



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE DOS DIFERENTES CRIOPROTECTORES
(TRILADYL Y TRILADYL-TREHALOSA) SOBRE LA
VIABILIDAD DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE DELFÍN
(*Tursiops truncatus*)”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ROCÍO ABIGAÍL FRAUSTRO CUEVAS

ASESORES:

**Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
MVZ Roberto Sánchez Okrucky**



México D.F

2012



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Luis y Laura por su infinita paciencia, su apoyo guía y amor incondicional desde que tengo memoria.

A mis hermanos Arturo, Adriana y Omar por formar parte de lo que soy y siempre estar ahí.

A mis Tíos Fellito, Lupita y Checho por contribuir en mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Lourdes Juárez Mosqueda por sus comentarios, apoyo, orientación y tiempo dedicado a la realización de este trabajo.

Al MVZ Roberto Sánchez Okrucky por las facilidades, la confianza para continuar con el proyecto a pesar de los obstáculos y por todos los conocimientos transmitidos.

Al staff Veterinario de Dolphin Discovery (Dra. Novoa, Ranita y Biólogo) por la paciencia, los consejos y todas las enseñanzas sobre la vida marina.

A todo el staff de entrenadores por su apoyo para la obtención de las muestras, principalmente al Sr Alejandro Mata, Daniel Nyselius y Roque Velarde.

A los miembros del jurado: MVZ. Javier de Jesús Valencia Méndez, MVZ Juan Alberto Balcázar Sánchez, MVZ Jorge Hernández Espinosa y MVZ Fernando Gual Sill por todas sus observaciones para mejorar este trabajo.

A la MVZ Frida Salmerón Sosa por su asesoría y paciencia para realizar el análisis estadístico.

A la familia playense Charly, Manu, Flaca, Feo, Leila, Roque, Poot, Santino, Anapau, Chuy, Cony, Felix, Julio, Mau, Wera, Oxcaret y Fanny por todo lo vivido, los consejos y el apoyo incondicional. Gracias!!!

A los amigos de siempre Miguel, Elisa, Anton, Blanquita, Betito, Didi, Gerardo, Anne, Clau, Étor, Piña, Ayin, May, Ju y a los que me falta nombrar gracias por su resistencia, amistad incondicional, la energía, los momentos y los buenos pensamientos.

CONTENIDO

ÍNDICE	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	IV
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Biología de la Especie.....	3
2. GENERALIDADES.....	7
2.1 Anatomía Reproductiva del Macho	7
2.2 Madurez Sexual	9
2.3 Estudio del Comportamiento Animal	11
2.3.1 Condicionamiento Clásico o Pavloviano	13
2.3.2 Condicionamiento Operante	13
3. ANTECEDENTES.....	16
3.1 Espermatozoide	20
3.2 Espermatogénesis	22
3.3 Capacitación Espermática	24
3.4 Reacción Acrosomal	26

3.5 Criopreservación	27
3.5.1 Sobre-enfriamiento.....	28
3.5.2 Efecto Solución	28
3.5.3 Estrés Osmótico	29
3.6 Alteraciones Espermáticas causadas por el Proceso de congelación-descongelación.....	29
3.7 Crioprotectores	31
3.7.1 Glicerol	32
3.7.2 Trehalosa.....	33
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo General	37
5.2 Objetivos Específicos.....	37
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6.1 Sujetos de Estudio	38
6.2 Obtención y procesamiento de las muestras	38
6.3 Movilidad Total	39
6.4 Movilidad Progresiva.....	40
6.5 Concentración del Eyaculado	41
6.6 Proceso de Congelación y Descongelación de semen.....	41

6.7 Preparación de los Diluyentes	42
6.7.1 Diluyente Triladyl (control)	42
6.7.2 Diluyente Triladyl+Trehalosa	42
6.8 Evaluación de las Muestras	43
6.8.1 Evaluación de la Integridad de Membrana.....	43
6.8.2 Evaluación de la Membrana Plasmática y del Acrosoma.....	44
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
8. RESULTADOS	46
8.1 Evaluación de la Movilidad	46
8.2 Evaluación de la Integridad de Membrana Plasmática	47
8.3 Evaluación de la Integridad Acrosomal mediante Azul de Coomassie	49
9. DISCUSIÓN	50
10. CONCLUSIONES	54
11. REFERENCIAS.....	56

RESUMEN

FRAUSTRO CUEVAS ROCÍO ABIGAÍL. “EVALUACIÓN DE DOS DIFERENTES CRIOPROTECTORES (TRILADYL Y TRILADYL-TREHALOSA) SOBRE LA VIABILIDAD DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE DELFÍN (*Tursiops truncatus*)”. (bajo la dirección de Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y MVZ Roberto Sánchez Okrucky).

El objetivo del presente trabajo fue comparar la capacidad crioprotectora de la combinación Trehalosa-Triladyl con la de un medio de congelación a base de Triladyl (control), en el semen del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*). Se utilizaron 8 eyaculados provenientes de 2 machos en los que se evaluó la movilidad, la integridad y la viabilidad espermática en el semen fresco y después del proceso de criopreservación. Los resultados mostraron que aunque la movilidad progresiva al descongelado de los espermatozoides de los grupos Triladyl+ Trehalosa (T-25mM, T-50mM), fue mayor (46.25% y 45% respectivamente) en comparación del tratamiento T-100mM (40.62%) y Triladyl (40%), esta no fue significativa. Al evaluar la viabilidad y la integridad espermática mediante la tinción Eosina-Nigrosina y Azul de Coomassie se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el grupo control (T) y los diluyentes adicionados con trehalosa, donde se ven favorecidos los medios (T-25mM y T-50mM), a diferencia del medio T-100mM donde el porcentaje de viabilidad y la integridad acrosomal se vieron afectados notablemente. Se concluye que la trehalosa tiene la capacidad para estabilizar la membrana del espermatozoide y mantener su integridad acrosomal siempre y cuando no se sobrepase la tolerancia osmótica de la célula.

I.- INTRODUCCIÓN

La información con la se cuenta actualmente acerca de la anatomía y fisiología reproductiva de los delfines es muy poca. Anteriormente la mayor parte de la información había sido obtenida mediante la recolección de los órganos de estos animales en estaciones balleneras, barcos o museos. Fue hasta el año de 1938 con la apertura del primer delfinario en Florida, que se logró mantener con éxito algunos ejemplares de delfines en cautiverio, iniciándose así el estudio sistemático de la anatomía y fisiología de estos animales (Wood F.G, 1977).

El delfín nariz de botella es la especie comúnmente mantenida en cautiverio, ya que presenta una buena respuesta al entrenamiento y una mayor habilidad para tolerar el cautiverio (Mayer, 1998).

A mediados de los 70's la industria de espectáculos en México inicia con la inclusión de mamíferos acuáticos y desde entonces el número de empresas dedicadas al entretenimiento ha ido en aumento, al igual que los animales mantenidos en cautiverio. (Mayer, 1998).

La mayoría de los delfinarios están localizados en las zonas turísticas costeras en el suroeste del país, principalmente en Quintana Roo y algunos otros localizados en el noroeste, en Baja California.

La mayor parte de los animales utilizados fueron obtenidos de vida libre pero el incremento en la demanda de estos, aunado a la baja tasa reproductiva en cautiverio, ha provocado una gran controversia sobre el mantenimiento de

cetáceos bajo cuidado humano. (Mooney J, 1998); dicha controversia ha aumentado notablemente en los últimos años, basándose en argumentos emocionales enfocándose principalmente en la demanda por la liberación de ejemplares, en lugar de basarse en evidencia científica y poner énfasis en la educación ambiental del público en general. (Ugaz C.M, 2009).

Derivado de lo anterior, en el año 2003 se decretó la Norma Oficial Mexicana 135 de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (NOM-135-SEMARNAT) para la regulación de la captura para la investigación, transporte, exhibición, manejo y mantenimiento de mamíferos marinos en cautiverio y la Ley General de Vida Silvestre que prohíbe la importación y/o captura de delfines, lo cual obliga a los delfinarios a reproducir a sus animales y así obtener reemplazos.

Debido a la imposibilidad de adquirir delfines de vida libre y/o de otros países y a la importancia en la conservación de fauna silvestre es necesario implementar diversas tecnologías reproductivas, así como aumentar el reservorio del material genético de los mamíferos marinos bajo el cuidado humano, para mantener una mayor diversidad genética.

1.1 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

El delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) está considerado dentro del orden de los cetáceos y están distribuidos tanto en océanos templados como en tropicales.

El orden de los cetáceos a su vez esta subdividido en 3 subórdenes:

Misticetos: Incluye a todas las ballenas

Odontocetos: Incluye a las orcas, belugas, delfines y marsopas

Archaeocetos: Incluye a las antiguas ballenas, extintas en el Oligoceno (hace 30 millones de años).

El origen de los cetáceos aún no está definido, pero diversos estudios bioquímicos, genéticos y hallazgos fósiles sugieren que están relacionados con los ungulados. Se dice que su ancestro es el Mesonyx, que es un ungulado primitivo del tamaño de un perro, que vivió en América del Norte, Europa y Asia; se cree que alguno de estos animales se alimentaba de peces y se fue adaptando a vivir en aguas poco profundas, teniendo una vida anfibia. Inicialmente se cree que eran como nutrias o lobos marinos, que utilizaban sus miembros para moverse dentro del agua, pero que la cola modificó sus movimientos haciéndolos verticales, iniciando así su adaptación con la vida marina; posteriormente experimentaron rápidos cambios fisiológicos, modificando ojos, los riñones para un diferente balance electrolítico, perdieron el pelo, desarrollaron una capa de aislamiento debajo de la piel (blubber), la habilidad para escuchar debajo del agua, perdieron las extremidades posteriores, y adaptaron la circulación para tolerar altas profundidades y para el buceo. (Fordyce R.E, 1988).

Además, los cetáceos, para poder compensar la pobre visión bajo el agua y así competir con los demás habitantes marinos, como los tiburones, desarrollaron un sistema sensorial (sonar). El sonar es una comunicación muy eficiente en el agua y es la base de la ecolocalización. (Rommel SA, Lowenstine LJ, 2001). Los delfines producen una gran variedad de sonidos (silbidos, chillidos o gemidos) que

evidentemente son producidos para comunicarse. Muchas especies de cetáceos producen este tipo de sonidos como comunicación individual o señales específicas; algunos machos de ballena jorobada los realizan para cortejar a las hembras, algunos delfines (toninas), las orcas y los cachalotes emiten los sonidos para aturdir a sus presas y que sea más fácil su captura o como una forma de autodefensa (Fish J, Hubbs, 1993).

La ecolocalización se basa en la longitud de onda de los sonidos, la cual varía dependiendo la frecuencia. Los sonidos de baja frecuencia se atenúan más lentamente; es decir; viajan mayores distancias y aunque son utilizados para ecolocalizar la información que se obtiene del objetivo no es muy fina. En cambio los sonidos de alta frecuencia, viajan distancias menores, se atenúan más rápido, pero proveen mayor información ya que sus longitudes de onda son más cortas (Fig. 1) La información de cualquier señal acústica se representa por medio de sonogramas (frecuencia vs tiempo) o por espectros de frecuencia (niveles de presión de sonido con frecuencia). (Fish J, Hubbs, 1993).

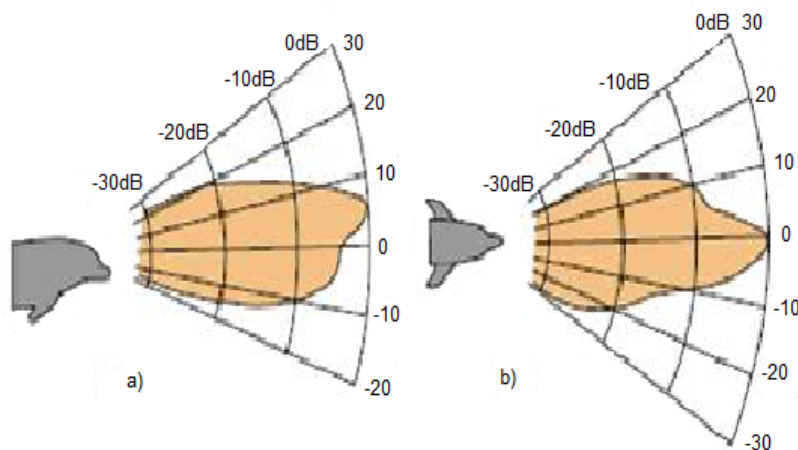


Fig. 1 Esquema de ecolocalización de un delfín nariz de botella a) Plano Vertical y b) Plano Horizontal (Modificado de Cranford *et al.*, 1996).

