclina (CTC)

g) Determinación de la fluidez de la membrana plasmática mediante la prueba de Merocianina (MC540).

7. Simultáneamente se realizó la prueba de viabilidad con el aparato Nucleo Counter, en esta etapa se hizo un pool de las tres pajillas de cada tratamiento, y se corrió la prueba registrando los resultados para cada caso.

Se llevó registro de cada pajilla descongelada por fecha, macho y tratamiento, para su posterior análisis.

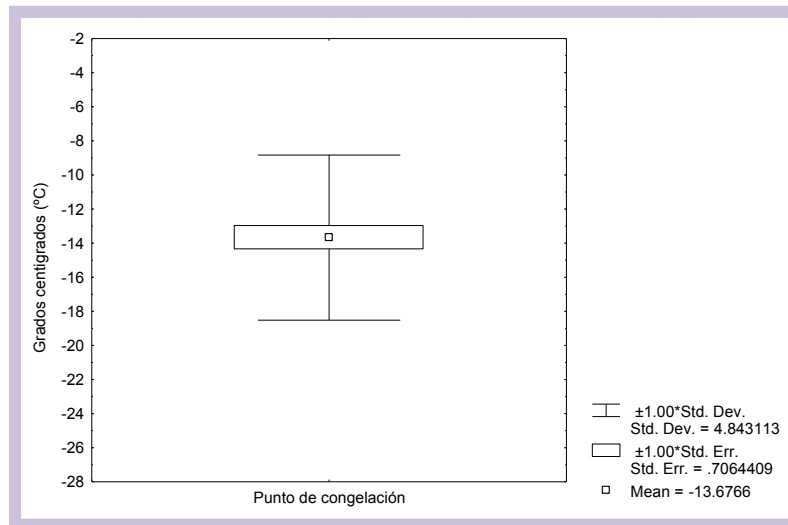
Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las tres etapas del trabajo experimental fueron analizados mediante el programa estadístico Stats Plus versión 5.0. Los datos de la primera etapa (punto de congelación) se analizaron mediante estadística descriptiva. Los datos de la segunda y tercera etapa se analizaron empleando ANOVA para determinar posibles diferencias entre tratamientos y entre machos, el nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$. Los valores de las diferentes variables expresados en porcentaje se transformaron al arcoseno para normalizarlos, previo al ANOVA.

7. RESULTADOS

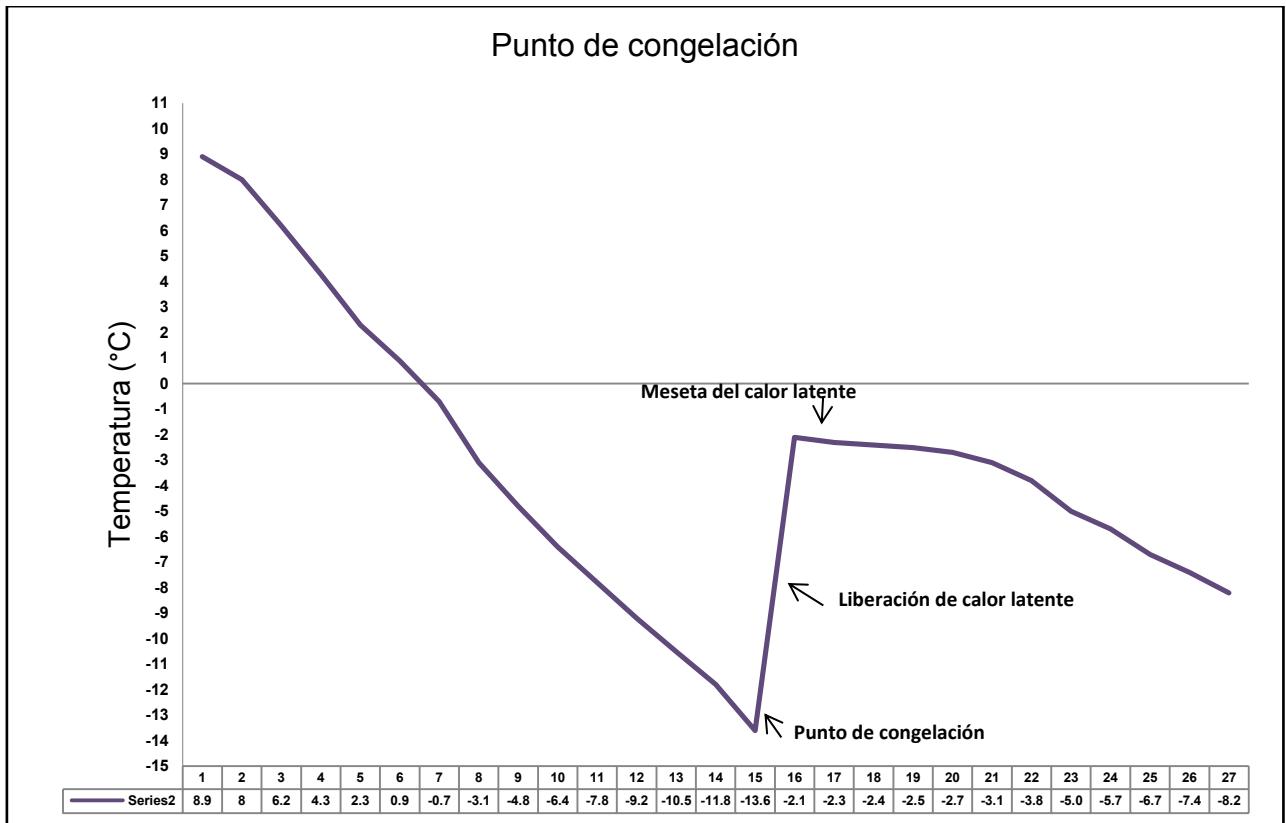
Primera etapa: Determinación del punto de congelación del semen de perro diluido en EYT con 5% de glicerol.

El punto de congelación, de las pajillas expuestas a vapores de nitrógeno líquido (n=47), fue de -13.6 ± 0.71 (media \pm error estándar) (Grafica 1).



Grafica 1. Punto de congelación de semen de perro diluido en un diluyente para congelación con 5% de glicerol.

En la siguiente grafica (Gráfica 2) se muestra el descenso de la temperatura, el punto de congelación, la liberación y la meseta del calor latente de fusión; nótese que después de este último evento vuelve a descender la temperatura en el interior de las pajillas.



Grafica 2. Curva de descenso de temperatura; se señala el punto de congelación del semen de perro diluido con EYT (5% de glicerol y una concentración de 200×10^6 espermatozoides/ml), la liberación y la meseta del calor latente de cristalización (fusión).

