



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Comparación del efecto del enfriado pre-congelación a 2 temperaturas, +5°C y -5°C, sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JESSICA KARINA OROZCO ADAME

ASESOR

Dr. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

COASESOR

M EN C. ALICIA ALCÁNTAR RODRÍGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, MAYO DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
2.1 Espermatogénesis	4
2.2 El espermatozoide	5
2.3 El espermatozoide porcino	6
2.4 Membrana plasmática	7
2.5 Propiedades de las membranas plasmáticas	8
2.5.1 La bicapa lipídica	8
2.6 Membrana plasmática del espermatozoide.....	10
2.7 Fluidez de la membrana	12
2.7.1 Transición de fase en las membranas	13
2.8 Criobiología.....	14
2.8.1 Criobiología aplicada en industria porcina.....	16
2.9 Aumento de la fluidez de la membrana relacionado con choque frío en espermatozoide de cerdo	17
2.10. Diluyentes y crioprotectores.....	19
2.11 Merocianina 540.....	20
2.12 Evaluación del semen	21
2.12.1 Evaluación macroscópica de semen de cerdo	21
2.12.2 Evaluación microscópica del semen de cerdo	22
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. Objetivo general	28
4.1 Objetivos particulares.....	28
5. Material y métodos.....	29
5.1 Obtención y transporte semen	29
5.2 Evaluación de semen.....	29
5.2.1 Evaluación macroscópica:.....	29
5.2.2 Evaluación microscópica.....	30
6. Fase experimental.....	34

6.1. Etapa 1: Incubación del semen de cerdo diluido en TALP (Tyrodes+ Albumina+ Piruvato) o BTS	34
6.2. Etapa 2: Refrigeración de semen de cerdo a 5°C en diferentes medios (BTS/TALP)	35
6.2.1. Dilución en BTS.....	35
6.2.3. Dilución en TALP	35
6.3. Etapa 3: Congelación y descongelación de semen de cerdo en diluyente lactosa-yema de huevo	36
6.3.1. Enfriado lento de los espermatozoides diluidos con Lactosa - Yema de huevo.....	36
6.3.2. Procedimiento de congelación	38
6.3.3. Procedimiento para la descongelación	39
6.4 Análisis estadístico.....	41
7. Resultados	42
7.1. Primera etapa: Incubación del semen de cerdo diluido en medio TALP	42
7.2. Segunda etapa: Refrigeración de semen de cerdo a 5°C diluido en dos diferentes medios: BTS y TALP	43
7.2.1. Enfriado lento de 23 a 5°C con BTS	43
7.2.2. Enfriado lento de 23 a 5°C con TALP	45
7.2.3. Tercera etapa: Congelación y descongelación	47
8. Discusión.....	48
9. Conclusiones	52
10. LITERATURA CITADA.....	53
Anexos.....	57
Anexo 1.- Técnica de “mano enguantada”	57
Anexo 2: DABCO	58
Anexo 3: Medio Tyrodes.....	59
Anexo 4: Preparación de medio TALP	60
Anexo 5 Preparacion de medio BTS	61
Anexo 6: Apartado de Fotos.....	62

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Medrano, por brindarme el apoyo y la confianza necesaria para poder realizar y finalizar este proyecto, a pesar de que no fue fácil el camino, con su compañía, asesoría y amistad fue mucho más ameno.

A la M en C Alicia Alcántar por la paciencia y el tiempo dedicado para ayudarme a entender cada uno de los procedimientos que lograron la culminación de este proyecto.

Al Dr. Salvador Romo García, Dra. María del Carmen Espejel, MVZ Jesús Arturo Sandoval, MVZ Saúl Alejandro Rodríguez, por dedicarme el tiempo suficiente para la revisión, corrección y aporte de sus conocimientos para enriquecer este trabajo.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP – FMVZ), por brindarme su apoyo con el semen utilizado en este proyecto.

A mí amada Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 2, UNAM.

A los proyectos: Efecto del enfriado lento pre-congelación, a temperaturas cercanas a la formación del hielo (-5°C), sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides de perro (PAPIIT – IN213815), y Estudio de los factores que determinan la criosupervivencia de los espermatozoides sometidos a los protocolos de la crioconservación (PIAPIVC03).

Dedicatorias

A mis padres María Esther Adame Solórzano y José Manuel Orozco, que durante 27 años han dedicado cada día para formarme como persona, mujer y profesionalista. Gracias por cada esfuerzo que realizaron para que yo pudiera lograr este sueño. Cada palabra, regaño, castigo y uno que otro jalón de orejas me sirvieron para que hoy pueda ser su mayor orgullo.

El amor incondicional que Uds. me han demostrado a lo largo de toda mi vida ha provocado que yo sea una mujer feliz, por tener a los padres más maravillosos del mundo. Doy gracias a Dios de aun darnos la oportunidad de disfrutar este gran triunfo que se merecen, ya que no hubiera sido posible sin ustedes a mi lado.

A mis hermanos Oscar, Bernardino, Consuelo y Gerardo. Gracias por haber hecho de mi infancia, la mejor. Por enseñarme a través de su vida la comprensión, la dedicación y la pasión que han tenido para realizar día con día sus actividades y que eso ha provocado en mi, el coraje y la pasión para culminar mi mayor sueño, haciéndolo realidad. Así como yo recibí de ustedes, tengan por seguro que ahora sin duda alguna, pueden contar conmigo incondicionalmente. Gracias por llenarme de tanto amor.

A mis sobrinos Ashley y Fabián, que han hecho de este camino, el más divertido y alegre que pude pedir. Gracias por su compañía en cada etapa de mi vida, por su apoyo cuando ejerzo mi profesión, que sin saberlo y a pesar de sus alergias me han ayudado a sacar adelante desde una simple estética hasta una complicada cirugía, por soportar cada olor raro emitido por mis diferentes pacientes. Gracias por cada sonrisa compartida, cada esfuerzo que realizaron por el simple hecho de no dejarme sola.

A la Dra Oswelia Serna Huesca, gracias por la ayuda que me otorga día con día desde el momento en que tuve la fortuna de conocerla. Por ser un libro abierto para cada una de mis dudas al momento de ejercer mi profesión. Gracias por ser mi mentora, usted para mi es el mayor de los ejemplos a seguir, he aprendido de usted una de las principales enseñanzas, el ser humilde, sencilla, responsable y sobre todo comprometida, no solo con mis clientes sino con cada paciente, porque ellos son los que nos brindan la mejor de las satisfacciones.

A mis amigos y ahora colegas Carolina, Kike, LD, Lalo Rojas, Sughei, Fernando Herrera, Jr, Tanita Andy, Lety, Gaby, Lish, Geli, César, Angie, porque cada uno de ustedes hicieron posible que mi camino estuviera lleno de risas, aventuras, diversiones, experiencias, porque siempre han tenido una palabra de aliento para cuando la he necesitado. Por compartir su manera de aprender, enseñarme que la amistad está en las buenas, en las malas y a pesar de las diferencias, logramos hacer que embonaran a la perfección.

A mis hermanos por elección Andrea, Edgar, Norberto, Jonny, Gonzalo, porque ustedes desde hace 15 años me enseñaron de lo que trata la amistad u el compromiso que se genera cuando gustas que una persona forma parte de tu vida, tu corazón, tu familia. Gracias por cada momento compartido por el apoyo brindado al confiarme a sus mascotas. Hoy cumpla uno de mis más grandes sueños y doy gracias a dios porque ustedes están presentes en él.

A mis chicas especiales (Comadres) Jimenita y Lili, gracias por cada momento a su lado, por sus consejos, risas, diversiones, porque este camino ha sido difícil pero con su compañía, cariño ha sido mucho más divertido y satisfactorio. Gracias por ser parte de un éxito más en mi vida. Las quiero mucho!

A mi amiga, Jessica Gallardo, que siempre me acompaña en cada momento de alegría, felicidad y tristeza que se me ha presentado en mi vida, gracias por tantos años de amistad, por tantas aventuras vividas, cada vez más locas, más maduras, más divertidas, más amigas!

A mi amiga Lorena, porque sin tu ayuda, este proceso me hubiera resultado a un más complejo, por el apoyo en todos los sentidos que tuviste conmigo, por tus detalles, tus palabras de aliento, tus locuras, por compartirme esa manera tan alegre de vivir, a pesar de los grandes obstáculos que nos presenta la vida.

A cada uno de los académicos con lo que tuve la fortuna de tomar cátedra, gracias por compartir sus conocimientos y con ellos ayudarme en mi formación profesional.

A Alberto Luebbert, por haber llegado a mi vida.

La confianza en sí mismo es el primer secreto del éxito.

*El mejor maestro es el tiempo, sin necesidad de que hagas preguntas, te da
las mejores respuestas.*

*Aprende a esperar el momento exacto para recibir los beneficios que
reclamas.*

*El día de hoy no se volverá a repetir. Vive intensamente, lo que no significa
alocadamente; sino mimando cada situación, escuchando a cada compañero,
intentando realizar cada sueño positivo, buscando el éxito del otro; y
examinándote de la asignatura fundamental: el amor. Para que un día no
lamentes haber malgastado egoístamente tu capacidad de amar y dar vida.*

Ser veterinario no es solamente cuidar a los animales. Es sobretodo amarlos, no fijándose solo en los patrones éticos de una ciencia médica.

Ser veterinario es acreditar la inmortalidad de la naturaleza y querer preservarla siempre más bella.

Ser veterinario es oír los maullidos, mugidos, balidos, relinchos, cacareos, y ladridos, y principalmente, interpretarlos y entenderlos. Es gustar de la tierra mojada, del campo, del monte, de los espacios abiertos, de lunas y lluvias.

Ser veterinario es no importar si los animales piensan, pero si, si sufren. Es dedicar parte de su ser al arte de salvar sus vidas.

Ser veterinario es aproximarse a los instintos. Es perder los miedos. Es ganar amigos de pelos y plumas, que jamás te van a decepcionar.

Ser veterinario es detestar encierros y jaulas. Es perder un tiempo enorme apreciando rebaños, tropillas, y vuelos de pájaros. Es descubrirse permanentemente, a si mismo, a través de los animales.

Ser veterinario es ser capaz de entender meneos de colas, arañazos cariñosos y mordiscos de afecto.

Ser veterinario es ser capaz de entender ojos tristes, orejas caídas, narices calientes, inquietudes o reposos anormales.

Ser veterinario es entender el lenguaje corporal de los animales, pedidos mudos de ayuda, interpretar gestos y actitudes de dolor, y conocer la forma de aliviarlos. Es sentir olor de pelo mojado, de almohada con esencia de gato, de ovejas, de corral, de estiércol.

Ser veterinario es tener el coraje de penetrar en un mundo diferente y ser igual. Es tener capacidad de comprender gratitudes mudas, más sin duda alguna, las únicas verdaderas. Es oler el aliento de un cachorro lactante y recordar su propia niñez.

Ser veterinario es convivir lado a lado con enseñanzas profundas sobre amor y vida.

Ser veterinario es participar diariamente en el milagro de la vida. Es convivir con la muerte, saber que es definitiva, pero no siempre desagradable. Todos nosotros podemos estudiar veterinaria, pero no todos seremos veterinarios.

Manuel Godoy

Al más grande amor de mi vida

Mis padres

Gracias por darme esta vida tan maravillosa que jamás
hubiera imaginado

1. Resumen

El uso de semen congelado en la industria porcina ha sido limitado en comparación con el de otros mamíferos domésticos, debido principalmente a la baja fertilidad obtenida. Por esto, es necesario mejorar los protocolos de crioconservación. Los cambios de temperatura inducen un estrés sobre la membrana de los espermatozoides; la susceptibilidad al choque frío puede estar relacionada a la composición de la bicapa lipídica de la membrana, afectando directamente a la fluidez de la membrana plasmática. A medida que disminuye la temperatura, hay una restricción del movimiento lateral de los fosfolípidos de la membrana, lo cual ocasiona un cambio físico, de fluido a gel. La Merocianina 540 (MC540) es una molécula fluorescente natural lipofílica que se une a la bicapa, preferentemente a los lípidos que se encuentran “desordenados” o “mal empaquetados”, esto se refiere a los cambios que fluctúan en la bicapa lipídica. El cambio de los lípidos se detecta a través de un aumento de la capacidad para la unión de la MC540, la cual depende del grado de desorden estructural de los lípidos. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto del enfriado pre-congelación a 2 temperaturas, +5°C y -5°C, sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo. Para esto, se estandarizó el uso del marcador de fluidez de membrana, MC540, empleando microscopía de fluorescencia. En la primera etapa, los eyaculados se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en TALP y se ajustó la concentración espermática a 7×10^6 células/ml, posteriormente se incubaron en 5% atmósfera de CO₂ a 38°C, y se tomaron alícuotas en los tiempos: i) 0, ii) 10, iii) 120 y iv) 240 min. A lo largo de este periodo de incubación se observó una diferencia con respecto a la motilidad progresiva entre el tiempo 0 y 120 min. En cuanto a la fluidez (patrón brillante, aumento de fluidez), se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tiempos 10 y 120 minutos, el Tiempo 240 minutos de incubación no fue diferente a los otros dos. En la segunda etapa, los espermatozoides fueron sometidos a un enfriado lento a +5°C en dos diferentes medios, BTS y TALP, tomando muestras en los siguientes tiempos: i) 0, ii) 10, iii) 120 y iv) 240 min (BTS) y i) 0, ii) 10, iii) 40 y iv) 90 min (TALP). En el enfriado con BTS, el porcentaje de espermatozoides con patrón brillante (aumento de fluidez) observado al Tiempo 10 minutos de refrigeración (30.4%) fue diferente al del Tiempo 240 minutos (43.2%) ($P < 0.05$), pero similar al observado al Tiempo 120 minutos (36.8%). En el enfriado con TALP, el porcentaje de espermatozoides con patrón brillante (aumento de fluidez) observado en el Tiempo 10 minutos de refrigeración (23.3%) fue diferente ($P < 0.05$) al del Tiempo 40 (30%) y Tiempo 120 minuto (39.8%); estos dos últimos valores fueron diferentes entre sí ($P < 0.05$). En la tercera etapa, los espermatozoides fueron diluidos en un medio de congelación lactosa-yema de huevo, con 3% de glicerol como crioprotector, se envasaron en pajillas de 0.5 ml y se enfriaron a dos diferentes temperaturas, T1 a +5°C y T2 a -5°C, congelándose en vapores de nitrógeno durante 15 min y posteriormente se sumergieron en el nitrógeno líquido. Al descongelado se centrifugaron para retirar el medio (lactosa-yema de huevo) y se resuspendieron en TALP. No hubo diferencias entre los tratamientos de refrigeración en ninguna de las variables evaluadas; MC540 patrón brillante fue 52 y 57% para la refrigeración a +5 y -5 ° C, respectivamente; el valor antes de la refrigeración fue del 11%. Se logró estandarizar la prueba utilizando la sonda fluorescente MC540 para observar la fluidez de la membrana en espermatozoides de cerdo, por medio de microscopía de fluorescencia, determinando dos patrones: por un lado espermatozoides que presentaban a nivel de la cabeza un alto nivel de fluorescencia a los que se les denominó como brillosos (alta fluidez), mientras que los espermatozoides que presentaban poca o nula fluorescencia a este nivel, se les denominó opacos (baja fluidez).

2. Introducción

Los primeros intentos sobre inseminación artificial en cerdos se realizaron entre 1926 y 1927 por Ivanov, posteriormente se continuaron entre 1930 y 1936 por Milovanov. Los primeros diluyentes fueron propuestos por Milovanov en los años 1931-1933 ya que estos primeros estudios de almacenamiento de semen de cerdo, se dio a conocer que solo una parte de espermatozoides en las muestras de semen fresco sobreviven a la preservación de cualquier tipo (Johnson *et al.*, 2000). A medida que disminuye la temperatura, es inevitable que exista una reducción en la proporción de espermatozoides que mantengan la integridad de la membrana normal, además de su estructura y componentes bioquímicos intactos (Johnson *et al.*, 2000).

En los últimos años se han incrementado los estudios referentes a los componentes de la membrana espermática, ya que ésta juega un papel preponderante en los procesos de conservación de los espermatozoides. Los lípidos que forman la membrana celular están involucrados en la respuesta de los espermatozoides a la criopreservación del semen. Cuando se refrigera o congela un eyaculado previamente diluido, la membrana de la célula espermática es el primer lugar donde se manifiestan los efectos del estrés por frío. Por lo tanto, la susceptibilidad de la célula al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide (Johnson *et al.*, 2000). Se ha descrito, en espermatozoides de especies como el verraco o el toro, cuya membrana la relación ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados es muy alta, que son más sensibles al proceso de enfriado. La susceptibilidad al choque térmico se ha relacionado también con el contenido del colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática (Quintero, 2003).

