



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**EFFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE  
ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y OVINOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA**

**BIOL. EXP. ITZEL PLANCARTE HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR**

**DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

**ASESORES**

**DR. FILIBERTO FERNÁNDEZ REYES**

**DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ**

México, D.F., 30 de Noviembre de 2015.

## COMITÉ TUTORAL

### **DIRECTOR:**

**Dr. Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular "C"

Investigador Nacional Nivel III, SNI

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM- Iztapalapa

### **ASESORES:**

**Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez**

Profesor Titular "C"

Investigador Nacional Nivel I, SNI

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM- Iztapalapa

**Dr. Filiberto Fernández Reyes**

Profesor Titular "C"

Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud UAM- Xochimilco

**“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Excelencia de CONACyT (PNPC) registro 003797 “**

**Número de CVU 570365 y becario otorgado por CONACyT 302853**



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL de la alumna ITZEL PLANCARTE HERNANDEZ, matrícula 2133801548, quien cumplió con los 188 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha treinta de noviembre del 2015 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EFFECTO DE LA CONGELACION SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y OVINOS

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 228 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobada

**JURADO**

Presidente

DR. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ

Secretario

DR. FILIBERTO FERNANDEZ REYES

Vocal

DR. EDITH ARENAS RIOS

Vocal

DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y OVINOS”** que presentó Itzel Plancarte Hernández en Noviembre de 2015.

---

**PRESIDENTE**

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Departamento de Ciencias de la Salud,  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM- Iztapalapa

---

**SECRETARIO**

Dr. Filiberto Fernández Reyes

Departamento de Producción Agrícola y Animal,  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM- Xochimilco

---

**VOCAL**

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción,  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM- Iztapalapa

---

**VOCAL**

Dr. Raymundo Rangel Santos

Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chapingo

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la UAM- Iztapalapa y fue apoyado por CONACyT, México (CVU/ 570365 No. Becario/ 302853).

Al Mtro. Ernesto Hernández Pichardo y al Dr. Raymundo Rangel Santos por la donación de muestra de semen de porcino y ovino.

Al Dr. José Miguel Betancourt Rule por todo el apoyo proporcionado para la realización de esta tesis, así como sus sugerencias para lograr mi formación académica.

A la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez por todo su apoyo, por compartir su conocimiento y experiencia para poder cumplir mis objetivos, por ser una excelente y agradable persona,

Al Dr. Filiberto Fernández Reyes, por todo su apoyo, por siempre estar dispuesto a ayudarme, por sus consejos y sugerencias para realización de este trabajo, por toda su amabilidad.

A la Dra. Edith Arenas Ríos por todo su apoyo, por ayudarme en todo momento, por compartir su sabiduría conmigo, por ser una excelente persona y por su excelente calidez humana.

A la Dra. María del Rocío Zarate Hernández por su apoyo en la parte estadística realizada en este trabajo, por ser una excelente persona.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura por todo su apoyo, sus consejos, por siempre estar dispuesto a ayudarme incondicionalmente, por su excelente calidez humana.

A mis compañeros y excelentes amigos Marco Antonio Sanabrais Jiménez, Diana Lisbeth Flores Martínez, Graciela Gavia García, Mario Teteltitla Silvestre y Andrea Chaparro por todo su apoyo incondicional, por compartir su conocimiento conmigo, por ayudarme en todo momento y sobre todo por su amistad.

A Roy, Flor y Oscar por ser mis grandes amigos y estar conmigo incondicionalmente.

## **DEDICATORIA**

A las dos personas más importantes en mi vida, por todo su amor, por siempre estar a mi lado y apoyarme en todo momento, por caminar conmigo siempre y ayudarme a lograr mis objetivos y a superarme siempre, lo que soy se los debo a ustedes por ser los mejores y excelentes padres del mundo, gracias Papá y Mamá.

A mi hermano Víctor por ser un gran hermano y por soportarme siempre.

A mis abuelitos Manuel (Tusu) y Elvira que siempre recordare con todo mi amor, por ser los mejores abuelos del mundo, por todo su cariño, por consertirme siempre, por sus consejos y sabiduría.

A la persona que inspira gran parte de mi vida, que me ayuda a ser una mejor persona, que siempre está dispuesto a ayudarme en todo momento, que me brinda su amor. Mi mejor amigo y mi gran amor... Mi Bichito.

## **ÍNDICE**

### **RESUMEN**

### **ABSTRACT**

## **I.- INTRODUCCIÓN**

1.1 Formación de espermatozoides (espermatogénesis)

1.2 Maduración espermática en el epidídimo

1.3 Capacitación y Reacción Acrosomal

1.4 Fecundación

1.5 Reproducción asistida

## **II.- ANTECEDENTES**

2.1 Criopreservación

2.1.1 Tipos de criopreservación

2.2 Crioprotectores

2.2.1 Tipos de crioprotectores

2.2.2 Mecanismo de acción de los crioprotectores

2.3 Congelación

2.4 Sensibilidad de las células a la congelación

2.5 Tipos de recipientes usados para la congelación

2.6 Descongelación

2.7 Estudios de congelación de espermatozoides en animales domésticos

2.7.1 Congelación de espermatozoides porcinos y ovinos

## **III.- JUSTIFICACIÓN**

## **IV.- HIPÓTESIS**

## **V.- OBJETIVO GENERAL**

## **VI.- OBJETIVOS PARTICULARES**

## **VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

## **VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS**

8.1 Obtención y transporte de la muestra

8.2 Selección espermática

8.2.1 Movilidad

8.2.2 Viabilidad

8.3 Congelación

8.3.1 Preparación del diluyente

8.3.2 Procesamiento del semen

8.4 Descongelación

8.5 Evaluación de la funcionalidad espermática

8.5.1 Integridad del acrosoma

8.6 Análisis estadístico

**IX.- RESULTADOS**

**X.- DISCUSIÓN**

**XI.- CONCLUSIONES**

**XII.- BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos de la congelación en espermatozoides porcinos y ovinos obtenidos de diferentes granjas comerciales, los cuales fueron congelados con crioprotectores y posteriormente fueron descongelados. Los parámetros de viabilidad, movilidad e integridad del acrosoma fueron evaluados antes y después de la congelación en ambas especies, en donde los porcentajes obtenidos en el grupo control en espermatozoides porcinos fueron de 80% de viabilidad, 79% de movilidad, y 68% de integridad acrosomal, mientras que los porcentajes obtenidos en espermatozoides congelados fueron de 31% de viabilidad, 27% de movilidad y 38% de integridad acrosomal, existiendo diferencias significativas respecto al grupo control, mientras que los porcentajes obtenidos en la especie ovina en el grupo control fueron de 87%, 89% y 56% para los parámetros de viabilidad, movilidad e integridad acrosomal, respectivamente, por otra parte en los espermatozoides congelados de esta especie los porcentajes obtenidos fueron de 54% de viabilidad, 52% de movilidad y 36% de integridad acrosomal, existiendo diferencias significativas entre grupos. Por lo tanto en este trabajo se observó que la especie ovina es más resistente a la congelación respecto a la especie porcina, obteniendo un mayor porcentaje en los tres parámetros evaluados antes y después de la congelación.

## **ABSTRACT**

This study was designed to evaluate the effects of freezing sperm in pigs and sheep obtained from different commercial farms, which were frozen with cryoprotectants and then were thawed. The parameters of viability, motility and acrosome integrity were evaluated before and after freezing in both species, where the percentages obtained in the control group in swine sperm were 80% viability, 79% motility, and 68% acrosome integrity, while the percentages obtained from frozen sperm were 31% viability, 27% motility and 38% of acrosome integrity, with significant differences compared to the control group, while the percentages obtained in sheep in the control group They were 87%, 89% and 56% for the parameters of viability, motility and acrosome integrity, respectively, on the other hand in frozen species sperm percentages obtained were 54% viability, 52% motility and 36% of acrosome integrity, with significant differences between groups. Therefore in this study we observed that sheep are more resistant to freezing regarding swine, getting a higher percentage in the three parameters evaluated before and after freezing.

## **I.- INTRODUCCIÓN**

Numerosos estudios han demostrado los efectos adversos que causa la congelación sobre los espermatozoides, en donde en la mayoría de los casos se ha observado una disminución en la viabilidad, movilidad y la tasa de fecundación, sin embargo para entender esta disminución en la fecundación, no es suficiente analizar únicamente la movilidad y viabilidad de la muestra, sino que es necesario analizar otros parámetros más específicos que anteceden a la fecundación y que son necesarios para que ésta se lleve a cabo, como son la capacitación y reacción acrosomal (RA). Además se ha visto que hay una variación en los espermatozoides entre especies en cuanto a su composición de lípidos de membrana, lo cual podría afectar el proceso de la fecundación.

Por tal motivo fue de interés el estudio de la funcionalidad de los espermatozoides porcinos y ovinos posterior a la descongelación. Entendiéndose como funcionalidad espermática: a todos aquellos vivos, con una movilidad progresiva, que tengan la facultad de ser capacitados y de llevar a cabo una RA adecuada y que por lo tanto sean capaces de fertilizar al ovocito.

Por ello en la reproducción animal asistida se están generando cambios basados en la aplicación de nuevas tecnologías con la finalidad de aumentar la eficiencia reproductiva. El desarrollo de técnicas que permitan la adecuada criopreservación de gametos, masculinos y femeninos en cerdos, así como en otras especies de mamíferos, resulta de gran importancia para la investigación aplicada en la

reproducción asistida (Betancourt et al., 1993). Ya que los gametos son un recurso potencialmente valioso para la preservación del genoma y la diversidad genética, se están desarrollando técnicas para conservar espermatozoides y ovocitos de diferentes especies para la fecundación *in vitro* (FIV). Los embriones producidos, pueden ser transferidos a hembras receptoras para el desarrollo de crías o bien para ser criopreservados (Somfai et al., 2010). El desarrollo de la criopreservación se ha traducido en logros tales como la tecnología para el almacenamiento de espermatozoides y embriones de mamíferos como bovinos, ovinos, porcinos y otras especies (Esaki et al., 2004).

Así, la utilización de espermatozoides congelados, representa una de las principales biotecnologías reproductivas para el mejoramiento genético (Arruda et al., 2000; Freitas et al., 2009), pues, ahora es posible, inseminar hembras receptoras desde cualquier parte del mundo, incluso después de la muerte del semental (Bailey et al., 2000). También se han conseguido niveles elevados de penetración de ovocitos con espermatozoides congelados y con técnicas de FIV lo que permite comparar la capacidad fecundante, de igual manera se han logrado obtener embriones viables a partir de espermatozoides congelados (Gadea et al., 1998).