Segunda etapa: Enfriado de semen de perro diluido en EYT con 5% de glicerol, a diferentes temperaturas blanco (+5,-3, -5 Y -7°C) sin congelación.

Los resultados obtenidos en esta etapa corresponden a las pruebas de enfriado y recalentado de espermatozoides diluidos en EYT con 5% de glicerol, envasados en pajillas de 0.5 ml las que contenían una concentración espermática de 200×10^6 células/ml.

En el cuadro **R1** se muestran los resultados de las pruebas de motilidad progresiva, HOST y acrosoma intacto con microscopia de contraste de fases; esta evaluación se hizo al recalentado a 37°C. Los resultados obtenidos en las pruebas de enfriado-recalentado

muestran que no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de enfriado.

Cuadro R1. Efecto del enfriado a tres temperaturas blanco y el recalentado a 37°C sobre la motilidad progresiva, funcionalidad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma de espermatozoides de perro

Tratamiento de enfriado	Motilidad Progresiva (%)	HOST (%)	Acrosomas Intactos (%)
+5°C	60.8 ± 9.07	79.2 ± 3.55	89.6 ± 1.30
-3°C	60 ± 9.39	76.1 ± 3.24	88.2 ± 1.32
-5°C	57.5 ± 10.14	76 ± 2.50	88.7 ± 2.42
-7°C	52.5 ± 9.63	75 ± 4.70	89.7 ± 1.87

Los valores son medias ± error estándar. HOST= Prueba del hinchamiento hiposmótico.

Tercera etapa: congelación y descongelación de semen de perro diluido en EYT con 5% de glicerol con tres diferentes temperaturas de enfriado previo a la congelación.

Evaluación del semen fresco

Las muestras de semen que se utilizaron en la etapa de congelado- descongelado fueron evaluadas previamente a este proceso. En relación al porcentaje de espermatozoides normales, anormalidades secundarias, motilidad progresiva, y al porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOST) los valores no presentaron diferencias significativas (Cuadro **R2**).

En relación al volumen, los valores se encontraron en un rango de 3.3 a 8.2 ml; para la concentración espermática el rango fue de 120 a 375 x10⁶ células por ml; para la viabilidad (Eosina-Nigrosina) el rango fue de 72.2 a 86.6%; para la integridad de la membrana plasmática (tinciones fluorescentes SYBR14/PI) el rango fue de 52.8 a 77.7%; para la viabilidad (Nucleo Counter) el rango fue de 60 hasta un 83.3%. En todas estas variables hubo diferencias significativas entre individuos (Cuadro **R2**).

Cuadro R2. Variables del semen fresco de perro empleado en la crioconservación

MACHO	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA ($\times 10^6$ /ml)	ESPERMATOZOIDES NORMALES (%)	ANORMALIDADES PRIMARIAS (%)	ANORMALIDADES SECUNDARIAS (%)	MOTILIDAD PROGRESIVA (%)	VIABILIDAD Eosina-Nigrosina (%)	FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA HOST (%)	INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SYBR14 /PI (%)	VIABILIDAD NUCLEO COUNTER (%)
1 (X)	3.3 ± 0.66a	216.7 ± 28.48ab	68.8 ± 4.91	2.2 ± 1.44 ab	29 ± 4.58	71.7 ± 1.66	72.2 ± 1.36a	77.8 ± 1.85	52.8 ± 5.66a	60 ± 0.57a
2 (X)	3.6 ± 0.60ad	203.3 ± 72.18ab	77.2 ± 5.18	1.16 ± 0.60 ab	21.6 ± 5.78	73.3 ± 3.33	75.8 ± 4.91 ab	77 ± 0.76	71.5 ± 2.84ab	70.3 ± 2.72abc
3 (X)	6.3 ± 0.55abcd	375 ± 53.08a	76.1 ± 2.60	1.9 ± 0.87 ab	21.9 ± 0.91	80 ± 2.58	81 ± 2.10ab	84.5 ± 3.05	70.8 ± 5.40ab	79 ± 2.06bc
4 (X)	8.2 ± 0.73bcd	182 ± 30.72b	67.9 ± 4.12	2.5 ± 0.57 ab	29.6 ± 4.12	81 ± 3.67	81.8 ± 1.21 ab	86.8 ± 1.66	75.6 ± 2.22b	76.8 ± 0.86bc
5 (X)	7.3 ± 0.33cd	215 ± 40.72ab	81.5 ± 2.36	1 ± 1.00 ab	17.5 ± 3.17	86.6 ± 3.33	86.6 ± 1.20b	89.3 ± 1.92	74.7 ± 4.93ab	83.3 ± 2.66c
6 (X)	6.4 ± 0.62d	245.7 ± 21.36ab	82.3 ± 3.48	0.5 ± 0.21 a	17.2 ± 3.57	82.8 ± 1.84	82.7 ± 1.83 ab	82.7 ± 3.13	77.7 ± 2.48a	80 ± 2.39bc
7 (X)	4 ± 0acd	120 ± 15.27b	74 ± 5.39	4.5 ± 0 b	21.5 ± 5.39	71.6 ± 1.66	78 ± 5.50ab	80.2 ± 2.20	67.2 ± 7.04ab	69.3 ± 3.84ab

Los valores representan las medias ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P<0.05). (n)= número de eyaculados.

En relación al porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (microscopia de contraste de fases y lectinas fluorescentes) no hubo diferencias entre machos; en contraste, el porcentaje de espermatozoides no capacitados (Patrón F, rango: 81.2 a 87.5%) y espermatozoides con reacción acrosomal (Patrón AR, rango: 2.2 a 8.3%) fue diferente entre machos (Cuadro R3).