Al llevar a cabo el enfriado se provoca una reorganización en las partículas de la membrana, este proceso a pesar de ser parcialmente reversible, tiene un influjo en la función de la membrana de diferentes maneras: incremento de la permeabilidad, reducción de la actividad enzimática, reducción en la difusión de los procesos de la membrana y cambios en el movimiento lateral de los canales (Johnson *et al.*, 2000).

Un método alternativo para la evaluación de los cambios en la membrana plasmática respecto a la organización de los fosfolípidos y su cambio de fases, es con el colorante hidrófobo

Merocianina 540 (MC540). La MC540 monitoriza la alteración en el orden de empaquetamiento de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática. En el cerdo, la capacitación, el enfriado y crioconservación, provocan modificaciones en la superficie de los espermatozoides, un cambio en la asimetría de fosfolípidos de la membrana plasmática. En estas condiciones, la tinción MC540 también aumenta su fluorescencia, detectando los cambios en la fluidez de la membrana (Harrison y Miller, 2000).

2. Marco Teórico

2.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos que comienza con división de espermatogonias y finaliza con formación de espermatozoides. Este proceso consiste en dos etapas proliferativas (renovación de las células madre y proliferación mitótica de las espermatogonias), seguidas por meiosis y espermiogénesis, durante la cual las espermatidas haploides se transforman en espermatozoides (Vázquez, 2012). De este modo, un pequeño número de células madre espermatogoniales diploides, producen espermatozoides altamente diferenciados que contienen un genoma haploide recombinado (Vázquez, 2012).

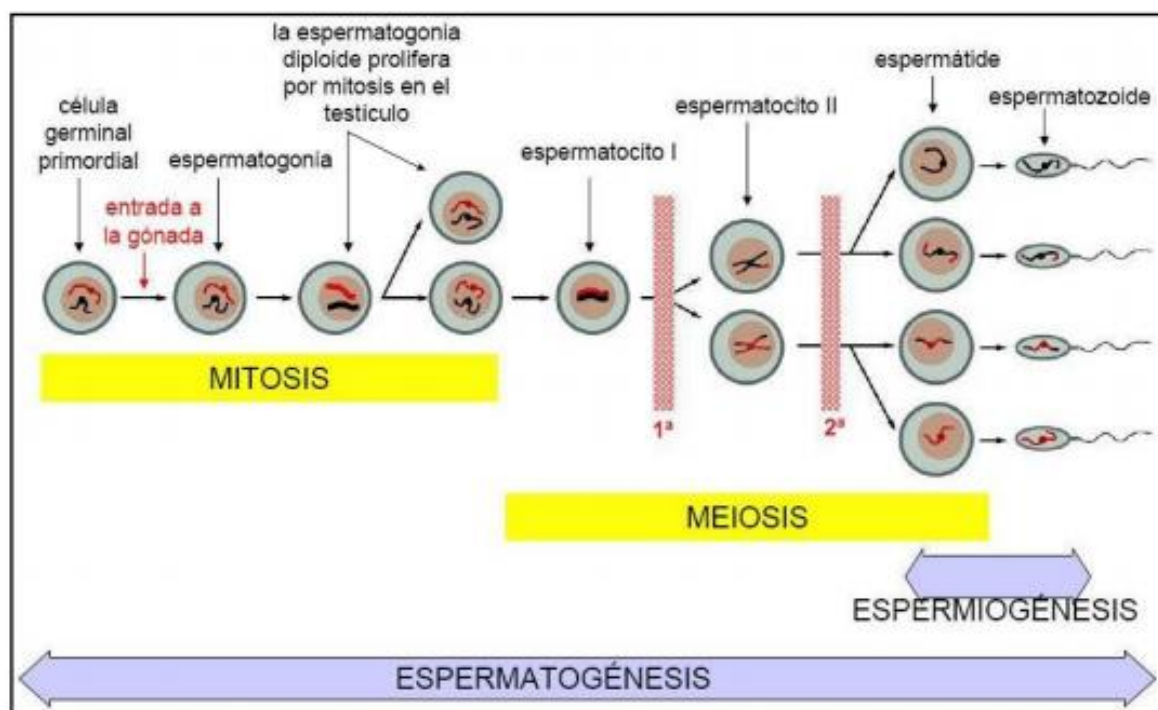


Figura 1. Espermatogénesis: Representación esquemática de las tres etapas en las que se divide.

(Tomada y modificada de Navarro, 2012)

2.2 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula formada por un núcleo haploide, un flagelo para trasladar el núcleo, y un saco de enzimas que le permiten al núcleo penetrar el gameto femenino. La mayor parte del citoplasma del espermatozoide se elimina durante la maduración, dejando solo ciertos organelos que son modificados para la función del espermatozoide. Durante la maduración del espermatozoide, el núcleo haploide se vuelve muy aerodinámico y su DNA resulta fuertemente comprimido. Por delante de este núcleo haploide comprimido se localiza la vesícula acrosómica o acrosoma, que se deriva del aparato de Golgi y que contiene enzimas; por lo tanto, el espermatozoide se considera una vesícula secretora modificada (Scott, 2005). Las enzimas almacenadas en el acrosoma son utilizadas para degradar y atravesar las cubiertas externas del ovocito. El acrosoma y el núcleo constituyen en conjunto la cabeza del espermatozoide (Scott, 2005).

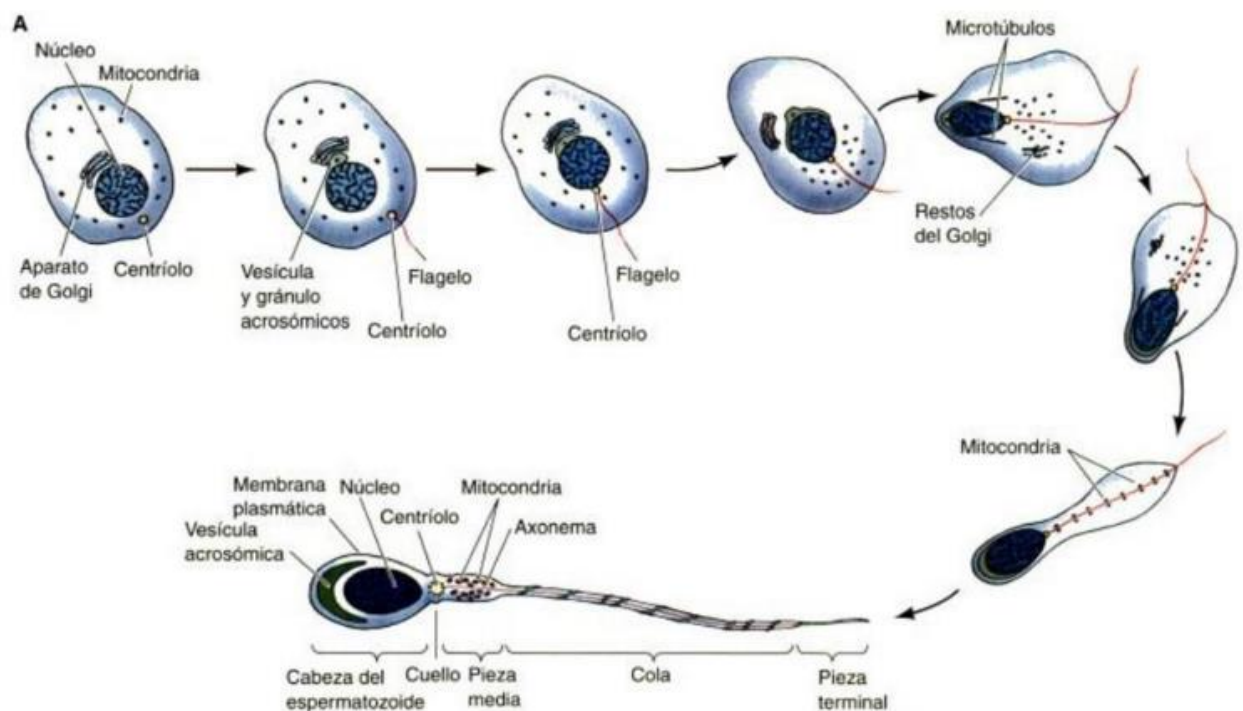


Figura 2. Espermatozoide de mamífero: Modificación de una célula germinal para formar un espermatozoide de mamífero (Tomada de Scott, 2005).

Los medios por los cuales el espermatozoide es impulsado varían de acuerdo a la forma en que cada especie se ha adaptado a las condiciones ambientales. Sin embargo, en la mayoría de las especies cada espermatozoide es capaz de viajar grandes distancias mediante el movimiento de su flagelo. Los flagelos son estructuras complejas; la principal porción motora del flagelo se denomina axonema, que está formado por microtúbulos que emanan del centriolo localizado en la base del núcleo del espermatozoide (Scott, 2015).

En los mamíferos, los espermatozoides liberados durante la eyaculación son capaces de moverse, pero todavía no cuentan con la capacidad para unirse y fecundar al ovocito. Estos estadios finales de la maduración del espermatozoide (denominados capacitación) no se producen hasta que se encuentran dentro del tracto reproductor femenino por un cierto tiempo (Scott, 2015)

2.3 El espermatozoide porcino

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. Es una célula altamente polarizada y especializada con una estructura tripartita conformada por cabeza, pieza media y cola. El espermatozoide, ha evolucionado, originando una enorme diversidad entre especies, que no tienen comparación con ningún otro tipo celular (Johnson *et al.*, 1996; Hafez, 2002).

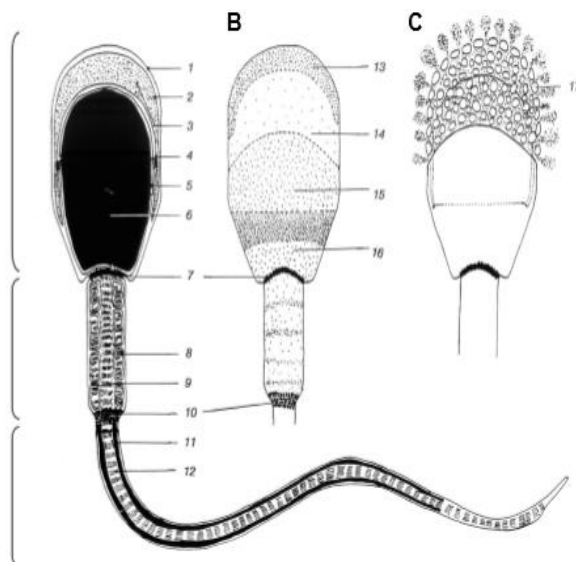


Figura 3. Espermatozoide de cerdo (Flesh y Gadella 2000)

Esquema representativo del espermatozoide de cerdo.

- A) Espermatozoide seccionado. Las líneas enumeradas continuas representan todas las bicapas que constituyen a la membrana: 1, membrana plasmática; 2, membrana acrosomal externa; 3, enzima acrosomal; 4, membrana acrosomal interna; 5, envoltura nuclear; 6, núcleo; 7, zona posterior de anillo y cuello; 8, mitocondria; 9, Parte proximal del flagelo; 10, anillo anular; 11, vaina fibrosa; 12, axonema mas otras fibras densas.
- B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza media con sus subdominios 13, cresta apical; 14, zona pre- ecuatorial; 15, zona ecuatorial; 16, zona post- ecuatorial.
- C) Reacción acrosomal 17, durante la reacción acrosomal la formación de vesículas mixtas a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa.

En el caso particular del cerdo, su espermatozoide se asemeja estructuralmente mucho al de otros ungulados domésticos. La cabeza es de aproximadamente $8.5\mu\text{m}$ de largo; es el doble de largo que de ancho con respecto a los espermatozoides de otras especies, mientras que la pieza intermedia es de aproximadamente $10\mu\text{m}$ de largo y la cola es de $30\mu\text{m}$. La cabeza está cubierta por una estructura derivada del aparato de Golgi que se encuentra en forma de capa denominada acrosoma constituida por una membrana acrosomal interna y una externa, la primera más corta que la segunda, ambas son una extensión de la membrana plasmática del espermatozoide; además, en el interior de ambas membranas se encuentra el contenido acrosomal, compuesto por enzimas que son liberadas durante la reacción acrosomal (Figura 3). Al segmento donde coinciden estas dos partes se le denomina zona ecuatorial (Valdés 2015).

2.4 Membrana plasmática

Es una estructura laminar formada por fosfolípidos (con cabeza hidrofílica y cola hidrofóbica) y proteínas que engloban a las células, define sus límites y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de éstas. También delimita la célula y le da forma (Hafez, 2002).

Las membranas biológicas están compuestas por proteínas asociadas a una matriz constituida por una bicapa lipídica. Sus fracciones de lípidos consisten en mezclas complejas que varían según el origen de la membrana y, hasta cierto punto, con la dieta y el organismo que produjo la membrana. Las proteínas de la membrana llevan a cabo procesos dinámicos asociados con las membranas por lo que ciertas proteínas específicas solo se encuentran en membranas determinadas (Hafez, 2002).

La relación proteína:lípido de las membranas varían considerablemente según la función de la membrana. La membrana plasmática está formada por lípidos, proteínas y, en menor medida, por glúcidos. La estructura y la organización de las membranas celulares, así como sus propiedades, están condicionadas fundamentalmente por los lípidos. Estos son moléculas anfipáticas, que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas se encuentran en el centro de la membrana y las hidrofílicas en contacto con el agua. Entre los lípidos se insertan las proteínas denominadas integrales o transmembrana, que poseen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos entre las cadenas de los ácidos grasos de los lípidos y

dominios hidrofílicos que están con la solución acuosa intra y extracelular. También hay proteínas asociadas a una u otra superficie de la bicapa lipídica. Los glúcidos no aparecen en todas las membranas, por ejemplo en algunas intracelulares pero son abundantes en la que delimita la célula con el medio externo (la membrana plasmática), localizados en la superficie extracelular; los glúcidos se encuentran unidos covalentemente a los lípidos o a las proteínas (Hafez, 2002; Megías *et al.*, 2014).

2.5 Propiedades de las membranas plasmáticas

Parte de las funciones de las membranas son debidas a sus propiedades fisicoquímicas: es una estructura fluida que hace que sus moléculas tengan movilidad lateral, como si de una lámina de líquido viscoso se tratase (Megías *et al.*, 2014). Es semipermeable, por lo que puede actuar como una barrera selectiva frente a determinadas moléculas; posee la capacidad de romperse y fusionarse de nuevo sin perder su organización, con excepción de la membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos, la cual ha perdido esa capacidad, al ser una célula más especializada, es una estructura flexible y maleable que se adapta a las necesidades de la célula, está en permanente renovación, es decir, eliminación y adición de moléculas que permiten su adaptación de moléculas que permiten su adaptación a las necesidades fisiológicas de la célula (Hafez, 2002).

2.5.1 La bicapa lipídica

Se ha establecido que la bicapa lipídica es la base universal de la estructura de la membrana plasmática. Las propiedades de los lípidos que forman las membranas son las responsables de las propiedades generales de las membranas, los lípidos de las membranas celulares combinan dos propiedades distintas en una misma molécula: tienen una cabeza hidrofílica y una o dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas (Figura 4). Los lípidos de membrana más abundantes son los fosfolípidos, en los cuales el grupo del extremo hidrofílico se encuentra unido al resto de la molécula por medio de un grupo fosfato (Megías *et al.*, 2014).

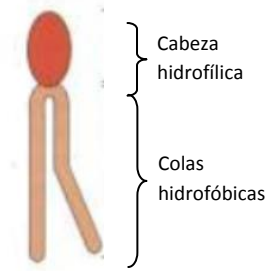


Figura 4: Esquema de una típica molécula lipídica de la membrana (Tomado y modificado de Hafez, 2002)

Las moléculas anfipáticas como los fosfolípidos están sujetas a dos fuerzas conflictivas: la cabeza hidrofílica es atraída por el agua, mientras que las colas hidrofóbicas rehúyen el agua y tienden a agregarse a otras moléculas hidrofóbicas. Este conflicto se resuelve maravillosamente con la formación de una bicapa lipídica, una disposición que satisface ambas partes y es lo más favorable desde el punto de vista energético. Las cabezas hidrofílicas quedan expuestas al agua mientras que todas las colas hidrofóbicas quedan alejadas del medio acuoso, unas junto a otras en el interior del sándwich (Alberts 2008; Megías *et al.*, 2014).

El ambiente acuoso dentro y fuera de la célula impide a los lípidos de la membrana escaparse de a bicapa, pero nada impide que estas moléculas se desplacen y cambien de posición las unas respecto a las otras dentro del plano de la bicapa. Por lo tanto, la membrana se comporta como un fluido bidimensional, lo cual es crucial para sus funciones. Esta propiedad es distinta de la de flexibilidad, que es la capacidad de la membrana para doblarse. La flexibilidad de la membrana también es importante, y establece un límite menor de aproximadamente 25nm para el tamaño de la vesícula que las membranas celulares pueden formar (Megías *et al.*, 2014).