En los odontocetos los sonidos para la ecolocalización son producidos justo debajo del respiráculo en los sacos nasales, la producción de sonido se asocia al paso del aire al momento de la exhalación por los labios fónicos localizados debajo del saco aéreo vestibular. Los labios fónicos están compuestos por un par de bursas o bolsas dorsales las cuales están llenas de grasa llamadas “labios de mono” unidas al cartílago bursal y al ligamento del respiráculo. Al abrir y cerrar los labios fónicos, forzando el paso del aire, se determina la repetición de los clics. (Fig. 2).

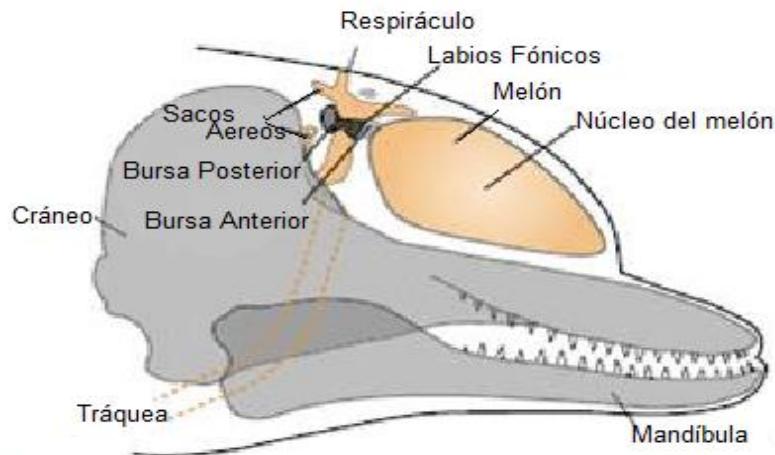


Fig. 2 Ilustración de la cabeza de un delfín nariz de botella, mostrando la posición del melón y las estructuras asociadas a la producción de sonido. La variación en la densidad lipídica se muestra con el sombreado. (Modificado de Crandford *et al*, 1996).

Además, el sistema de generación de sonido está acoplado al sistema de propagación (melón); este último contiene lípidos de baja densidad, que sirven como una lente acústica para crear emisiones direccionales enfocadas a los objetivos ubicados enfrente del mismo (Fish J, Hubbs, 1993).

El delfín nariz de botella tradicionalmente no habita aguas poco profundas, la mayoría de las poblaciones se localizan en mar abierto, aunque existen especies que viven en las costas (*Tursiops aduncus*). Al estudiar poblaciones de vida libre se descubrió que las poblaciones de mayor tamaño habitaban en aguas templadas, tropicales, encontrándose además que los delfines tienen un territorio estacional y otro de alrededor de 500km para viajes. (Mooney J, 1998 y Caldwell y Caldwell, 1972).

Los delfines son animales sociales y generalmente se encuentran en grupos de 2 a 15 individuos, aunque existe evidencia que en África del Sur se han observado grupos de hasta 1,000 individuos (Wells and Scott; 1999). Para formar un grupo social intervienen muchos factores como el sexo, la edad, condición reproductiva y las relaciones familiares; se han documentado 3 tipos de agrupaciones: bandas de hembras adultas con sus crías, grupos de subadultos de ambos sexos y machos adultos solitarios o en pares. (Wells *et al*; 1987).

II.- GENERALIDADES

2.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

Los machos presentan testículos en forma cilíndrica, localizados lateral y caudalmente a los riñones, se encuentran fijos a la pared dorsal de la cavidad abdominal. La túnica vaginal que cubre a los testículos, y también gran parte del

epidídimo, tiene un color blanco grisáceo. La túnica albugínea es una membrana gruesa y resistente, y está fusionada a la túnica vaginal. (Green R.F, 1977).

El testículo está formado por lóbulos de forma irregular, cada uno dividido por membranas septales, numerosos y pequeños canales en el septum forman la rete testis; estos canales se unen para formar el conducto eferente corto y aplanado, llegando al epidídimo, que es extensamente sinuoso y se divide en cabeza, cuerpo y cola. En la cola distal hay un incremento de tamaño formando así el conducto deferente, además existe un tubo ciego localizado en la parte distal del conducto deferente el cual se describe como un órgano reproductivo accesorio (glándula prostática) (Green R.F, 1977).

El pene de los delfines es fibroelástico, tiene su origen en la superficie media de los vestigios de los huesos pélvicos, siendo similar al de los rumiantes. Es retráctil y con una flexura sigmoidea, está soportado por el cuerpo cavernoso y la túnica albugínea que se insertan en los huesos isquiáticos de la pelvis. No existe os peneana. De la región pélvica el pene corre anteriormente, proyectándose dentro del saco peneal. (Pabst D.A *et al.*, 1999).

La piel que recubre el saco peneal se refleja hacia adelante para cubrir el primer tercio anterior del pene (cono terminal). Cuando el pene está erecto el recubrimiento del saco peneal es estirado hacia afuera para cubrir el tercio medio del pene, posterior al cono terminal. El pene relajado tiene una curvatura en forma de "S", esta curvatura es mantenida por los músculos retractores del pene, que se originan en la pared rectal anterior y se insertan en la porción ventral del pene inmediatamente atrás del cono terminal.

La erección del pene se debe parcialmente a la estructura fibroelástica del órgano, a la turgencia causada por la infiltración de sangre en el tejido cavernoso y a la relajación de los músculos retractores del pene. (Fig. 3). (Green R.F, 1977).



Fig. 3 Imagen de la erección del pene de un delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) donde se puede observar la irrigación de este debido a la infiltración de sangre en el tejido cavernoso. (Dolphin Discovery, Training Techniques, 2006).

2.2 MADUREZ SEXUAL

Diversas observaciones indican que los delfines machos tienen erecciones en un periodo cercano a las 48 horas posteriores a su nacimiento, esto debido a que los delfines poseen un control físico altamente desarrollado y las crías pueden intentar la cópula (normalmente con la madre) a las pocas semanas de nacidos. El joven macho continúa sus intentos por copular conforme se va desarrollando y puede alcanzar un patrón copulativo a los pocos meses de nacido, pero no alcanza la madurez sexual sino hasta los doce años (Schroeder J.P, 2001).

En el caso de las hembras, éstas alcanzan la madurez sexual alrededor de los 6 años y son poliéstricas estacionales. La época de apareamiento puede llegar a ser muy estresante para los machos maduros; los testículos, la próstata y los músculos asociados a los órganos reproductivos aumentan de tamaño en esta época. Aunado al estrés para controlar el territorio, por las peleas por las hembras, el consumo de alimento desciende marcadamente (Robeck T.R *et al.*, 2001).

Las principales hormonas relacionadas a la reproducción son producidas en el testículo; cada testículo con 2 regiones funcionales que consisten en las células intersticiales y los túbulos seminíferos, estos delineados con las células germinales y las células de Sertoli, que secretan andrógenos los cuales participan en la espermatogénesis. La testosterona es producida por las células de Leydig, que se encuentran entre el tejido intersticial y los túbulos seminíferos. (Kirby V.L, 2001).

En los machos aproximadamente 2/3 de la testosterona corporal es producida por los testículos el resto es de origen adrenal. (Kirby, V.L, 2001).

La pubertad en los machos es caracterizada por un marcado incremento en el desarrollo testicular, del tamaño del pene y aumento circulante en los niveles de testosterona, LH y FSH. (Kirby, V.L, 2001).

La madurez sexual de un macho se puede medir de diferentes formas: postmortem se puede basar en el peso testicular, en el diámetro de los túbulos seminíferos, en la presencia de espermatozoides en éstos, y por la presencia de líquido seminal en el epidídimo (Seargent *et al.*, 1973; Perrin and Reilly, 1984;

Cockcroft and Ross, 1990). In vivo se puede basar en la medición de los niveles de testosterona circulante o mediante la edad. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Madurez Sexual del delfín nariz de botella.

PATRÓN REPRODUCTIVO	EDAD	NIVEL DE TESTOSTERONA
Inmaduro	1 a 7 años	≤ 3 ng/ml
Púber	8 a 12 años	De 3 a 5 ng/ml
Maduro	De 12 años	De 5 a 54 ng/ml

(Adaptado de Kirby, V.L, CRC Handbook of Marine Mammals).

2. 3 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ANIMAL

El entrenamiento animal ha existido por mucho tiempo, esto mediante la domesticación animal y la modificación de su comportamiento. Fue en 1938 cuando B.F Skinner publicó su libro “El Comportamiento de los Organismos” donde se explica la psicología del aprendizaje y sus efectos en el comportamiento.

El fundamento científico de esta disciplina tiene 2 raíces: la etología y la psicología, cada una con un enfoque específico.

Mientras los etólogos se enfocan en la evolución del comportamiento haciendo énfasis en comportamientos instintivos, los psicólogos se basan en elementos del aprendizaje y de la influencia del ambiente sobre el desarrollo de un comportamiento (Galindo y Orihuela, 2004).

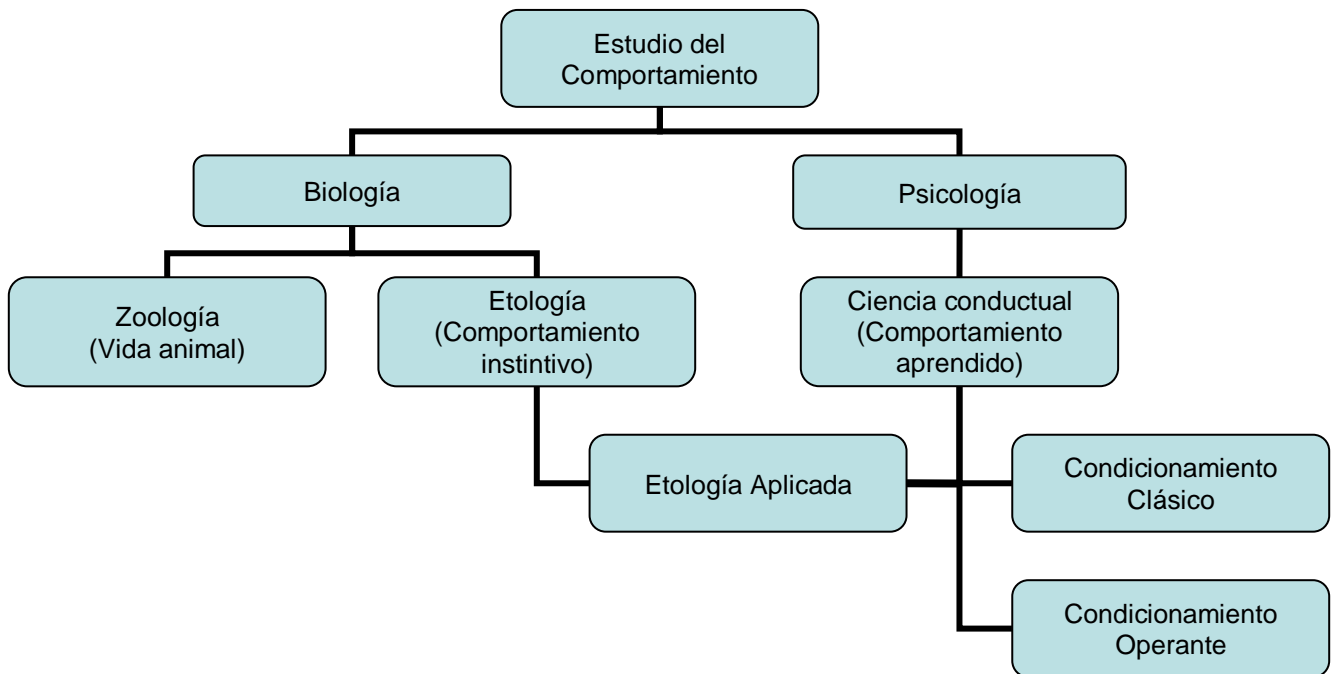


Fig. 4 Esquema del comportamiento animal. (Adaptado de Galindo F.A y Orihuela A: Etología Aplicada, 2004).