Cuadro R3. Variables del semen fresco de perro empleado en la crioconservación

Macho	Acrosoma Intacto		Estado de capacitación (prueba CTC)		
	Microscopia contraste de fases (%)	Lectinas fluorescentes (%)	F (%)	B (%)	AR (%)
1	91.8 ± 1.85	91.2 ± 1.45	81.2 ± 3.46 <i>ab</i>	11.3 ± 2.08	7.5 ± 1.75 <i>a</i>
2	93.5 ± 1.73	91.6 ± 1.30	86.2 ± 2.72 <i>ab</i>	8.7 ± 1.36	5.3 ± 1.58 <i>ab</i>
3	93.2 ± 0.97	89.9 ± 0.91	85.6 ± 2.14 <i>ab</i>	10.5 ± 1.63	3.8 ± 0.58 <i>ab</i>
4	92.6 ± 0.43	87.0 ± 1.44	87.5 ± 2.06 <i>ab</i>	8.2 ± 1.61	4.3 ± 0.64 <i>ab</i>
5	91.5 ± 0.57	86.5 ± 3.27	81.2 ± 2.42 <i>a</i>	10.5 ± 1.52	8.3 ± 1.74 <i>a</i>
6	95.0 ± 0.93	92.4 ± 1.16	91.4 ± 1.36 <i>b</i>	6.4 ± 1.06	2.2 ± 0.48 <i>b</i>
7	93.5 ± 2.75	90.7 ± 2.12	91.7 ± 1.87 <i>ab</i>	5.8 ± 0.88	2.5 ± 1.75 <i>a</i>

Los valores representan las medias ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

COMPARACIÓN DE LA CRIOSUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA ENTRE TRATAMIENTOS DE ENFRIADO PRE-CONGELACIÓN

En el cuadro **R4** se presenta la calidad espermática al descongelado de cada tratamiento de enfriado pre-congelación.

No hubo diferencias significativas entre tratamientos en lo que se refiere a la motilidad progresiva, funcionalidad (HOST) e integridad de la membrana plasmática (SYBR14/PI), viabilidad (Nucleo Counter®), integridad del acrosoma (PSA/FITC) e hiperfluidez de la membrana plasmática (Merocianina 540).

Sin embargo, hubo diferencias entre tratamientos en los diferentes patrones de capacitación: el tratamiento 1 (+5°C) tuvo un mayor ($P<0.05$) porcentaje de espermatozoides con **patrón F** que el tratamiento 3 (-5°C), pero ambos fueron iguales al tratamiento 2 (-3°C). El tratamiento 3 (-5°C) tuvo un mayor ($P<0.05$) porcentaje de espermatozoides con **patrón B** que el tratamiento 2 (-3°C), pero ambos fueron iguales al tratamiento 1 (-5°C). El tratamiento 2 (-3°C) tuvo un mayor ($P<0.05$) porcentaje de espermatozoides con **patrón AR** que los otros dos tratamientos.

Cuadro R4. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la criosupervivencia de espermatozoides de perro al descongelado

Tratamiento de enfriado pre-congelación	Motilidad progresiva (%)	Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) (%)	Integridad de la membrana plasmática SYBR14/PI (%)	Viabilidad Nucleo Counter® (%)	Integridad del acrosoma PSA/FITC (%)	Estado de capacitación Prueba CTC			Membrana plasmática hiperfluida Merocianina 540 (%)
						F (%)	B (%)	AR (%)	
1 (+5°C)	25.4±1.31 a	38.8 ± 1.25a	33.3±1.33^a	27.3±2.5 0a	57.0±1.2 5a	13.9 ± 0.48a	61.8 ± 0.81ab	23.9 ± 0.74a	51.8 ± 1.18a
2 (-3°C)	21.6±1.41 a	36.8 ± 1.51a	28.9±1.44^a	23.2±2.4 2a	58.4±1.2 7a	12.9 ± 0.35ab	59.0 ± 0.91a	27.5 ± 0.81b	51.4 ± 1.16a
3 (-5°C)	22.2±1.47 a	37.1 ± 1.80a	29.6±1.48 a	24.3±3.0 8a	64.7±1.1 1a	12.3 ± 0.38b	63.6 ± 0.85b	24.0 ± 0.85a	50.6 ± 1.23a

Los valores son medias ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

COMPARACIÓN DE LA CRIOSUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA ENTRE TRATAMIENTOS Y MACHOS

En el cuadro **R5** se presenta el porcentaje de espermatozoides móviles (motilidad progresiva) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, la motilidad espermática de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo en algunos machos hubo algunas diferencias. En el macho 1 la motilidad progresiva en el tratamiento 3 (-5°C) fue menor ($P<0.05$) a la de los otros dos tratamientos; en contraste, en el macho 3 la motilidad progresiva en el tratamiento 2 (-3°C) fue menor ($P<0.05$) a la de los otros dos tratamientos.

Cuadro R5. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	27.8 ± 3.23a xy	31.1 ± 2.60a x	19.2 ± 3.29a y
2	35.0 ± 2.23a x	31.7 ± 1.66ab x	33.3 ± 3.33a x
3	25.9 ± 2.71a x	15.3 ± 3.62b y	21.2 ± 3.41a xy
4	20.8 ± 3.73a x	13.8 ± 2.95b x	17.1 ± 3.81a x
5	27.8 ± 2.22a x	26.7 ± 1.66ab x	23.3 ± 2.35a x
6	24.2 ± 3.15a x	23.5 ± 2.83ab x	24.0 ± 3.58a x
7	17.5 ± 2.50a x	16.7 ± 4.21ab x	21.7 ± 4.77a x

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a**, **b**) dentro de las columnas representan diferencias significativas entre machos ($P<0.05$) para el mismo tratamiento. Los valores con letras diferentes (**x**, **y**) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P<0.05$).

En el cuadro **R6** se presenta el porcentaje de espermatozoides viables (tinción Eosina-Nigrosina) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, la viabilidad espermática de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo en los tratamientos 1 (+5°C) y 2 (-3°C) hubo algunas diferencias entre machos.

Cuadro R6. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la viabilidad (tinción Eosina-Nigrosina) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides viables (tinción Eosina-Nigrosina)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	37.6 ± 1.85ab	35.2 ± 2.29ab	31.1 ± 4.85a
2	32.7 ± 0.84ab	30.1 ± 4.36ab	32.9 ± 6.98a
3	35.2 ± 2.40ab	27.5 ± 1.74a	29.0 ± 3.08a
4	35.0 ± 3.98ab	35.0 ± 3.53ab	29.9 ± 3.22a
5	40.9 ± 1.00a	41.4 ± 1.12b	37.4 ± 2.82a
6	27.8 ± 1.99b	26.4 ± 2.34a	27.0 ± 2.29a
7	26.6 ± 4.23ab	28.3 ± 5.19ab	23.9 ± 6.70a

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas representan diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento (P<0.05). No hubo diferencias entre tratamientos para el mismo macho.

En el cuadro **R7** se presenta el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional (prueba del hinchamiento hiposmótico, HOST) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, la funcionalidad de la membrana espermática de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo en los tratamientos 1 (+5°C) y 2 (-3°C) hubo algunas diferencias entre machos.