El grado de fluidez de una membrana celular, la facilidad con la que sus moléculas lipídicas se desplazan en el plano de la bicapa, es importante para su función y se ha de mantener dentro de unos ciertos límites. La fluidez de una bicapa lipídica a una temperatura determinada depende de su composición de fosfolípidos y, especialmente, de la naturaleza de las colas, cuanto más regular y más compacto sea el empaquetamiento de estas colas, más viscoso y menos fluido será la bicapa. Dos propiedades de las colas hidrocarbonadas afectan

su empaquetamiento en la bicapa: su longitud y su insaturación (es decir, el número de dobles enlaces que contienen) (Edidin, 2003; Megías *et al.*, 2014).

2.6 Membrana plasmática del espermatozoide

Los espermatozoides son células especializadas para el almacenamiento y transporte de material genético. Tienen la capacidad de la motilidad activa y de la fertilización del óvulo. Durante la espermatogénesis, la posterior maduración en el epidídimo y finalmente en el tracto genital femenino, el espermatozoide obtiene estas habilidades que dependen en gran medida de la función de su membrana plasmática (Aurich, 2005).

El espermatozoide está rodeado por una membrana plasmática que lo delimita, del entorno externo. La membrana plasmática cubre la célula espermática en su totalidad manteniendo unidos sus organelos y los componentes intracelulares, debido a sus características semi-permeables mantiene el gradiente químico de iones y otros componentes solubles (Silva y Gadella, 2006). La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y se conforma de cinco dominios específicos: el dominio del acrosoma, el dominio del segmento ecuatorial, el dominio de la pieza media, el dominio de la pieza principal, y el dominio de la pieza final. Las diferencias entre estas regiones están relacionadas a sus diferentes funciones fisiológicas (Aurich, 2005). La membrana plasmática del espermatozoide cumple un rol regulador importante en el mantenimiento de la viabilidad y funciones que permiten la fertilización del ovocito (Villa, 2009).

La composición química de las membranas espermáticas contiene altas concentraciones de fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados de cadena larga (Morales, 2010). También contiene importantes concentraciones de colesterol, molécula que juega un papel clave en la modulación de la fluidez de membrana, mientras que la cantidad de proteínas es casi la misma que la cantidad de lípidos totales (Morales, 2010).

Las diferentes regiones de la membrana plasmática difieren en su proporción de colesterol / fosfolípidos. En comparación con otras especies, en el cerdo, la membrana plasmática de los espermatozoides de los cerdos tiene relativamente un alto contenido de colesterol (aproximadamente 37%). Sin embargo, el contenido de colesterol no sólo es distinto entre las

especies, sino también entre los machos dentro de una especie y entre eyaculados individuales de un solo macho (Gadella *et al.*, 2001).

El estudio detallado de la estructura y función de esta membrana plasmática es muy necesario cuando se requiere emplear con éxito biotecnologías de conservación espermática. 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 (Alcántar, 2015).

La membrana plasmática del espermatozoide está altamente compartimentada, cada compartimiento presenta composición y organización muy característica, dando origen a las propiedades físicas y a sus distintas funciones. Estos compartimientos son principalmente:

- La red mitocondria-flagelar (importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide).
- El núcleo (necesario para el almacenamiento estable del ADN).
- La cabeza (la cual destaca la porción anterior fundamental para la apropiada activación acrosómica).
- El segmento posterior (imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito).

Cambios de pH, de temperatura u osmolaridad del medio ambiente circundante son factores que pueden causar cambios irreversibles en la membrana plasmática que limitarían la función fecundante de los espermatozoides (Watson, 2000).

Otro factor que puede afectar la estructura principal de la membrana plasmática del espermatozoide es el protocolo de crioconservación. La viabilidad celular asociada a los procesos de crioconservación depende, exclusivamente, de la integridad de la membrana plasmática. La resistencia o susceptibilidad que presenta la membrana plasmática a estos procesos puede estar influenciada por dos razones: su composición bioquímica y su fluidez, asimismo de otros mecanismos, como las proteínas del citoesqueleto que están unidas a las estructuras intramembranas (Medrano *et al.*, 2012).

Ashworth (1995) ha propuesto que después de la congelación y al descongelado el espermatozoide entra a un estado que asemeja una capacitación prematura, proceso similar al

que se dan en condiciones fisiológicas. Los procesos de congelación y descongelación producen un movimiento de solutos y de moléculas de agua a través de las membranas celulares lo que puede superar las resistencias físicas de éstas; en este sentido, la mayoría de los procesos de transporte a través de la membrana dependen de la fluidez de ésta, que a su vez depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos y de la temperatura (Rodríguez, 2005). La relación fosfolípidos-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-lípidos sea diferente en varios dominios de la membrana plasmática del espermatozoide. 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) (Yanagimachi, 2015).

2.7 Fluidez de la membrana

La fluidez de la membrana es importante para la célula por muchas razones. Permite a las proteínas de membrana difundir rápidamente en el plano de la bicapa y que interaccionen unas con otras (Hidalgo *et al.*, 1996). La fluidez de una membrana se puede definir como la propiedad que indica con qué facilidad es posible el movimiento (traslacional, rotacional y vibracional) dentro de ella. El concepto de fluidez se refiere específicamente a las propiedades de la región hidrófoba de la membrana. 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 ellas con respecto al plano de la bicapa, sin considerar el movimiento de las cabezas polares. Una membrana muy fluida permite mayor movimiento entre ella. La fluidez de una membrana es una propiedad macroscópica resultante de la suma de las propiedades individuales de sus componentes y se podría considerar que tiene una relación inversa a su viscosidad, con la salvedad de que se trata de un líquido anisotrópico (Hidalgo *et al.*, 1996).

Además la fluidez de la membrana puede variar con la composición química de sus componentes. Así, generalmente, la menor longitud o la mayor cantidad de enlaces insaturados de las cadenas de ácidos grasos hacen que las membranas sean más fluidas. El colesterol también influye, pero su efecto depende de las condiciones de temperatura y

composición lipídica. En general se puede decir que mayor concentración de colesterol disminuye la fluidez de la membrana plasmática (aunque a bajas temperaturas favorece la fluidez) (Megías *et al.*, 2014).

2.7.1 Transición de fase en las membranas

Los lípidos en las membranas biológicas pueden hallarse en dos estados, uno 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 cierta temperatura para cada fosfolípido específicamente. En el estado líquido-cristalino las cadenas 9 hidrocarbonadas adquieren considerablemente más movilidad. Aunque el glicerol y la cabeza polar mantienen un arreglo regular, se ha observado un 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 5) (Hazel, 1995; Hidalgo *et al.*, 1996). Se sabe que a temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado regularmente fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (Hidalgo *et al.*, 1996). Todos los lípidos pasan por una fase de transición, desde un estado fluido o líquido-cristalino a un estado de gel a medida que la temperatura disminuye. Para una apropiada función se requiere que la membrana se encuentre en estado fluido; cada especie de lípido pasa por esta transición de fase a una temperatura específica (McKinnon y Voss, 1995).

La temperatura pico de transición de fase para fosfolípidos en potros es 20.7°C, comparado con 24°C en cerdo, 25.4°C en toro y en el gallo 24.5°C. Es posible que estos datos reflejen diferencias en las distintas tolerancias de los espermatozoides a las rápidas disminuciones de temperatura (Parks y Lynch, 1992).

Existen algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los lípidos no-bicapa, que 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 cuando 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 (Hazel, 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 (De Leeuw *et al.*, 1990). Después de la refrigeración y principalmente tras el calentamiento, los micro-dominios de la bicapa de lípidos, no restablecen las asociaciones con los restantes componentes de la membrana y las regiones resultantes de agregados hexagonales pueden potencialmente desestabilizar la membrana (Hazel, 1995)

2.8 Criobiología

La criobiología se considera la ciencia multidisciplinaria que estudia los efectos, físicos y biológicos de las temperaturas bajo cero en las células y tejidos, especialmente menor que el punto de congelación del agua, 0°C (Gao y Crister, 2000).

El objetivo principal de la criobiología es conocer los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares y su aplicación al desarrollo de protocolos mejorados (Figura 6) (Woods, 2004). Un porcentaje importante de la investigación realizada en criobiología, se ha enfocado a la conservación de diferentes tipos de células somáticas, como son los eritrocitos o líneas de cultivo celular (Holt *et al.*, 2005), además de dar a conocer los mecanismos físicos y biológicos relacionados con los daños producidos en las células cuando se someten a bajas temperaturas (lesión criogénica); y con el cambio de fase del agua en los ambientes intracelular y extracelular (formación de cristales de hielo) (Gao y Crister, 2000).

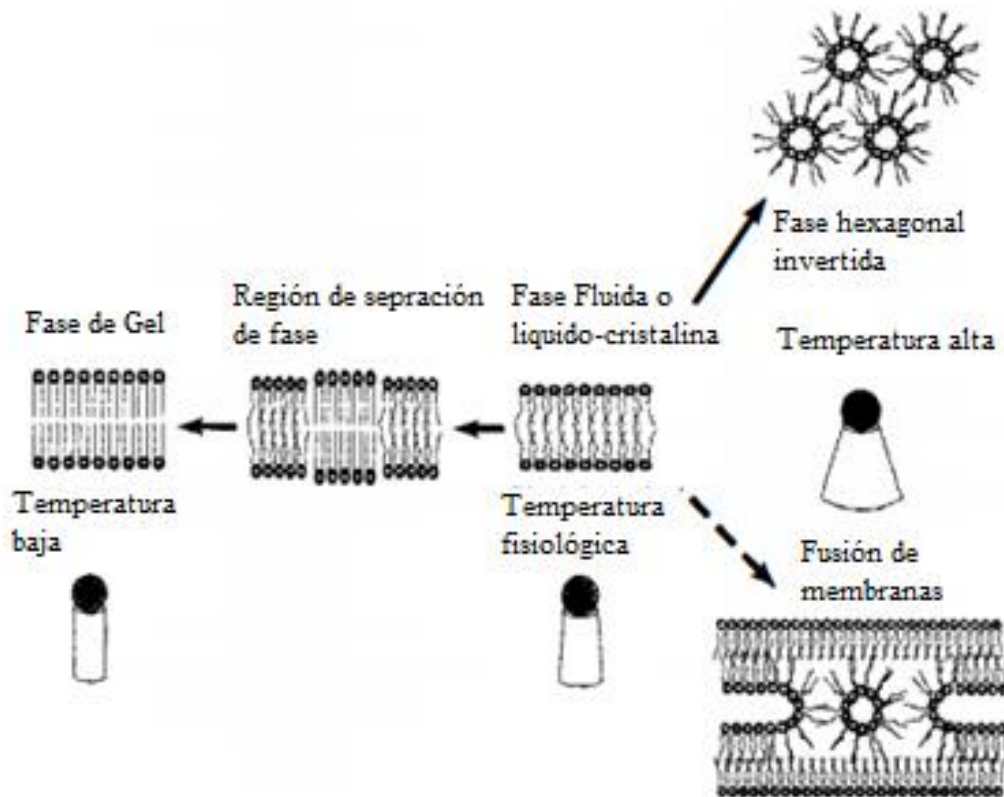
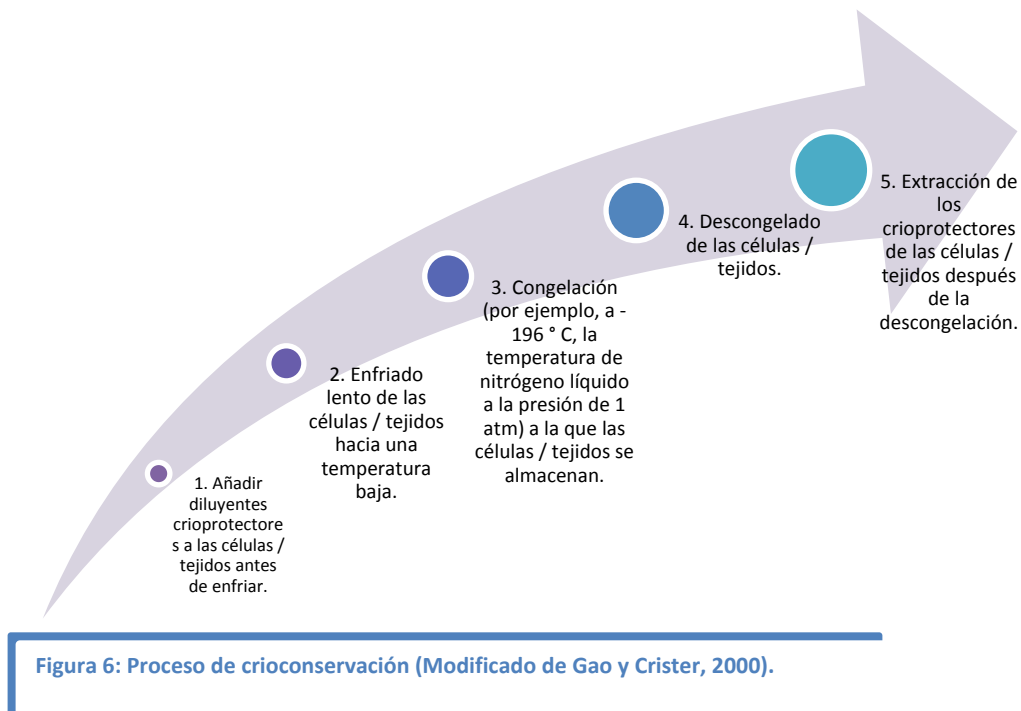


Figura 5: Transición de fase en las membranas. Las flechas continuas indican el efecto de un aumento o descenso de la temperatura en el comportamiento de la fase y de la geometría molecular de los fosfolípidos de membrana. La temperatura fisiológica se refiere a la temperatura en la que un organismo se adapta. La flecha punteada ilustra la supuesta participación de la fase hexagonal invertida en la fusión de membranas (Hazel, 1995).

Una de los problemas principales del proceso de crioconservación, es la variabilidad del éxito en los protocolos de congelación, no solo en los diferentes tipos de células, sino también en los mismos tipos de células de diferentes especies. Al aplicar los principios básicos teóricos de la criobiología a los espermatozoides de mamíferos, no se han obtenido resultados exitosos, debido a la elaborada diferenciación morfológica y extensiva heterogeneidad de la membrana mostrada por las células espermáticas (Holt *et al.*, 2005).



Aunque el fenómeno de la criopreservación se ha intentado llevar a cabo desde hace muchos años en diferentes especies, su aplicación está limitada al ganado bovino y se ha desarrollado en importantes industrias agrícolas como la acuicultura, en la cual se ha practicado con éxito, sin embargo continua siendo muy limitada (Holt *et al.*, 2005).

Los protocolos de criopreservación en semen de toro han tenido pocos avances durante los últimos años; el porcentaje de éxito de supervivencia de los espermatozoides después de descongelados oscila entre el 30% y el 40% usando los métodos tradicionales. Sin embargo, hay científicos que han trabajado en proyectos de investigación y que han adoptado un enfoque empírico para mejorar el índice de supervivencia actual. El ensayo de múltiples facetas en el procedimiento de criopreservación ha servido para determinar las operaciones óptimas y ha tenido éxito en el desarrollo de nuevas propuestas para el método (Holt *et al.*, 2005).

2.8.1 Criobiología aplicada en industria porcina

Durante la última década, la industria porcina ha evolucionado para facilitar el movimiento y la preservación de una amplia gama de rasgos genéticos de importancia comercial y así introducir en empresas multinacionales de genética porcina, el mantenimiento de sus rebaños en el mundo. Aun así, tienen una gran demanda en cuanto a las técnicas de reproducción

asistida en las granjas porcinas, implementando variaciones en el material genético (Johnson *et al*, 2000).

En realidad, el almacenamiento de semen criopreservado, facilitaría programas extendidos de reproducción y la diversidad genética altamente controlada, estabilidad prolongada del material genético y programas de distribución en el mundo. Hasta la fecha, la industria porcina no ha hecho la transición a semen congelado ya que el impacto económico que tiene es negativo. El uso de espermatozoides criopreservados contribuye a una reducción del 10% al 50% en las tasas de parto y a un tamaño medio de la camada de 1.5 a 3.0 lechones menos si se compara con la Inseminación Artificial (IA) con semen refrigerado (Johnson, *et al* 2000). Además, el panorama es desalentador cuando se considera que la pérdida de los espermatozoides no solo es por el procedimiento de criopreservación, sino también cuando los espermatozoides congelados-descongelados tienen un período de vida más limitada, y por lo tanto el uso de espermatozoides criopreservados requiere la detección de celo más exacta y precisa al realizar la técnica de IA (Johnson *et al*, 2000).

Al igual que en las industrias de la carne y los productos lácteos, aproximadamente el 99% de la IA realizada en cerdos utiliza semen diluido en diluyentes especiales que le permiten durar hasta 7 o más días posteriores a la recolección a 18°C con una reducción mínima en la fertilidad y fecundidad. Estas temperaturas son críticas, sin embargo, tan pronto llegan a temperaturas inferiores a 15°C puede reducir significativamente la fecundidad, ya que los espermatozoides porcinos son "sensibles a choque frío". Esto ocurre cuando el eyaculado fresco se somete con rapidez a una baja temperatura, de la temperatura corporal a temperaturas por debajo de 15°C; el resultado es un incremento del número de espermatozoides con una baja viabilidad, especialmente cuando se continúa un enfriado rápido hasta 1-2°C (Johnson *et al*, 2000).