La evaluación del semen es un componente importante, ya que esta puede determinar su capacidad fecundante antes de ser utilizado para inseminación artificial (IA) o en FIV (Rodríguez-Martínez, 2006).

La preservación eficiente de las células espermáticas con su completa capacidad de fecundar, es el objetivo principal del proceso de su criopreservación. Sin embargo,

hay una pérdida significativa en el potencial de fecundación de las muestras congeladas (Watson, 2000; Cooter et al., 2005). El proceso de criopreservación representa una interrupción artificial del progreso del espermatozoide post eyaculación hacia la capacitación, RA y la fecundación (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

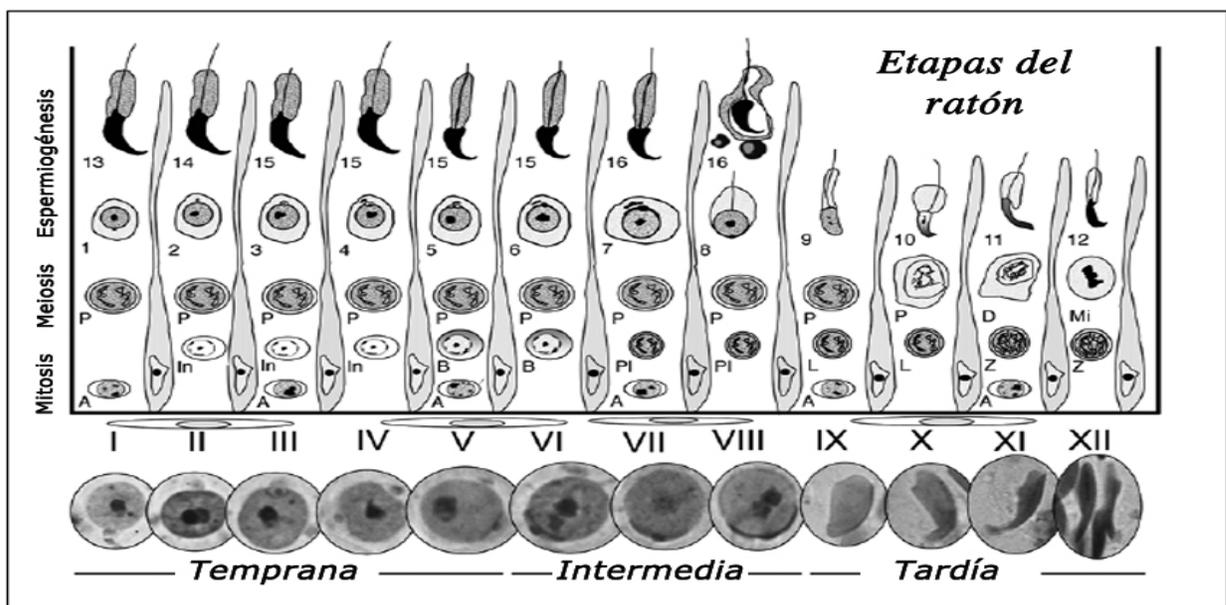
Son numerosos los efectos que la criopreservación puede inducir en los espermatozoides, que van desde lesiones letales hasta aquellas que solo alteran sus funciones (Cooter et al., 2005). El proceso de criopreservación reduce la viabilidad de los espermatozoides que va de un 50 a un 60 %, y causa varias alteraciones bioquímicas y estructurales que implican distintos compartimentos de la célula (Chaveiro et al., 2006), por ello se requiere de un análisis más profundo sobre el efecto de la criopreservación en células espermáticas para realizar mejoras en la técnicas establecidas y así obtener un mayor porcentaje de recuperación posterior al proceso de criopreservación.

Por otra parte es necesario conocer a fondo al espermatozoide, de este modo se puede realizar, un proceso de congelación específico, para obtener una mayor eficiencia de recuperación, por ello es importante conocer al espermatozoide desde su origen, diferenciación y maduración post-testicular en las diferentes especies.

## 1.1 Formación de espermatozoides (espermatogénesis)

La espermatogénesis es un proceso celular complejo, el cual involucra el desarrollo de las espermatogonias hasta convertirse en espermatozoides con ayuda de las células de Sertoli. Se pueden reconocer tres fases funcionales específicas que le caracterizan: proliferación, meiosis, y diferenciación (Figura 1). En la **fase de proliferación**: las espermatogonias experimentan varias divisiones mitóticas para formar espermatocitos primarios. Las espermatogonias pueden ser subdivididas en distintas clases debido a que poseen varios marcadores en su superficie, que principalmente se caracterizan en células tallo (As), células proliferantes (Apr, Aa1), y células en diferenciación (A1-4, In, B). El adecuado desarrollo de éstas es dependiente de un microambiente específico, conformado por las células de Sertoli y las células mioideas favorecido por las células de Leydig. Los espermatocitos secundarios se convierten en espermátidas haploides por meiosis, conformando así la **fase meiótica**. Durante esta fase los espermatocitos secundarios experimentan recombinación de los cromosomas, sinapsis e intercambio genético, así como transformación en células haploides al terminar la meiosis. Las células meióticas forman entidades estructurales específicas conocidas como el complejo sinaptonémico que garantizan el apareamiento de los cromosomas homólogos. Por último, en la **fase de diferenciación**, las espermátidas se desarrollan en espermatozoides como resultado de una compleja metamorfosis, que es referida como espermiogénesis e involucra profundas modificaciones estructurales en la forma del núcleo, la compactación de la cromatina, la formación del acrosoma, y el

establecimiento de un flagelo que le permitirá la movilidad. La espermatogénesis en consecuencia constituye la renovación y proliferación de espermatogonias indiferenciadas, la diferenciación espermatogonial, la meiosis de los espermatocitos, y la metamorfosis de las espermatidas para formar espermatozoides (Arenas et al., 2012). Una vez terminada la formación de espermatozoides estos adquieren su capacidad fertilizante en el epidídimo, donde el espermatozoide sufre cambios bioquímicos, proceso denominado maduración espermática,



**Figura 1.** Diagrama que representa la espermatogénesis en el ratón, particularmente las etapas que conforman el ciclo del epitelio seminífero (I-XII). Las capas horizontales representan las asociaciones de células germinales, y las células de Sertoli, separan cada una de las etapas. Las imágenes junto a la base corresponden al núcleo de espermatidas tempranas, intermedias y tardías. Los tipos de células germinales son: espermatogonias (A, In, B); espermatocitos ((PI: preleptoteno, L: leptoteno, Z: zigoteno, P: paquiteno, D: diacinesis, Mi: división meiótica); espermatidas redondas (1-8); espermatidas alargadas (9-16) (Hess y De Franca, 2008).

## 1.2 Maduración espermática en el epidídimo

El epidídimo es el órgano donde los espermatozoides sufren una serie de cambios y adquieren la capacidad fertilizante (maduración). Los cambios que ocurren en el espermatozoide, relacionados con la maduración, involucran una gran cantidad de cambios, que se llevan a cabo en el núcleo, el acrosoma, elementos del citoesqueleto, gota citoplásmica o membrana plasmática del espermatozoide. Los cambios pueden ser morfológicos (disminución en el tamaño del acrosoma y el diámetro mitocondrial) (Briz et al., 1995), aumento en la resistencia a cambios externos (Cooper y Yeung, 2006), reducción de la región cefálica del espermatozoide que puede deberse a la formación de puentes disulfuro S-S intracelulares durante el tránsito por el epidídimo (Bedford et al., 1973), a la deshidratación por el aumento del nivel de la presión osmótica en el lumen epididimario (Hinton et al., 1981), o al aumento de la compactación nuclear (Cooper y Yeung, 2006). Otro de los cambios morfológicos que acompañan a los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, es la migración de la gota citoplásmica. Mientras los espermatozoides pasan de la región cefálica al cuerpo del epidídimo, la gota citoplásmica se desliza de la base de la cabeza del espermatozoide a la pieza media, antes de desprenderse finalmente en la región caudal del epidídimo o después de ser eyaculado (Gatti et al., 2004). Este fenómeno es directamente proporcional con el aumento en la movilidad, y aunado a lo anterior, el espermatozoide sufre una serie de modificaciones que le permitirán fecundar al ovocito una vez que entre al tracto reproductor femenino,

procesos denominados capacitación y RA, además de adquirir hipermovilidad que es un movimiento especial del flagelo que le permite penetrar al ovocito (Arenas et al., 2010).

### **1.3 Capacitación y Reacción Acrosomal**

**La capacitación** es un proceso del espermatozoide que comprende una serie de cambios previos a la fecundación y que normalmente ocurre en el tracto reproductor femenino. La capacitación espermática es un término que indica el desarrollo funcional que comprende una serie de cambios estructurales y funcionales como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor femenino (Figura 2) (Arenas et al., 2010; Grasa et al., 2006). Entre las modificaciones que se producen, se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos en los que se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide cuando pasaron por el epidídimo o durante la exposición al plasma seminal y la disminución de colesterol, dando como resultado un incremento en la permeabilidad de la membrana al calcio (aumento del calcio intracelular), aumento de los canales de calcio y sodio/potasio, generación de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de la tirosina de las proteínas (Rodríguez-Martínez et al., 2008). Durante la capacitación, el espermatozoide experimenta numerosos cambios en la composición lipídica de su membrana plasmática siendo el más importante la disminución de la relación colesterol: fosfolípidos, lo que afecta la permeabilidad de