Cuadro R7. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la funcionalidad de la membrana plasmática (prueba del hinchamiento hiposmótico) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional (prueba del hinchamiento hiposmótico – HOST)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	48.4 ± 1.46a	44.2 ± 3.66ab	43.8 ± 7.52a
2	38.6 ± 1.20ab	33.2 ± 2.44ab	40.9 ± 4.46a
3	39.4 ± 2.06a	33.2 ± 2.10ab	33.5 ± 3.62a
4	38.3 ± 3.87ab	37.8 ± 4.00ab	36.7 ± 3.51a
5	49.1 ± 1.84a	48.3 ± 0.93a	43.1 ± 3.06a
6	30.0 ± 2.25b	31.4 ± 3.68b	32.7 ± 4.15a
7	35.0 ± 4.90ab	37.6 ± 8.03ab	40.4 ± 6.97a

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes dentro de las columnas representan diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento (P<0.05). No hubo diferencias entre tratamientos para el mismo macho.

En el cuadro **R8** se presenta el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (tinciones fluorescentes: SYBR14/ Yoduro de Propidio) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo en el macho 3 la integridad de la membrana en el tratamiento 2 (-3°C) fue menor ($P<0.05$) a la de los otros dos tratamientos.

En los tres tratamientos hubo diferencias entre algunos machos.

Cuadro R8. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la integridad de la membrana plasmática (SYBR14/ Yoduro de Propidio) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (tinciones fluorescentes: SYBR14/ Yoduro de Propidio)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	37.9 ± 2.57ab	32.6 ± 2.76abc	33.3 ± 4.88ab
2	31.1 ± 4.93ab	28.3 ± 4.40abc	33.3 ± 5.01ab
3	36.1 ± 2.76ab x	25.4 ± 1.65bc y	29.9 ± 3.04ab xy
4	34.3 ± 4.19ab	32.8 ± 4.48abc	31.3 ± 3.56ab
5	43.2 ± 1.21a	44.4 ± 1.82a	38.7 ± 2.76a
6	26.1 ± 2.31b	23.5 ± 3.16bc	24.7 ± 2.92ab
7	24.5 ± 2.07ab	20.9 ± 4.68bc	19.2 ± 5.76b

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a, b, c**) dentro de las columnas representan diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento ($P<0.05$). Los valores con letras diferentes (**x, y**) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P<0.05$).

En el cuadro **R9** se presenta el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (Nucleo Counter®) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta de cada macho fue similar en los tres tratamientos, de igual manera no hubo diferencias entre machos dentro del mismo tratamiento.

Cuadro R9. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la integridad de la membrana plasmática (Nucleo Counter®) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (Nucleo Counter®/ Yoduro de Propidio)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	29.0 ± 6.35	31.7 ± 6.93	28.3 ± 13.16
2	38.7 ± 2.72	29.0 ± 3.05	29.7 ± 14.85
3	29.5 ± 5.85	21.5 ± 3.37	25.5 ± 6.03
4	32.5 ± 8.95	25.3 ± 8.37	26.0 ± 8.19
5	16.7 ± 6.98	17.7 ± 5.33	18.7 ± 4.25
6	24.0 ± 4.22	19.3 ± 6.22	24.3 ± 6.45
7	21.3 ± 10.91	24.7 ± 12.33	15.7 ± 13.71

Los valores representan las medias ± el error estándar. No hubo diferencias entre tratamientos para el mismo macho ni entre machos para el mismo tratamiento.

En el cuadro **R10** se presenta el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (lectinas fluorescentes: PSA/FITC) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo en algunos machos hubo algunas diferencias. En el macho 2 la integridad acrosomal en el tratamiento 3 (-5°C) fue mayor ($P<0.05$) a la de los otros dos tratamientos; en el macho 4 la integridad acrosomal en el tratamiento 3 (-5°C) fue mayor ($P<0.05$) a la del tratamiento 2 (-3°C) pero no fue diferente a la del tratamiento control (+5°C). En cambio en el macho 7 la integridad acrosomal en el tratamiento 3 (-5°C) fue mayor ($P<0.05$) a la del tratamiento 1 (+5°C) pero no fue diferente a la del tratamiento 2 (-3°C).

En los tres tratamientos hubo diferencias significativas entre algunos machos.

Cuadro R10. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la integridad del acrosoma (PSA/FITC) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (Lectinas fluorescentes: PSA/FITC)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	55.3 ± 5.14abc	62.3 ± 3.87ab	65.4 ± 2.52ab
2	61.3 ± 1.89abc x	63.9 ± 2.59ab x	71.8 ± 1.08a y
3	51.6 ± 2.25a	51.1 ± 2.55a	59.9 ± 3.15ab
4	60.9 ± 1.49ab xy	54.1 ± 3.87ab x	64.8 ± 2.22ab y
5	47.3 ± 4.12c	58.1 ± 3.28ab	55.8 ± 4.58b
6	63.6 ± 1.75b	63.1 ± 2.41b	68.9 ± 1.08a
7	56.6 ± 6.22abc x	61.3 ± 1.80ab xy	69.0 ± 0.88ab y

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a, b, c**) dentro de las columnas indican diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento ($P<0.05$). Los valores con letras diferentes (**x, y**) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P<0.05$).

En el cuadro **R11** se presenta el porcentaje de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto (patrón F, prueba de la CTC) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con patrón F de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo hubo diferencias en algunos machos. En el macho 3 el patrón F en el tratamiento 1 (+5°C) fue mayor ($P<0.05$) que en el tratamiento 2 (-3°C) pero no fue diferente al tratamiento 3 (-5°C). En cambio en el macho 4 el patrón F en el tratamiento 1 (+5°C) fue mayor ($P<0.05$) que en el tratamiento 3 (-5°C) pero no fue diferente al tratamiento 2 (-3°C).

No hubo diferencias entre machos dentro del mismo tratamiento.

Cuadro R11. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre el estado de capacitación (Patrón F, CTC) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto (Patrón F, prueba de la CTC)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	14.6 ± 1.75x	12.8 ± 0.84x	13.1 ± 1.84x
2	13.7 ± 1.52x	13.0 ± 0.44x	13.3 ± 0.66x
3	14.5 ± 0.67x	12.0 ± 0.85y	13.1 ± 0.58xy
4	15.7 ± 1.47x	13.5 ± 1.13xy	11.0 ± 0.83y
5	15.8 ± 1.89x	13.9 ± 1.14x	13.7 ± 0.97x
6	11.3 ± 0.64x	12.3 ± 0.67x	10.6 ± 0.71x
7	13.5 ± 0.88x	15.0 ± 0.42x	13.9 ± 1.47x

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (x, y) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P<0.05$). No hubo diferencias entre machos para el mismo tratamiento.