2.9 Aumento de la fluidez de la membrana relacionado con choque frío en espermatozoide de cerdo

Los espermatozoides de cerdo son susceptibles a un enfriamiento rápido, por ejemplo, de 35 ° C a 15 ° C y son especialmente sensibles al frío cuando se enfría por debajo de 15 ° C, el rango de daño en el esperma durante el enfriamiento depende de la velocidad y el umbral de temperatura de refrigeración, un rápido enfriamiento genera en los espermatozoides un

“choque frío” (Gączarzewicz *et al.*, 2015). Los cambios de temperatura inducen un estrés sobre la membrana del espermatozoide de cerdo; se cree que la susceptibilidad al choque frío puede estar relacionada a la composición de la bicapa lipídica de la membrana, afectando directamente a la fluidez de la membrana plasmática (Harrison, 2000).

A medida que disminuye la temperatura, hay una restricción del movimiento lateral de los fosfolípidos de la membrana, lo cual ocasiona un cambio físico, de fluido a gel. Con la diferencia de temperaturas existe un cambio en la translación de los lípidos de la membrana, produciendo la separación de fases, por lo cual las proteínas tienden a ser irreversiblemente agrupadas (Johnson *et al.*, 2000).

Estas diferencias que se observan durante el enfriado son explicadas por la composición de la membrana, es por esto que existe una resistencia al frío en los espermatozoides de toro y una sensibilidad al enfriado en el espermatozoide de cerdo. La composición de los fosfolípidos de los ácidos grasos es lo que determina el comportamiento de los cambios de fase de la membrana plasmática, las diferencias más significativas entre el espermatozoide de cerdo y el espermatozoide de toro se encuentran entre los tipos de fosfolípidos, existe un porcentaje más bajo de fosfatidilcolina y un porcentaje más alto de fosfatidiletanolamina y esfingomiélin en el cerdo, esto dificulta la evaluación de la estabilidad de la membrana del espermatozoide de cerdo con base en la diferencia de la composición de los fosfolípidos (Johnson *et al.*, 2000).

Otro factor que influye en el comportamiento termotrópico de las membranas es el porcentaje de colesterol. La relación colesterol/fosfolípido en el espermatozoide de cerdo es muy bajo y el colesterol está distribuido asimétricamente, presentándose más en la parte externa de la monocapa de la membrana que en la parte interna de la misma. Esta combinación provoca que la monocapa interna sea especialmente vulnerable al choque frío (Johnson *et al.*, 2000).

Al llevar a cabo el enfriado se provoca una reorganización en las partículas de la membrana, este proceso a pesar de ser parcialmente reversible, tiene un influjo en la función de la membrana de diferentes maneras:



La dilución y la congelación provocan que la membrana del espermatozoide de cerdo sea más permeable (Johnson *et al.*, 2000).

Se hace un énfasis en los eventos de la transición de fases de la membrana concomitante a la entrada de iones de Calcio libre para la envoltura interna de la célula. Esto estimula los procesos dependientes de calcio asociados con la capacitación, y en consecuencia provoca que la membrana celular sea más fusogénica, con esto ocurre un mecanismo usual de capacitación prematura (Johnson *et al.*, 2000).

2.10. Diluyentes y crioprotectores

El semen de cerdo es diferente en muchos aspectos con respecto al semen de otros animales domésticos: es producido en grandes volúmenes y es extremadamente susceptible al choque frío o enfriamiento brusco inmediatamente después de su recolección. Por esto y otras características, el semen de cerdo requiere especial consideración para el diseño de protocolos de congelación (Johnson *et al.*, 2000).

Entre los factores que se deben considerar para los protocolos de congelación son el diluyente y crioprotectores adecuados y/o específicos. Durante las últimas tres décadas muchos diluyentes se han elaborado, muchos para protocolos de procesos particulares, por lo que generalmente no son diluyentes transferibles de un método a otro. En general, los diluyentes están compuestos por azúcares, proteínas y lipoproteínas (yema de huevo), amortiguadores de pH (TRIS), aditivos y agentes crioprotectores como el glicerol (Johnson *et al.*, 2000).

Aunque la composición de los diluyentes varía, muchos se caracterizan por las bajas concentraciones de glicerol. No obstante, la concentración de glicerol se determina por la velocidad de enfriado (3% a 30°C/min), ya que un incremento en el glicerol, así como una adición rápida del mismo puede ser tóxico para los espermatozoides, provocando una pérdida de la motilidad e integridad acrosomal (Johnson *et al.*, 2000).

Por lo tanto, el glicerol se ha utilizado extensamente para la protección del semen de cerdo, y en general, es el crioprotector de elección para la preservación de semen de otros mamíferos. Sin embargo, el espermatozoide de cerdo muestra una gran sensibilidad en comparación con espermatozoides de otros animales domésticos, por consiguiente se deben utilizar niveles de glicerol adecuados para una óptima crioconservación (Johnson *et al.*, 2000).

2.11 Merocianina 540

Se han realizado estudios microscópicos diseñados para revelar la presencia y tipología de la distribución de los componentes de la superficie de una célula viva mediante sondas fluorescentes, presuntamente específicas (Williamson *et al.*, 1983). Para este fin, se han empleado fluoróforos que actúan como marcadores de macromoléculas, tales como anticuerpos, lectinas y ligandos específicos de membrana. Sin embargo, sólo existen sondas hidrofóbicas pequeñas, ya sea fluorescente natural o conjugado con un fluoróforo, que aportan información sobre la estructura y organización de la mitad de los lípidos de la membrana. Existe una tinción fluorescente natural, particularmente especializada en esta última clase de sondas, la MC540 (Williamson *et al.*, 1983).

La MC540 es una molécula fluorescente natural lipofílica que se une a la bicapa, preferentemente a los lípidos que se encuentran “desordenados” o “mal empaquetados”, esto se refiere a los cambios que fluctúan en la bicapa lipídica; cuando se une a la membrana plasmática de las células vivas, esta molécula responde a los cambios rápidos en el potencial de membrana, teniendo un ligero cambio en la absorción y emisión de la sonda fluorescente (Williamson *et al.*, 1983).

También se ha demostrado que la MC540 reorganiza dominios discretos de los leucocitos, células del sistema hematopoyético, células inmaduras de eritrocitos, macrófagos y células espermáticas (Williamson *et al.*, 1983).

La microscopía de fluorescencia se ha utilizado para demostrar que aquellos protocolos que producen alguna fijación diferencial en las membranas plasmáticas de las células vivas también produzcan fijación diferencial en bicapas artificiales que estén en diferente fase: las bicapas en fase fluida fijan la MC540 fuertemente, mientras que las membranas en fase de gel no lo hacen. La observación de que el espectro de absorción de la Merocianina 540 en la presencia de vesículas artificiales cambia de un espectro acuoso a uno hidrofóbico a medida que la temperatura aumenta a lo largo de la temperatura de transición de fases, se puede interpretar como un indicativo de una fijación preferencial a bicapas en fase fluida, como lo hacen las mediciones calorimétricas que muestran que la Merocianina 540 incorporada en vesículas induce la aparición de una transición de fases a una temperatura menor que la mostrada por vesículas de fosfolípidos puros (Williamson *et al.*, 1983). Por lo tanto, el cambio

de los lípidos se detecta a través de un aumento de la capacidad para la unión de la MC540, que como se ha demostrado tiene una afinidad por la bicapa lipídica de la membrana plasmática, la cual depende del grado de desorden estructural de los lípidos (Harrison y Miller, 2000).

Aunque el mecanismo molecular preciso del aumento en la unión de MC540 a la bicapa de la membrana plasmática con aumento de fluidez en espermatozoides sigue siendo incierto, cambios similares en otro tipo de células se han interpretado como un indicativo de un colapso de la asimetría transversal de la distribución de los fosfolípidos de la membrana plasmática concomitante a un aumento en la desestabilización de estas estructuras (Harrison y Miller, 2000).

2.12 Evaluación del semen

Incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso de inseminación artificial. Entre todas las pruebas detallaremos las siguientes:

2.12.1 Evaluación macroscópica de semen de cerdo

2.12.1.1 Color

Es normalmente gris a blanco grisáceo. En caso de haberse colectado solamente la segunda fracción (espermio-rica) el color se hace o más blanco o tira a amarillento, dependiendo del verraco y de la concentración espermática. La contaminación con sangre, suciedad o flóculos se observa fácilmente y se considera inaceptable. La determinación del pH y la presencia de hemoglobina pueden realizarse con ventaja en forma inmediata a la colección del semen (Johnson *et al.*, 2000).

2.12.1.2 Olor

El olor del semen del verraco es sui generis; en caso de contaminación con orina, presentará modificaciones características como mayor volumen, escasa concentración y pH alto (Johnson *et al.*, 2000).

2.12.1.3 Densidad

Se da por la concentración espermática del eyaculado. Altas concentraciones resultan en densidades más altas y viceversa. Para medirla se utiliza un densímetro (Johnson *et al.*, 2000).

2.12.2 Evaluación microscópica del semen de cerdo

2.12.2.1 Concentración espermática

La concentración espermática es una de las pruebas de análisis seminal más importante. Existe una variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar. La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra, entre estos métodos destaca la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámara de recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thomas (Quintero, 2003).

Este análisis se lleva a cabo mediante contaje en un microscopio óptico con el que se examina la muestra de semen previamente diluida con solución fijadora formolada al 0.3%. Los preparados se mezclan cuidadosamente y se contabilizan en el microscopio con un aumento de 40x, empleando por comodidad un contador manual. El fondo de la cámara está grabada con dos cuadrículas de recuento, separadas entre ellas por una ranura, sobre esta cámara se coloca un cubreobjeto que delimita su profundidad (Quintero, 2003).

Se procede a contabilizar los espermatozoides que se encuentran en la cuadrícula inferior y superior de la cámara, cada cuadrícula cuenta con 25 cuadros, a su vez, éstos cuentan con 16 cuadros, de los cuales solo se contaron los espermatozoides contenidos en 5 cuadros de los 25 cuadros centrales (los dos superiores de los extremos, los dos inferiores de los extremos y el central), tomando en cuenta solo los espermatozoides que queden dentro del cuadro y los que toquen alguna de las 3 líneas de la parte superior e izquierda del mismo. Se calcula un promedio de ambas cuadrículas y se multiplica por 10 millones, obteniendo la concentración de espermatozoides por ml.

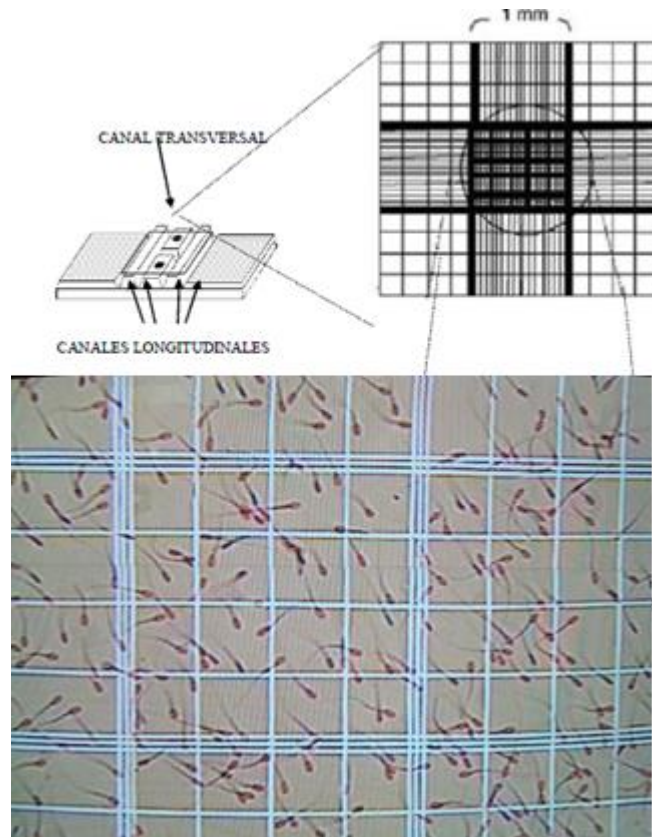


Figura 7: Camara de Neubauer. (Tómada y modificada de Alcántar, 2015)

2.12.2.2 Motilidad espermática

La movilidad o motilidad espermática es el parámetro más frecuentemente utilizado para medir la calidad de un eyaculado, a pesar de que presenta una pobre correlación con la fertilidad en vivo. Existen varias formas para su estudio, y aunque cada vez tiene más presencia los sistemas de análisis computarizado (CASA), que realizan una evaluación de ciertos parámetros cinéticos, hoy en día todavía sigue utilizándose la valoración visual con microscopía óptica prácticamente como único método en los centros de inseminación artificial porcina (Bonet *et al.*, 2006).

La motilidad es una manifestación de competencia estructural y funcional del espermatozoide, de tal manera que el resultado obtenido en esta técnica usualmente es la correlación positivamente con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal (Peña-Martinez, 2004) Se pueden determinar dos tipos de motilidad en un eyaculado:

- La motilidad masal: es el movimiento de superficie que releja la movilidad de las células espermáticas en su conjunto. Se trata de una valoración subjetiva que clasifica a los eyaculados de de 0 a 5 en función del número, densidad y velocidad de movimiento de las ondas o remolinos que se forman en la superficie de la gota del semen (Tabla 1).
- Motilidad Progresiva: se trata de una valoración cualitativa, ya que se observa el porcentaje de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento, progresivo y en línea recta. Los valores aceptados como mínimos para considerar un eyaculado como apto, para todos los mamíferos, serían 75% de espermatozoides móviles y un 65% de espermatozoides con movimiento progresivo.

2.12.2.3 Morfología

Es otra prueba importante de la contrastación rutinaria del semen, ya que nos aporta una referencia sobre la fertilidad de un determinado eyaculado. Las anomalías morfológicas del espermatozoide pueden ser clasificadas de acuerdo a la región afectada (Bonet *et al.*, 2006).

Tipo de movimiento	Valoración	Categoría del semen
Ondas escasas con movimiento muy rápido	5	Excelente
Ondas de movimiento vigoroso pero inferior al anterior	4	Buena
Ondas de movimiento lento	3	Regular
Ondas inexistentes pero movimiento observable en la mayoría de los espermatozoides	2	Escasa
Ondas inexistentes, pocos espermatozoides móviles	1	Deficiente
Ondas inexistentes espermatozoides inmóviles	0	Pésima

Tabla 1: Valoración de la motilidad masal (Tomada de Bonet *et al.*; 2006).

- Anomalías primarias: son las anomalías que presentan aberraciones que se presentaron durante la espermatogénesis (Peña-Martínez, 2004)

- Anormalidades secundarias: son las anormalidades que ocurren durante la maduración espermática en el epidídimo o posterior a la eyaculación (Peña-Martínez, 2004).

2.12.2.4 Integridad funcional de la membrana plasmática

El espermatozoide está rodeado por una membrana que permite, entre otras actividades fisiológicas, el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de la célula, siempre y cuando esté presente una integridad funcional y estructural. La vitalidad espermática haría referencia a la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, ya que la pérdida de permeabilidad selectiva en esta membrana va a hacer que el espermatozoide sea incapaz de mantener las concentraciones necesarias de iones y solutos, perdiéndose importantes metabolitos y coenzimas, lo que conducirá a la supresión de la motilidad y de todas las funciones vitales (Bonet *et al.*, 2006).

2.12.2.4.1 Eosina/Nigrosina.

El uso de tinciones supravitales como lo es 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).

2.12.2.5 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 (Petrunina y Harrison, 2013).

Se han descrito una gran variedad de fluorocromos para evaluar la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, el método más extendido hoy día es la combinación de SYBR-14

con yoduro de propidio. Estas sonda 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.

2.12.2.5.1 SYBR14 en combinación con yoduro de propidio (SYBR14/PI)

El SYBR-14 es una sonda permeable capaz de atravesar membranas intactas (espermatozoides viables) mientras que tanto el Ioduro de propidio como el homodímero de etidio solo atraviesan la membrana del espermatozoide si está rota (son impermeables). Por tanto usando esta combinación de fluorocromos se obtendrán las siguientes subpoblaciones celulares; los espermatozoides con fluorescencia verde por el SYBR-14, son por lo tanto células vivas y espermatozoides que se observan con fluorescencia roja por el PI, son por tanto células con la membrana completamente alterada (Bonet *et al.*, 2006).

2.12.2.6 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.

3. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas clásicas que se emplean para la evaluación de la calidad de los espermatozoides frescos, refrigerados y descongelados proporcionan información útil sobre su potencial fértil, sin embargo son insuficientes. A mayor cantidad de información sobre las características morfo y fisiológicas de los espermatozoides, mayor será la certeza sobre su capacidad fértil; esto nos proporciona más herramientas para decidir cuál protocolo de conservación es el mejor. La MC540 proporciona información más amplia sobre la fluidez de la membrana y así la viabilidad del espermatozoide. Esta prueba se usa generalmente con citometría de flujo, aunque originalmente se describió con microscopía de fluorescencia. Por esto, en este trabajo se pretende estandarizar en nuestras condiciones de trabajo el uso de la Merocianina empleando microscopía de fluorescencia.

4. Objetivo general

Comparar el efecto del enfriado pre-congelación entre 2 temperaturas, +5°C y -5°C, sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar los cambios de fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo capacitados por medio de la incubación, empleando el marcador fluorescente Merocianina 540.
2. Determinar los cambios de fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo enfriados a +5°C con dos diferentes medios: TALP y BTS.
3. Comprobar el efecto de 2 distintas temperaturas blanco de enfriado pre congelación (+5°C y -5°C) sobre la fluidez de la membrana plasmática de semen de cerdo.

5. Material y métodos

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

5.1 Obtención y transporte semen

El semen de cerdo se obtuvo de 6 sementales híbridos, del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP - FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en Jilotepec, Estado de México.

La colección se realizó dos veces por semana utilizando diferentes machos en cada muestra, mediante la técnica de la “mano enguantada”(Ver anexo 1), posteriormente fue diluido (1:1 v/v) en un diluyente comercial* (MAGAPOR®)¹ para su transporte al laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES–C. El semen fue transportado en recipientes aislados (termos), con camas de gel, a una temperatura inicial, al llegar al CEIEPP de 32°C y una temperatura final, al llegar al laboratorio de 28°C, para evitar cambios bruscos de temperatura.

5.2 Evaluación de semen

Al llegar al laboratorio, el semen se dejó atemperar durante 30 min a una temperatura de cuarto de 21°C, aproximadamente, en seguida se realizó una evaluación como se describe a continuación:

5.2.1 Evaluación macroscópica:

Se realizó considerando las siguientes variables:

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

¹ (MAGAPOR®: Producto comercial de Empresa Registrada a Magapor S.L. España. Con fecha 09/07 /2001 AENOR emitió el certificado n° ER-1028/2001

5.2.2 Evaluación microscópica

5.2.2.1 Motilidad Masal (MM):

Se colocó una gota al centro de un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica a una temperatura de 37°C, se observó en el microscopio a 100 y 200 aumentos, el borde de la gota; se dio un valor de 1 a 3 considerando los siguientes criterios:

0	Ondas inexistentes espermatozoides inmóviles.
1	Espermatozoides móviles, pero no alcanzan a formar ondas.
2	Formación de ondas, pero muy lentas.
3	Formación de ondas que se muevan rápidamente

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

5.2.2.2 Concentración espermática:

Se realizó una dilución 1:200 (1990 µl de solución salina formolada al 0.3%, para suprimir la motilidad espermática, más 10 µl del semen diluido 1:1 volumen/volumen), se mezcló perfectamente, llenando la cámara de Neubauer (cámara de recuento celular), la cual nos ayudó a determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen; se dejó en reposo 5 minutos, para que los espermatozoides se asentaran.

Pasados los 5 minutos, se procedió a contabilizar los espermatozoides que se encontraban en la cuadrícula inferior y superior de la cámara, cada cuadrícula cuenta con 25 cuadros, a su vez, éstos cuentan con 16 cuadros, de los cuales solo se contaron los espermatozoides contenidos en 5 cuadros de los 25 cuadros centrales (los dos superiores de los extremos, los dos inferiores de los extremos y el central), tomando en cuenta solo los espermatozoides que queden dentro del cuadro y los que toquen alguna de las 3 líneas de la parte superior e izquierda del mismo. Se calculó un promedio de ambas cuadrículas y se multiplicó por 10 millones, obteniendo la concentración de espermatozoides por ml.

Dilución: Para realizar la evaluación microscópica, se realizó una dilución 1:10 (9 partes de medio BTS (Beltsville Thawing Solution) y 1 parte del eyaculado) (Ver anexo 5). Se mantuvo 10 minutos en baño María y se procedió a realizar las siguientes pruebas. El stock del medio

BTS se mantuvo en refrigeración, pero para su uso se colocó en el baño María a 37°C, alcanzada dicha temperatura se utilizó.

5.2.2.3 Motilidad progresiva:

Transcurridos los 10 minutos en el baño María, se tomó una gota de la dilución descrita anteriormente y se colocó entre un cubre y portaobjetos previamente calentados en la platina térmica a 37°C; enseguida se observó en el microscopio con el objetivo 10x y 20x.

Evaluación: Para esta evaluación se estimó, visualmente, la proporción de espermatozoides con movimiento rectilíneo y progresivo, asignando un valor que va de 0 a 100%.

5.2.2.4. Viabilidad con la tinción eosina/nigrosina (vivos/muertos):

De la misma manera, en un portaobjetos previamente calentado a 37°C, se colocó una gota de espermatozoides diluidos en BTS y a un lado se puso una gota de la tinción eosina/nigrosina a 37°C, se mezclan ambas gotas, con la ayuda de otro porta objetos se realizó un frotis de capa delgada, se dejó secar bajo un ventilador y se observó al microscopio con el objetivo de 100x, se contaron 200 células en total de cada frotis (Ver anexo 6)

Evaluación: Los espermatozoides vivos no se tiñen, se aprecian de color blanco, los espermatozoides muertos se tiñen de color rosa.

5.2.2.5. Funcionalidad de la membrana plasmática mediante la prueba de la hinchazón hiposmótica (HOST):

Se tomó 100 µl de la dilución de espermatozoides con BTS a un tubo tipo eppendorf, posteriormente se le agregó 100 µl de solución hipo-osmótica (60 mOsm/Kg), se mezcló perfectamente y se mantuvo en baño María por 30 minutos. Enseguida, se fijó esta mezcla con 10µl de glutaraldehído al 0.4%, se tomó una gota, se colocó en un porta y cubre objetos previamente calentados, y se observó en un microscopio óptico con el aumento de 100x.

Evaluación: 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; se contabilizaron 200 células en total de cada preparación.

5.2.2.6. Morfoanomalías de los espermatozoides empleando el frotis de eosina/nigrosina

Para esta prueba se utilizó un frotis teñido con eosina/nigrosina (EN) (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.

Evaluación: Se contabilizaron 200 células y se expresó el resultado en porcentaje

5.2.2.7. Integridad del Acrosoma empleando microscopía de contraste de fases

Se mezclaron 100 μ l de los espermatozoides en BTS con 100 μ l de glutaraldehído al 0.4% en un tubo tipo Eppendorf, 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 100x.

Evaluación: 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 un borde apical rugoso, craterizado, incompleto o ausente, se consideraban células con acrosoma dañado.

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

Para esta prueba se realizó una solución stock de MC540 en DMSO (5 mM) (Ver anexo 2), se colocó en un frasco color ámbar y se protegió de la luz, se mantuvo a temperatura ambiente hasta su utilización.

Esta solución se utilizó para preparar 500 μ l de 40 mM, se realizó una segunda solución llamada “de trabajo” de MC540, en un tubo tipo Eppendorf se colocaron 495 μ L de TALP más 5 μ L de la solución stock de MC540 en DMSO (5 mM).

Se tomaron 140 μ l de los espermatozoides en BTS y se mezclaron con 10 μ l de solución trabajo de MC540, 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 de DABCO (220 mM diluido en glicerol/PBS 9:1), que es utilizado 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.

Evaluación: Para esta prueba se tomaron dos patrones de fluorescencia: 1) opacos y 2) brillosos. Los opacos, son células que mostraban poca fluorescencia (fluidez de membrana baja); los brillosos, son células que mostraban una fluorescencia intensa (fluidez de membrana alta). Se contabilizaron 200 células de cada frotis.

El protocolo anteriormente descrito es un proceso común que se realizó para la evaluación de las muestras de semen en fresco para las tres etapas experimentales, que a continuación se mencionan.

6. Fase experimental

6.1. Etapa 1: Incubación del semen de cerdo diluido en TALP (Tyrodes+ Albumina+ Piruvato) o BTS

En esta etapa se realizó un monitoreo de cambios de la fluidez de la membrana plasmática conforme al tiempo de incubación. El protocolo que se siguió para la incubación de las alícuotas y su evaluación microscópica correspondiente es el siguiente:

1. Centrifugación: Se centrifugaron 10 ml de semen diluido (1:1 volumen/volumen) a 500 gravedades durante 10 minutos; se obtuvieron dos partes:

a) Un botón o pellet el cual contiene a los espermatozoides concentrados

b) El sobrenadante que es el diluyente y parte del plasma seminal

El sobrenadante se extrajo y desechó con una pipeta Pasteur, manteniendo intacto al pellet. Este último se resuspendió en 0.5 ml de medio TALP y se mezcló.

El medio Tyrodes (Ver anexo 3) se conservaba en congelación, por lo cual, previamente fue descongelado en el baño María a una temperatura de 37°C, una vez descongelado, se gasificó durante 2min, posteriormente se le agrego 50µl de piruvato y 500mg de albumina, con este proceso el medio Tyrodes se convierte en medio TALP (Ver anexo 4), se extrajo del baño María para colocarlo inmediatamente a la Incubadora de CO₂, bajo las condiciones de 38°C al 5% de CO₂, donde se mantenía, hasta su utilización.

Ya resuspendido el pellet con el medio TALP se ajustó la concentración espermática a 7x10⁶/células por ml.

1. Una vez ajustada la concentración, se introdujo a una incubadora con las siguientes condiciones: una atmósfera de 5% de CO₂ a una temperatura de 38°C. Ahí se mantuvieron durante 10 minutos.

2. Pasados los 10 minutos se obtuvo una alícuota, sin sacar el tubo de la incubadora, de aproximadamente 1 ml, mezclando previamente para obtener una muestra uniforme. La muestra se colocó en el baño María.

3. A esta alícuota se le evaluarón las siguientes variables: Motilidad Progresiva, Viabilidad (Eosina-Nigrosina), Integridad del Acrosoma (contraste de fases) y la prueba de la fluidez de la membrana (MC540).

Para la prueba de MC540, se realizó una dilución “de trabajo” como anteriormente se describió, solo con el cambio de medio, se sustituyó BTS por TALP.

Este proceso se llevó a cabo cada hora, teniendo un total de 5 tiempos 10 min, 1 hr, 2 hrs, 3 hrs y 4 hrs, respectivamente, 5 resultados de cada variable, con diferencia en la prueba de MC540, la cual solo fue cualitativa.

En la segunda parte de esta etapa se realizó el mismo procedimiento, con diferencia en los tiempos para extraer la alícuota para su evaluación microscópica. Los tiempos en las que se tomaba el muestreo ahora fueron a los 10 min, 2 y 4 hrs.

En esta parte se obtuvieron las mismas variables, la diferencia es que para la prueba de MC540 los resultados ya se contabilizaron, 200 células y el resultado fue expresado en porcentaje.

6.2. Etapa 2: Refrigeración de semen de cerdo a 5°C en diferentes medios (BTS/TALP)

Una vez observados y contabilizados los diferentes patrones presentados durante la incubación, se llevó a cabo la refrigeración en dos diferentes medios:

6.2.1. Dilución en BTS

1. Se realizó la centrifugación del semen de la misma manera que en la etapa anterior, se resuspendió en BTS y se realizó el ajuste correspondiente a 7×10^6 /células por ml.
2. Se colocó en un tubo de vidrio y se selló con parafilm, para evitar su contaminación, se sumergió en un vaso de precipitado con agua corriente con una temperatura de 22°C y se colocó en el refrigerador.
3. Se realizó un muestreo, sin sacar el tubo del refrigerador, se obtuvieron alícuotas de 1 ml y se colocaron en el baño María. El muestreo se hizo a los i) 10 minutos, a las ii) 2 y iii) 4 horas.

Para cada tiempo se evaluó la motilidad progresiva, integridad del acrosoma, viabilidad, y la fluidez de la membrana.

6.2.3. Dilución en TALP

1. Se realizó la centrifugación de la misma manera que la etapa anterior, se resuspendió en medio TALP y se realizó el ajuste correspondiente a 7×10^6 /células por ml.

2. Se colocó en un tubo de vidrio y se selló con parafilm, para evitar su contaminación, se sumergió en un vaso de precipitado con agua corriente con una temperatura de 22°C y se colocó en el refrigerador.

3. Se realizó un muestreo, sin sacar el tubo del refrigerador, se obtuvieron alícuotas de 1 ml y se colocaron en el baño María. El muestreo se hizo a los i) 10, ii) 40 y iii) 80 minutos.

Para cada tiempo se evaluó la motilidad progresiva, integridad del acrosoma, viabilidad, y la fluidez de la membrana.

6.3. Etapa 3: Congelación y descongelación de semen de cerdo en diluyente lactosa-yema de huevo

En esta etapa se realizó el enfriado pre-congelación a las siguientes temperaturas blanco:

i) 5°C (testigo),

ii) -5°C (experimental)

El semen utilizado en esta etapa se sometió al mismo procedimiento de recolección y evaluación, que se describió anteriormente. Posteriormente para su congelación se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

6.3.1. Enfriado lento de los espermatozoides diluidos con Lactosa - Yema de huevo

1. El tubo con los espermatozoides diluidos con Lactosa - Yema de huevo (sin glicerol) a una concentración de 1200×10^6 espermatozoides/ml, se colocó dentro de un recipiente de cristal (150 ml aprox.) que contenía agua salina (NaCl 10% p/v) a temperatura de cuarto, se unieron tres recipientes iguales para colocar tubos de centrifuga de 15 mL.

2. Simultáneamente se colocó en otro tubo el diluyente Lactosa - Yema de huevo con 6% de glicerol, para que se enfriara de igual manera que los espermatozoides diluidos.

3. En otro tubo se colocó diluyente Lactosa - Yema de huevo con glicerol (3%) que se empleó para monitorizar la temperatura con la ayuda de la sonda de un termómetro digital (VWR).

4. Cuando se alcanzó la temperatura de 7°C se agregó la fracción del diluyente con 6% de glicerol a los espermatozoides diluidos en Lactosa - Yema de huevo sin glicerol; esto se realizó en tres tiempos, cada uno de ellos con un periodo de equilibrio de 10 minutos, y se mezcló perfectamente. La concentración final fue de 600×10^6 células/mL con 3% de glicerol.

5. Finalmente se envasaron los espermatozoides en pajillas de 0.5 mL, previamente enfriadas e identificadas.
6. Se llenaron 2 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%), lo que facilitaba su manejo y evitaba que se tuvieran que secar al momento de sacarlas del recipiente. Se dejaron enfriar hasta 5°C y se mantuvieron en refrigeración hasta el día siguiente).

Para el tratamiento de enfriado a -5°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. Este recipiente se colocó lo más cercano posible al refrigerador, para que al momento de sacar el aparato enfriador del refrigerador se evitara en lo posible la variación de la temperatura de las pajillas.

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 la temperatura blanco; una vez alcanzada la temperatura esperada se continuó con la congelación en vapores de nitrógeno, para el cual también se preparó una caja de unicel la cual tenía 17 cm de profundidad en la que se colocó una cama de nitrógeno líquido de 8 cm, las pajillas se colocaron sobre unas varillas de cobre a 4 cm por encima del nitrógeno líquido; así se expusieron a los vapores del nitrógeno.

Se congelaron 4 pajillas para cada tratamiento y una pajilla adicional 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 y/o descongelación.

Color	Tratamiento
Morado	+5°C
Naranja	-5°C

Patrón de colores que se utilizó para identificación entre tratamientos

6.3.2. Procedimiento de 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 aprox.) 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 del tratamiento 2 (-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 gobelets 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 gobelets; enseguida los gobelets 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

6.3.3. Procedimiento para la descongelación

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

1. Para la descongelación se preparaba el baño María y el material de vidrio, hasta que alcanzaban una temperatura de 37°C, una vez listos estos materiales para la evaluación del semen al descongelado, se acerca el termo de nitrógeno que contiene los gobelets con las pajillas.
2. Una vez identificadas las pajillas a descongelar, considerando el color, número, la canastilla y el gobelet donde se ubican, se sacaban las 4 pajillas (una por una) de cada tratamiento, pasándolas rápidamente al baño María y dejándolas ahí por 30 segundos.
3. Pasado este tiempo se sacaron las pajillas del baño María y se colocaron en papel absorbente, secándolas suavemente sin frotar. Se cortó el tapón de alcohol polivinílico y se vació el contenido en un tubo de vidrio colocado previamente en el baño María.
4. Una vez que se descongelaron todas las pajillas, se evaluó la motilidad en de cada una de ellas.
5. Enseguida, los espermatozoides descongelados se diluyeron 1:10 en TALP (20 µl de semen + 180 µl de TALP), esta mezcla se dejó en reposo durante 10 minutos como periodo de equilibrio.
6. Mientras tanto, se hizo una mezcla (pool) que se formó de la unión del contenido de dos de los tubos de vidrio en uno, quedando solo 4 tubos de vidrio, dos de cada tratamiento, y se sometieron a la centrifugación, con el fin de quitar el exceso del diluyente (yema de huevo-lactosa) y así poder visualizar mucho mejor la fluorescencia de MC540.
7. Una vez transcurridos los 10 minutos del periodo de equilibrio, se realizaron las siguientes pruebas:
 - a) Motilidad progresiva
 - b) Viabilidad
 - c) Determinación de la integridad acrosomal con contraste de fases
 - d) Determinación de la viabilidad con las tinciones fluorescentes SYBR14/PI
8. Una vez terminada la centrifugación, se quitó el sobrenadante de cada tubo, y se reconstituyó en medio TALP, se obtuvo la concentración espermática y se hizo el ajuste correspondiente a 7×10^6 células por mL

9. Una vez ajustada la concentración se realizó la prueba para la determinación de la fluidez de la membrana plasmática mediante MC540.