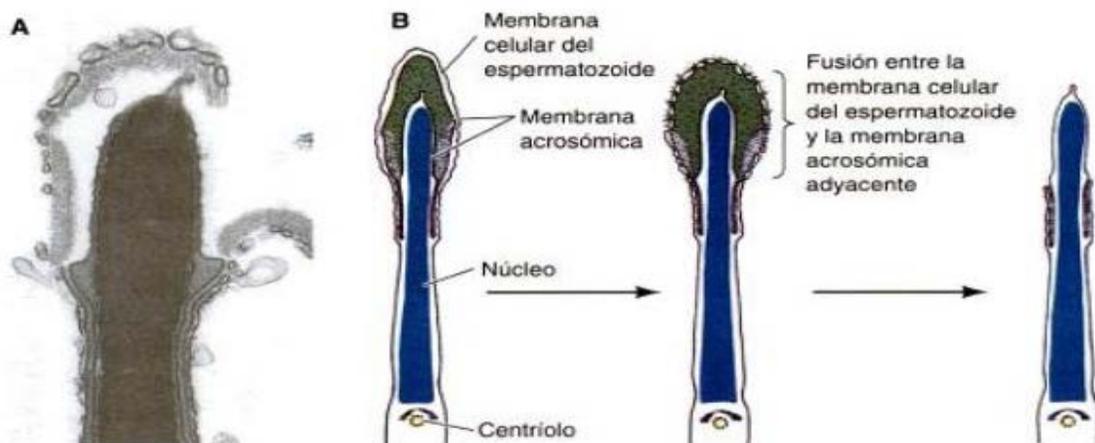
la membrana (Olivera et al., 2006). El colesterol es el esteroide presente en mayor concentración en el eyaculado con un efecto estabilizador sobre las membranas celulares (Grasa et al., 2006). Este elemento es desprendido de la membrana plasmática por acción de las lipoproteínas de alta densidad presentes en las secreciones del tracto reproductor femenino (Olivera et al., 2006), por lo tanto, una vez que los espermatozoides han sido depositados en el tracto genital de la hembra, las proteínas seminales contenidas en la superficie espermática, tienen contacto, con los fosfolípidos de alta densidad presentes en el oviducto, generando una alteración de permeabilidad de la membrana espermática, lo que permite la entrada de calcio que convierte los fosfolípidos en lisofosfolípidos capaces de desestabilizar membranas y así iniciar la RA (Mayren et al., 2012; Boerke et al., 2013). Ya que, la capacitación representa una desestabilización de la membrana acrosomal, esto finalmente se traduce en un aumento de la ocurrencia espontánea de la exocitosis acrosomal, disminuyendo la vida media de la población de espermatozoides. Todos los cambios que ocurren durante la capacitación espermática conducen al aumento del metabolismo y la movilidad del espermatozoide (Mayren et al., 2012). Las modificaciones lipoproteicas de las membranas permiten la exteriorización de los receptores y activan canales iónicos que intervienen en la activación de mecanismos de transducción (flujo de calcio, síntesis de AMPc, fosforilación-desfosforilación de proteínas, etc.), y cambian el metabolismo energético que conduce a la desestabilización de la membrana plasmática a nivel de la región acrosomal y la hiper-activación del movimiento flagelar (Arenas et al., 2010). Estos cambios

permiten al espermatozoide responder a inductores específicos y experimentar la RA al final de la capacitación (Arenas et al., 2010).

La criopreservación genera en los espermatozoides, cambios similares a la capacitación espermática denominándose criocapacitación y que al utilizar espermatozoides criopreservados para la FIV, la etapa de capacitación inducida puede ser innecesaria (Boerke et al., 2013). Sin embargo, los cambios producidos por la criopreservación reducen las tasas de concepción al usar espermatozoides criopreservados para la IA (Rodríguez-Martínez et al., 2008).

**Reacción acrosomal:** Cuando el espermatozoide se une al ovocito, se induce la RA (Figura 3). Esta ocurre de forma espontánea debido al incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante el proceso, siendo este de interés por su participación en la preparación final de los espermatozoides antes de la penetración de la Zona Pelúcida (ZP) (Del Río et al., 2007). Sin embargo, trabajos realizados en la FIV indican que la RA puede ser inducida empleando diferentes sustancias como heparina, ionóforo de calcio, fluido sintético de oviducto y progesterona (Chávez et al., 2008). La RA es especie específica, e implica la existencia de moléculas para el reconocimiento entre los gametos masculino y femenino (Arenas et al., 2010). La membrana plasmática y la acrosomal externa se fusionan en varios sitios, formando vesículas que se desprenden, quedando la membrana acrosomal interna, como nueva membrana de superficie (Olivera et al., 2006). Las vesículas liberan su contenido a medida que el espermatozoide penetra a través de la ZP.

Bioquímicamente la RA se caracteriza por la activación de las enzimas acrosomales y la secreción de algunas de ellas, antes de la formación de vesículas. El calcio desempeña un papel fundamental en todos los mecanismos de exocitosis, principalmente el calcio extracelular (Arenas et al., 2010). Para que se desarrolle la RA es necesario que el espermatozoide sufra la debida capacitación acompañada de la hiperactividad, aumento de calcio intracelular, disminución del contenido de colesterol, activación de las enzimas hidrolíticas generada por el aumento de pH intra-acrosomal, y regulación de la exocitosis (Del Río et al., 2007). Finalizada la capacitación y la RA el espermatozoide está listo para penetrar y fusionarse con el ovocito, proceso denominado, fecundación.



**Figura 3.** RA en el espermatozoide. A. Microfotografía de un espermatozoide experimentando la RA. La membrana acrosomal se observa formando vesículas. B. Diagrama que muestra la fusión de la membrana acrosomal con la membrana celular en la cabeza del espermatozoide (Gilbert, 2005).

## **1.4 Fecundación**

La fecundación es el proceso mediante el cual los gametos masculinos y femeninos se unen y dan origen al cigoto, dando comienzo a la formación de un nuevo individuo. Es una etapa en la que hay una interacción entre ambos gametos, con la consiguiente fusión y mezcla de caracteres hereditarios.

En mamíferos la fecundación se realiza en el tercio externo de las trompas uterinas o región ámpular; comienza cuando el espermatozoide penetra la corona radiada y la ZP, y termina con la mezcla de los cromosomas de ambos gametos, después que el espermatozoide ha penetrado en el ovocito (Revisado en: Valdés et al., 2010). Se pueden describir las fases siguientes:

### **1. Penetración del espermatozoide en la corona radiada**

Las células de la corona radiada están rodeadas por una matriz extracelular de proteínas y carbohidratos, fundamentalmente ácido hialurónico, estas células se desprenden, de forma paulatina, por efectos combinados mecánico y enzimático de la mucosa tubárica y de los espermatozoides (Gilbert, 2005). Se considera que la hialuronidasa y otras enzimas contenidas en el acrosoma desempeñan una función importante en la separación y penetración del espermatozoide, además de los movimientos mecánicos alrededor del ovocito (Valdés et al., 2010). Se ha estudiado una proteína llamada PH20 (Myles y Primakoff, 1997) que tiene actividad de hialuronidasa, por la cual el espermatozoide es capaz de hidrolizar el ácido

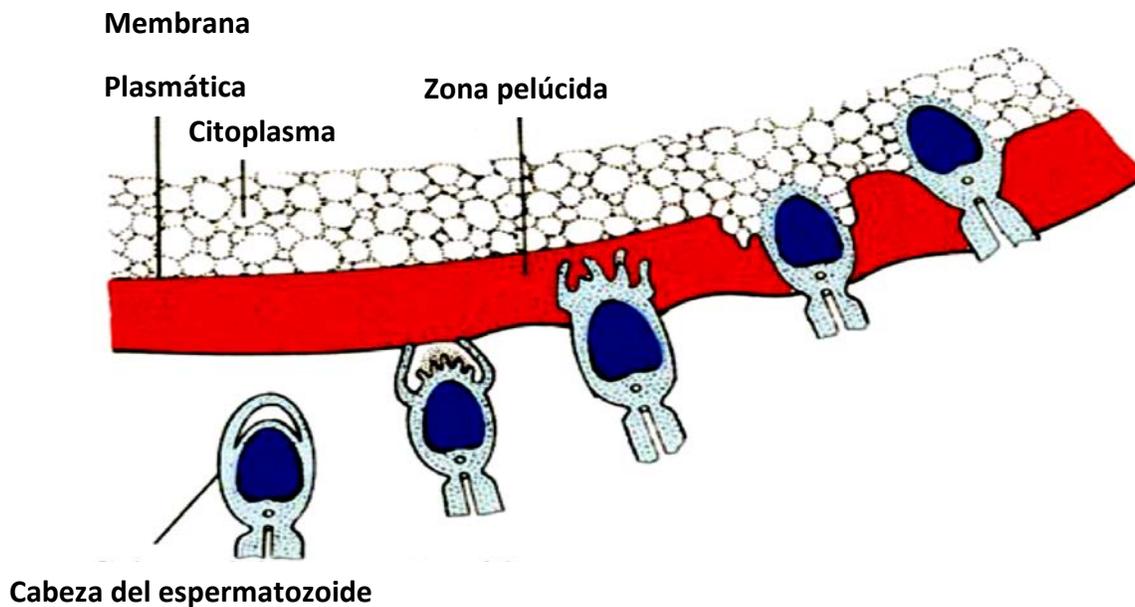
hialurónico y atravesar la densa capa de células de la granulosa ayudado por su movimiento hiperactivo. De los 300 a 500 millones de espermatozoides depositados en el tracto reproductor femenino, alrededor de 300 a 500 alcanzan el sitio de la fecundación y sólo uno de ellos penetra al ovocito (Sadler, 2007; Yanagimachi, 1994). Se cree que los restantes ayudan al espermatozoide fecundante a penetrarla corona radiada y la ZP que protegen al ovocito. Los espermatozoides capacitados, adquieren hipermovilidad que es un cambio en el movimiento del flagelo, lo que permite que estos pasen libremente a través de las células de la corona radiada (Valdés et al., 2010).

## **2. Unión y penetración a la zona pelúcida**

La ZP es una cubierta de glicoproteínas, de estructura filamentosa, que rodea al ovocito, así como también facilita y mantiene la unión del espermatozoide e induce la RA (Larsen, 2002). En mamíferos la ZP está formada por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3, con peso molecular de 20 000, 120 000 y 83 000 Daltons respectivamente. Las ZP2 y ZP3 se unen entre sí de forma alterna, formando largos filamentos de polímeros, los cuales, a su vez, están unidos entre sí por las ZP1 (Jiménez y Merchant, 2003).

La unión del espermatozoide a la ZP es mediada por la ZP3 y por receptores de la membrana plasmática del espermatozoide. Estas moléculas ZP3 actúan como receptores específicos para los espermatozoides, a su vez, moléculas expresadas en la cabeza del espermatozoide actúan como sitios de unión exclusivos para las moléculas ZP3 de la ZP (Larsen, 2002). Una de estas moléculas es la galactosil-

transferasa. Después que el espermatozoide se une a la ZP comienza la RA, cuyo objetivo es la unión de la membrana acrosomal con la membrana plasmática del ovocito (Figura 2) (Valdés et al., 2010).