En el cuadro **R12** se presenta el porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (patrón B, prueba de la CTC) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con patrón B de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo hubo diferencias en algunos machos.

En el macho 4 el patrón B fue diferente ($P < 0.05$) en los tres tratamientos, el valor mayor correspondió al tratamiento 3 (-5°C).

En el macho 6 el patrón B en el tratamiento 1 ($+5^{\circ}\text{C}$) fue mayor que en el tratamiento 2 (-3°C) pero no fue diferente al tratamiento 3 (-5°C). En cambio en el macho 7 el patrón B en el tratamiento 1 ($+5^{\circ}\text{C}$) fue mayor ($P < 0.05$) que en los otros dos tratamientos.

Hubo diferencias entre algunos machos en los tratamientos 2 (-3°C) y 3 (-5°C).

Cuadro R12. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre el estado de capacitación (Patrón B, CTC) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto (Patrón B, prueba de la CTC)		
	T1 ($+5^{\circ}\text{C}$)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	57.9 \pm 1.85a	56.1 \pm 3.26ab	63.6 \pm 1.81ab
2	65.5 \pm 1.38a	59.0 \pm 2.36ab	59.3 \pm 1.90ab
3	64.0 \pm 2.42a	63.4 \pm 1.76a	65.8 \pm 1.52ab
4	59.0 \pm 1.48a x	61.8 \pm 2.07ab y	69.1 \pm 1.10a z
5	61.7 \pm 2.16a	62.3 \pm 1.22ab	67.9 \pm 2.99a
6	61.4 \pm 1.51a x	54.7 \pm 2.18b y	59.7 \pm 1.96b xy
7	65.3 \pm 0.82a x	53.3 \pm 1.19ab y	57.2 \pm 0.61b y

Los valores representan las medias \pm el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a**, **b**) dentro de las columnas indican diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento ($P < 0.05$). Los valores con letras diferentes (**x**, **y**, **z**) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P < 0.05$).

En el cuadro **R13** se presenta el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal (patrón AR, prueba de la CTC) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con patrón AR de cada macho fue similar en los tres tratamientos; sin embargo hubo diferencias en algunos machos.

En los machos 2 y 7 el patrón AR fue menor ($P < 0.05$) en el tratamiento 1 (+5°C) que en los otros dos tratamientos.

Hubo diferencias entre algunos machos en los tres tratamientos.

Cuadro R13. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre el estado de capacitación (Patrón AR, CTC) de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal (Patrón AR, prueba de la CTC)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	27.4 ± 1.46a	28.6 ± 1.55ab	23.4 ± 2.03abc
2	21.0 ± 1.06ab x	29.3 ± 1.74ab y	27.3 ± 1.49abc y
3	19.8 ± 1.27b	24.1 ± 1.98a	21.2 ± 1.47a
4	25.3 ± 2.00ab	25.0 ± 2.07ab	20.0 ± 1.29a
5	22.7 ± 2.08ab	23.6 ± 1.51a	18.4 ± 2.63c
6	27.1 ± 1.71a	32.0 ± 1.74b	29.2 ± 1.97b
7	21.3 ± 1.05ab x	29.7 ± 1.06ab y	29.1 ± 1.24ab y

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a**, **b**) dentro de las columnas indican diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento ($P < 0.05$). Los valores con letras diferentes (**x**, **y**) dentro de las filas representan diferencias significativas entre tratamientos para el mismo macho ($P < 0.05$).

En el cuadro **R14** se presenta el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática hiperfluida (prueba de la Merocianina 540) al descongelado de cada macho en los diferentes tratamientos de enfriado pre-congelación.

En términos generales, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática hiperfluida de cada macho fue similar en los tres tratamientos.

Hubo diferencias entre algunos machos en los tres tratamientos.

Cuadro R14. Efecto del enfriado pre-congelación a tres temperaturas blanco sobre la hiperfluidéz (Merocianina 540) de la membrana plasmática de espermatozoides de perro al descongelado

Machos	Porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática hiperfluida (Merocianina 540)		
	T1 (+5°C)	T2 (-3°C)	T3 (-5°C)
1	52.6 ± 2.58ab	48.0 ± 2.79ab	49.3 ± 3.08ab
2	54.5 ± 2.90ab	52.9 ± 2.90ab	54.5 ± 2.10ab
3	49.8 ± 3.36ab	57.9 ± 3.18ab	51.2 ± 3.52ab
4	55.2 ± 2.10ab	55.0 ± 1.87ab	48.8 ± 1.90ab
5	49.9 ± 3.06a	49.4 ± 1.59a	49.7 ± 3.02a
6	50.4 ± 3.48b	46.3 ± 3.54b	52.1 ± 4.22b
7	54.3 ± 4.40ab	50.0 ± 1.73ab	49.3 ± 3.84ab

Los valores representan las medias ± el error estándar. Los valores con letras diferentes (**a, b**) dentro de las columnas indican diferencias significativas entre machos para el mismo tratamiento (P<0.05). No hubo diferencias entre tratamientos para el mismo macho.

8. Discusión

El fundamento del enfriado de los espermatozoides a temperaturas bajo cero grados es permitir que la estructura tridimensional de la membrana plasmática se reorganice en respuesta a los cambios ocasionados por la transición de fase de los lípidos que podría ocurrir a esas temperaturas.

En la primera parte de este trabajo, se determinó el punto de congelación del semen de perro diluido con la finalidad de definir una serie de temperaturas blanco de enfriado pre-congelación. De esta manera, en la segunda parte de este trabajo se evaluó el efecto de tres temperaturas pre-congelación (-3°, -5°, -7°C) sobre la calidad espermática al recalentado. Con base en este experimento, se eligieron dos temperaturas de enfriado bajo cero grados (-3°, -5°C) para probar su efecto sobre la crio-supervivencia espermática, esto es posterior al congelado y descongelado.

En el experimento sobre enfriado – recalentado de los espermatozoides se mostró que el enfriado a -7°C redujo los porcentajes de células móviles y de células con membrana plasmática funcional (positivos a la prueba HOST), aunque no de manera significativa en contraste con la observado en espermatozoides de cerdo (García, 2015). Una desventaja del enfriado a -7°C fue que algunas pajillas se congelaban antes de alcanzar esa temperatura.