La etología se refiere a la observación y descripción detallada del comportamiento animal, con el fin de conocer el funcionamiento de los mecanismos biológicos. El condicionamiento es un proceso de modificación de la conducta, donde un sujeto asocia un comportamiento deseado con un estímulo previamente no relacionado. La etología aplicada toma fundamentos de ambas posturas para entender de manera integral los problemas de salud y bienestar cuando las condiciones del entorno afectan el comportamiento natural (Fig. 4). Para entender el condicionamiento, necesitamos entender la relación entre comportamiento y estímulo. Comportamiento es cualquier acto o respuesta medible u observable. Estímulo lo que causa una respuesta conductual (comportamiento). (Pryor , 2004).

Existen 2 tipos de Condicionamiento Animal:

2.3.1 Condicionamiento Clásico o Pavloviano

Tipo de aprendizaje basado en una respuesta fisiológica o involuntaria a un estímulo. Se llama pavloviano debido al experimento de Pavlov con la campana y el perro.

En presencia de su perro, Pavlov hacía sonar una campana (estímulo neutral) lo cual no provocaba respuesta comportamental por parte del perro; después de sonar la campana el perro siempre recibía su alimento, estableciendo así una relación entre la campana y el alimento. Al sonar la campana el perro comenzaba a salivar, aun cuando la comida no era presentada. Esta relación entre estímulo (el sonido de la campana y el alimento), causaba el comportamiento de salivación (respuesta fisiológica o involuntaria) por parte del perro (Pryor, 2004).

2.3.2 Condicionamiento Operante

El condicionamiento operante es un tipo de aprendizaje en donde la frecuencia de una conducta ocurre debido a la consecuencia que ésta tenga, es decir, donde el sujeto llega a asociar gusto o disgusto por la acción a causa de la consecuencia. En este condicionamiento la respuesta siempre será voluntaria.

Un punto clave del condicionamiento operante es el refuerzo, el cual debe ocurrir al terminar el comportamiento y a causa de este. El refuerzo no es más que un estímulo para que un comportamiento se repita en el futuro. (Pryor, 2004).

En el caso de los delfines, para la obtención de algún comportamiento se trabaja con 2 tipos de condicionamiento operante el emitido y el solicitado. El comportamiento emitido es algo que el animal hace naturalmente y el entrenador captura el momento en el que el animal lo presenta para así provocar la repetición del comportamiento. Un comportamiento solicitado es cuando el entrenador da cierta información para indicarle al animal que debe comportarse de cierta manera. (Dolphin Discovery: Training Techniques, 2006).

Es importante utilizar una señal (marcaje) para indicarle al animal porque está siendo premiado o reforzado. A esta señal se le llama bridge (puente) el cual puede ser auditivo, visual o táctil. Esta señal le indica al animal un “sí” ese es el comportamiento que deseo y además le indica que el refuerzo está por llegar (Pryor , 2004).

En el caso para la colección de semen se siguen diversos pasos para lograr el comportamiento:

1. Este comportamiento se debe realizar siempre en un encierro (holding) específico.
2. Palpar al animal en y alrededor del área genital, buscando tranquilidad y comodidad en él; no debe mover ni rostro ni aletas.
3. Con el ejemplar en decúbito dorsal, con la mano enguantada se introduce el dedo índice izquierdo en el área genital hasta tocar la punta

del pene moviéndolo ligeramente de un lado a otro (aletas y cabeza del animal deben estar tranquilas y sin moverse).

4. La mano derecha debe estar debajo sosteniendo al delfín, entre ano y genitales. Con esto se está buscando pequeñas contracciones del músculo recto abdominal, oblicuo interno y del panniculus (que controlan la erección del pene).
5. En este paso es muy importante la mano derecha para sentir las contracciones, por más ligera que sea (como el pulso de la sangre) se debe bridgear (puente) y reforzar al animal.
6. Continuar estos pasos hasta sentir una contracción fuerte, el dedo índice se va alejando cada vez más del pene, para que funcione como un objetivo (target) y cada vez que el pene toque el dedo índice se bridgea (puente) y se refuerza al animal.
7. Así hasta lograr una exposición completa del pene, el cual debe lucir de un tono rosa rojizo (con una buena irrigación) y firme, antes de tocarlo.
8. Introducir una segunda persona quien sostendrá dorsalmente al animal a la altura del área genital y del ano.
9. Tocar el pene con un dedo luego dos y así sucesivamente hasta poder sujetarlo con toda la mano, sin incomodar al animal, ya que se logra este paso, iniciar movimientos ligeros de arriba hacia abajo para estimular.

10. Juntar dedo índice y pulgar formando un anillo, el cual permanecerá firme al momento de realizar el jalé (tirar del pene), utilizar toda la mano para abrazar el pene, el anillo marca la altura del jalé. (el cual es tipo freno de mano)
11. Introducir la vagina colectora de semen y utilizar lubricante base agua. El jalé debe ser seco, rápido y firme; pero sin lastimar al animal simulando la intensidad con la que el macho penetra a la hembra (Dolphin Discovery: Training Techniques, 2006).

III.- ANTECEDENTES

Una de las estrategias para la conservación de la biodiversidad es la criopreservación de las células germinales, con la finalidad de ser utilizadas en el futuro para restablecer las especies amenazadas. Dado que los espermatozoides son células accesibles y se han criopreservado con éxito en algunas especies de mamíferos y aves, éstos son los que tienen un mayor potencial para el establecimiento de un banco de germoplasma (Gilmore *et al.*, 1998).

La criopreservación de semen, en combinación con la inseminación artificial, ha tenido un gran impacto en la reproducción animal a nivel mundial, ya que ha permitido no solo incrementar el número de crías, sino el mejoramiento genético. (Watson., 1995).

En la actualidad el manejo reproductivo de especies de fauna silvestre se ha visto beneficiado por la integración y desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la

reproducción asistida (Robeck y O'Brien 2004). En el caso del semen del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) el primer informe de criopreservación fue realizado por Seager *et al.*, (1981), quien mencionó la existencia de diversos métodos de colección de semen como la electroeyaculación, obtención por entrenamiento y la colección postmortem.

Si bien el método de criopreservación permite conservar viables y durante largo tiempo a los espermatozoides, se ha observado que algunos espermatozoides descongelados, aparentemente fértiles, no mantienen la misma capacidad fecundante que tenían al momento de ser eyaculados, debido a alteraciones celulares inducidas por el proceso (Storinelli *et al.*, 2005).

Se ha señalado que durante la congelación-descongelación, los daños que sufren las células espermáticas pueden presentarse en diversos grados debido a distintos mecanismos en cada fase del proceso. Al final menos del 50% de los espermatozoides sobreviven (Giraud *et al.*, 2000). Esto se ha atribuido a los cambios drásticos de la temperatura (estrés térmico), la formación de cristales de hielo, de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en la membrana plasmática, en la función metabólica, daño al DNA, toxicidad de los crioprotectores y el estrés osmótico. (Watson., 1995.) Aunque en el caso del delfín se ha observado que la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides pueden ser mayores al 60% al descongelado, la concentración espermática requerida para lograr una inseminación exitosa debe ser de 270×10^6 células/ml (Robeck y O'Brien *et al.*, 2006); indicativo de que el espermatozoide sufre otras alteraciones no detectadas al evaluar los parámetros tradicionales. Respecto a esto último, en otras especies de mamíferos domésticos se ha observado que los espermatozoides

descongelados no requieren una incubación previa para adquirir la capacitación, por lo que se ha determinado que el proceso de crioconservación induce un estado similar a éste; así mismo se observa un aumento en las células que presentan reacción acrosomal, lo que se conoce como criocapacitación, que se traduce en un menor tiempo de vida y fertilidad espermática (Green *et al.*, 2001).

Para el proceso de congelación es necesario adicionar diversos crioprotectores, los cuales pueden alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas donde ocurre la criopreservación. (Boiso *et al.*, 2001). En el delfín se han empleado diversos métodos para la criopresevación del semen muy similares a los usados en caninos, encontrándose que el método más efectivo es el que contiene glicerol al 4% adicionado con tris y yema de huevo. (Robeck y O'Brien *et al.*, 2004).

Si bien el glicerol es el crioprotector más empleado, la concentración del mismo en los medios de dilución debe ser baja (menor al 4%), ya que concentraciones mayores tienen efectos perjudiciales, principalmente porque los crioprotectores permeables con su entrada y salida pueden producir cambios en el volumen celular y por lo tanto daño osmótico (Watson, 1995 y Morris *et al.*, 2006).

Por otra parte, se han observado notables mejoras en el semen descongelado al emplear la trehalosa como crioprotector en el carnero, ratón, conejo, muflón europeo y perro, obteniéndose porcentajes mayores de células sin alteraciones en la membrana, de movilidad y de embriones por fertilización in vitro. (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009, Aboagla *et al.*, 2000, 2004, Aisen E.G *et al.*, 2002 y 2005, Bhur M *et al.*, 2001, Bwanga *et al.*, 1990, Roca *et al.*, 2005).

En el caso del espermatozoide del delfín no existe información sobre el uso de la trehalosa en el medio de congelación. Adicionalmente, el empleo de la trehalosa en el diluyente para la conservación del semen de cerdo a 16° C ha permitido conservar un mayor número de células con el acrosoma íntegro, mantener la movilidad hasta por seis días e incrementar la fertilidad y el número de embriones obtenidos en comparación con un diluyente sin trehalosa. De manera general, se ha propuesto que la efectividad de un crioprotector depende de su capacidad para salvaguardar a la célula del daño por congelación y de no resultar un agente tóxico para ésta. Así, una de las funciones de éstos es mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y, por lo tanto, una menor concentración de electrolitos para posibilitar la supervivencia celular; sin embargo el uso de éstos provoca daños importantes sobre la membrana y el citoesqueleto (Stornelli *et al.*, 2005).

En el caso del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) se ha visto que la inseminación artificial (IA) con semen fresco tiene mejores resultados que la realizada con semen criopreservado (Robeck *et al.*, 2004).

La mayoría de los trabajos publicados sobre congelación de semen de delfín han usado el método de pastilla o pellet, el cual ha permanecido sin cambio por más de 25 años. Si bien el empleo de pastillas para dicho proceso ha sido empleado con relativo éxito en varias especies domésticas (por ejemplo, borrego y cerdo) y fauna silvestre (elefante y panda gigante, entre otras), el uso de pajillas proporciona mayores ventajas al proporcionar condiciones estériles de empaquetamiento, que aseguran la integridad de la muestra; son de fácil

identificación y evitan la contaminación de patógenos que pudiera ocurrir durante el almacenamiento de la muestra. Por otra parte, a la fecha, aparentemente no existen reportes en los que se haya evaluado el estado fisiológico del semen descongelado de delfín. En otras especies se ha observado que los espermatozoides que resisten el proceso de congelación y descongelación presentan modificaciones en la membrana plasmática similares a los que se producen durante la capacitación y la reacción acrosomal, como la pérdida de fosfolípidos y colesterol (Holt *et al.*, 1994). Esto se ha atribuido al daño en la membrana del espermatozoide que se produce durante la criopreservación y el descongelado, lo que lo hace más permeable, por lo que los iones que se encuentran en altas concentraciones en el medio extracelular, como el Ca^{2+} , entra a la célula estimulando los eventos dependientes del calcio, como la capacitación y la reacción acrosomal (Watson, 1996). Por lo tanto el ensayo de un protocolo de congelación con diferentes crioprotectores, aplicados a una especie de interés y la evaluación de los mismos mediante la valoración de diversos parámetros permitirá incrementar la eficiencia de la IA con semen criopreservado y en un futuro recrear una población silvestre sostenible.

3.1 ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide fue descrito por primera vez en 1677 por Leeuwenhoek, quien observó su forma general e hizo una descripción de los diferentes movimientos que presentaba la célula; pero no fue hasta 1875 cuando Hertwig demostró la

penetración del espermatozoide al ovocito y por lo tanto la unión de ambos gametos. (Fawcett, 1975).

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula altamente especializada en el almacenamiento y transporte de material genético, por lo que tiene una limitada capacidad de autoreparación (Aurich, 2005).

En el espermatozoide de delfín, al igual que en el de los demás mamíferos, se pueden identificar diversos segmentos: una cabeza, la cual es elipsoide, un cuello que une a la cabeza con el flagelo; este último se divide en la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal, todas estas estructuras delimitadas por la membrana plasmática. La longitud de la cabeza es de 4.5 μm y 2 μm de ancho; la longitud de la pieza media es de 4 μm ; la longitud del flagelo es de 60 μm (incluyendo la pieza media), teniendo un tamaño total promedio de 65 μm (Fleming, 1981).