**Figura 2.** Etapas sucesivas de la fusión y la penetración del espermatozoide (Valdés et al., 2010).

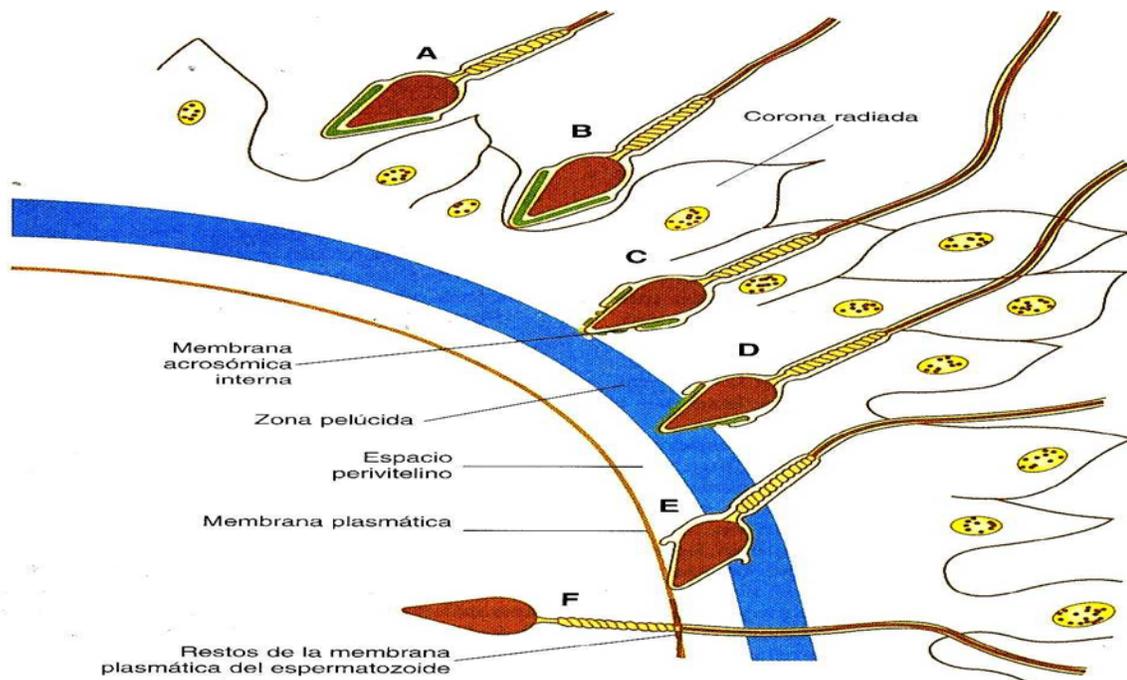
La liberación de enzimas acrosomales como la acrosina, permite que el espermatozoide penetre la ZP y se ponga en contacto con el oolema del ovocito. La composición de la ZP cambia cuando la cabeza del espermatozoide entra en contacto con la superficie del ovocito (Urbina y Lerner, 2008). Este contacto causa la liberación de enzimas lisosomales de los gránulos corticales que se encuentran en el citoplasma muy cerca de la membrana plasmática del ovocito. Estas enzimas, alteran

las propiedades de la ZP (reacción de zona), para prevenirla penetración de otros espermatozoides, e inactivarlos sitios receptores específicos (ZP3) en la superficie de la ZP (Jiménez y Merchant, 2003), otros espermatozoides se pueden encontrar adheridos a esta última, pero solo uno es capaz de penetrar al ovocito. Esta reacción culmina con la liberación de numerosas enzimas, necesarias para penetrar la ZP, contenidas en el acrosoma que incluye la acrosina y otras proteínas parecidas a la tripsina (Valdés et al., 2010), tales como:

1. Proteínasa ácida.
2.  $\beta$ -galactosidasa.
3. Acrosina (proteínasa).
4.  $\beta$ -glucuronidasa.
5. Arilaminidasa.
6. Hialuronidasa.
7. Arilsulfatasa.
8. Neuraminidasa.
9. Colagenasa.
10. Fosfolipasa C.
11. Esterasa.
12. Proacrosina.

### 3. Unión y fusión del espermatozoide a la membrana plasmática (oolema)

El espermatozoide, después de atravesar la ZP y el espacio perivitelino, hace contacto con el ovocito, uniéndose primero y fusionándose después por la región ecuatorial de la cabeza. Las moléculas de la membrana plasmática del espermatozoide se unen a las integrinas  $\alpha 6\text{-}\beta 1$  presentes en la membrana plasmática del ovocito. Si la RA no ocurre, el espermatozoide es incapaz de fusionarse con el ovocito. Debido a que el acrosoma desaparece, durante la RA, y la fusión de los gametos sucede entre la membrana del ovocito y la membrana que cubre la región posterior de la cabeza del espermatozoide (Figura 4) (Revisado en: Valdés, 2010).



**Figura 4.** Secuencia de los acontecimientos en la penetración de cubiertas y la membrana plasmática del ovocito. A y B. Penetración de la corona radiada, C y D. Anclaje a la ZP y RA, E y F. Unión a la membrana plasmática y entrada al ovocito (Palma, 2001).

#### **4. Contacto de los pronúcleos y mezcla de los cromosomas. Formación del cigoto**

En los mamíferos, los pronúcleos masculino y femenino son indistinguibles morfológicamente, y al entrar en singamia pierden sus envolturas nucleares (Gilbert, 2005). Durante el crecimiento de estos, cada uno debe replicar su ADN, ya que solo presentan un juego de cromosomas (haploides). De inmediato, después de la síntesis del ADN, los cromosomas se disponen en el huso mitótico, organizado por los centríolos aportados por el espermatozoide, en preparación para la primera división mitótica del cigoto (Moore et al., 2008). Los cromosomas maternos y paternos se dividen longitudinalmente por medio del centrómero, y las cromátides resultantes se desplazan a los polos opuestos, de manera que, proporcionan al cigoto, un número diploide de cromosomas. Al tiempo en que las cromátides hermanas se desplazan hacia los polos opuestos, un profundo surco aparece en la superficie de la célula y divide al citoplasma del cigoto en las dos primeras células, (blastómeros) que continúan su desarrollo hasta la formación del nuevo organismo (Valdés et al., 2010).

## 5. Segregación citoplasmática

Inmediatamente después de la penetración del espermatozoide, comienza una intensa actividad dinámica de las partes que componen el citoplasma del ovocito (ooplasma) y que recibe el nombre de segregación citoplasmática. Durante este proceso se observa una reorganización espacial del huevo (Eynard et al., 2008).

## 6. Segmentación

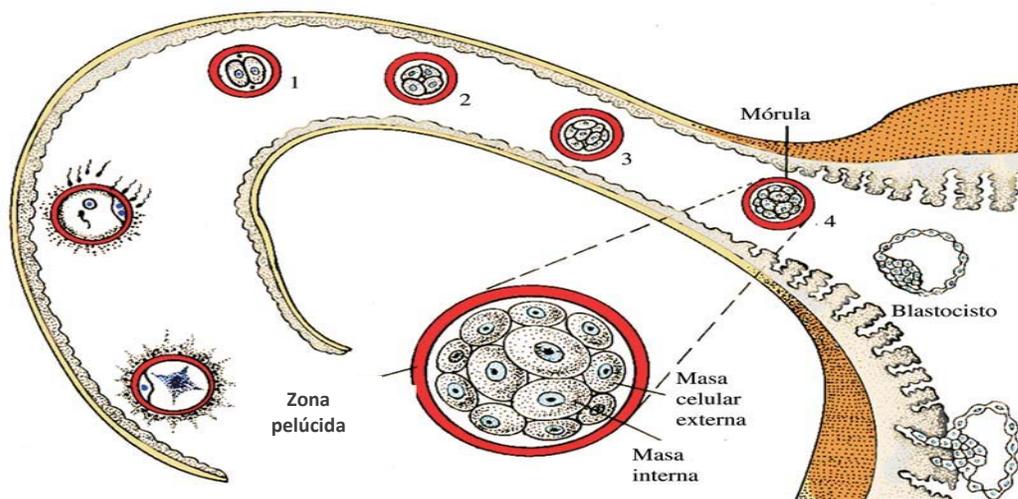
El periodo inicial, en el desarrollo de un individuo multicelular se denomina segmentación (Figura 5), el cual consiste en una rápida sucesión de divisiones mitóticas que conducen a la formación de un número progresivamente mayor de células, las cuales se tornan más pequeñas con cada división y denominadas blastómeros. En primer lugar, el cigoto se divide en dos blastómeros, luego en 4, en 8, y así sucesivamente durante el paso del cigoto a lo largo de la trompa de Falopio. Las divisiones subsecuentes a las 12 células dan origen a la mórula que posteriormente da origen al blastocisto (Gilbert, 2005).



**Figura 5.** Desarrollo del huevo durante la segmentación, hasta la etapa de mórula (Valdés et al., 2010).

## 7. Formación del blastocisto

La entrada progresiva de líquido a través de la ZP hace que la mórula se transforme (Larsen, 2002). Las células de la masa interna son desplazadas hacia la periferia y quedan ubicadas cerca de uno de los polos de esta estructura esférica (polo animal) (Moore et al., 2008). Las células de la masa externa se aplanan, al tiempo que se origina una cavidad llena de líquido, producto de la confluencia de los espacios intercelulares (Gilbert, 2005). La nueva estructura que se forma recibe el nombre de blastocisto (Figura 6). En el interior del blastocisto existe un cúmulo de células indiferenciadas de gran tamaño, embrioblasto (masa celular interna), las cuales se encuentran delimitando la cavidad del blastocisto en toda su extensión, excepto a nivel donde contacta con el embrioblasto, estas células reciben el nombre de trofoblasto (masa celular externa) el cual que provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta (Moore et al., 2008).



**Figura 6.** Segmentación y formación del blastocisto (Valdés et al., 2010).

## **8. Implantación**

El blastocisto llega al lugar de implantación a los cinco o seis días y medio después de la fecundación, esto puede variar dependiendo de la especie. El primer signo de crecimiento embrionario es detectado entre las 10 y 15 h después que el embrión se libera de la ZP, cuando las células del trofoblasto exhiben una abrupta actividad proliferativa seguida por la unión y expansión en el endometrio. En este momento, es cuando normalmente debe adherirse a la superficie del endometrio por su polo embrionario. Las células trofoblásticas situadas sobre el polo embrionario comienzan a penetrar entre las células epiteliales de la mucosa uterina. Posteriormente, el blastocisto se adhiere a la mucosa uterina por las integrinas (Revisado en: Valdés, 2010)

### **Fecundación *In vitro***

Por otra parte la fecundación también se puede realizar fuera del organismo, en condiciones de laboratorio, (*in vitro*) esta técnica es de utilidad cuando los gametos no pueden fusionarse de manera natural.