Se llevó un registro de cada pajilla descongelada, por fecha, macho y tratamiento, así como las pruebas que se le realizaron, para su posterior análisis.

6.4 Análisis estadístico

Los datos de la primera y segunda etapa (cada variable en los diferentes tiempos de incubación y refrigeración) se analizaron mediante estadística no paramétrica: ANOVA de Friedman y Wilcoxon (prueba de pares). En la tercera etapa (crio-conservación de semen) las variables de cada tratamiento de enfriado pre-congelación se analizaron mediante las pruebas de “t” y de Wilcoxon (Snedecor y Cochran, 1989).

7. Resultados

7.1. Primera etapa: Incubación del semen de cerdo diluido en medio TALP

En esta etapa se utilizaron 5 eyaculados de 3 machos.

En la Tabla 1 se presentan los resultados que se obtuvieron en el análisis en fresco del semen de los diferentes cerdos.

Tabla 1: Calidad de semen en fresco.

Macho	MM	MP	Viabilidad	AI	HOST
Jack	2.8 ± 0.25	87.5 ± 2.5 ^{ab}	87.5 ± 2.5	85.3 ± 3.25	60.5 ± 2.0
Obi	2.2 ± 0.20	88.0 ± 2.09 ^a	76.6 ± 10.6	77.0 ± 11.5	61.8 ± 4.8
Ares	1.5 ± 0.5	67.5 ± 7.5 ^b	65.0 ± 3.5	63.8 ± 4.3	69.0 ± 0.5

Los valores son medias ± error estándar. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente (P<0.05). ANOVA, datos transformados al arcoseno para normalizarlos, y Prueba de Tukey.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo (incubación con medio TALP), en la cual se puede observar las diferentes variables que se analizaron, en 4 diferentes tiempos: un tiempo antes de colocar la muestra en la incubadora y tres diferentes tiempos de incubación.

Al comparar cada variable a lo largo del periodo de incubación se observó una diferencia significativa en la motilidad progresiva entre el Tiempo 0 y el Tiempo 120 minutos. En relación a la viabilidad y la integridad del acrosoma, no se observaron diferencias entre los distintos tiempos de incubación. En cuanto a la fluidez (patrón brillante, aumento de fluidez), se observó una diferencia significativa entre el Tiempo 10 minutos y el Tiempo 120 minutos, el Tiempo 240 minutos de incubación no fue diferente a los otros dos tiempos.

Tabla 2. Calidad de los espermatozoides de cerdo diluidos en TALP e incubados a 38°C en atmósfera de CO₂ (5%)

Variable	Tiempo 0	Tiempo 10 min	Tiempo 120 min	Tiempo 240 min
Motilidad progresiva (%)	62.1 ± 6.35a	57.9 ± 8.58ab	41.7 ± 11.67b	41.7 ± 22.05ab
Viabilidad (%)	69.8 ± 3.13	64.4 ± 4.72	62.3 ± 6.46	66.0 ± 5.07
Acrosomas intactos (%)	71.4 ± 3.54	64.7 ± 4.06	60.8 ± 3.52	57.0 ± 4.31
Patrón brillante (%)		31.0 ± 7.58a	38.6 ± 6.85b	47.5 ± 10.91ab

Los resultados muestran la media ± el error estándar. Los valores con literales distintas (a, b) dentro de las filas son significativamente diferentes (P<0.05). Viabilidad evaluada con la tinción Eosina/Nigrosina; Integridad del acrosoma evaluada con microscopía de contraste de fases; Fluidez de la membrana (Patrón brillante) evaluada con la tinción fluorescente Merocianina 540.

7.2. Segunda etapa: Refrigeración de semen de cerdo a 5°C diluido en dos diferentes medios: BTS y TALP

7.2.1. Enfriado lento de 23 a 5°C con BTS

Los resultados obtenidos en esta etapa corresponden a las pruebas de enfriado lento de 23°C a 5°C y recalentado de espermatozoides diluidos en dos medios BTS y TALP. Para esta etapa se utilizaron 7 eyaculados de 5 machos diferentes.

Obteniendo los resultados expresados en la tabla 3 en fresco.

Tabla 3 Evaluación de semen Fresco.

Macho	MM	MP	Viab	AI	Host
Jack	2.7 ± 0.17	85 ± 2.89	75.0 ± 4.36	84.8 ± 5.65	57.3 v 1.20
Ares	2.3 ± 0.32	82.5 ± 4.33	77.3 ± 7.10	67.6 ± 11.9	52.4 ± 1.20
Cronos	25 ± 0.0	82.5 ± 2.50	73.0 ± 0.5	93.8 ± 2.5	49.0 ± 1.5
Obi	25 ± 0.0	87.5 ± 2.5	92.0 ± 2.5	89.8 ± 4.25	59.3 ± 4.25

Los resultados muestran la media ± el error estándar. No hay diferencias entre cerdos en ninguna de las variables.

La motilidad progresiva disminuyó a medida que transcurría el tiempo de refrigeración (Tabla 4). Los valores de la motilidad progresiva observada al Tiempo 0 y al Tiempo 10 minutos no

fueron diferentes entre sí; sin embargo fueron diferentes a los valores observados en los tiempos de 120 y de 240 minutos ($P<0.05$), estos últimos fueron diferentes entre sí ($P<0.05$).

En cuanto a la viabilidad, El valor observado al Tiempo 0 fue diferente al del resto de los tiempos ($P<0.05$); los valores del Tiempo 10 y 120 minutos no fueron diferentes entre sí; el valor observado al Tiempo 240 minutos fue diferente al resto de los tiempos ($P<0.05$). (Tabla 4).

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó a lo largo de la refrigeración (Tabla 4). Los valores de esta variable obtenidos en los 4 tiempos de refrigeración fueron diferentes entre sí ($P<0.05$).

En cuanto a la fluidez de la membrana, el porcentaje de espermatozoides con patrón brillante (aumento de fluidez) observado al Tiempo 10 minutos de refrigeración (30.4%) fue diferente al del Tiempo 240 minutos (43.2%) ($P<0.05$), pero similar al observado al Tiempo 120 minutos (36.8%). (Tabla 4).

Tabla 4. Calidad de los espermatozoides de cerdo diluidos en BTS y enfriados lentamente de 23 a 5°C

Variable	Tiempo 0	Tiempo 10 min	Tiempo 120 min	Tiempo 240 min
Motilidad progresiva (%)	65.8 ± 4.84a	57.5 ± 6.05a	36.4 ± 4.91b	20.9 ± 5.13c
Viabilidad EN (%)	77.3 ± 3.38a	70.4 ± 3.86b	66.4 ± 3.39b	61.1 ± 3.94c
Acrosomas intactos (%)	82.7 ± 3.70a	75.7 ± 3.52b	69.6 ± 3.13c	62.5 ± 2.92d
Patrón brillante MC540 (%)		30.4 ± 3.61a	36.8 ± 2.82ab	43.2 ± 4.75b

Los resultados muestran la media ± el error estándar. Los valores con literales distintas (a, b, c, d) dentro de las filas son significativamente diferentes ($P<0.05$). Viabilidad evaluada con la tinción Eosina/Nigrosina; Integridad del acrosoma evaluada con microscopía de contraste de fases; Fluidez de la membrana (Patrón brillante) evaluada con la tinción fluorescente Merocianina 540.

7.2.2. Enfriado lento de 23 a 5°C con TALP

Para esta segunda parte, se utilizaron 7 eyaculados de 5 machos diferentes.

Teniendo como resultados los descritos en la tabla 5, semen en fresco de cada macho.

Macho	MM	MP	Viabilidad	AI	HOST
Ares	1.7 ± 0.2	62.5 ± 5.83	71.3 ± 2.18	85.3 ± 3.72	63.9 ± 1.02 ac
Hassan	2.25 ± 0.25	77.5 ± 2.5	79.0 ± 10.0	85.3 ± 3.72	50.3 ± 2.25 bd
Jack	2.5 ± 0.0	80.0 ± 0.0	84.5 ± 0.5	89.8 ± 1.75	59.5 ± 0.5 cd
Paris	2.5 ± 0.0	85.5 ± 5.0	88.0 ± 2.0	83 ± 4.25	54.0 ± 1.5

Los valores son medias ± error estándar. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente (P<0.05). ANOVA, datos transformados al arcoseno para normalizarlos, y Prueba de Tukey.

En cuanto a la motilidad progresiva, se observó una diferencia significativa (P<0.05) entre todos los tiempos de refrigeración: 0, 10, 40 y 90 minutos (61.7, 50.4, 41.8 y 27.5%, respectivamente). (Tabla 6).

La viabilidad espermática observada en el Tiempo 0 (69.6%) fue diferente a la de los tiempos 40 (59.8%) y 90 (54.8%) minutos de refrigeración (P<0.05), pero fue similar a la observada en el Tiempo 10 minutos (68.9%) de refrigeración (Tabla 6).

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó a lo largo de la refrigeración; el valor en el Tiempo 0 (76.2%) fue diferente (P<0.05) a los demás: Tiempo 10 (68.3%), Tiempo 40 (59.9%) y Tiempo 90 (59.4%) minutos de refrigeración (Tabla 6).

Respecto a la fluidez de la membrana, el porcentaje de espermatozoides con patrón brillante (aumento de fluidez) observado en el Tiempo 10 minutos de refrigeración (23.3%) fue diferente (P<0.05) al del Tiempo 40 (30%) y Tiempo 120 minutos (39.8%); estos dos últimos valores fueron diferentes entre sí (P<0.05) (Tabla 6).

Tabla 6. Calidad de los espermatozoides de cerdo diluidos en TALP y enfriados lentamente de 23 a 5°C

Variable	Tiempo 0	Tiempo 10 min	Tiempo 40 min	Tiempo 90 min
Motilidad progresiva (%)	61.7 ± 6.97a	50.4 ± 5.98b	41.8 ± 5.53c	27.5 ± 5.59d
Viabilidad (%)	69.6 ± 4.20a	68.9 ± 4.23ab	59.8 ± 1.70b	54.8 ± 2.33c
Acrosomas intactos (%)	76.2 ± 2.94a	68.3 ± 4.47b	59.9 ± 2.89c	59.4 ± 3.62bc
Patrón brillante (%)		23.3 ± 3.91a	30.0 ± 3.58b	39.8 ± 3.73c

Los valores son la media ± error estándar. Los valores con literales distintas (a, b, c, d) dentro de las filas son significativamente diferentes. Viabilidad evaluada con la tinción Eosina/Nigrosina; Integridad del acrosoma evaluada con microscopía de contraste de fases; Fluidez de la membrana (Patrón brillante) evaluada con la tinción fluorescente Merocianina 540.

7.2.3. Tercera etapa: Congelación y descongelación

En la Tabla 7, se muestran los resultados obtenidos en los espermatozoides en el semen de cada macho en fresco.

Tabla 7: Resultados de la evaluación en fresco de cada macho

Macho	MM	MP	Viabilidad	AI	Host	PB
Obi	2.5 ± 0.0	86.7 ± 1.67	82.8 ± 4.42	85.2 ± 3.59	58.7 ± 5.13 ^a	14.3 ± 1.20
Hassan	2.17 ± 0.17	66.7 ± 18.56	62.2 ± 4.7	92.5 ± 3.78	36.0 ± 0.58 ^b	10.8 ± 4.42
Cronos	2.8 ± 0.17	83.3 ± 3.33	62.7 ± 8.52	93.5 ± 3.78	42.5 ± 1.04 ^b	6.8 v 1.48

Los valores son medias ± error estándar. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente ($P < 0.05$). ANOVA, datos transformados al arcoseno para normalizarlos, y Prueba de Tukey.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de calidad de los espermatozoides al descongelado. En ninguna de las variables evaluadas hubo diferencia significativa entre los tratamientos de enfriado pre-congelación: +5 vs -5°C.

Tabla 8. Crio-supervivencia de los espermatozoides de cerdo enfriados a dos temperaturas pre-congelación: +5 y -5°C

Tratamiento de enfriado pre-congelación	Motilidad Progresiva (%)	Integridad de la membrana plasmática (%)	Viabilidad (%)	Acrosoma intacto (%)	Patrón Brillante (%)
+5°C	32.8 ± 1.84	38.8 ± 3.05	52.0 ± 4.43	40.3 ± 3.89	52.8 ± 4.40
-5°C	32.5 ± 2.11	42.2 ± 3.86	55.0 ± 2.56	38.9 ± 5.29	57.4 ± 5.72

Los valores son medias ± error estándar. No hay diferencias entre tratamientos en ninguna de las variables. Integridad de la membrana plasmática evaluada con las tinciones fluorescentes SYBR14/PI; Viabilidad evaluada con la tinción Eosina/Nigrosina; Integridad del acrosoma evaluada con microscopía de contraste de fases; Fluidez de la membrana (Patrón Brillante) evaluada con el compuesto fluorescente Merocianina 540.

8. Discusión

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto del enfriado pre-congelación a 2 temperaturas, +5°C y -5°C, sobre la crio-supervivencia y la fluidez de la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo. Para esto, se estandarizó el uso del marcador de fluidez de membrana, MC540, empleando microscopía de fluorescencia. Se realizaron 3 etapas experimentales cuya intención fue provocar cambios en la organización de los lípidos de la bicapa de la membrana plasmática (cambios de fluidez); la detección de estos cambios proporciona información más amplia sobre la viabilidad del espermatozoide, en este caso se utilizó semen de cerdo, sin embargo tiene como fin ser utilizada en otras especies, como en emen de canino, caprinos, equinos y ovinos

Una vez estandarizados los patrones de fluorescencia, donde poca o nula fluidez se toma como patrón opaco (baja fluorescencia) y un aumento de fluidez se describe como un patrón brillante (alta fluorescencia), se llevó a cabo la primera etapa de este trabajo en la que se realizó la incubación de los espermatozoides con medio TALP durante 4 diferentes tiempos. En los tiempos de 10 y 120 minutos de incubación se observó un aumento en el número de espermatozoides que presentaban patrón brillante, del primer tiempo con respecto al segundo. Gadella y Harrison (2000) mencionan que en los espermatozoides de cerdo, el bicarbonato juega un papel importante en la inducción de la capacitación espermática, y en consecuencia provoca modificaciones en el revestimiento de la superficie del espermatozoide y un incremento en el desorden lipídico de la membrana plasmática. Este aumento de la fluidez se detectó como el aumento en la sostenibilidad de la fluorescencia de MC540, esto apoya los resultados que obtuvimos en este estudio, considerando que el medio que utilizamos (TALP) contiene bicarbonato.

Por otro lado, Flesch y col. (2001) incubó espermatozoides de cerdo en 2 diferentes medios: un medio testigo, Tyrode - HEPES (HBT), y un medio de “capacitación” (HBTBic) adicionado con bicarbonato (NaCO₃); los espermatozoides fueron incubados a 38.5°C en una atmósfera de 5% CO₂. Los resultados indican que las células espermáticas incubadas con HBTBic mostraron un patrón brillante al ser teñidas con MC540, comparados con los espermatozoides del medio testigo donde hubo un mayor número de espermatozoides con baja fluorescencia; esto indica que el bicarbonato provoca una respuesta de MC540 solo en las células con bajos niveles de colesterol (se induce un reordenamiento de colesterol en estas

células), siendo estos cambios el resultado de la aleatorización que tienen los fosfolípidos de la bicapa de la membrana plasmática al ser sometidos a las condiciones mencionadas.

Por otra parte, Watson (2000) menciona que el mayor cambio de transición de fase de los lípidos ocurre en un intervalo de temperatura de +5 a +15°C, y que en este rango de temperatura podría ocurrir cualquier daño que se pueda producir en la membrana plasmática. Los estudios sobre la fractura que sufre la membrana plasmática durante y después del enfriado son una clara evidencia de los eventos de separación de fase, esto es parcialmente reversible al recalentado. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana se incrementa después del enfriado, esto generalmente se debe a las fugas que existen en la membrana por efectos específicos de los canales de proteína (Watson, 2000).