En la cabeza se encuentra el núcleo el cual contiene cromatina altamente condensada con un contenido de DNA haploide, rodeando al núcleo esta la teca perinuclear y el acrosoma que ocupa la región anterior de la cabeza. (Juárez, 2000). El acrosoma es originado durante la fase de espermátida a partir del complejo de Golgi; éste contiene las enzimas necesarias para la penetración del ovocito tales como son la hialuronidasa y la acrosina. El acrosoma consta de una membrana interna localizada por arriba de la teca perinuclear y una membrana externa relacionada con la parte de la membrana plasmática de la cabeza espermática. El cuello abarca desde la cabeza en la base del núcleo hasta la

pieza media del flagelo, aquí se pueden observar diferentes estructuras como la placa basal, los cuerpos laminares, el *capitulum*, las columnas segmentadas, el cuerpo basal y el axonema. (Mackinnon y Voss, 1993).

La pieza media se extiende desde la región distal del cuello hasta el anillo de Jensen (*annulus*); en esta parte podemos distinguir el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas (Fawcett, 1975).

El axonema ocupa todo el eje central del flagelo y se forma por 2 microtúbulos simples, que a su vez está rodeado por nueve dobletes de microtúbulos y diversas proteínas.

3.2 ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación y desarrollo celular que ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos y tiene el objetivo de producir espermatozoides. Su duración depende de la especie; en el caso del delfín aun no se ha determinado la duración de esta. (Hafez y Hafez, 2000).

Este proceso ocurre en 3 fases:

Mitosis

Las células germinales (espermatogonias) que están en el testículo inmaduro se activan en la pubertad y sufren mitosis mientras se sitúan en el compartimiento basal del túbulo seminífero. Así, las espermatogonias madre se dividen y originan otra célula con una característica morfológica propia (espermatogonia A1). La aparición de estas células marca el inicio de la espermatogénesis, estas

espermatogonias pasan por un número definido de divisiones mitóticas exclusivas de la especie; que dan por resultado clonas celulares que difieren morfológicamente de sus progenitoras, en el caso del delfín aun no se cuenta con esta información. La división nuclear (cariocinesis) durante la mitosis es completa a diferencia de la citoplasmática (citocinesis). El resultado de la última división mitótica son los espermatoцитos primarios que entraran a meiosis. (Hafez y Hafez, 2000).

Meiosis (Espermatocitogénesis)

Durante este paso se expresan diversos genes localizados en los autosomas; ocurre la primera división meiótica y dan lugar a los espermatoцитos secundarios; en la segunda división meiótica se activan los genes localizados en los cromosomas sexuales, se detiene la producción de RNA y los espermatoцитos reducen su DNA convirtiéndose a un contenido haploide (espermátides). (Hafez y Hafez, 2000).

Fase posmeiotica (Espermiogénesis)

En esta fase se remodela la estructura de las espermátides por una serie de cambios morfológicos que incluyen la condensación de la cromatina nuclear, la formación de la cola o aparato flagelar y el desarrollo del casquete acrosómico, para dar lugar al espermatozoide (Hafez y Hafez, 2000).

Al concluir la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados a la luz de los conductos seminíferos, por medio de la espermiación (Hafez y Hafez, 2000).

Los espermatozoides son transportados desde el testículo a través del epidídimo, el cual transporta distalmente a los espermatozoides al conducto deferente. Durante su paso por el epidídimo los espermatozoides sufren un proceso de maduración (capacidad potencial de fecundar al óvulo), el cual incluye la adquisición de la movilidad sostenida, pérdida de agua, migración distal y pérdida eventual de la gota citoplasmática; este proceso está influenciado por los andrógenos testiculares. Además durante este trayecto los espermatozoides entran en contacto con fluidos epididimales los cuales los cubren con una capa de carbohidratos y proteínas (factor descapacitante); en el delfin se desconoce la duración de este paso. (Hafez y Hafez, 2000).

El proceso de maduración se considera parcial, ya que los espermatozoides deben sufrir otro tipo de capacitación o maduración en el aparato reproductor de la hembra que les permita interactuar con el óvulo para llevar a cabo la reacción acrosomal y poder penetrar a este (Hafez y Hafez, 2000).

3.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides no adquieren su capacidad de fecundar hasta que no recorren el tracto reproductivo de la hembra. La capacitación ocurre desde el útero pero la de importancia fisiológica es la que experimentan los espermatozoides que logran alcanzar la región ístmica del oviducto, en donde sufren cambios fisiológicos vitales para que puedan sufrir la reacción acrosomal y poder realizar la fecundación (Hafez y Hafez, 2000).

La capacitación es un proceso mediado por el incremento de Ca^{+2} intracelular (Singh *et al.*, 1978), consecuencia de una cascada de procesos fisiológicos, activados por diferentes vías de señalización en el aparato reproductor de la hembra.

No todos los espermatozoides se capacitan al mismo tiempo, ya que este proceso depende también de la respuesta individual de cada célula. Los principales eventos que ocurren en la capacitación que provocan la reacción acrosomal son: (Hafez y Hafez, 2000).

- a. La remoción del factor descapacitante (partículas intermembranas) en la superficie del espermatozoide provocada por los fluidos en el aparato reproductor de la hembra.
- b. La disminución del contenido de colesterol y de la rigidez de membrana plasmática del espermatozoide y la modificación de glucosaminoglucanos.
- c. Cambios iónicos a medida que el espermatozoide avanza por el aparato reproductor (aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular).
- d. Aumento del metabolismo energético y de la movilidad del espermatozoide y por lo tanto en hay un cambio en el patrón de movilidad.

Los espermatozoides, como algunos tipos celulares, mantienen gradientes de concentración a través de la membrana plasmática (MP) manteniendo una mayor concentración de K^+ y una menor de Na^+ en el espacio intracitoplasmático, lo cual es mediado por la bomba de Na^+/K^+ . Durante la capacitación este proceso se invierte, reflejando una disminución de la actividad de la bomba. Acerca del papel

del Ca^{2+} en la capacitación no se tiene mucha información, pero Félix (2002) sugiere que la albúmina sérica tiene un papel significativo en la permeabilidad de membrana, mientras que el β -estradiol en pequeñas concentraciones inhibe la actividad de los canales de Ca^{2+} . Se sabe que la concentración de Ca^{2+} en el espermatozoide es baja en la cabeza y en el flagelo, desconociéndose la forma en la que éste se almacena, aunque se ha propuesto que las mitocondrias y algunas proteínas pueden actuar como reservorios. El incremento del Ca^{2+} durante la capacitación está relacionado con un aumento en los niveles de AMPc y en la fosforilación de proteínas espermáticas, como la fosfolipasa C; estos eventos están relacionados con la desestabilización de membranas. (Galina C y Valencia J, 2008). Todo esto ha sido estudiado en espermatozoides de diversas especies domésticas como en el del humano; en el caso del delfín no se ha definido esta información.

3.4 REACCIÓN ACROSOMAL

Ésta ocurre enseguida de la capacitación; durante ésta el espermatozoide ha modificado su patrón de movilidad, dejando de ser lineal y progresivo convirtiéndose en un movimiento poco controlado, agitados y en un solo lugar; a esto se le conoce como hipermovilidad, que ayuda en el contacto de éste con el óvulo, generalmente ocurre en el ámpula del oviducto.

La reacción acrosomal (RA) se desencadena por la presencia de una glicoproteína que está en la zona pelúcida (ZP_3) y de la progesterona liberada por células de la granulosa que forman el *cumulus*, que al hacer contacto con sus receptores

específicos localizados en la membrana plasmática del espermatozoide, desencadenan una cascada de señalización para liberar el contenido (Hafez y Hafez, 2000).

La reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa; produciendo pequeñas vesículas mixtas en los puntos de fusión y liberando así las enzimas contenidas en el acrosoma; este proceso de exocitosis le permite al espermatozoide penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Después de la RA la única porción del acrosoma que se conserva, es el segmento ecuatorial donde se establece un nuevo dominio de fertilización esencial para la interacción de los gametos y completar así la fertilización. (Parks *et al.*, 1992; Hafez y Hafez, 2000; Galina y Valencia, 2008).

3.5 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es el proceso empleado para congelar tejidos y células vivas, disminuyendo su metabolismo al mínimo, dejando funcional sólo lo necesario para sobrevivir, en este caso sin perder su capacidad fertilizante.

Durante la criopreservación, el descongelamiento o en ambos se pueden provocar daños a la célula espermática a través de distintos mecanismos; tales como formación de cristales de hielo, cambios en concentración de solutos o cambios por deshidratación, lo que provoca que menos del 50% de los espermatozoides sometidos a este proceso sobreviva. (Giraud *et al.*; 2002).

3.5.1 Sobre-enfriamiento

Durante la congelación existen puntos críticos como la fase inicial de enfriamiento y el periodo de retorno para la supervivencia celular. (Mazur, 1984).

El sobre-enfriamiento ocurre cuando la temperatura de la célula disminuye a una temperatura cercana al punto de congelación por debajo de los 0°C en la cual el agua extracelular se congela mientras que el agua intracelular no lo hace a la misma velocidad, ya que la membrana celular funciona como barrera impidiendo que el cristal extracelular crezca hacia el interior de la célula (Watson, 2005).

Por ello es muy importante tener una velocidad de enfriamiento adecuada, permitiendo que el agua intracelular salga para que el proceso de congelación inicie extracelularmente, por medio de núcleos de hielo, y así evitar que se formen cristales dentro de la célula y ésta se dañe por efecto mecánico. (Watson, 1995). Sin embargo, esto no garantiza la supervivencia de la célula, ya que la presión que ejerce el crecimiento del hielo sobre la célula, provoca una deformación que en bajas temperaturas podría ser letal. (Mazur, 1984).

3.5.2 Efecto solución

Como resultado del efecto anterior conforme aumenta la osmolaridad del medio extracelular, debido a la formación de cristales, el agua intracelular sale (deshidratación) para mantener la osmolaridad de la solución donde está suspendida la célula. Al continuar el sobre- enfriamiento, más moléculas de agua se congelan y por lo tanto hay menor líquido y mayor osmolaridad por lo que se

forman zonas o canales hiperosmolares causando el efecto solución, que son modificaciones del agua donde se encuentra suspendida la célula provocando que la misma se encoja. (Watson y Duncan, 1988).

3.5.3 Estrés osmótico

Debido a las variaciones extremas de temperatura y osmolaridad a la que son sometidos los espermatozoides durante el proceso de criopreservación se produce un cambio drástico en el volumen celular lo que provoca un estrés osmótico.

Además, el adicionar un crioprotector (que puede ser permeable o no), provoca un cambio en la concentración de solutos intracelulares; lo mismo ocurre al congelar la solución o al descongelarla, provocando cambios en el volumen y por lo tanto en la función celular. (Wessel y Ball, 2004).

3.6 ALTERACIONES ESPERMÁTICAS CAUSADAS POR EL PROCESO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Los espermatozoides que son sometidos a la congelación y a la descongelación, debido a las fluctuaciones de temperatura, pueden sufrir modificaciones en la organización de la membrana plasmática, proceso similar a lo que ocurre fisiológicamente durante la capacitación y en la reacción acrosomal, a lo que se le conoce como criocapacitación.

El daño en la asimetría de la membrana, ha sido atribuido a la pérdida de fosfolípidos y colesterol o fracciones de éstos, lo que hace que la membrana sea más permeable y que por lo tanto los iones que están en el medio extracelular

como el Ca^{2+} y el Na^+ entren a la célula. Esto ocasiona además cambios osmóticos, que al no ser regulados correctamente pueden dañar a su vez otras estructuras de la célula. (Watson, 1995).

Así, se menciona que la resistencia que tienen los espermatozoides a la congelación depende en gran parte de la membrana, específicamente de la concentración de colesterol y de la relación de ácidos grasos poliinsaturados y saturados. En algunas especies como en el humano o el conejo, la concentración de ácidos grasos y colesterol es muy elevada, lo que les da a los espermatozoides una mayor resistencia al choque frío a diferencia de otras especies. Esta tolerancia a la congelación se ha visto también en los delfines. (Durrant *et al.*, 2000).

Por otra parte, además del daño a la membrana, durante la criopreservación se pueden formar especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden tener efectos tóxicos y dañar la funcionalidad de la célula. Los ROS reaccionan con los ácidos grasos, con los nucleótidos de DNA, proteínas y carbohidratos sustrayendo electrones para mantener su estabilidad. (Machlin y Bendich, 1987; Baumber *et al.*, 2002).