La FIV es una técnica que permite el estudio de los procesos que conducen a la penetración del ovocito por un espermatozoide y la formación de un cigoto viable. También puede ser utilizada en la valoración de la capacidad fecundante de los gametos masculinos, es una herramienta que permite la obtención de embriones a partir de gametos de alto valor genético (Gilbert, 2005). La producción de embriones mediante la FIV puede ofrecer una gran ayuda a los programas de mejora y

conservación del patrimonio genético, al permitir la utilización de gametos que, de modo natural, no pueden fecundar (Gadea et al., 1998).

## **1.5 Reproducción asistida**

La reproducción asistida es el conjunto de técnicas o métodos biomédicos que facilitan o sustituyen a los procesos naturales que se dan durante la reproducción. Las técnicas de reproducción asistida en humanos, permiten que las parejas puedan solucionar problemas de subfertilidad, cuando la concepción no ha sido posible por métodos naturales (Bonilla et al., 2009).

La reproducción asistida en humanos es el conjunto de técnicas y tratamientos destinados a lograr un embarazo. El uso de estas tecnologías permite el desarrollo de un individuo cuando éste no puede concebirse de manera natural principalmente a través de la inseminación artificial o transferencia embrionaria. En la reproducción asistida existen técnicas como la FIV y muchas de las ocasiones utilizan la criopreservación, como herramienta para la conservación de gametos y embriones (Evans y Maxwell., 1987). En especies de mamíferos domésticos la reproducción asistida ha permitido incrementar la obtención de animales con alto valor económico.

## **II.- ANTECEDENTES**

### **2.1 Criopreservación**

La criopreservación de gametos de mamíferos se originó en 1949 mediante un estudio en donde se demostró que los espermatozoides de humano poseen la habilidad de recuperar su viabilidad aún después de haberse mantenido a temperaturas extremadamente bajas (Polge et al., 1949). Hoy en día existen diversos métodos de criopreservación.

La criopreservación permite mantener células, tejidos y órganos a bajas temperaturas, generalmente entre los  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ , manteniendo su metabolismo totalmente inactivo. Las reacciones bioquímicas quedan detenidas permitiendo preservar durante largos periodos su potencial de desarrollo y su viabilidad. En la actualidad la criopreservación ha sido empleada para la conservación de gametos, de manera que la criobiología y las técnicas de reproducción asistida han avanzado en los últimos 50 años (Watson, 2000).

La criopreservación de espermatozoides es una forma de utilizarlos para la cría de animales de importancia agrícola y ha sido de utilidad para la preservación de gametos de especies en peligro de extinción y a la superación de algunos de los aspectos de la subfertilidad masculina en los humanos. Sin embargo, es generalmente aceptado que hay reducción de la fertilidad como una consecuencia de la criopreservación (Watson, 2000).

### 2.1.1 Tipos de criopreservación

Para el desarrollo de la criopreservación, se han empleado diferentes procedimientos, en relación a los tipos celulares, cuyo objetivo ha sido conservarlos por periodos relativamente largos. Estos procedimientos son:

**Congelación lenta:** En esta técnica, las células son expuestas antes de su enfriamiento a una solución crioprotectora con una concentración de 1-2 M, la cual es considerada hiperosmótica. Las células responden al cambio osmótico deshidratándose, a la vez que incorporan lentamente el crioprotector. Para la supervivencia celular es extremadamente importante determinar la tasa de enfriamiento adecuada que permita una correcta deshidratación celular disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, la cual está determinada por el tipo celular y la naturaleza de los crioprotectores utilizados (Polge et al., 1949). Por ejemplo, se sabe que para la congelación de embriones humanos, la tasa de enfriamiento es de 2°C/ min hasta -7°C/min, temperatura a la que se realiza la inducción de la formación de hielo en la solución donde se encuentran las células, proceso conocido como “seeding”. Con ello aumenta la concentración de solutos extracelulares debido a la deshidratación provocada por los crioprotectores, evitando así la formación de hielo en su interior. Esta técnica se realiza sometiendo a las células a bajas temperaturas de forma gradual con equipo especializado. Estas temperaturas incluyen rangos desde -4°C, -80°C hasta -196°C (Bajo, 2009).

**Vitrificación:** Se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo debido al rápido descenso de la temperatura. Para lograr el estado vítreo, la viscosidad de la muestra aumenta hasta que las moléculas quedan inmóviles. Este aumento de viscosidad requiere velocidades de enfriamiento rápidas, y por lo tanto, concentraciones de crioprotectores elevadas (Bajo, 2009). La principal estrategia de la vitrificación es pasar el rango de temperatura crítica (-30°C a -80°C) lo más rápido posible para disminuir el riesgo de daño y llevar a la célula hasta la temperatura de -196°C de manera inmediata (Vajta, 2000).

La principal desventaja de la vitrificación es el efecto citotóxico que puede producir el crioprotector utilizado, por ello el tiempo de exposición a estos crioprotectores es de gran importancia para esta técnica. Es posible limitar la toxicidad de los medios de vitrificación utilizando la combinación de dos crioprotectores intracelulares. De este modo se consigue aumentar su permeabilidad a las células permitiendo su recuperación a temperaturas inferiores y disminuyendo la toxicidad (Bajo, 2009).

## **2.2 Crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias empleadas para la protección contra el daño celular que se produce durante los procesos de congelación, vitrificación y desvitrificación debido principalmente a la formación de cristales de hielo y a una

deshidratación inadecuada (Marina et al., 2002). Los crioprotectores alteran las propiedades fisicoquímicas de las soluciones, son moléculas hidrosolubles y de baja toxicidad, que actúan disminuyendo la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del solvente y del soluto. Además disminuyen la temperatura a la que se produce la transición del agua de un estado líquido a un estado sólido, interactuando con las moléculas de agua reduciendo su capacidad para formar enlaces entre ellas. También actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas evitando que pierdan su estructura original y por lo tanto, la viabilidad celular (Bajo, 2009).

Los crioprotectores se clasifican en función de la permeabilidad que poseen para atravesar la membrana celular en dos grupos: crioprotectores permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares.

### **2.2.1 Tipos de crioprotectores**

**Los crioprotectores intracelulares o permeables**, forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua e impiden la cristalización de hielo. En altas concentraciones inhiben la formación de cristales de hielo y generan la formación de cristal sólido que no se expande, este proceso es conocido como “vitrificación”. Otro efecto de los crioprotectores permeables es que protegen a la célula de los efectos de la solución y mantienen en dilución a los electrolitos. Este proceso se conoce

como la “regla de fase”, en la que la concentración de soluto en la fase líquida es constante para una temperatura dada (Marina et al., 2002).

Los crioprotectores intracelulares a través de sus propiedades, reducen el crio-daño intracelular (Gordon, 1994). Por lo tanto, la mayor cantidad de agua permanecerá en el estado líquido cuando se somete a baja temperatura, disminuyendo la concentración intracelular de solutos y proporcionando así un menor perjuicio para las células durante la congelación (Watson, 1995). Se han usado varios crioprotectores como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y propilenglicol, y sus combinaciones. Sin embargo, el glicerol se usa con mayor frecuencia, adicionándose a 3765 °C, (Leboeuf et al., 2000). El glicerol se une a la molécula de agua y baja el punto de congelación de las soluciones, por lo que en su presencia se forma menos hielo a cualquier temperatura (Marina et al., 2002), de esta manera, se reduce la concentración de solutos en el líquido residual. La influencia dañina de la concentración de solutos depende, aparentemente, de la temperatura. Por lo tanto el glicerol, al reducir la temperatura a la cual se llega a una determinada concentración de solutos, reduce estos efectos dañinos. El glicerol probablemente deshidrata las células y forma complejos con los iones metálicos. Por ejemplo, el glicerol penetra rápidamente al espermatozoide en suspensión, siendo oxidado, y se concentra en la parte posterior de la cabeza (Cavestany, 1994). A demás de su efecto osmótico el glicerol parece actuar directamente sobre la membrana plasmática, debido a que hay evidencia de que se une a la cabeza de los fosfolípidos, reduce la fluidez de la membrana, del mismo modo reduce la interacción con las proteínas y enlaces entre

glicoproteínas de la membrana (Parks y Graham, 1992). Para ser más efectivo, el glicerol requiere una tasa de congelación relativamente baja. Aunque es esencial para el congelamiento de espermatozoides, también puede afectar adversamente la membrana celular y eliminar su capacidad fertilizante aunque la movilidad al descongelarlo se mantenga (Cavestany, 1994). El efecto tóxico del glicerol ha sido reportado por muchos autores, como la desnaturalización de proteínas, alteración en las interacciones de actina en el citoplasma celular debido a un aumento de la viscosidad del intracelular, polimerización de la tubulina en los microtúbulos: por otra parte se ha visto actuando directamente sobre la membrana plasmática, y el glicocálix produciendo cambios en las proteínas de superficie celular (Alvarenga et al., 2000).

Al estudiar el efecto de diferentes crioprotectores (glicerol, etilenglicol, dimetilformamida y DMSO) en espermatozoides de sementales, Alvarenga et al., (2000) demostraron efecto similar en la adición del etilenglicol y de glicerol, además informaron que cuando se utilizan juntos, reducen la concentración de glicerol y por lo tanto disminuyen los daños causados por su efecto tóxico. Los mismos autores encontraron resultados similares con el uso de glicerol, etilenglicol glicol, dimetilformamida y DMSO. Este último es ampliamente utilizado como crioprotector, individualmente y en asociación con glicerol. Se ha observado que el DMSO aumenta la movilidad en espermatozoides después de la descongelación. Es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO

se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos, de otras sustancias durante el proceso de congelamiento y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana (Ávila-Portillo et al., 2006).

**Crioprotectores impermeables o extracelulares.** Son sustancias de alto peso molecular, se mantienen fuera de la célula, aumentando la concentración extracelular de solutos y por tanto aumentando la presión osmótica extracelular en relación con la intracelular. Este desequilibrio osmótico, induce la salida de agua intracelular, la alta concentración de solutos extracelulares se diluye hasta que el agua extracelular se congela. La célula se deshidrata, disminuye su volumen y el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares se reduce (Marina et al., 2002).