En este trabajo, no se encontraron diferencias en calidad espermática entre el enfriado a +5°C y el enfriado a -3° o -5°C en contraste con lo encontrado en trabajos previos de enfriado a temperaturas bajo cero: espermatozoides de caprino (Medrano et al., 2001), de ovino (Ríos, 2005), y de porcino (Garzon-Perez et al., 2010). Esto podría explicarse por el largo periodo de almacenaje en refrigeración a 5°C antes de la congelación (16 horas); este efecto aunado al estrés ocasionado por el proceso de congelado y descongelado podría neutralizar algún posible efecto positivo del enfriado a temperaturas bajo cero grados sobre la crio-supervivencia espermática de los espermatozoides caninos.

En este sentido, Contreras (2015) encontró que el enfriado de espermatozoides de equino a -3°C, previamente almacenados a 5°C por 17 horas, no produjo positivos sobre la crio-supervivencia espermática. Hay evidencias de que el efecto de la temperatura de enfriado pre-congelación podría depender de la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides de cada macho (Medrano et al., 2012).

Una observación interesante de este trabajo es que aunque el enfriado a diferentes temperaturas bajo cero grados (-3°, -5°C) no produjo efectos positivos sobre la calidad espermática, tampoco comprometió la calidad espermática al recalentamiento ni al

descongelado. Esto nos sugiere, que en otras condiciones este enfriado pre-congelación podría mejorar la crio-supervivencia espermática.

La motilidad progresiva al descongelado que se observó en el presente trabajo ($\approx 23\%$) es menor a la reportada por otros autores, que suele estar en torno al 35%. Rota et al. (2005) compararon dos métodos de congelación en semen canino, vapor estático vs congelado controlado y obtuvieron 30 y 35% de células móviles al descongelado respectivamente. Varesi et al. (2014) compararon el efecto de la adición de melatonina a espermatozoides de perro, obtenidos del epidídimo, sobre su supervivencia al congelado-descongelado y obtuvieron 38 y 36% de células móviles, sin y con melatonina respectivamente. Asimismo, Kim et al. (2012) obtuvieron 51 y 39% de motilidad progresiva en espermatozoides de perro congelados con 5% de glicerol o 5% de etilenglicol respectivamente.

En relación a otras variables evaluadas en los espermatozoides al descongelado, como la funcionalidad de la membrana plasmática, mediante la prueba de HOST, Rota et al. (2005) obtuvieron valores de 49 y 63% empleando dos métodos para congelar, vapor estático vs congelado controlado respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos por Kim et al. (2012) en espermatozoides caninos congelados con 5% de glicerol o de etilenglicol: 55 y 45% respectivamente. Estos valores también son mayores que los que se obtuvieron en este trabajo ($\approx 38\%$). En relación al porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, Varesi et al. (2014) obtuvieron 37 y 36% de acrosomas intactos, sin y con melatonina respectivamente. Estos valores son menores que los que se obtuvieron en nuestro trabajo ($\approx 60\%$); es importante mencionar que en el trabajo citado, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto previo a la congelación fue relativamente bajo para la especie ($\approx 67\%$).

Como se mencionó anteriormente, en trabajos previos de enfriado a temperaturas bajo cero grados se ha observado un efecto positivo de éste sobre la criosupervivencia de los espermatozoides de diferentes especies animales. Para explicar este efecto, se ha propuesto la hipótesis de que el enfriado a temperaturas cercanas al punto de congelación permite que los lípidos de la membrana se reorganicen sin que se rompa la membrana, evitando así un aumento de la fluidez de la membrana. Por eso, en este trabajo se ha utilizado la merocianina como un marcador de fluidez que nos permitiría comparar diferentes protocolos de crioconservación e identificar aquel menos agresivo para los espermatozoides: el que ocasione el menor cambio de fluidez. En el presente trabajo no se encontraron diferencias en el porcentaje de espermatozoides con membranas fluidas entre tratamientos de enfriado pre-congelación, la media general fue

51.5%. Valores similares a éste se han reportado en espermatozoides de humano incubados durante 3 horas (Muratori et al., 2004). Por otro lado, Harrison y Miller (2000) observaron en espermatozoides de cerdo activados con bicarbonato que, después de 9 minutos de incubación, el 35% de los espermatozoides mostraron fijación alta de merocianina; este porcentaje se incrementó a 52% después de 25 minutos de incubación. Aunque las condiciones experimentales del presente trabajo son muy distintas a las de los trabajos citados en este párrafo, se puede observar que el porcentaje de espermatozoides con membranas fluidas es muy similar; esto podría sugerir que la mitad de una población de espermatozoides tiene membranas plasmáticas muy susceptibles a cualquier proceso similar a la capacitación, en el caso de los espermatozoides descongelados el fenómeno de crio-capacitación o capacitación prematura (Watson, 1995).

El largo periodo de almacenaje a 5°C previo a la congelación podría explicar estas diferencias entre nuestros resultados y los reportados en la literatura.

9. Conclusión

El enfriado lento a -7°C y el recalentamiento inmediato a 38°C disminuyó la motilidad y la proporción de espermatozoides con membrana plasmática funcional, aunque no de manera significativa. El enfriado a temperaturas bajo cero grados, previo a la congelación, no mejoró la crio-supervivencia de los espermatozoides de perro.

10. Bibliografía

- Albarracín JL, Mogas T, Palomo MJ, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. *In vitro* capacitation and acrosome reaction of dogs spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucosa. *Reproduction Domestic Animal*; 39: 129-135.
- Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Belíiti A. 2001. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*; 55:1159-1170.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*; 7: 145-176.
- Amann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *Journal Andrology*; 10: 89-98.
- Amann RP, Hammersted RH. 1993. *In vitro* evaluation of sperm quality. An opinion. *Journal Andrology*; 14:397- 406.
- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled- stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 89: 65-75
- Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Suresh Kumar, Sinha S, Dutta DJ, Saikia GK. 2014. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 149: 231-237.
- Barth AD, Oko RJ.1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames IA: Iowa State University Press; 8-18.
- Barroso VG, Karchmer KS, Castelazo ME, Carballo ME, Kably AA. 2002. Changes in mitochondrial membrane potentials and its exponential relation with phosphatidylserine translocation in the plasma membrane as markers in the initial events of apoptosis: evaluation in different spermatid fractions. *Ginecologia Obstetricia México*. 270:182-9.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critsere JK. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 78; 1682–1699.
- Boerke A, Tsai N, García GIA, Gadella BM. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*; 70: 1188–1196
- Bucci D, Isani G, Giaretta E, Spinaci M, Tamanini C, Ferlizza E, Galeati G.2014. Alkaline phosphatase in boar sperm function. *Andrology*; 2(1):100-106.
- Capanna E. 1999. Lazzaro Spallanzani: At the Roots of Modern Biology. *The Journal of Experimental Zoology*; 285:178–196.
- Christensen BW, Asa CS, Wang C, Vansandt L, Bauman K, Callahan M, Jens Jk, Ellinwood Nm. 2011. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (*Canis lupus*) and domestic dogs (*C. l. familiaris*). *Theriogenology* 76, 975–980.