En relación a la segunda etapa de este trabajo, el enfriado de los espermatozoides a +5°C, se observó el cambio de la fluidez de la membrana (detectados con MC540) conforme al tiempo de enfriado; se observó un incremento del número de espermatozoides desde el primer muestreo y en todos los otros tiempos de enfriado. Se ha reportado que los cambios de la fluidez de la membrana son detectados mediante la tinción fluorescente MC540, ya que es una molécula natural lipofílica que se une a la bicapa, preferentemente si ésta se encuentra con lípidos “desordenados” o “mal empaquetados” (Williamson, 1983; Gadella y Harrison, 2000); en este sentido nuestras observaciones confirman lo reportado por los autores arriba citados, que durante el enfriado conviven segmentos de la membrana en estado líquido-cristalino con segmentos en estado de gel, esto se puede interpretar como lípidos “mal empaquetados”.

Una congelación exitosa vista en el semen de cerdo depende de la comprensión de los factores y de las interacciones que influyen en la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir a la congelación. Johnson *et al.*, (2000) mencionan que estos factores se pueden clasificar en dos categorías: i) Factores internos, tales como características inherentes de los espermatozoides y las diferencias que existen entre verracos y eyaculados, y ii) Factores externos, como la composición de los diluyentes, tipo y concentración de agentes crioprotectores, tasas de dilución y de refrigeración, además de el método de congelación y descongelación.

Los factores externos, a diferencia de los internos, pueden ser modificados o manipulados con el fin de optimizar el protocolo de congelación. En cualquier protocolo, una congelación apresurada de los espermatozoides que están a temperatura corporal a una temperatura cercana a la congelación, reduce irreversiblemente la viabilidad del espermatozoide. Bajo

estas condiciones, el espermatozoide pierde la integridad de su membrana y motilidad con una reducción irreversible de metabolismo de carbohidratos (Watson, 2000). La congelación rápida también da lugar a la liberación de enzimas intracelulares, lípidos y redistribución de iones; sin embargo y a pesar de todos los cambios que se generan al congelado de los espermatozoides, se ha encontrado que el espermatozoide de cerdo incubado a temperatura de cuarto en su propio plasma seminal, llega a ser resistente al choque frío durante 16 horas posterior a la eyaculación (Watson, 2000), las membranas son alteradas de tal manera que no resisten el choque frío (cold shock). Esta observación sugiere que el tiempo óptimo para crioconservar el semen de cerdo no debe ser inmediatamente después de la eyaculación, sino dentro de las primeras 6 horas y antes de las 18 a 24 horas, evitando en la medida de lo posible daños irreversibles. En nuestro trabajo se utilizó un protocolo de congelación convencional, el cual incluía el glicerol a una concentración de 3% como crioprotector y un diluyente a base de yema de huevo y lactosa (Bayshia *et al.*, 2014), estos compuestos proporcionan protección a los espermatozoides contra el choque frío, tanto de cerdos como en otras especies.

En el presente trabajo, el tiempo de almacenamiento de las pajillas congeladas fue de un mes aproximadamente, transcurrido ese tiempo se evaluaron 4 diferentes variables, así se determinó que la viabilidad de los espermatozoides estaba en el rango con respecto a otros trabajos que se han realizado bajo condiciones similares (Flores, 2005; García, 2015). Con respecto a los resultados de Bayshia *et al.* (2014), nuestros valores de viabilidad evaluada con eosina/nigrosina son mayores a los de ellos, pero en lo que se refiere a la motilidad progresiva nuestros valores están por debajo, 8 unidades porcentuales. Es importante señalar, que nosotros utilizamos el mismo diluyente que ellos, bajo las mismas condiciones de la temperatura pre-congelación de +5°C.

Con respecto a los resultados de integridad de la membrana, a pesar de haber realizado un protocolo donde se cuidaron los factores ya antes mencionados para así evitar en la medida de lo posible daños a los espermatozoides, se obtuvo un 40% (promedio de ambos tratamientos) de espermatozoides con membrana intacta. Se ha reportado que la composición de los lípidos y los cambios en su organización dentro de la membrana plasmática son visibles durante un rápido o lento proceso de congelación (Johnson *et al.*, 2000), y como resultado se tiene un incremento en la permeabilidad de la membrana. Además, estas características parecen estar

correlacionadas con la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo con respecto a la resistencia a los daños por choque frío (Parks y Lynch, 1992). El espermatozoide de cerdo es el más susceptible a este fenómeno (dentro de las especies domésticas), por lo tanto al someterse a la congelación y descongelación se provoca una mayor permeabilidad a la membrana (Johnson *et al.*, 2000).

En el presente trabajo, al realizar la prueba de MC540 antes y después del congelado, se pudo apreciar que no hubo una diferencia significativa entre tratamientos, la presencia de espermatozoides con un patrón brillante en ambos tratamientos (52%) nos indica que las membranas de estos espermatozoides tuvieron cambios de fluidez en la membrana, indicándonos los patrones brillosos membranas hiperfluidas. Como lo menciona Flesch *et al.* (2001), se observan diferencias en la fluidez de la membrana al distinguirse una alta o baja fluorescencia de MC540, esto está relacionado con la diferencia de ácidos grasos de los fosfolípidos y su organización. Un valor similar de células con patrón brillante se ha reportado en espermatozoides de hombre incubados durante 3 horas (Muratori *et al.*, 2004). Por otro lado, Harrison y Miller (2000) observaron en espermatozoides de cerdo, activados con bicarbonato, 35 y 52% de células con patrón brillante después de 9 y 25 minutos de incubación, respectivamente. En contraste, Steckler *et al.* (2015) reportaron un 75% de espermatozoides de perro viables con membranas desestabilizadas después de 2 horas de incubación. Aboagla y Terada (2003) reportaron un 51% de espermatozoides de cabra con patrón brillante al descongelado. Aunque nuestras condiciones experimentales son muy diferentes a las de los trabajos mencionados anteriormente, el porcentaje de espermatozoides con patrón brillante es similar; esto sugiere que la membrana plasmática de aproximadamente la mitad de la población espermática es muy susceptible (que muestra hiperfluidez) al efecto de la capacitación o la crio-capacitación (Ashworth, 1995).

9. Conclusiones

Se logró estandarizar la prueba de fluidez de la membrana en espermatozoides de cerdo utilizando la sonda fluorescente MC540, por medio de microscopía de fluorescencia, determinando dos patrones: por un lado espermatozoides que presentaban a nivel de la cabeza una alto nivel de fluorescencia a los que se les determinó como brillosos (alta fluidez), mientras que los espermatozoides que presentaban poca o nula fluorescencia a este nivel, se les denominó opacos (baja fluidez).

Se determinó que existen cambios en la fluidez de la membrana cuando los espermatozoides fueron sometidos a diferentes condiciones de trabajo: incubación, enfriado y crioconservación, por lo tanto, esta técnica puede incluirse como una prueba más dentro del espermiograma que se realiza en el laboratorio para conocer más sobre las los cambios que existen en la fluidez de la membrana.

Se observó que no hay una mejora en la criosupervivencia de los espermatozoides llevados a una temperatura pre-congelación de -5° con respecto a la de $+5^{\circ}\text{C}$, sin embargo se observó que la fluidez de la membrana no se ve afectada en ninguno de los tratamientos a pesar de ser una temperatura bajo cero.

10. LITERATURA CITADA

- ✚ Aboagla EME y Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*; 69: 1245–1250.
- ✚ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. New York, USA. 617-695 pp.
- ✚ Alcántar A. 2015. Evaluación de la criosupervivencia y la fluidez de la membrana de espermatozoides de perro enfriados a -5°C , previo a la congelación. Tesis para Maestría en Ciencias. UNAM. FES Cuautitlán. Estado de México, México. 94 pp.
- ✚ Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF. 1995. Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Molecular Reproduction and Development*; 40 (2): 164-176.
- ✚ Aurich C. 2005. Factors affecting the Plasma Membrane function of Cooled- Stored stallion Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 89: 65-75.
- ✚ Barth AD, Oko RJ. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames IA: Iowa State University Press, USA. 8-18pp.
- ✚ Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, 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.
- ✚ Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera J. 2006. *Biotechnología de la Reproducción Porcina. Manual de Técnicas de Reproducción asistida en porcino*. Universidad de Girona. España.
- ✚ De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*; 27: 171-183.
- ✚ Edidin M. 2003. Lipids on the frontier: A century of Cell-Membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 4: 414-418.
- ✚ Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, Van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*; 114: 3543-3555.

- ✚ Gadella BM, Harrison RAP. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilateral behavior in the sperm plasma membrane. *Development*; 127: 2407-2420.
- ✚ Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*; 68 (3, 4): 249-265.
- ✚ Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*; 52: 473-480.
- ✚ Gao D, Critser JK. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Cryobiology. ILAR Journal*. 41 (4): 187-196.
- ✚ García AY. 2015. Determinación de la temperatura de pre-congelación óptima de semen porcino a temperaturas inferiores al punto de congelación, sobre la viabilidad de los espermatozoides. Tesis de licenciatura FES- Cuautitlán UNAM. Estado de México, México.
- ✚ González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC; Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S, Cardenas S. 2006. En *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Universidad de Girona. España. 19-35 pp.
- ✚ Hafez ESE. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. Editores Hafez ESE, Hafez B. McGraw-Hill Interamericana, México. 472-494 pp.
- ✚ Harrison RAP, Miller NGA. 2000. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular Reproduction and Development*; 55(2): 220-228.
- ✚ Hazel JR. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology*; 57: 19-42.
- ✚ 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. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*; 62: 3-22.

- ✚ Johnson LA, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. 1996. Staining sperm for viability assessment. *Reproduction in Domestic Animal*; 31: 37-47.
- ✚ Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*; 62(1): 143-172.
- ✚ McKinnon AO, Voss JL. 1995. *Equine Reproduction*. Wiley, Iowa, USA p 1137.
- ✚ 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.
- ✚ Megías M, Molist P, Pombal MA. 2014. Atlas de histología vegetal y animal. La célula. Departamento de Biología Funcional y ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Pontevedra, España. 4-24 pp.
- ✚ Morales NB. 2009. Valoración de la integridad de la membrana plasmática y morfología del espermatozoide como herramienta para determinar calidad seminal en el cerdo doméstico. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias, Post Grado en Producción Animal. Maracaibo, Venezuela. 71 p.
- ✚ 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: 797–810.
- ✚ Oberlender G, Murgas LDS, Zangeronimo MG, Silva AC, Pereira LJ, Muzzi RAL. 2012. Comparison of two different methods for evaluating boar semen morphology. *Journal SciELO, Arch Med Vet* 44: 201-205.
- ✚ 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-Martínez AI, 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 209-224.
- ✚ Petrunkina AM, Harrison RAP. 2013. Fluorescence technologies for evaluating male gamete function. *Reproduction in Domestic Animals*; 48: 11-24.
- ✚ Quintero MAA. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Bellaterra, Barcelona, España.

- ✚ Rodríguez GL. 2005. Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona, España.
- ✚ Scott GF. 2005. Biología del desarrollo. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 198-201 pp.
- ✚ 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. *New Zealand Society of Animal Production*; 57: 246-250.
- ✚ Snedecor GW, Cochran WG. 1989. *Statistical methods*. 8th Edition. Ames: Iowa State University Press. US. 491 pp
- ✚ 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 (9): 1451-1460.
- ✚ Valdés MC. 2015. Evaluación de la viabilidad de semen porcino tratado con estreptolisina o (SLO). Tesis de Maestría en Ciencia Animal. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 69 pp.
- ✚ Villa CE. 2009. Enfoques sobre semen, estrés oxidativo y antioxidantes. *Sitio argentino de Producción Animal. Taurus*, Bs. As; 11(43): 34-38.
- ✚ Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*; 60–61: 481–492.
- ✚ Williamson P, Mattocks K, Schlegel RA. 1983. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*; 732(2): 387-393.
- ✚ Woods EJ, James DB, Yuksel A, Critser JK. 2004. *Fundamental Cryobiology of Reproductive Cells and Tissues*. *Cryobiology*; 48, 146-156
- ✚ Yanagimachi R. 2015. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Editors Knobil E. And JD. Neill. New York: Raven Press, USA. 189-315 pp.

Anexos

Anexo 1.- Técnica de “mano enguantada”

PREPARACIÓN DEL MATERIAL

- 1- Precalentar agua destilada a 37° C en un matraz, el volumen dependerá de las dosis que vayamos a producir (suele hacerse una estimación de dos litros por verraco). Agitar con la ayuda de un agitador magnético.
- 2- Añadir el diluyente correspondiente al volumen de agua que se tiene.
- 3- Coger un vaso de recogida y cubrirlo con una gasa que actuará a modo de filtro y asegurar esta con una goma. Al vaso se le pueden añadir 50-100 cc de diluyente ya preparado y calentado a 37° C con objeto de evitar cambios bruscos de temperatura al eyaculado y prevenir aglutinaciones.
- 4- El vaso se coloca en un termo previamente atemperado.
- 5- Mantener el matraz con el diluyente en el baño María a 37° C.
- 6- Es conveniente poner varios “portas” y “cubre” sobre la platina calefactora para que estén atemperados a la hora de la validación seminal (evaluación de la motilidad, aglutinación). Hay que tener en cuenta que el material ha de estar limpio y, en los casos que proceda, esterilizado.

RECOLECCIÓN DEL SEMEN

Es recomendable realizarla sobre un potro fijo situado en una sala habilitada a tal efecto, así el animal se habitúa y se reduce el tiempo de salto simplificando el manejo al operario. La recogida se ha de realizar con el mayor grado de higiene que sea posible. Para ello debe vaciarse el divertículo prepucial cuando el verraco esté sobre el potro con objeto de eliminar los restos de orina y limpiar la zona con una toallita desinfectante. Una vez colocado el guante no se debe tocar ningún objeto ni superficie para minimizar el riesgo de contaminación; otra opción es colocarse dos guantes y quitarse uno justo antes de comenzar la extracción, es lo que se conoce como la técnica del doble guante. El pene debe sujetarse colocando los dedos alrededor de la espiral del glande, ejerciendo tracción suavemente hasta su total extensión. Se ha de procurar mantener el pene horizontal (en paralelo con el suelo) para evitar que por el escurra orina u otros contaminantes que caerían al vaso de recogida. Una vez en este punto, el verraco dejará de empujar y comenzará a bombear el eyaculado (Oberlender *et al.*, 2012).

Anexo 2: DABCO

DABCO 0.22 M (= 220 mM) en glicerol.

$$112.2 \text{ --- --- } 1M$$

$$x \text{ --- --- } 0.22M$$

$$x = 24.684g/l$$

$$x = 0.12342 \text{ g /5ml}$$

Preparación:

- 1- Después de calcular la cantidad de DABCO a mezclar con el glicerol, se procede a su dilución, para posteriormente agregar PBS.
- 2- La relación glicerol:PBS es de 9:1, respectivamente.
- 3- Se realiza el cálculo correspondiente dependiendo la cantidad a utilizar.

Anexo 3: Medio Tyrodes

Preparación de solución stock para el medio Tyrodes

NaCl (0.5 M)	2.922 g / 100 ml
NaHCO ₃ (0.25 M)	2.100 g / 100 ml
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ (0.1 M)	0.690 g / 50 ml
Na-Hepes (0.2 M)	9.532 g / 200 ml
KCl (0.5 M)	3.728 g / 100 ml
CaCl ₂ (1.0 M)	14.702 g / 100 ml
Glucosa (0.5 M)	4.5 g / 50 ml
MgSO ₄ (0.01 M)	1.235 g / 50 ml

Nota: Cada gramaje se diluye en agua desionizada.

Una vez realizada cada una de las mezclas anteriores, se prosigue a realizar la preparación del medio Tyrodes.

Preparación para cada 100 ml:

NaCl	19.2 ml	MgSO ₄	0.400 ml
NaHCO ₃	6 ml	Glucosa	1 ml
Hepes	10 ml	CaCl ₂	0.460 ml
Na-phosphate	0.300 ml	Penicilia- estreptomina	1 ml
KCl	0.620 ml	Rojo Fenol	2 mg

Cada una de las cantidades mencionadas, se proceden a aforar.

Anexo 4: Preparación de medio TALP

Medio Tyrodes	10 ml
Piruvato	22 mg
Albumina de suero bovino (BSA)	50 mg
Agua MilliQ	1 ml

Procedimiento:

- 1- Colocar en baño María el tubo de 10 ml de medio Tyrodes.
- 2- Pesar 22 mg de piruvato y se colocan en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua MilliQ (el tubo debe estar protegido de la luz con papel aluminio).
- 3- Pesar 50 mg de BSA.
- 4- Gasificar Tyrodes con CO₂ durante 2 min.
- 5- Agregar al medio Tyrodes los 50 mg de BSA y 50 µl de piruvato, sin mezclar.
- 6- Se introduce en la incubadora de CO₂ (38°C / 5%).