Los crioprotectores extracelulares son efectivos a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes; los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano (Corti, 2006). Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo su actividad. Algunas sustancias, como lípidos, proteínas y otras

macromoléculas, son eficaces en la protección de la célula espermática durante el proceso de congelación, sin la necesidad de que penetren (Gordon, 1994). Estas sustancias se pueden encontrar en la yema de huevo, leche, en algunos azúcares y albúmina sérica bovina. La yema huevo contiene lecitina (fosfatidilcolina), que protege a la membrana mediante la restauración de fosfolípidos celulares perdidos por los espermatozoides durante el choque térmico (Watson, 1995). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se adhieren a la membrana celular durante el proceso de criopreservación, preservando la membrana de los espermatozoides (Moussa et al., 2002). Los fosfolípidos que componen la fracción LDL de la yema de huevo protegen a los espermatozoides durante la refrigeración (5°C) (Gordon, 1994). Por lo tanto, el uso de fosfatidilserina purificada ha demostrado proteger al espermatozoide contra el choque térmico (Wilhelm et al., 1996). Los liposomas que comprenden fosfatidilserina y colesterol protegen al espermatozoide contra los daños causados por la congelación, posiblemente mediante la prevención de los cambios deletéreos. La prevención de daño por choque térmico conferida por los lípidos parece estar relacionada a la quelación del ion de  $\text{Ca}^{+2}$  del medio. (Wilhelm et al. 1996).

Los azúcares actúan por la presión osmótica al deshidratar a la célula, reduciendo el agua que puede estar congelada en la célula a fin de reducir las lesiones causadas por la cristalización del hielo (Aisen et al., 2002). Además de actuar como crioprotectores, los azúcares actúan como un sustrato de energía para los espermatozoides (Yildiz et al., 2000), lo que confiere protección a la membrana

plasmática durante la congelación y descongelación a través de la interacción directa con la membrana, la cual implica enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo de los azúcares con grupos fosfato situados en la cabeza de los fosfolípidos, Así los azúcares pueden prevenir el daño causado por la deshidratación. Generalmente los disacáridos (sacarosa y trehalosa) son más eficaces en la estabilización de la bicapa de la membrana que los monosacáridos (De Leeuw et al., 1993), manteniendo al mismo tiempo su capacidad de transportar calcio, inhibiendo la fusión de la membrana y manteniendo los lípidos en una fase de fluido ante la ausencia de agua (Anchordoguy et al., 1987; Crowe et al., 1987).

### **2.2.2 Mecanismo de acción de los crioprotectores**

Crioprotectores Intracelulares: El EG tiene un peso molecular de 62.07 Da. Es de penetración rápida, reduce el cambio de volumen y el tiempo de exposición para completar el equilibrio osmótico. En alta concentración (más de 35%) o exposición prolongada (más de 1 minuto) produce daño excesivo en la membrana (Hotamisligil et al., 1996).

El DMSO tiene peso molecular de 78.13 Da, tiene la característica de aceptar protones, impide el daño causado por cristales de hielo en la congelación, por concentración de electrolitos, deshidratación, cambios de pH y desnaturalización de proteínas (Sigma, 2006-2007).

Los crioprotectores extracelulares como el polivinil alcohol (PVP) tiene un peso molecular de 40,000 Da, es un coloide que tiene la propiedad de retener gran cantidad de agua y aumenta la viscosidad en el medio de vitrificación (Freshney, 1987).

La yema de huevo contiene el fosfolípido fosfatidilcolina, que tiene una temperatura de transición de  $-7^{\circ}\text{C}$  cuando está totalmente hidratada, característica que impide la formación de cristales de hielo durante el proceso de criopreservación de células (Corti, 2006).

La trehalosa es un disacárido natural formado por la unión de dos moléculas de glucosa, tiene un peso molecular de 378.33 Da y presenta características más favorables que otros azúcares para la estabilización de las proteínas y de la doble capa de fosfolípidos en las membranas biológicas (Corti, 2006). Tiene una acción protectora relacionada con el efecto osmótico y participa en interacciones específicas con los fosfolípidos de la membrana (Abe et al., 2005), estabiliza la bicapa de lípidos de la membrana y ejerce una función protectora contra el frío (Conejo, 2003).

La sacarosa es un disacárido formado por la unión de glucosa y fructosa y tiene un peso molecular de 342.3 Da, se une a la superficie del material que se va a deshidratar, aumenta la viscosidad y lleva la temperatura de transición a temperaturas inferiores a las que se conserva el sistema con la formación de hielo. Durante la deshidratación el azúcar reemplaza al agua que hidrata las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que reduce la temperatura de transición y permite la vitrificación (Corti, 2006).

## 2.3 Congelación

La congelación de espermatozoides presenta varios problemas, incluyendo el shock de frío, el daño por la fracción de cristales de hielo, y los cambios intracelulares provocados por la deshidratación.

Cuando una suspensión de espermatozoides es enfriada por debajo de 0°C, el primer paso es la formación de cristales de hielo extracelular; la concentración de solutos en el agua extracelular aumenta (Bajo, 2009).

Debido al aumento de concentraciones de solutos extracelulares, el agua pasa de la célula al espacio extracelular. A medida que el agua sale la célula se deshidrata. Si el agua no puede abandonar la célula lo suficientemente rápido, se forman cristales de hielo intracelulares que dañan al espermatozoide, mientras que los cristales extracelulares no causan daño irreversible. Si el proceso de enfriado es muy lento, la concentración de solutos intracelulares, deshidratación, precipitación de solutos y cambio de pH, pueden ocasionar daños (Cavestany, 1994).

El agua pura se congela y forma cristales a 0°C, mientras que el agua que contiene iones y otras sustancias en solución lo hace a temperaturas más bajas, dependiendo de la concentración de tales sustancias. Conforme el agua de una solución se congela, los cristales de agua pura que se forman van dejando mayores concentraciones de solutos que se encuentran en la solución. Este hecho aumenta la presión osmótica, lo que puede determinar la lesión de las células.

Actualmente los espermatozoides pueden conservarse en nitrógeno líquido, a temperatura tan de  $-196^{\circ}\text{C}$  y conservar su capacidad fertilizante relativamente alta después de descongelados. Sin embargo muchos de los espermatozoides mueren o se inmovilizan por la congelación-descongelación. De aquí que, para lograr buenos porcentajes de fertilidad, se utilice una mayor concentración de espermatozoides que para las técnicas de inseminación con espermatozoides frescos. La capacidad de los espermatozoides congelados depende principalmente del cuidado ejercido en la dilución antes de la congelación, y después de esta, la fertilidad depende del cuidado y método de descongelación (Cavestany, 1994).

#### **2.4 Sensibilidad de las células a la congelación**

La membrana del espermatozoide sufre una amplia variedad de daños durante el proceso de congelación. La causa principal de estos cambios es debida a alteraciones térmicas, mecánicas y químicas, asociados a la acción previa de los crioprotectores, cambios volumétricos, en parte dependientes del balance  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ligado al aporte de ATP intracelular, por lo que podría estar implícito un fracaso metabólico, y en parte dependiente de variaciones osmóticas, desestabilización de proteínas ligadas al citoesqueleto y la formación de cristales de hielo (Galina y Valencia, 2009; Hafez, 2004).

Los daños en las membrana plasmática se debe a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se produce a una temperatura de entre 10°C y 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad; durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávila et al., 2006). Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que produce cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada en un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras, y posteriormente, cuando el espermatozoide se exponga a la solución que es congelada (Kuwayama et al., 2005). Más tarde ocurren otros cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios están asociados a cambios en la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para sobrevivir (Stornelli et al., 2005; Galina y Valencia, 2009). Otro factor que afecta la viabilidad espermática en la congelación es el shock térmico, dado por el enfriamiento rápido de los espermatozoides entre 30 y 0 °C, el cual induce un estrés letal y un aumento de la permeabilidad de la membrana en algunas células viéndose afectada la regulación del calcio debido a que algunos canales del calcio se abren provocando el aumento de este al interior de la célula. El shock térmico por frío es

considerado como el estado extremo de un estrés continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia (Stornelli et al., 2005).

## **2.5 Tipos de recipientes usados para la congelación**

Los recipientes utilizados en la congelación son: pajillas de 0.5 mL y de 0.25 mL (Gordon, 1994), pajilla abierta alargada, de punta fina (OPS) de 1-1.5  $\mu$ L (Rojas et al., 2004) y de punta extrafina (SOPS) de 0.5-1.0  $\mu$ L (Córdova et al., 1999), criotubos de 1-5 mL (Isachenko et al., 2005), en donde el volumen de medio que usan cada uno de ellos es importante en el proceso de congelación.

El tipo de recipiente utilizado en el proceso de congelación, así como los tiempos en que se realiza el proceso de equilibrio son importantes para obtener un resultado favorable (Kuwayama et al., 2005). Los espermatozoides congelados en pajillas de 0,25ml o 0,5ml se han convertido en la unidad universalmente aceptada de almacenamiento (Baracaldo et al., 2007)

## **2.6 Descongelación**

En la utilización de espermatozoides criopreservados, la fase de descongelamiento es tan importante para su sobrevivencia como el proceso de congelación. Los

espermatozoides que sobreviven a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  son sometidos a la descongelación y atraviesan nuevamente la zona crítica de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  (Mazon, 2011). La descongelación es un punto muy crítico pudiendo lesionarse las células si el proceso no se lleva a cabo de una forma apropiada, aparte de los daños criogénicos causados por la congelación. Los espermatozoides se deben descongelar a una temperatura no menor a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua por un lapso de 45 a 50 segundos (Evans y Maxwell, 1990; Illera, 1994). La descongelación de los espermatozoides a  $37^{\circ}\text{C}$  es la más adecuada en condiciones prácticas por excluir el riesgo de sobrecalentamiento (Mazon, 2011).

## **2.7 Estudios de congelación de espermatozoides en animales domésticos**

La conservación del semen es una de las biotecnologías que solucionan algunos problemas reproductivos (principalmente de apareamiento). Asimismo, permiten conservar y manejar la calidad genética de razas de importancia económica. Además, la adecuada preservación del semen conlleva la posibilidad de transportar el material genético a grandes distancias lo que resulta de mayor utilidad (Sánchez et al., 2006).

Por otra parte el descubrimiento del glicerol como crioprotector y el hecho de que fueran espermatozoides las primeras células en ser satisfactoriamente congeladas-descongeladas (Polge et al., 1949) resultó determinante en el desarrollo de la

criopreservación. La criopreservación de espermatozoides y su capacidad fecundante posterior a la congelación, ha sido descrita como exitosa en varias especies de animales domésticos (Holt, 2000). No obstante en estos antecedentes, se debe considerar que los espermatozoides experimentan daño durante el proceso de congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992). Se ha descrito que semen con alto porcentaje de espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales, al ser sometido a técnicas de criopreservación experimenta una reducción de la movilidad espermática, fenómeno que se asocia con modificaciones en el metabolismo celular y daños en la membrana espermática (Hammerstedt et al., 1990).