- Contreras-Mendez A, Medrano A. 2015. A comparative study of two cooling protocols on stallion sperm cryosurvival. *Andrologia*; in press
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ, Drobnis E. 1989. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*; 26: 76-84.
- Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*; 5: 46–52.
- Darin-Bennett A, Poulos A, White IG. 1974 - The phospholipids and phospholipidbound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*; 41: 471-474.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993 Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of experimental zoology*; 15, 265(4):432-437.
- Colenbrander, T And Arie J. Verkleij Franciska E. De Leeuw, T Hsiao-Ching Chen,* Ben Cold-Induced Ultrastructural Changes in Bull and Boar Sperm Plasma Membranes *CRYOBIOLOGY* 27, 171-183
- Concannon PW, Batista M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In *Current Veterinary Therapy*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1247-1259 pp.
- Du Bois S, Len JA, Parlevliet JM, Eilts BE. 2012. Effects of Cooling Time on Membrane Integrity and Motility of Frozen-Thawed Canine Spermatozoa using Two Different Commercial Egg Yolk-based Extenders at Two Different Cooldown Equilibration Times. *Reproduction in Domestic Animals*; 47: 278-280.
- De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Proc. 2nd Int. Conf. Boar Semen Preserv.*, Beltsville, 1990, 95-104
- Eddy EM. 2015. The Spermatozoon. Gametes, Fertilization, and Embryogenesis. In: "Physiology of Reproduction. Editors Knobil E, Neill JK, Wassarman MP, New York, EEUU. 3-50 pp.
- Eilts BE, 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*; 65: 584- 593.
- England GC, Plummer JM. 1993. Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*. 47: 261-270.
- England GC. 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*; 52: 981-986.

- England GCW, Allen WE. 1989. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record* 125, 399.
- Espinoza JA, Schulz MA, Sánchez R, Villegas JV. 2009. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrology*; 41(1):51-54.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Meryman HT. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*; 27: 247-268.
- Farstad W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*; 42 : 25 I-260
- Farstad W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*; 53: 175-186.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochemical et Biophysical Acta*; 14 (69):197-235.
- Freshman JL. 2002. Semen collection and evaluation. *Reproductive Techniques in Small Animals*; 17:104–107
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostdadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. 2010. *In vitro* comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*; 73: 480-487
- Gadella BM, Harrison RA. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of amino-phospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology Reproduction*; 67: 340-350.
- Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology Reproduction*; 53(2):276-84.
- Garzon-Perez C, Flores HF, Medrano A. 2010. A simple osmotic stress test to predict boar sperm cryosurvival. *CryoLetters*; 31: 438-444.
- Graham JK. 2001 - Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*; 68: 239-247.
- Guillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*; 63: 445-457
- Hafez, E.S.E. 2002. Preservación y crioconservación de gametos y embriones. En *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. Editores Hafez, E.S.E., Hafez, B. McGraw-Hill Interamericana, México. 472-494 pp.
- Harkema W, Harrison RAP, Miller NGA, Topper EK, Woelders H. 1998. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of inact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biology Reproduction*; 58: 421-430.

- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal Andrology*; 11: 73 – 88.
- Harper H. 1995. *Manual de Bioquímica*. Ediciones, El Manual Moderno.
- Hazel JR. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annual Review of Physiology*; 57: 19-42.
- Hermansson U, Linde Forsberg C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*; 65: 584–593.
- Hidalgo C, Devés R, Lagos N. 1996. Organización molecular de las membranas biológicas. En *Biofísica y Fisiología celular*. Editores Latorre, R., López-Barnen, J., Bezanilla, F. Universidad de Sevilla. España.
- Holt WV. 1984. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology*; 87: 159-194.
- Holt WV. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 3-22.
- Holt WV. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez- Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ, 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertility*; 70: 219–228.
- Johnson LA, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. 1996. Staining sperm for viability assessment. *Reproduction in Domestic Animal*; 31: 37-47.
- Johnson LA, K.F Weitzel KF, P Fiserc P, W.M Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*; 62: 143–172.
- Juárez ML, Valencia J. 2009. Transporte de gametos y fertilización. En *Reproducción de animales domésticos*. Editores Galina, C. y Valencia, J. Limusa, México. 127-146.
- Karger S, Arlt S, Haimerl P, Heuwieser W. 2014. A Systematic Review of Studies Performing the Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Quality of Canine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*; 49: 1–6.
- Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW. 1993. Comparison of a fluoresceinated lectin stain with a triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *Journal of Experimental Zoology*; 265: 599-603.
- Kim SH, Yu DH, Kim YJ. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidyl serine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*; 73(3):282-92.
- Kutzler MA. 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology*; 64:747–754.
- Larson B, Rodriguez-Martinez H. 2000. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal Reproduction Science*; 61:327-336

- Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-hawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small animal)*; 10: 48-58.
- Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*; 2 (3): 246–256.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal Reproduction Fertility* 47: 283-291.
- Malmgren L. 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*; 48: 523-530.
- Manosalva PI, Cortes, CL, Leyva V, Valdivia MC., De los Reyes S, Barros RC y Moreno M R. 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, Integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigación Veterinaria*; 16: 114-128.
- Martins MIM, Padilha LC, Souza FF, Lopes MD. 2009. Fertilizing Capacity of Frozen Epididymal Sperm Collected from Dogs. *Reproduction in Domestic Animal*; 44: 342–344.
- Martins MIM, Justino RC, Sant’Anna MC, Trautwein LGC, and Souza FF. 2012. Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm Reproduction in Domestic Animal; 47: 293–294.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Journal Physiology*; 247: 125 - 142.
- Medrano A, Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Quesada E, Gracia A. 2001. Slow cooling to -5°C before freezing improves buck sperm cryosurvival. *Cryobiology*; 43: 365-366.
- Medrano A, Anderson WJ, Millar JD, Holt WV, Watson PF. 2002. A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *CryoLetters*; 23: 397-404.
- Medrano A, Watson PF, Holt WV. 2012. Investigation of pig sperm plasma membrane reorganization using progesterone-albumin-fluorescein probes. *Asian Pacific Journal of Reproduction*; 1: 27-33.
- Mendoza EV, Valadez AR. 2005. El perro como legado cultural. Instituto de investigaciones antropológicas, UNAM. 16- 35 pp.
- Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movements in mammals. *Human Reproduction Update*; 3: 403-409.
- Morton DB, Bruce SG. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal Reproduction Fertility*; 39: 311-316.

- Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2004. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *Journal of Andrology*; 25 (5): 797–810.
- Nagy SZ, Házás G, Bali Papp A J, Iváncsics F, Szász F, Szász JA. Kovács RH. Foote. 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*; 52: 1153–1159.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. A triple stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology Reproduction*; 68: 1828-1835.
- Noorafshan A, Karbalay-Doust S. 2010. A simple method for unbiased estimating of ejaculated sperm tail length in subjects with normal and abnormal sperm motility. *Micron*; 41:96-99.
- Orozco-Benítez MG, Lemus-Flores C, Hernández-Ballesteros JA, Navarrete-Méndez R, Juárez- Mosqueda L. 2008. Alterations of domains in the plasmatic membrane due to damages of the perinuclear theca of pig preserved spermatozoa. *Pakistan Journal Biology Science*; 11(10):1360-1364.
- Otero PA. 2011. Breve historia de los modelos de la Membrana celular. En boletín biológica; 21:29-32.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes *Theriogenology*; 38: 209- 222.
- Payró DJL. 2004. El perro y su mundo. En: Tratado de zootecnia canina. Federación Canófila Mexicana. México.
- Peña AI, Quintela LA, Herradón PG. 1998. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*; 50: 1211-1220.
- Peña A, Johannisson A, Linde-Forsberg C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*; 52(6):965-80.
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000a. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*; 54: 703-718.
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000b. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*; 54: 859-875.
- Petrunkina AM, Gropper B, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E, 2004a: Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction*; 128, 829–842.
- Parks JE, Lynch DV. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*; 29: 255-266.

- Parks EJ, Graham J K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*; 38: 209-222.
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*; 54 (5): 703–718.
- Peña MAI. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*; 82–83: 209–224.
- Peña FJ, Nuñez-Martínez I, Morán JM. 2006. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update *Reprod Dom Anim* 41 (Suppl.2), 21–29 (2006)
- Pinto CRF, Paccamonti DL, Eilts BE. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*; 52 (4): 609–616.
- Poulos A, Darin-Bennett A, White IG. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 46: 541-549.
- Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*; 22: 409-415.
- Quinn PJ, White IG. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*; 12: 263-270.
- Quintela AT, Oliveira IRS, Souza AO, Gusmao AL, Silva AR, 2010. Water induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Animal Reproduction*; 7: 70–74.
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*; 56: 801-815.
- Rath R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*; 65: 462-470.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*; 60: 1553-1568.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A. 2005a. Effect of blood admixture on *in vitro* survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*; 61(7-8):1589-602.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Thaghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A . 2005b. New techniques for assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*; 64, 706-719.
- Ríos Granillo E. 2005. Comparación del enfriado tradicional a +5°C vs el enfriado a +2°C y -2°C sobre la criosupervivencia y la capacitación prematura del semen de carnero. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán, UNAM. 64 pp.

- Rodriguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*; 42: 815– 829.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L. 1996. Assessment of bull sperm fertilizing ability. *Reproduction Domestic Animal* 31: 515-517.
- Rodríguez-Martínez H. 2006. Can we increase the estimative value of semen assessment?. *Reproduction Domestic Animal*; 41: 2-10.
- Rodríguez-Martínez, H.; Eriksson, B.; Lundengeim, N. (1996). Freezing boar semen in flat plastic bags, membrane integrity and fertility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31: 161-168.
- Root KMV. 2005. Reproductive Behavior In Small Animals. *Theriogenology*; 64:734-746.
- Root KMV. 2007. The evaluate of canine evaluation for practitioners. *Theriogenology*; 68(3): 329-337.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*; 44: 885-900.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. 1999. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*; 57: 199-215.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006 Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*; 65, 958-978.
- Silva A, Cardoso R, Silva L. 2006b. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reproduction Domestic Animal*; 41: 74-78.
- Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *American Association for the Advancement of Science new series*; 175 (4023): 720-731.
- Threlfall W. 2005. Recolección y evaluación del semen. En: *Manual de Reproducción del Perro y del Gato*. Editor Root-Kustritz MV. Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, pp: 43-54.
- Valadez AR. 2003. La domesticación animal. Instituto de Investigaciones Antropologicas. UNAM 34-48 pp.
- Vilà CP, Savolainem JE, Maldonado IR, Amorim JE, Rice RL, Honeycutt KA, Crandall J, Ludenberg YRK, Wayne. 1997. Multiple And Ancient Origins Of The Domestic Dog. *Science*; 276:1687-1689.
- Santana M, Batista M, Álamo D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. 2013. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen-thawed semen samples in dogs. *Reproduction in Domestic Animals* 48, 165-170.
- Yanagimachi R. 2015. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Editors Knobil E. And JD. Neill. New York: Raven Press, 189-315 pp.

- Salamon S, Maxwell, WM. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37: 185-249.
- Silva AR. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*; 59: 821–829.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*; 65, 958-978.
- Smith JF, Murray GR. 1997. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*; 57: 246-250.
- Steckler D, Stout TAE, Durandt C, Nöthling JO. 2015. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology* 83, 1451–1460.
- Sukardi S, Curry MR, Watson PF. 1997. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science*; 46: 89-96.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Editores Morris GJ, Clark A. Academic Press, New York, 189-218 pp.
- Watson PF. 1995. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*; 7: 871–891.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*; 60–61: 481–492.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility Development*; 5: 639-658.
- Woelders H, Matthijs A, Den Besten M. 1996. Boar variation in freezability of the semen. *Proceedings III Conference on Boar semen Preservation. Reproduction in Domestic Animals*; 31: 153-159.
- Yanagimachi, R. 2015. Mammalian fertilization. In: *“Physiology of reproduction.Editors Knobil E, Neill JK. Raven Press Ltd, New York, EEUU. Pp: 189-317.*
- Yaniz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosálvez J, López-Fernández C, Santolaria P. 2013. Comparison of membrane permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction Domestic Animal*; 48 (4): 598-603.
- Yeung CH, Wagenfeld A, Nieschlag E, Cooper TG, 2000: The cause of infertility of male cros tyrosine kinase receptor knockout mice. *Biol Reprod* 63, 612–618.