Nota: Las cantidades de los reactivos que se mencionan, se utilizan por cada 10 ml de medio Tyrodes.

Anexo 5 Preparacion de medio BTS

EDTA	0.125 g / 100 ml
Dextrosa anhidra	3.7 g / 100 ml
Citrato de Sodio	0.6 g / 100 ml
Bicarbonato de Sodio	0.125 g / 100 ml
Cloruro de Potasio	0.075 g / 100 ml

Procedimiento

- 1- Se pesan los ingredientes.
- 2- Con ayuda de un embudo se colocan en un matraz.
- 3- Mezclar con agua MilliQ todos los ingredientes.
- 4- Una vez disueltos se afora hasta 100 ml.
- 5- Identificar y conservar.

g

Anexo 6: Apartado de Fotos.

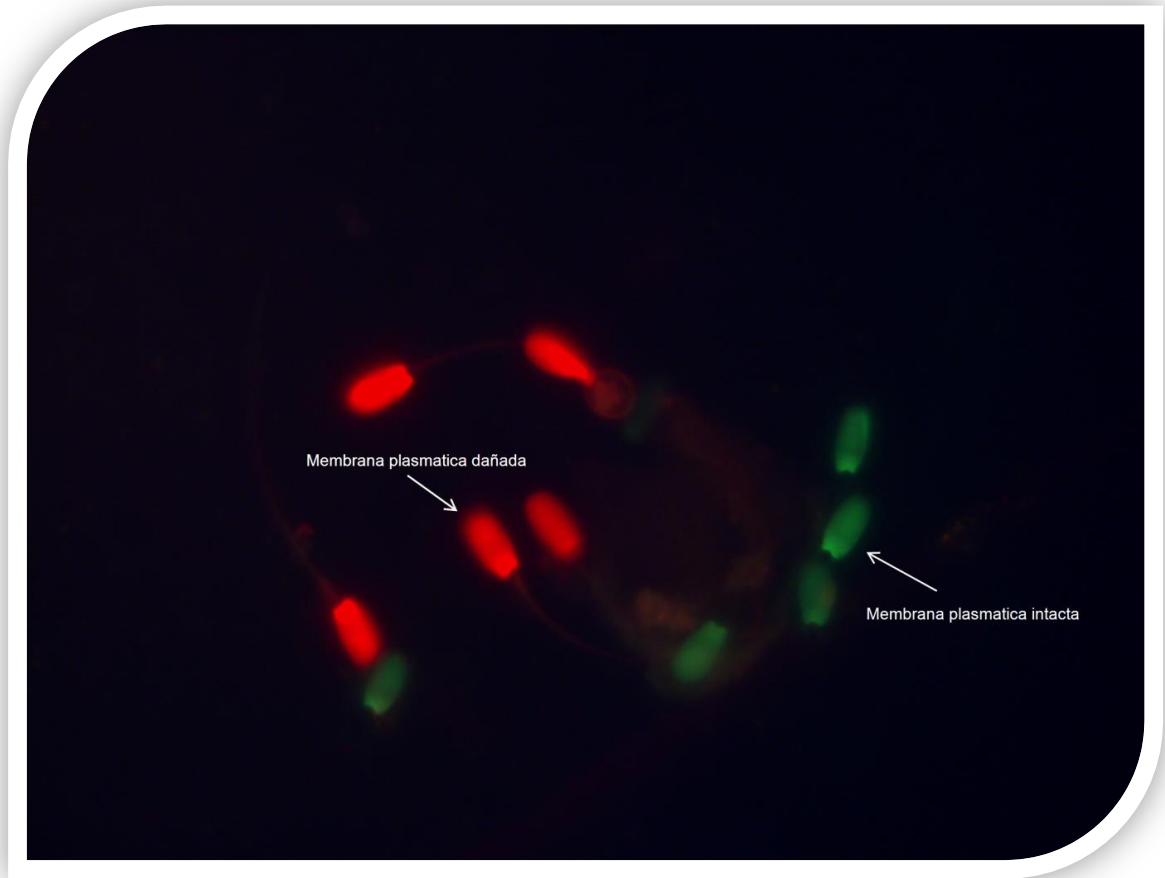


Foto 1.- Prueba de viabilidad con tinción de SYBR14-PI en microscopía de fluorescencia. (Tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal, UIM, UNAM)

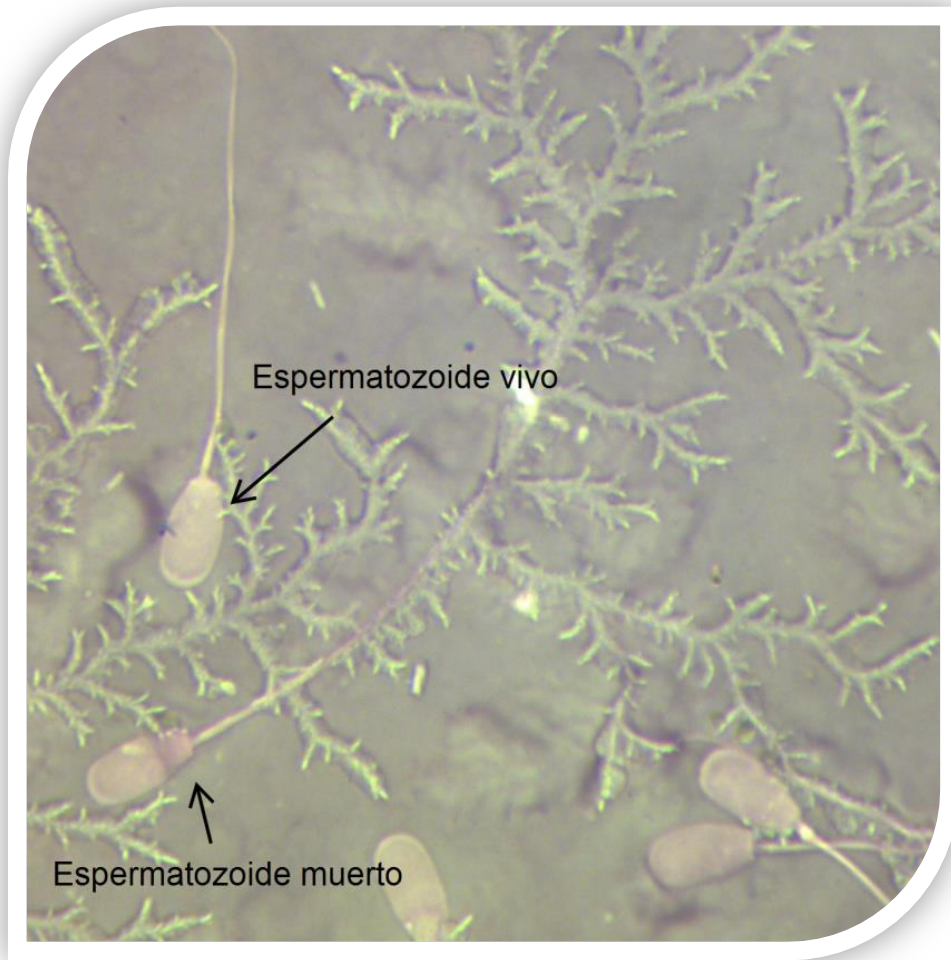


Foto 2: Prueba de viabilidad con tinción de Eosina-Nigrosina, microscopía óptica. (Tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal, UIM, UNAM)

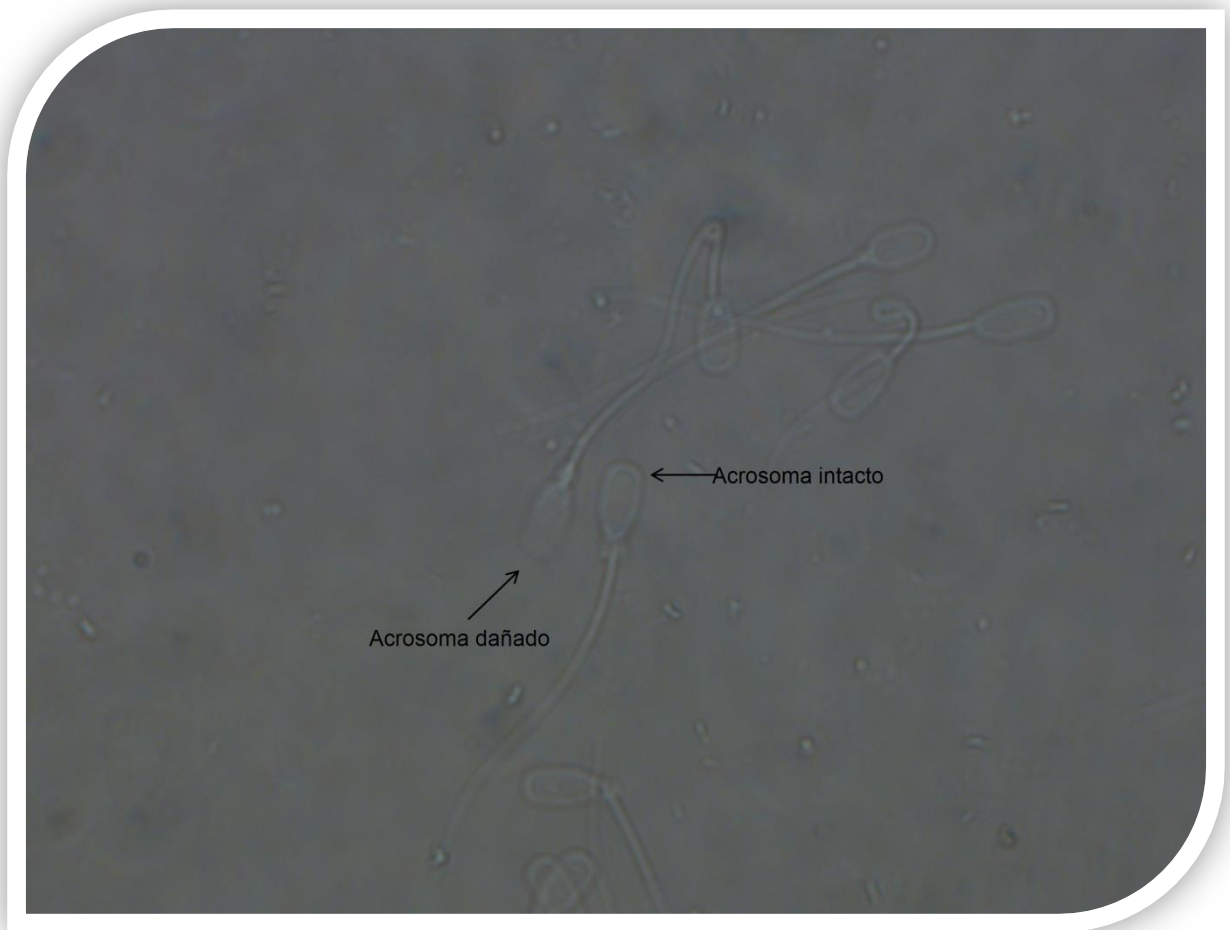


Foto 3: Prueba de Hinchamiento Hipo-osmótico, HOST, con contraste de fases. (Tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal, UIM, UNAM)

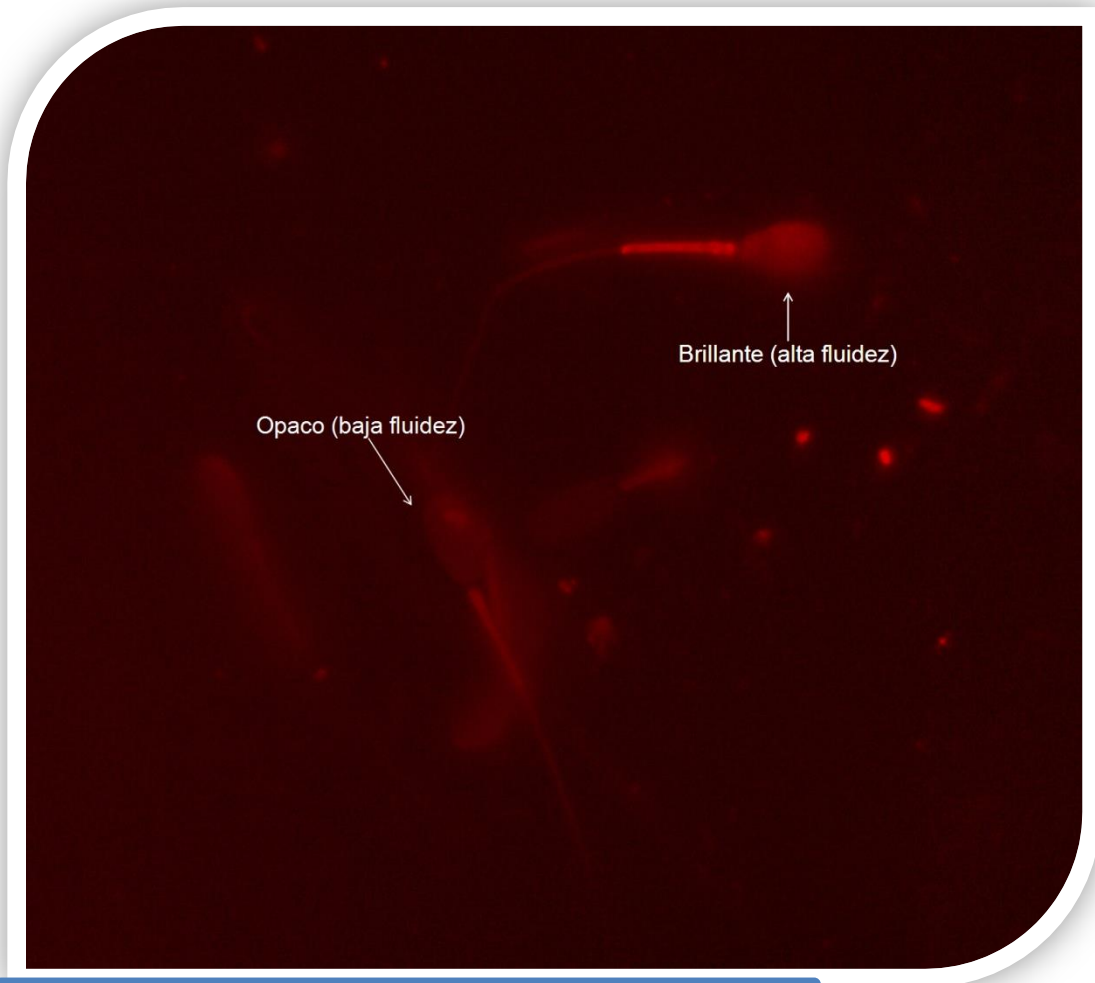
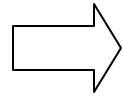


Foto 4: Prueba de fluidez de la membrana, tinción MC540, con microscopía de fluorescencia. (Tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal, UIM, UNAM)

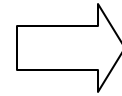
Proceso de crioconservación



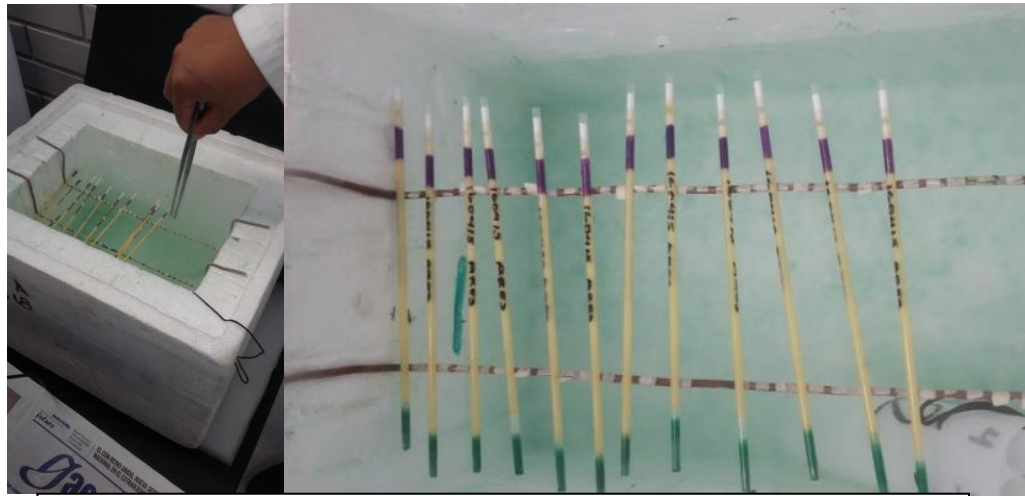
Ingreso de muestras al enfriado lento de 5°C



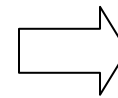
Traspaso de muestras al aparato enfriador de 16 huecos.



Enfriado a -5°C en hielo salino



Exposición de muestras en vapores de nitrógeno



Crioconservación