### **2.7.1 Congelación de espermatozoides porcinos y ovinos**

En estudios realizados por Medrano y Holt (1998), en cuanto a la variación entre individuos en la susceptibilidad del semen porcino al congelamiento-descongelamiento, indican que parece ser más importante que la tasa de enfriamiento en la criosupervivencia espermática. Además se observó, por medio de microscopía, con tinciones fluorescentes, que la membrana plasmática del espermatozoide se mantiene intacta durante la congelación pero al descongelarse se manifiesta la ruptura de esta estructura. Diferencias en la composición química de la

membrana espermática podrían explicar la variabilidad individual al congelar-descongelar.

El eyaculado completo del ganado porcino, inmediatamente después de ser extraído hace extremadamente sensibles a los espermatozoides. Sin embargo, la fracción rica en espermatozoides es más resistente que el eyaculado completo y puede tolerar al enfriamiento lento debido a su concentración de componentes como proteínas y enzimas antioxidantes presentes en esta fracción (Córdova et al., 1997; 1999; 2000).

Echegaray (2003), afirma que para congelar semen de verraco es absolutamente necesario realizar una selección de los animales que se van a utilizar, además de tener buena calidad seminal (movilidad superior al 80%, viabilidad y acrosomas normales superiores al 80%).

En el caso de los ovinos se ha probado una gran cantidad de diluyentes para la congelación del semen en pastillas (Salamon y Maxwell, 1995), y sin embargo no existe un consenso acerca de cuál es el que proporciona mejores resultados al descongelar, pero los diluyentes preparados a partir de Tris-yema de huevo y el de Lactosa-yema de huevo son los que más se han experimentado. Algunos autores han encontrado que cuando se utiliza el diluyente a base de Tris-glucosa-yema de huevo, se obtienen buenos resultados al descongelar (Salamon y Viser, 1972) y buena fertilidad en la inseminación (Viser y Salamon, 1974). Sin embargo, el diluyente Lactosa-yema de huevo, ampliamente utilizado para congelar el semen de ovino (Colas y Brice, 1970), contiene lactosa que es altamente efectiva para proteger

a los espermatozoides, al reducir la temperatura de cristalización durante la congelación, se logran mejores resultados al descongelar (Mathur y Mathur, 1989).

En la especie ovina, los resultados de fertilidad mediante inseminación artificial con semen congelado son especialmente bajos debido a los severos daños que afectan a los componentes de la membrana espermática, reduciendo drásticamente la capacidad fecundante. Esta pérdida de poder fecundante de los espermatozoides ovinos congelados podría deberse a la capacitación prematura inducida por el choque térmico por frío (Sandoval et al., 2007).

### **III.- JUSTIFICACIÓN**

- La criopreservación de espermatozoides puede ser utilizada para su conservación y para aumentar la variabilidad genética de especies de mamíferos domésticos.
- Este método puede ser usado para llevar a cabo ensayos de FIV ya que es necesario contar con la disponibilidad de muestras espermáticas en el momento que se requiera, con una buena capacidad fertilizante.
- Aún no se obtienen resultados con alta eficiencia en viabilidad y capacidad fertilizante de espermatozoides post-descongelación.

#### **IV.- HIPÓTESIS**

La sensibilidad de los espermatozoides a bajas temperaturas varía entre especies de mamíferos, siendo los espermatozoides porcinos los más susceptibles debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en su membrana plasmática y su funcionalidad se altera durante el proceso de congelación, por lo tanto si se utilizan muestras de alta calidad, reduciendo así la probabilidad de daño durante el procedimiento, y si se lleva a cabo una técnica de congelación y descongelación adecuada, los parámetros de viabilidad, movilidad e integridad acrosomal no se verán alterados. Sin embargo la capacidad de recuperación post-congelación será inferior en los espermatozoides porcinos a diferencia de los espermatozoides de ovino.

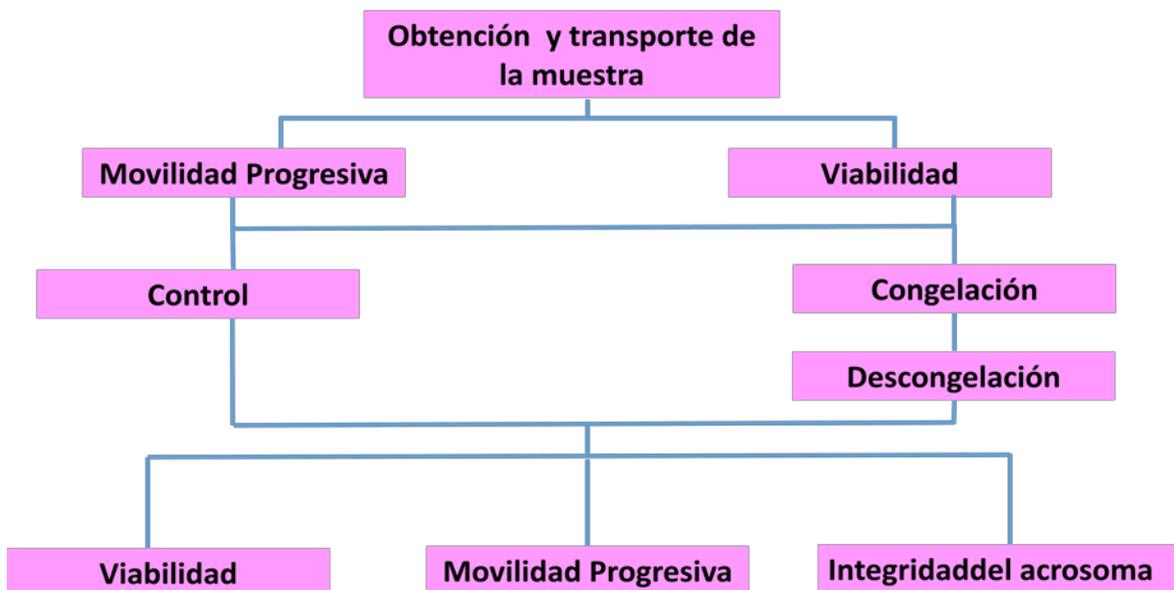
#### **V.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la congelación sobre la funcionalidad de los espermatozoides porcinos y ovinos.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar si la congelación altera funciones de los espermatozoides descongelados en su:
  - Viabilidad
  - Movilidad progresiva
  - Integridad acrosomal
- ❖ Determinar si existen diferencias entre especies.

## VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL



## **VIII. MÉTODOS**

### **8.1 Obtención y transporte de la muestra**

La muestra de semen se obtuvo de sementales porcinos y ovinos con una historia reproductiva conocida, y edad media de 2.5 años, provenientes de diferentes granjas en ambas especies. Para porcinos se obtuvieron de las granjas de Texcoco Edo. México, Tlahuac D.F y Puebla México. Para ovinos de las granjas de la Universidad de Chapingo, Edo. México y de la granja de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

El eyaculado de la especie porcina se obtuvo por el método de mano enguantada, retirando la porción gelatinosa por filtración, a través de una gasa. Para ovinos, con vagina artificial. Antes de agregar el diluyente, se determinó volumen y movilidad, con la finalidad de asegurar la calidad de la muestra. La muestra de semen se diluyó en una proporción 1:1 en un diluyente comercial (Megapor–Duragen. España) para el caso de la especie porcina. Para el caso de ovinos se utilizó un diluyente preparado en el laboratorio (Triladyl®, agua bidestilada y yema de huevo); la muestra es transportada al laboratorio a 16°C en menos de 1h después de la colecta (Conejo-Nava et al., 2003).

## **8.2 Selección espermática**

### **8.2.1 Movilidad.**

Para evaluar la movilidad en ambas muestras se depositaron 10  $\mu$ L de la suspensión espermática sobre un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos de 18x18 mm y se procedió a evaluar la movilidad progresiva dándole un porcentaje subjetivo de 0 a 100% (Berrios y Sánchez, 2011).

### **8.2.2 Viabilidad**

En un portaobjetos se colocaron 10  $\mu$ L de la suspensión espermática, mezclándola con 10  $\mu$ L de una solución de eosina-nigrosina al 5%. Se colocó un cubreobjetos de 18x18mm y se observó al microscopio óptico Zeiss. Se contaron al menos 100 espermatozoides. Considerando vivos aquellos que no se tiñeron.

Si los parámetros de viabilidad y movilidad eran mayores al 80% se procedió a la realización de las técnicas de criopreservación (Berrios y Sánchez, 2011).

## **8.3 Congelación**

### **8.3.1 Preparación del diluyente**

Para preparar el diluyente se colocaron 3mL de Triladyl® (200 mM Tris, 70.8 mM ácido cítrico, 55.5 mM de glucosa y glicerol a una concentración final del 5%), 9 mL de agua bidestilada y 3 mL de yema de huevo, el cual fue previamente lavado y desinfectado, el diluyente se colocó en el recipiente con la muestra a 16°C para el proceso de equilibrio (Fontecha, 2006).

### **8.3.2 Procesamiento del semen**

Tanto la muestra de semen de ovino como porcino se centrifugaron a 600g por 5 min para eliminar el plasma seminal (Salamon y Maxwell, 1979). Se agregaron 2 mL del diluyente equilibrado por cada mL del paquete celular, se realizaron las pruebas de viabilidad, movilidad progresiva, anomalías morfológicas y concentración de espermatozoides, para obtener el número de pajillas a congelar por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de pajillas} \times (\text{Vol}) (\text{M.P}) (\text{Viab}) (\text{Norm}) (\text{Conc})}{\text{Número de espermatozoides}}$$

Dónde:

Vol= Cantidad del paquete celular

M.P= Movilidad progresiva de la muestra

Viab= % de viabilidad de la muestra

Norm= % de espermatozoides sin anomalías morfológicas

Conc= Concentración de la muestra

La suspensión de los espermatozoides en el diluyente se colocó en un recipiente con agua a 16°C en un cuarto frío a temperatura de 5°C durante 3 h para disminuir la temperatura gradualmente y equilibrar la muestra. Posteriormente se rellenaron las pajillas con las muestras a 5°C y fueron selladas con una mezcla de agua y PVA para evitar la salida de la muestra, enseguida las pajillas fueron sometidas a vapores de nitrógeno líquido, durante 15 min, finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido hasta su uso (Petters y Wells, 1993).

## **8.4 Descongelación**

Las pajillas de 0.5 mL con los espermatozoides se descongelaron a 37 °C en baño de agua durante 45 seg, posteriormente se realizó un lavado con 3 mL de medio amortiguado y modificado Tris (mTBM) que contenía 13.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O, 20 mM Tris, 11 mM de glucosa y 5 mM piruvato de sodio, suplementado con 0.4% de BSA fracción V y 2.5 mM de cafeína (Petters y Wells, 1993).