Si bien los ROS cumplen una función importante en la fisiología normal de algunas células, el desequilibrio en su producción se relaciona con diversas mutaciones, infertilidad, anormalidades morfológicas, disminución en la movilidad y daño en la integridad acrosomal y de membrana. (Baumber *et al.*, 2000).

También se han encontrado daños en el citoesqueleto, ya que las proteínas que sostienen a la membrana plasmática y acrosomal sufren una despolimerización y repolimerización que dependen de la temperatura, provocando los cambios en el volumen de las células espermáticas durante la congelación. (Watson, 1995).

3.7 CRIOPROTECTORES

Durante la criopreservación de semen, además de requerir una adecuada velocidad de enfriamiento, se necesita la adición de un medio que funcione como protector para alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas donde ocurre la criopreservación. (Boiso, 2001).

La principal característica que se busca en los agentes protectores es la capacidad para evitar que la célula sufra daño por congelación, pero sin ser tóxico para ésta. Éstos sirven para mantener una mayor proporción de agua en estado líquido a bajas temperaturas lo que provoca tener una menor concentración de electrolitos y mantener la supervivencia celular durante el proceso. (Ya-Hui Li *et al*, 2005).

Sin embargo, se ha reportado que el uso de éstos produce daños sobre algunas estructuras tanto en la membrana como en el citoesqueleto de la célula. (Stornelli *et al.*, 2005).

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a los mismos. En el primer grupo se encuentran las sustancias que poseen bajo peso molecular o crioprotectores penetrantes, los cuales protegen a la célula de lesiones causadas por una congelación lenta; los más usados de este

grupo son: el glicerol, el etilenglicol y el DMSO. Éstos son usados para remover el agua intracelular, reemplazándola por el crioprotector durante el enfriamiento para prevenir el choque osmótico, interviniendo en la rehidratación intracelular durante la descongelación y en la estabilización de membranas y proteínas. (Medina *et al.*, 2005). El otro grupo está formado por sustancias de alto peso molecular o crioprotectores no permeables que pueden actuar extrayendo el agua libre intracelular, utilizando la diferencia de presión osmótica, sin penetrar la célula. Éstos son útiles en protocolos con velocidades de congelación rápidas. La rafinosa, la sacarosa y la trehalosa son algunos de los crioprotectores utilizados exitosamente en este tipo de congelación (Liu *et al.*, 1998; Patist y Zoerb 2005).

3.7.1 GLICEROL

Es el crioprotector más utilizado para la congelación de células (Polge *et al.*, 1949) ya que penetra dentro de la célula espermática evitando la formación de hielo intracelular y la concentración de electrolitos. A pesar de su eficacia, puede resultar tóxico para los espermatozoides de algunas especies; por lo cual la concentración del glicerol debe ser baja y cuya tolerancia varía dependiendo la especie (Clark *et al.*, 2003).

Se ha comprobado que en el espermatozoide de gallo y caballo el glicerol disminuye la fertilidad del semen (Hammerstedt y Graham, 1992; Squires *et al.*, 2004). También se ha visto que disminuye la movilidad y altera el potencial de membrana mitocondrial (Ball y Vo *et al.*, 2001).

Existen muchas teorías que intentan explicar la causa de la toxicidad del glicerol; la primera se relaciona con la acción osmótica ya que la introducción y remoción del mismo puede provocar grandes cambios en el volumen osmótico. Se ha demostrado que ésta toxicidad es específica de cada especie, por ejemplo se ha visto que los espermatozoides de ratón son más sensibles en este punto que los espermatozoides de humano. (Noiles, 1997).

Otros autores atribuyen, los efectos tóxicos del glicerol a que afecta la polimerización de actina, la cual es esencial para que las células espermáticas lleven a cabo sus funciones normales (Liu *et al.*, 1999).

En caso de espermatozoides de carnero, macho cabrío, verraco y toro, se ha observado que el espermatozoide es incapaz de metabolizar el glicerol. (Johnson, 1985).

Debido a esto, se sugiere utilizar concentraciones bajas en glicerol, para que al momento del descongelado se tenga un mayor número de espermatozoides viables. En el caso del delfín se ha reportado la utilización al 4% de glicerol, empleando el método de pastilla que comúnmente se utiliza en caninos; observando una movilidad total del 60% y una movilidad progresiva de 5 posterior al descongelado (Robeck y O'Brien; 2006).

3.7.2 TREHALOSA

Algunos azúcares se han utilizado como crioprotectores no permeables, ya sea solos o en combinación con algún crioprotector permeable. (Lillford y Holt, 2002).

La trehalosa tolera una alta temperatura de transición, así como un alto punto de fusión en solución; es un disacárido no reductor de glucosa (α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranososa) lo que le brinda una estructura muy estable (Chen *et al.*, 2000). Este azúcar se ha encontrado en altas concentraciones (80-90%) en la hemolinfa de insectos (*Polypedilum vanderplanki*), produciéndose en otros organismos de forma natural como una repuesta al estrés, la deshidratación y los cambios osmóticos. (Leslie *et al.*, 1995; Cerrui *et al.*, 2000).

Wigger describió la trehalosa por primera vez en 1832, como un azúcar que estaba presente en el centeno (*Claviceps purpurea*). Posteriormente fue aislado en las pupas o capullos de los escarabajos (*Larinus mucalata*), a los cuales comúnmente se les llama “trehala” y de ahí recibió su nombre por Bertelot. (Gutiérrez-Pérez, 2009).

Existen varias teorías para explicar el mecanismo por el cual la trehalosa estabiliza diversas biomoléculas:

- a) Formación de puentes de H con proteínas y fosfolípidos reduciendo así la cantidad congelable de agua. (Rudolph y Crowe, 1985).
- b) Formación de una capa que atrapa las moléculas de agua cercanas a la superficie biomolecular (Patist y Zoerb, 2005).
- c) Alta viscosidad, lo que estabiliza macromoléculas envolviéndolas para mantener su conformación. (Sampedro *et al.*, 2002).

Ya sea por acción de uno o de los tres mecanismos, los beneficios de la adición de trehalosa se observan en la disminución de fosfolípidos separados, lo que evita

la fusión de la bicapa lipídica de la membrana, además de estabilizar la estructura de las proteínas (Gutiérrez-Pérez, 2009).

Por estas propiedades se ha utilizado para la preservación de células, por ejemplo de células de órganos para transplantes (Chen *et al.*, 2004; Sasnoor *et al.*, 2005), en células de la piel (Erdag *et al.*, 2002), en la criopreservación de ovocitos humanos (Eroglu *et al.*; 2002) y en embriones de rata (Honadel *et al.*, 1988).

En el caso de los espermatozoides, los beneficios dependen de la especie. En los bovinos, la movilidad y la viabilidad no han presentado mejoras significativas. Chen *et al.*, 1992; Foote *et al.*, (1997) quienes utilizaron concentraciones de 67mM y 100mM de trehalosa respectivamente en medios a base de leche descremada, observaron que ésta combinación tiene un efecto detrimental en el espermatozoide (Bakas y Disalvo, 1991). Lo anterior puede contradecir lo mencionado por Ainsen *et al.*, 2000, 2002 y 2005 quienes reportan buenos resultados en espermatozoides de carnero a una concentración de 100mM. Woelders *et al.*; (1997) mencionó mejoras significativas tanto en viabilidad como en integridad al emplear una concentración de 200mM utilizando un diluyente a base de tris-yema de huevo. En el ciervo rojo ibérico se observó una disminución en la movilidad, pero sin dañar la integridad de membrana (Fernández-Santos *et al.*, 2007). En otro estudio empleando espermatozoides de gacela africana, se observó que los diluyentes que tenían trehalosa mostraron porcentajes menores de viabilidad, movilidad e integridad acrosomal (Garde *et al.*; 2002), iguales resultados fueron obtenidos en un estudio con semen de garañón (Squires *et al.*, 2004).

Por otra parte, en el semen de carneros se alcanzó un mayor porcentaje de movilidad y de fertilidad al descongelado, sin alteraciones en la membrana (Aisen *et al.*, 2005; Bucack *et al.*, 2007); lo mismo fue observado en los espermatozoides de machos cabríos (Aboagla *et al.*, 2004) y en muflones europeos donde además se observó un incremento en el porcentaje de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* (Berlinguer *et al.*, 2007). En el caso de los ratones se encontraron resultados similares (Sztein *et al.*, 2001).

En el perro sucede lo mismo, aumentando el porcentaje de viabilidad y movilidad al adicionar trehalosa al medio de congelación (Yildiz *et al.*, 2000) y en el caso del conejo la adición de trehalosa y metil celulosa aumenta el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (Dalimata y Graham, 2008).

No existen referencias acerca de la adición de trehalosa a los medios de criopreservación en el semen de delfín.

IV.- HIPÓTESIS

La adición de trehalosa a un medio a base de Triladyl* garantizará una mejor viabilidad e integridad en el semen criopreservado del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) que un medio a base solamente de Triladyl*.

V.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Comparar la capacidad crioprotectora de la combinación Trehalosa-Triladyl con la de un medio de congelación a base de Triladyl, en el semen del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*).

5.2 Objetivos Específicos:

- Valorar microscópicamente la movilidad, la integridad de membrana y del acrosoma de los espermatozoides de delfín antes y después del proceso de congelación (mediante diversas técnicas macro y microscópicas) para comparar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de trehalosa (25Mm, 50Mm y 100Mm) al medio de crioconservación a base de Triladyl sobre los parámetros antes mencionados.
- Comparar los resultados obtenidos de los diferentes parámetros evaluados, en los medios de congelación para determinar cuál es el que mejor mantiene la viabilidad de los espermatozoides del delfín nariz de botella.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en las instalaciones de Dolphin Discovery México, en el poblado de Puerto Aventuras y la isla de Cozumel, ubicados en el estado de Quintana Roo, México. Durante los meses de Julio del 2009 a Agosto del 2010.

6.1 Sujetos de estudio

Se utilizó el semen de 2 animales (*Tursiops truncatus*) entre 17 y 20 años de edad, con fertilidad probada, ambos, son los machos reproductores de cada locación. Los animales presentaban buena condición corporal y se observaron físicamente sanos. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Sujetos de estudio

Nombre	Especie	Locación	Jerarquía	Peso	Edad
Kich	<i>Tursiops truncatus</i>	Puerto Aventuras	Macho α	172 Kg	20 años
Titan	<i>Tursiops truncatus</i>	Cozumel	Macho α	166 Kg	17 años

6.2 Obtención y procesamiento de las muestras

Para la colección del semen los animales fueron separados en encierros (holdings) un día antes y trabajados durante una sola sesión por aproximación y exposición de pene voluntaria, previo entrenamiento mediante condicionamiento operante.

La recolección fue realizada durante la principal temporada reproductiva que abarca el periodo de noviembre a junio para los delfines en el Caribe Mexicano.

Se tomaron 4 eyaculados por macho, el semen fue colectado una vez cada tercer día utilizando la técnica de mano enguantada y vagina artificial. Los eyaculados obtenidos se llevaron inmediatamente al laboratorio que se encontraba dentro de

las instalaciones del delfinario. Se evaluaron macroscópicamente tomando en cuenta el volumen y el color (cualquier cambio en la coloración es indicativo de semen de mala calidad, lo cual fue motivo de eliminación).

Posteriormente el eyaculado se dividía en 5 alícuotas; se tomaba una para su evaluación en fresco tomando en cuenta la movilidad (movimiento en masa (MT) y el movimiento individual (MPr), además del cálculo de la concentración espermática del eyaculado. Las 4 alícuotas restantes se utilizaron para congelación con Triladyl (control) y Triladyl + Trehalosa (25mM, 50mM y 100Mm) respectivamente.

6.3 Movilidad total

Para la evaluación de la movilidad total se colocó una gota de semen en un portaobjetos limpio, seco y a 37°C, y se observó en un microscopio de luz (Olympus Cx21) a un aumento total de 10X. La valoración final se basó en el vigor o potencia de las ondas espermáticas.

Se valoró en un rango de 0 a 5 (Cuadro 3). Los eyaculados que obtuvieron una calificación menor a 3 fueron desechados.

Cuadro 3. Valores para la evaluación de la movilidad espermática en masa.

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas y remolinos con movimientos muy rápidos.
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son rápidos.
3	Regular	Ondas con movimiento lento.
2	Pobre	No se aprecian ondas, pero si hay movimiento en la muestra.
1	Muy pobre	Movimiento muy ligero
0	Muertos	Sin movimiento

Adaptación de Salamon *et al* 1990.

6.4 Movilidad progresiva

Se utilizó una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica (SSF) sobre un portaobjetos, limpio, seco y a 37°C; se cubrió con un cubre objetos y se observó al microscopio de luz (Olympus Cx21) a un aumento total de 40X. Se observaron varios campos y se valoró subjetivamente el porcentaje de espermatozoides móviles en un rango de 0 a 100%; los eyaculados con un porcentaje menor al 60% fueron desechados. (Evans y Maxwell *et al*; 1987).

Únicamente las muestras con adecuada movilidad (>70%) se utilizaron para la congelación (Salamon *et al.*, 1990).

6.5 Concentración del eyaculado

La concentración espermática se calculó mediante la dilución de 25µl de la muestra en 500µl de Tritón al 0.1% en solución salina (154mM). Se depositó una gota sobre un hematocitometro (cámara de Neubauer) y se evaluaron 5 cuadrantes de la cámara. El número de células se determina mediante la fórmula: $(FD \times \text{No. de células espermáticas} \times 10,000 \times 5)$. Donde FD es el factor de dilución (21); No. es el número de células contadas en los 5 cuadrantes de la cámara; 10, 000 dado por la dimensión de la cámara, y 5 el número de cuadrantes contabilizados.

Solo después de realizadas las valoraciones anteriores se tomaron las 4 alícuotas restantes y se procesaron para su congelación en los diferentes medios (Triladyl y Triladyl-trehalosa (25,50 y 100Mm).

En total se colectaron de 8 eyaculados; cuatro por cada delfín, para un total de 20 alícuotas por delfín; 16 para evaluación postcongelación y 4 para evaluación de semen en fresco.

6.6 Proceso de congelación y descongelación de semen

A las alícuotas empleadas para el proceso de criopreservación, se les dio un tiempo de equilibrio de 5 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo la concentración final de las muestras fue ajustada a 400×10^6 células/ml adicionando a cada una de las muestras los medios correspondientes.

La dilución del semen se realizará mediante el método de un paso, es decir los diluyentes utilizados fueron adicionados con el crioprotector adecuado (Triladyl y Triladyl-Trehalosa). Esta ultima a las concentraciones de 25mM, 50mM y 100mM.

6.7 Preparación de los diluyentes

6.7.1 Diluyente Triladyl

Tris 4.36g

Glucosa 0.6g

Acido cítrico 2.38g

Glicerol 4%

Agua bidestilada 76ml

Yema de huevo 3%

Penicilina/estreptomicina como antibiótico (de acuerdo a la directiva 88/407 de la Unión Europea). Triladyl *

* Triladyl® Minitube añadido con glicerol, tris, ácido cítrico, fructuosa y antibióticos

6.7.2 Diluyente control adicionado con Trehalosa

Triladyl 20%

Yema de huevo 20%

Agua bidestilada 60%

Trehalosa 25, 50, 100mM

Los diluyentes fueron utilizados a una temperatura de 21°C, realizándose una dilución a razón 1:1 en todos los casos. Posteriormente las muestras fueron

equilibradas durante 1 hora dejando que la temperatura descendiera paulatinamente hasta llegar a los 5°C; posteriormente el semen fue envasado en forma manual en pajillas francesas de 0.5 ml a una concentración final de 200×10^6 por dosis y selladas con alcohol polivinílico.

Enseguida las pajillas fueron expuestas a vapor de nitrógeno a una distancia de 5cm durante 12 minutos y se sumergieron en nitrógeno líquido para su conservación y posterior evaluación.

Se obtuvieron 4 pajillas por tratamiento; para un total de 16 pajillas por eyaculado.

La descongelación del semen se realizó utilizando el protocolo propuesto por Squires et al., (2004), para esto las muestras fueron expuestas a baño María a una temperatura de 37°C durante 30s, una vez descongeladas se evaluó la movilidad, la integridad del acrosoma y la integridad de la membrana plasmática

6.8 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para la evaluación de todos los tratamientos, las muestras fueron ajustadas a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml. Estas evaluaciones se realizaron antes del proceso de criopreservación y después de la descongelación del semen.

6.8.1 Evaluación de la integridad de membrana

Esta evaluación se realizó mediante la tinción de eosina-nigrosina (Selles, Gadea Matas *et al* 2003). La muestra de semen fue diluida 1:2 (semen: colorante respectivamente) mezclando perfectamente.

La tinción de eosina-nigrosina contenía eosina 0.167g, nigrosina soluble 1g, citrato de sodio 0.29g y agua destilada cbp 10ml. El semen fue incubado en este colorante durante 5 min a 37°C y se realizaron frotis que se dejaron secar al aire y ya secos se les aplicó resina para montar con cubreobjetos. Posteriormente se evaluó en un microscopio a un aumento de 100x contabilizando 200 células.

Interpretación: Las células con membrana plasmática alterada, se tiñen con el colorante, ya que este penetra al interior de la misma =Muerto

Las células con membrana intacta no permiten la penetración del colorante y por lo tanto no se tiñen =Vivo

6.8.2 Evaluación de la membrana plasmática y del acrosoma.

Se realizó mediante la prueba hiposmótica en combinación con la prueba de azul de coomassie descrita por Rodríguez *et al* 1997, Larson y Miller *et al* 1999.

La prueba constó de 2 frotis:

Frotis Testigo: Se tomaron 100 µl de semen + 100 µl de paraformaldehído al 4%, se fijó la muestra por 10 min a temperatura ambiente, se lavó la muestra 2 veces con PBS a 2500rpm durante 3 min y reconstituyó en 100 µl de cloruro de amonio (50 mM en PBS) y por último se realizó un frotis con 20µl y se dejó secar al aire.

Frotis Prueba: Se tomaron 100µl de semen + 100µl de solución hiposmótica (0.5ml de citrato de sodio al 1.46% y 0.5 ml de fructosa al 2.7%) se incubaron por 60 min a 37°C, pasado ese tiempo se agregaron 200 µl de paraformaldehído al 4% y se

fijó la muestra por 10 min a temperatura ambiente, se lavó la muestra 2 veces con PBS a 2500rpm durante 3 min y reconstituyó en 100 μ l de cloruro de amonio (50 mM en PBS) y por último se realizó un frotis con 20 μ l y se dejó secar al aire.

Se sumergieron los frotis (ya secos) en azul de Coomassie (Azul de Coomassie 0.55gr, 12.5ml de metanol, 2.5ml de ácido acético y 125ml de agua destilada cbp) durante 10 a 15 min a temperatura ambiente, pasado ese tiempo se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante, se dejaron secar y se cubrieron con resina y un portaobjetos. Se evaluaron 200 células por laminilla en 10 campos en un microscopio a un aumento de 100x.

Interpretación:

Colas enrolladas (positivos=vivo)

Colas rectas (negativo=muerto)

Porción acrosomal teñida de azul (espermatozoide con acrosoma)

Porción acrosomal sin teñir (espermatozoide sin acrosoma)

VII.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

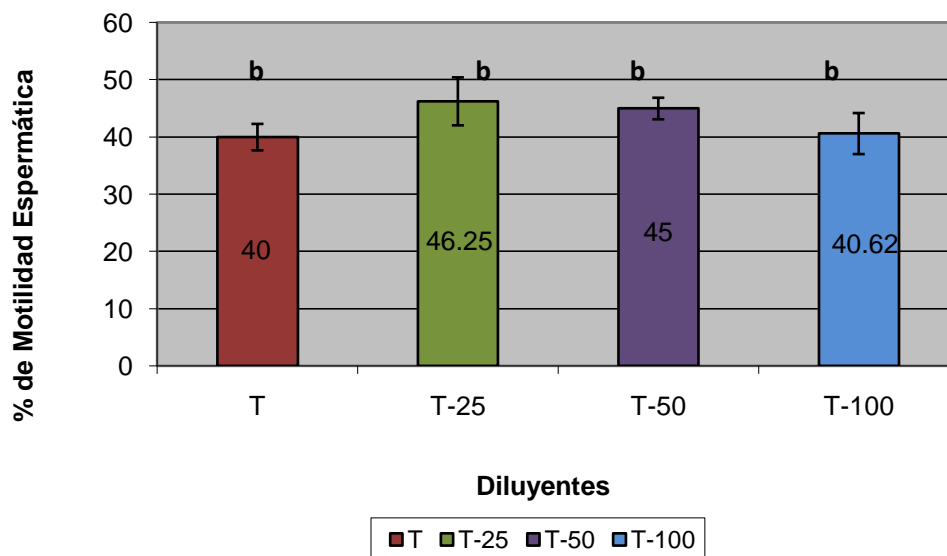
El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico JMP 9 realizando un análisis de varianza en donde las muestras cumplieron los supuestos de las pruebas. En aquellas variables que por el tipo de comparación no se cumplen los supuestos de ANOVA se utilizó un análisis no paramétrico mediante la prueba Kruskal Wallis que es un equivalente de ANOVA.

VIII.- RESULTADOS

8.1 Evaluación de la movilidad

En promedio la movilidad progresiva en los eyaculados recién obtenidos fue de $78.75 \pm 2.45\%$.

La movilidad progresiva (MP) en los eyaculados al descongelado en los 4 grupos (Triladyl, T-25mM, T-50mM, T-100mM), se muestra en la Grafica 1, donde se puede observar una diferencia, aunque no significativa ($P \geq 0.05$) a favor de los diluyentes en los que se adicionó trehalosa (T-25mm y T-50mM), siendo los porcentajes de $46.25 \pm 4.19\%$ y $45 \pm 1.88\%$ respectivamente, mientras que en los otros tratamientos (T-100mM y T) la movilidad fue de $40.62 \pm 3.59\%$ y $40 \pm 2.31\%$ respectivamente.



Grafica 1. Porcentaje promedio de la movilidad obtenida en el semen criopreservado de delfín utilizando Triladyl solo o adicionado con trehalosa.

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, tampoco existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre machos al evaluar la movilidad en el semen criopreservado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje promedio de la movilidad obtenida por macho y tratamiento al descongelado del semen criopreservado de delfín.

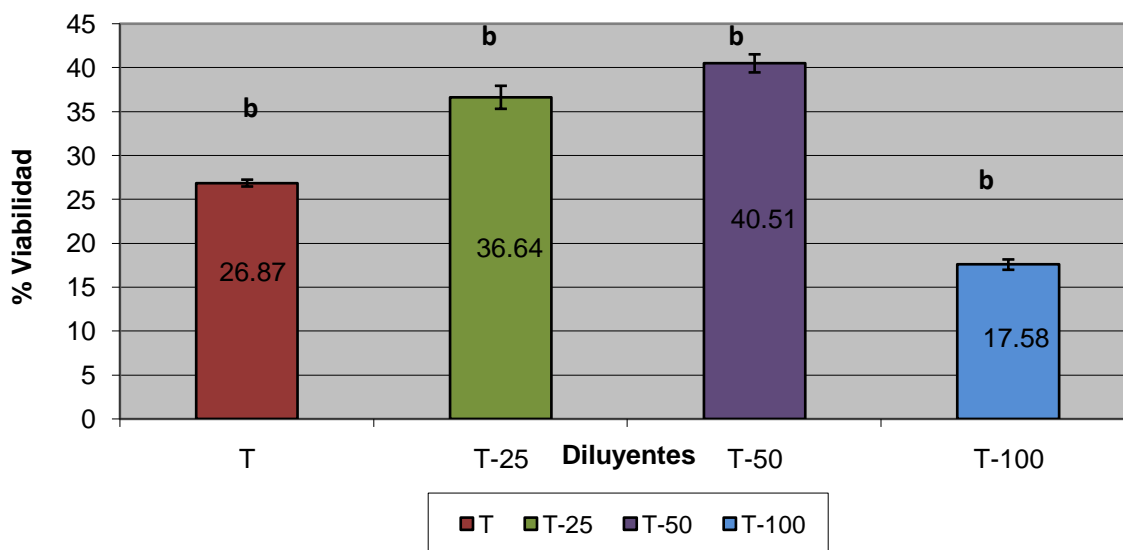
Macho	Triladyl	T-25mM	T-50mM	T-100mM
Kich	43.75±2.39% ^b	52.5±4.33% ^b	48.75±1.25% ^b	46.25±4.73% ^b
Titan	36.25±3.14% ^b	40±6.12% ^b	41.25±2.39% ^b	35±4.08% ^b

Medias ± error estándar

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

8.2 Evaluación de la Integridad de la membrana plasmática

En la gráfica 2 se muestra el porcentaje de espermatozoides vivos, evaluados mediante la prueba de eosina-nigrosina. Los medios adicionados con trehalosa (T-25mM y T-50mM) presentaron el mayor porcentaje de células vivas en comparación con el diluyente control (Triladyl) y el grupo adicionado con 100mM de trehalosa (T-100mM), encontrándose una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cada uno de los grupos. Por otra parte no se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$) al hacer la comparación entre machos. (Cuadro 5).



Grafica 2. Porcentaje promedio de la viabilidad de los diferentes tratamientos.

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Porcentaje de espermatozoides viables por macho y tratamiento después del proceso de descongelado (Tinción de Eosina-Nigrosina).

Macho	Triladyl	T-25mM	T-50mM	T-100Mm
Kich	25.60 ± 0.40%d	42.18±0.51%c	44.24±0.51%b	19.17±0.44%e
Titan	28.13±0.46%d	31.10±1.17%c	36.78±1.29%b	15.99±0.91%e
Media	26.87±0.39%d	36.64±1.31%c	40.51±1.03%b	17.58±0.59%e

Medias ± erros estándar

Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

8.3 Evaluación de la integridad acrosomal mediante Azul de Coomassie.

En el Cuadro 6 se puede observar que aunque el porcentaje de viabilidad espermática fue mayor en T-50mM, sin embargo en este medio los espermatozoides vivos con acrosoma integro fue menor que el medio T-25mM ($P \leq 0.05$). Estadísticamente ambos tratamientos con trehalosa ($P \leq 0.05$) fueron superiores al grupo control, a diferencia del medio T-100mM donde tanto el porcentaje de viabilidad y la integridad acrosomal fueron menores. En la Fig. 5 se pueden observar espermatozoides de delfín teñidos con azul de Coomassie.

Cuadro 6. Porcentaje de espermatozoides viables y con acrosoma integro (AI) en el semen criopreservado de delfín con acrosoma integro (AI) por tratamiento al descongelado.

Tratamiento	%Viabilidad	% AI Vivos
Triladyl	26.75±0.47%d	35.02±0.73%c
Triladyl-25mM	33.16±1.85%c	44.28±1%b
Triladyl-50mM	36.81±1.07%b	35.39±1.50%c
Triladyl-100mM	15.71±0.47%e	29.8±1.97%d

Medias ± erros estándar

literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

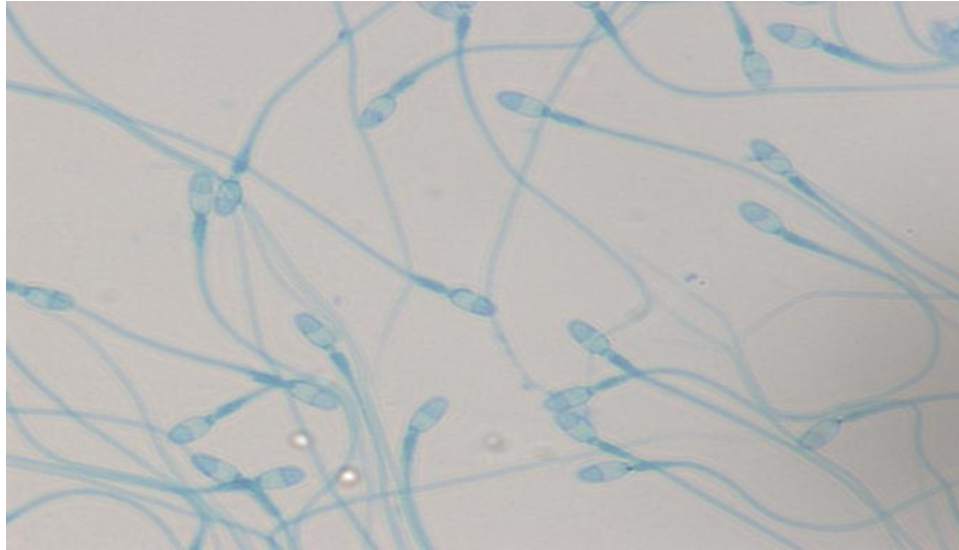


Fig. 5 Espermatozoide de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) teñido con la técnica de Azul de Coomassie.

IX.- DISCUSIÓN

La hipótesis de este trabajo indicaba que la adición de trehalosa en un medio a base de Triladyl* mejoraría la viabilidad e integridad en el semen criopreservado a diferencia de un medio a base solamente de Triladyl. Los resultados mostraron que la movilidad del grupo control (Triladyl) fue menor a la de los grupos adicionados con trehalosa 25mM y 50mM. Sin embargo el medio adicionado con la mayor concentración de trehalosa (T-100mM) presentó un porcentaje de movilidad considerablemente menor que el grupo control. Adicionalmente los resultados no superaron a los de otros autores de manera importante el porcentaje de movilidad en los grupos tratados no presenta diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con el control. En delfines se reporta que el uso de glicerol en bajas concentraciones (4%) mantiene movilidades hasta del 60% (Robeck y O'Brien, 2006), lo que difiere con las movilidades obtenidas en este estudio.

Diversos estudios sugieren que el efecto crioprotector que tiene la trehalosa se ve afectado por la osmolaridad total del medio. Ainsen *et al.*, 2002 menciona que la crioprotección ofrecida por la trehalosa en espermatozoide de carnero dependió de la concentración de esta; ya que al utilizar concentraciones de 200 y 400mM la movilidad disminuyó y la membrana perdió su permeabilidad. Saragusty *et al.*, 2009 encontraron aumentos significativos en viabilidad e integridad acrosomal en espermatozoides de elefante pero una ausencia total de movilidad. En este estudio observamos que en el caso del diluyente T-100mM hubo una disminución en los parámetros observados e incluso la integridad acrosomal y la viabilidad fueron menores que el grupo control, lo cual probablemente esté relacionado a su alta concentración provoco un medio hiperosmótico para la célula. (Chen *et al.*, 2000 y 2002).

Por otra parte la adición de trehalosa no causo el efecto detrimental sobre la movilidad reportada por otros autores (Saragusty *et al.*; 2009), mencionándose, por ejemplo que en los espermatozoides criopreservados de elefante, en donde existió una mejor viabilidad e integridad acrosomal de la célula pero estos fueron inmóviles, resultados similares fueron obtenidos por Gutiérrez Pérez 2009 en espermatozoide de cerdo; éste último autor lo atribuye a la posible viscosidad del medio dada por la trehalosa. Molinia *et al.*, (1994) sugiere que la crioprotección que ofrece la trehalosa depende de su concentración en la solución diluyente, esto Koshimoto y Mazur (2002) lo interpretan como efecto dependiente de la masa de azúcar, donde se forma una película protectora sobre la membrana plasmática evitando así su deshidratación. También refieren que la protección es dependiente

de la molaridad, y mencionan una propiedad coligativa la cual depende del número de moles presentes y no del tamaño o naturaleza química de la misma, es decir la concentración de azúcar presente en la porción no congelada evita que las sales excedan su solubilidad, se congelen y se precipiten (punto eutéctico) proveen cambios en la osmolaridad y encogimiento de la célula. (Koshimoto y Mazur, 2002).

Por otra parte, estudios previos donde no se encontraron mejoras en la viabilidad de espermatozoide de caballo (Squires *et al* 2004) o de gacelas (Garde *et al.*, 2002) en los que emplearon concentraciones de 9mM y de 100mM respectivamente, difiere con los resultados del presente trabajo, ya que el número de espermatozoides viables fue considerablemente mejor en 2 de los diluyentes adicionados con trehalosa (T-25mM y T-50mM) que en el grupo control, lo que concuerda con estudios en donde la viabilidad se ve mejorada en el espermatozoide de ratón, conejo, carnero y perro. (Aboagla *et al.*, 2000 y 2004, Aisen E.G *et al.*, 2002, Bhur M. *et al.*, 2001). En el caso del diluyente (T-100mM) sí se observó un efecto detrimental en la viabilidad lo cual podría deberse a el incremento en la osmolaridad del medio. A este respecto, algunos autores han observado que cuando el espermatozoide es sometido a medios hiperosmolares la membrana se mantiene intacta, pero al ser sometida a un proceso de congelación descongelación la célula no tiene la capacidad para mantener su integridad. (Pommer *et al.*, 2002). Ainsen *et al.*, 2002 mencionan que la crioprotección de un diluyente adicionado con trehalosa es dependiente de la molaridad y que al utilizar concentraciones hipertónicas la célula pierde la permeabilidad.

En el caso del delfín no existen referencias sobre el uso de trehalosa en el medio de congelación. La mayoría de los trabajos que se han publicado sobre congelación de semen son mediante el método de pastilla el cual ha estado sin cambios por más de 25 años, sin embargo el uso de pajillas proporciona mayores ventajas al tener condiciones estériles al momento de empaquetar la muestra, evitando contaminación de la misma durante el almacenamiento asegurándonos su integridad. En este estudio se encontró que la trehalosa presenta una mejora en la integridad acrosomal en comparación con el medio control, con excepción de T-100mM donde los resultados fueron significativamente menores a otras 2 concentraciones ensayadas (T-25mM y T-50mM).

El crioprotector T-25mM presentó un porcentaje mayor de espermatozoides con acrosoma integro al de los demás tratamientos, donde se infiere que la trehalosa presenta su efecto benéfico al mantener la integridad acrosomal al momento de la criopreservación, lo cual concuerda con los trabajos de Gutiérrez Pérez., 2009 con espermatozoide de cerdo y Ramírez Vega., 2008 con espermatozoide de caballo. Es importante hacer notar que aunque T-50mM presentó una mayor viabilidad que T-25mM, los espermatozoides con acrosoma integro fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) a T-25mM.

Se ha señalado que la trehalosa en altas concentraciones puede resultar tóxica para la célula, esta toxicidad está relacionada con el estrés osmótico y la reducida tolerancia que presentan algunos espermatozoides, similar a la tolerancia congelación-descongelación específica de cada especie (Watson, 1995).

Así los resultados obtenidos en este estudio presentan una tendencia positiva a los tratamientos adicionados con trehalosa, sin embargo es importante incrementar tanto el número de machos como el número de eyaculados para encontrar la concentración óptima de trehalosa que mantenga la viabilidad e integridad del espermatozoide de delfín, además de que sería conveniente mantener una osmolaridad fisiológica al manejar las diferentes concentraciones de trehalosa. La diferencia entre las dos técnicas utilizadas para la evaluación, en el caso de T-50 mM en porcentaje de viabilidad hay salido mayor aunque estadísticamente esta diferencia no es significativa ($P \geq 0.05$), pudo deberse a un error humano ya sea al momento de manipular la muestra o a un error en el conteo.

X.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que la trehalosa tiene la capacidad para estabilizar la membrana del espermatozoide y mantener su integridad acrosomal siempre y cuando no se sobrepase la tolerancia osmótica de la célula como se pudo observar en T-100mM.

En comparación con otros trabajos la trehalosa en altas concentraciones aumenta el daño causado por la criopreservación.

Es necesario seguir esta línea de investigación incrementando el número de machos, así como el número de eyaculados por macho para encontrar una

concentración óptima de trehalosa para mantener la osmolaridad de la célula y por ende la viabilidad de la misma.

Tomando en consideración que la criopreservación afecta de manera importante la integridad y viabilidad de los espermatozoides sería conveniente ensayar un diluyente con crioprotectores tanto permeables como no permeables, en este caso a base de un menor porcentaje de glicerol (Triladyl) y con una concentración de 25mM de trehalosa para mantener un elevado número de células integra y viables.

XI.- REFERENCIAS

1. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freeezing. *Biol Reprod.* 2000; 69: 1245-50.
2. Aboagla EM, Terada T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62:809-18.
3. Aisen EG, Alvarez HJ, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53: 1053:61.
4. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology* 2002; 57: 1801-08.
5. Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morillo H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-base hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50:239-49.
6. Aurich C. factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion sepermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89:65-75.

7. Bakás LS, Disalvo EA. Effect of the Ca⁺⁺ on the cryoprotective action of trehalose . Cryobiology 1991; 28: 347-353.
8. Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. J Androl. 2001; 6:1061-9.
9. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J. of Androl.2000;21 (6):895-902.
10. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M, Naitana S. Cryopreservation of European Mouflon (*ovis gmelii musimon*) semen during the non-breeding season by the use of trehalosa. Reprod Dom Anim 2007; 42: 202-207.
11. Bhur M, Fiser P, Bailey J, Curtis E. Cryopreservation in different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. J Androl. 2001; 22: 961-69.

12. Boiso I. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2001; 18: 1-20.
13. Bucak MN, Atessahim A, Varisili Ö, Yüce A, Tekin N, Akcay A. The influence of trehalosa, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenolog 2007; 67: 1060-1067.
14. Bwanga CO, Braganga MD, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H. Cryopreservation in mini- and maxi-straws. J Vet Med. 1990; 37: 651-8.
15. Caldwell M.C, Caldwell D.K.: Behavior of Marine Mammals. Mammals of the Sea. Biology and Medicine. Edited by Ridgway, S.H.; 419-465, Charles C. Thomas publisher, Springfield, Illinois (USA), 1972.
16. Cerruti P, Segovia de Huergo M, Galvagno M, Schebor C, Buera M. Comercial baker's yeast stability as affected by intracelular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. Appl Microbiol Biotechnol 2000; 54: 575-580.
17. Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. Yonsei Med J 2004; 45 (6): 1107-1114.

18. Chen T, Fowler A, Toner M. Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40:277-82.
19. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improve sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Rep Fertil Dev.* 2003; 15:377-381
20. Cockcroft VG, Ross GJB. Age, growth, and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the east coast of southern Africa. *Fishery Bulletin.* Vol. 88, no. 2, pp. 289-302. 1990.
21. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Cryobiology* 1997; 48: 831-841.
22. Durrant BS, KD Russ, JR Proulx, ML Reddy, SH Ridgway. 2000. Current techniques for semen cryopreservation in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). In: D. Duffield and T. Robeck (eds.). *Report of the Bottlenose Dolphin Reproduction Workshop.* AZA Marine Mammals Taxon Advisory Group, Silver Springs. Pp. 239-248.
23. Erdag G, Eroglu A, Morgan JR, Toner M. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 2002; 44:218-228.

24. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* 2002; 77(1): 152-158.
25. Evans G, Maxwell WMC. Handling and examination semen. In: MAXWELL WMC (Ed). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*, Butterworths, Sydney; 1987:93-106.
26. Fawcett D.W. The Mammalian Spermatozoon. *Dev Biol.* 1975; 44:394-436.
27. Félix R, Treviño LC, Hernández VA. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva* 2002; 21: 89-95.
28. Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macia V, Estreso MC, Solar AJ, Paz P, Anel L, Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian reed deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67: 738-753.
29. Fleming AD, Yanagimachi R, Yanagimachi H. Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *J Reprod Fer* 1981, 63:509-514.
30. Foote RH, Chen C, Brockett C, Kaproth MT. Fertility of bull frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J Dairy Sci* 1992, 76:1908-1913.

31. Fordyce, R.E.: Evolution. Whales, Dolphins and Porpoises. Edited by Harrison, R.J. and Bryden, M.M., 14-23, International Publishing Corporation, Singapore, Hong Kong, 1988.
32. Galina C. Valencia J. Reproducción de Animales Domésticas, 3^{ra} edición Editorial. Limusa, D.F.México,2008.
33. Galindo F.A, Orihuela A. Etología Aplicada, 1^{ra} edición. Editorial. International Fund for Animal Welfare (IFAW) y Universidad Autónoma de Morelos. 2004.
34. Garde JJ, Soler AJ, Cassienello J, Crespo C. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. damma mhorh*, and *G.dorcas meglecta*). Biol. Reprod 2002; 69: 602-611.
35. Gillan L. Evans G. Maxwell W. M. C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod Fertil Dev 1997; 9:481-487.
36. Gilmore JA, McGann LE, Ashworth E, Acker JP, Raath JP, Bush M, Crister JK. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. Anim Reprod Sc 1998; 53: 277-297.

37. Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 2160-4.
38. Gutierrez-Perez O, Juárez M, Uribe C, Trujillo O. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/threitol enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 2009.
39. Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122:889-898.
40. Green, R.F.: *Gross Anatomy of the Reproductive Organs in Dolphins. Breeding Dolphins; present status, suggestions for the Future.* Edited by Ridgway, S.H. and Benirschke, K; 185-194, *Rep. to Mar. Mamm. Commn;* Washington, D.C (USA), 1977.
41. Hafez E.S.E, Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* Editorial Mc Graw Hill 7^{ma} Edición, 2000.
42. Holt W. V. North R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 51 (3):414-24.

43. Honadel TE, Killian GJ. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology* 1988; 25: 331-337.
44. Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Sybesma W. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J Anim Sci* 1981; 52 (5): 1130-1136.
45. Juárez-Mosqueda ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de nivel Doctorado. CINVESTAV, I.P.N., México 2000.
46. Kirby, V.L.: Endocrinology of Marine Mammals. In DIERAUF LA, GULLAND FMD, editors. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* 2nd ed. United States of America: CRC Press, 2001: 165-192.
47. Koshimoto C, Mazur P. The effect of the osmolality of sugar-containing media the type of sugar and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 2000; 45: 80-90.
48. Larson JL. and Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 1999;52: 445-449.

49. Leslie S, Israeli E, Lighthart B, Crowe J, Crow L. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microb* 1995; 61 (10); 3529-3597.
50. Lillford PJ and Holt CB. In vitro uses of biological cryoprotectants. *Philos Trans. R Soc Lond.B.*2002; 357: 945-951.
51. Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37:207-18.
52. Machlin LJ and Benedich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *J. Faseb.* 1987; 1: 441–445.
53. Mckinnon A and Voss J. Equine reproduction. Lea and Febiger, 1st Edition 1993; 80:715-714.
54. Mayer S.A Review of the Scientific Justifications for Maintaining Cetaceans in Captivity. A Report for the Whales and Dolphins Conservation Society (WDCS). February 1998.
55. Mazur P. Freezing of living cells. Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247:125-142.

56. Medina V, Aisen E, Quintana M, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50: 239-49.
57. Mooney J. Captive cetaceans: a Handbook for campaigners. A Whale and Dolphin Conservation Society (WDCS) document. Eds: Stroud C, Williams V, Clarke F. United Kingdom 1998.
58. Molina FC, Evans, Quintana-Casares PI, Maxwell WMC. Effect of monosaccharide and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994; 36: 113-122.
59. Morris G.J. Goodrich M, Acton E., Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions. Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52:323-334.
60. Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability (Lp) of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology* 1997; 35: 79-92.
61. Norma Oficial Mexicana 135 de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003.

62. Pabst DA, Rommel SA, McLellan WA, Williams TM, and T. K. Rowles TK. Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J. of Exp Biol* 1999; 198: 221-226.
63. Patist A and Zoerb H. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 40: 107-113.
64. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992; 38 (2): 209-220.
65. Perez L. J. Valcárcel A. de las Heras M. A. Moses D. Baldassarre H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 1996; 46:131-140.
66. Perrin WF and Reilly SS. Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. *Reproduction in whales, dolphins and porpoises, proceedings of the Conference Cetacean Reproduction: Estimating parameters for stock assessment and management*. La Jolla, CA (USA), 1984.

67. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 4172:666.
68. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*. 2002;58:1373–1384.
69. Pryor K. Don't shoot the dog. The new art of teaching and training. Copyrighted material. 1st edition. 2004.
70. Ramírez V D F. Estudio del efecto crioprotector de un medio de congelación a base de trehalosa sobre la viabilidad del espermatozoide del caballo. Tesis de maestría. Fac. de Med Vet y Zoot. UNAM. México, D.F. 2008.
71. Robeck TR, Greenwell M, Boehm JR, Yoshioka M, Tobayama T, Steiman K and Monfor ST, Artificial insemination using frozen-and thawed semen in the pacific white-sided dolphin White-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquideans*). *Proceedings international Association of Aquatic Animal Medicine* 2003; 34: 50-54.
72. Robeck TR, O'Brien J. Effect of cryopreservation methods and precryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2004; 70:1340-1348.

73. Robeck TR, , KJ Steinman, M Yoshioka, Jensen E, O'Brien, E Katsumata, C Gili, McBain JF, Sweeney J and Monfort SL. Estrus cycle characterization and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction and Fertility* 2005:1741-7899.
74. Robeck TR, O'Brien J. Development of sperm sexing and associated reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) *Reproduction, Fertility and Development*, 2006; 18:319-329.
75. Robeck TR, Shannon K.C. Atkinson, and Brook F. Reproduction. In DIERAUF LA, GULLAND FMD, editors. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* 2nd ed. United States of America: CRC Press, 2001: 193-236.
76. Roca J, Rodriguez- Martinez H, Vazquez JM, Bolarin A, Hernandez H, Saravia F, Wallgren M, Martinez EA. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination, in CJ Asworth, RR. Kraeling (Eds). *Control of pig Reproduction VII*, Nottingham University Press, 2005: 262-75.
77. Rodriguez-Martinez H, Larsson B and Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up *Reproduction Fertility and Development*. 1997; 9:297–308.

78. Roland K, Andrzej D and Agnieszka NN. Comparison of Acetamide and Dimethylsulfoxide (DMSO) as Cryoprotectants of European Brown Hare (*Lepus europaeus*) Spermatozoa. J. of Reprod and Develop 2008.
79. Rommel S.A. and Lowenstine L.J. Gross and Microscopic Anatomy. In DIERAUF LA, GULLAND FMD, editors. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine 2nd ed. United States of America: CRC Press, 2001: 129-164.
80. Rudolph AS and Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology. 1985; 22 (4): 367-377.
81. Salamon S. Evans G. Maxwell W.M.C Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1^{ra} edición. Editorial: Acribia. España 1990.
82. Sampedro JG, Muñoz-Clares RA, Uribe S. Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. Journal of Bacteriology. 2002; 16:4384-91.
83. Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. 2009. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. Animal Reproduction Science 115(1-4):255-266.

84. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. A combination of trehalse as additives to conventional freezing medium results in improved cryprotection of human hematopoietic cells with reference tp *in vitro* migration and adhesion properties. *Transfusion* 2005; 45:622-633.
85. Schroeder JP and Keller KV. Artificial insemination of bottlenose dolphins. In the Bottlenose dolphin. Leatherwood and Reeves. San Diego, Ca, USA: Academic Press. 1990, 22:447-460.
86. Seager S, Gilartin W, Moore L, Platz C y Kirby V. Semen collection (electroejaculation), evaluation an freezing in Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Abstract 1981; 136.
87. Seargeant DE, Caldwell DK and Caldwell MC. Age, Growth and maturity of Bottlenosed dolphin (*Tusiops truncatus*) from Northeast Florida. *J Fish. Res. Can;* 2003; 30 (7): 1009-101.
88. Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C. and Ruiz, S. Analysis of *In vitro* Fertilizing Capacity to Evaluate the Freezing Procedures of Boar Semen and to Predict the Subsequent Fertility. *Reproduction in Domestic Animals.* 2003; 38:66–72.

89. Squires EL, Kate SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004;62:1056-1065.
90. Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Storinelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria* 2005; 25: 28-35.
91. Sztejn JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2001: 41; 28-39.
92. Ugaz R. CM. Evaluación del Comportamiento y Bienestar de delfines *Tursiops truncatus* en delfinarios de México. Tesis de Doctorado. FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 2009.
93. Watson PF y Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988; 25: 131-142.
94. Watson PF. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing Function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.
95. Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 1996; 31:135-140.

96. Wells R.S; Scott M.D. and Irvine A.B. The social structure of free-ranging bottlenose dolphins. In "Current Mammalogy". H.H Genoways, Editors, Plenum Press, New York. 1987. 247-305.
97. Wessel MT, Ball BA .Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. Anim Rep Sci. 2004; 84: 147-156.
98. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of the trehalose and sucrose osmolality of the freezing medium, and cooling rate of viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology 1997; 35: 93-105.
99. Wood, F.G.: Birth of Porpoises at Marineland, Florida, 1939 to 1969, and comments involved in Captive Breedings of Small Cetacea. Breedings Dolphins; present status, suggestions for the future. Edited by Ridgway, S.H. and Benirschke, K; 47-60, Rep Mar Mamm Comn; Washington, D.C.(USA),1977.
100. Ya-Hui Li, Ke-Jun Cai, Andras Kovacs, Wei-Zhi. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. J Androl 2005; 26: 387-95.

101. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M and Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2000; 54: 579-785.