## **8.5 Evaluación de la funcionalidad espermática.**

En el grupo experimental (muestras congeladas) y en el grupo control (muestras sin congelar) se evaluaron los parámetros de viabilidad, movilidad, RA.

Parámetros de movilidad y viabilidad previamente descritos.

### **8.5.1 Integridad del acrosoma.**

Para evaluar la RA, se utilizó la lectina aglutinina *Arachis hypogaea*, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC- PNA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Para

evaluar la viabilidad se utiliza ioduro de (IP) (Sigma). A 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión, con aprox.  $2 \times 10^6$  espermatozoides, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de FITC-PNA y 5  $\mu\text{L}$  de IP. Se incubaron durante 5 minutos a 37°C. En un portaobjetos se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución con los espermatozoides, se fijaron con 5  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído al 1% y se evaluaron 100 células a 40x en el microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss.

## **8.6 Análisis Estadístico**

Los resultados, entre la congelación de espermatozoides porcinos y ovinos en viabilidad, movilidad y RA, se analizaron mediante ANOVA de dos vías para comparar el efecto entre los tratamientos y cada una de sus variables. Cuando ANOVA mostró un efecto significativo, los tratamientos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ , con respecto al grupo control (Wayne, 2008). Se realizaron al menos tres ensayos por muestra.

## **IX.- RESULTADOS**

### **EFFECTO DE LOS PARÁMETROS INDEPENDIENTES EN LA VIABILIDAD, MOVILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL**

Para validar los resultados y determinar si otros parámetros independientes como: diferentes granjas de donde se obtuvieron las muestras, tiempo de eyaculado (tiempo desde la eyaculación hasta su llegada al laboratorio para ser procesado) y raza, afectaban directamente a los parámetros evaluados, se realizó un análisis de la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal, contra estos parámetros independientes. No se observó ninguna diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con ningún parámetro, en ambas especies.

NOTA: El tiempo de eyaculado únicamente se analizó en la especie porcina, ya que los espermatozoides de ovino fueron eyaculados y procesados el mismo día.

Los resultados obtenidos del control fresco para la especie porcina fueron los siguientes: la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal fueron superiores al 60% en los tres parámetros. Por otra parte el porcentaje de la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal inmediatamente después de la descongelación fue menor respecto al control fresco (Tabla 1), observándose una diferencia significativa en la

viabilidad (g.l= 1, 8; F=62.34; p<0.05), movilidad (g.l= 1, 8; F=90.13; p<0.05),e integridad acrosomal (g.l= 1, 8; F=23.23; p<0.05) con respecto al grupo control.

**TABLA 1.** VIABILIDAD, MOVILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS FRESCOS Y DESCONGELADOS.

<b>Tratamiento</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Movilidad (%)</b>	<b>Integridad acrosomal (%)</b>
<b>Control fresco</b>	80 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>
<b>Descongelación</b>	31 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>

La evaluación de la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal fueron realizadas con una N= 5 ensayos en muestras diferentes. Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos; P<0.05.

Los resultados obtenidos en el control fresco en ovinos fueron los siguientes: la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal fueron superiores al 55% en los tres parámetros; de la misma manera fueron evaluados inmediatamente después de la descongelación en donde el promedio de la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal fue inferior respecto a los espermatozoides en fresco (Tabla 2), observándose una diferencia significativa en la viabilidad (g.l= 1, 8; F=42.92; P<0.05),

movilidad (g.l= 1, 8; F=30.42; P<0.05) e integridad acrosomal (g.l= 1, 8; F=11.14; P<0.05), con respecto al grupo control.

**TABLA 2.** VIABILIDAD, MOVILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES OVINOS FRESCOS Y DESCONGELADOS

<b>Tratamiento</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Movilidad (%)</b>	<b>Integridad acrosomal (%)</b>
<b>Control fresco</b>	87 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>
<b>Descongelación</b>	54 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>

La evaluación de la viabilidad, movilidad e integridad acrosomal fueron realizadas con una N= 5 ensayos en muestras diferentes. Literales en la misma columna son estadísticamente significativas; P<0.05.

En el análisis realizado para determinar si existían diferencias entre especies se obtuvo lo siguiente: En el grupo control, se encontró que el promedio de viabilidad, en ambas especies fue similar (Tabla 3), (g.l= 1,8; F= 3.99; P>0.05). Por otra parte el promedio de la viabilidad inmediatamente después descongelación fue superior en ovinos, respecto a porcinos (Tabla 3), observándose diferencias significativas entre especies (g.l= 1,8; F= 9.51; P<0.05).

**TABLA 3.** VIABILIDAD EN ESPERMATOZOIDES OVINOS Y PORCINOS ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACIÓN.

Tratamiento	Viabilidad (%)	
	Control fresco	Descongelación
Porcinos	80 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>
Ovinos	87 <sup>a</sup>	54 <sup>b</sup>

La evaluación de la viabilidad fue realizada con una N= 5 ensayos en muestras diferentes en ambas especies. Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos; P<0.05.

La movilidad de los espermatozoides entre las dos especies antes de proceder a la congelación (control fresco) fue superior en los ovinos, respecto a los porcinos (Tabla 4), con una diferencia significativa entre grupos (g.l= 1,8; F= 10.53; p<0.05). Inmediatamente después de la descongelación el promedio de la movilidad nuevamente fue superior en ovinos, respecto a los porcinos (Tabla 4), observándose una diferencia significativa entre grupos (g.l=1,8; F= 9.54; p<0.05).

**TABLA 4. MOVILIDAD EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y OVINOS ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACIÓN**

<b>Tratamiento</b>	<b>Movilidad (%)</b>	
	<b>Control fresco</b>	<b>Descongelación</b>
<b>Porcinos</b>	79 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
<b>Ovinos</b>	89 <sup>b</sup>	52 <sup>b</sup>

La evaluación de la movilidad fue realizada con una N= 5 ensayos en muestras diferentes en ambas especies. Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos; P<0.05.

De la misma manera se realizó la comparación entre especies en el parámetro de integridad acrosomal justo antes de proceder a la congelación (control fresco). El promedio en porcinos fue ligeramente superior a los espermatozoides con acrosoma integro en ovinos (Tabla 5). Por otra parte, inmediatamente después de la descongelación, el promedio de la integridad acrosomal en espermatozoides porcinos fue similar a la de los espermatozoides de ovino (Tabla 5), donde no se observaron diferencias significativas en frescos (g.l= 1,8;F= 3.23; P>0.05) y congelados (g.l= 1,8; F= 0.26; P>0.05) entre especies.

**TABLA 5. INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y OVINOS**

<b>Tratamiento</b>	<b>Integridad acrosomal (%)</b>	
	<b>Control fresco</b>	<b>Descongelación</b>
<b>Porcinos</b>	68 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>
<b>Ovinos</b>	56 <sup>b</sup>	36 <sup>a</sup>

La evaluación de la integridad acrosomal fue realizada con una N= 5 ensayos en muestras diferentes en ambas especies. Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos P<0.05.

## **X.- DISCUSIÓN**

La congelación es un método que se emplea para la criopreservación de tejidos y células tanto somáticas como germinales. La importancia de congelar gametos, principalmente espermatozoides es su uso en las técnicas de reproducción asistida humana y de otros animales. Esta metodología requiere del uso de crioprotectores añadidos a los medios de congelación y una tasa de enfriamiento programada en la cual la temperatura disminuye gradualmente para reducir el estrés térmico y evitar el daño celular (Gualtieri et al., 2014). Debido a sus características químicas, los crioprotectores son sustancias altamente tóxicas por lo cual es importante utilizarlos

a bajas concentraciones, junto con un adecuado manejo de la temperatura para garantizar la supervivencia espermática.

Recientemente diversos estudios se han realizado para mejorar los procedimientos de congelación con el objetivo de incrementar las tasas de movilidad y viabilidad con la finalidad de obtener espermatozoides que sean capaces de fecundar al ovocito in vitro (Elkhawagah et al., 2015; Funahashi, 2015). Sin embargo pocos estudios han evaluado después de la congelación otro tipo de parámetros que son fundamentales para que ocurra el proceso de fecundación como es la capacitación y la RA, ya que si estos procesos ocurren durante el proceso de congelación, el espermatozoide tendrá una menor capacidad de fecundar. En la actualidad se sabe que la congelación genera un incremento de EROs, debido al consumo de oxígeno de los mismos espermatozoides durante el almacenamiento, el cual se encuentra bajo condiciones aeróbicas. Las EROs atacan libremente ácidos grasos poliinsaturados de la membrana de los espermatozoides de mamíferos, causando peroxidación lipídica, con posterior fracaso de la fecundación (Agarwal et al., 2003); de igual manera se sabe que durante los procesos de capacitación y RA se requiere de un aumento de EROs para que se lleven a cabo, por lo cual, la congelación y descongelación pueden generar que estos procesos se realicen de manera prematura, además de causar daños en estructuras como el acrosoma, llevando a una reducción de la fecundación e incluso a la muerte del espermatozoide.

Otros de los principales daños que se producen por EROs que se conocen en la actualidad son: disminución de la movilidad de los espermatozoides, aumento de

disrupción de la membrana, deterioro del ADN y la función mitocondrial (Chatterjee y Gagnon 2001). Además del daño causado por EROs los espermatozoides son extremadamente susceptibles a las tensiones mecánicas que intervienen en el proceso de la crioconservación, como los producidos por el manejo de la pipeta, (Mazur et al., 1998) la dilución, y centrifugación (Schreuders et al., 1996). Estos son de los principales daños que se generan durante la congelación, además de los causados por los cristales de hielo que se generan durante el proceso, que puede lesionar estructuras en el espermatozoide, por lo cual es de gran importancia establecer una tasa de enfriamiento y descongelación óptima para reducir la formación de estos cristales, además de un buen manejo de la muestra antes y después de la congelación para reducir EROs que puedan provocar una capacitación y RA espontaneas. Por tal motivo en este trabajo se evaluó el estado del acrosoma posterior a la congelación para determinar el daño que sufre esta estructura durante el proceso, lo cual podría indicar de manera indirecta la capacidad del espermatozoide para poder fecundar al ovocito, ya que esta estructura libera enzimas que son necesarias para la penetración de la ZP. Por otra parte se evaluaron la viabilidad y movilidad posterior al proceso de congelación, estos parámetros son de suma importancia debido a que pueden existir espermatozoides viables, sin embargo que no tienen la capacidad de la movilidad y como se sabe esta es necesaria para que pueda penetrar las capas que envuelven al ovocito, por lo tanto es otro parámetro esencial para evaluar la capacidad fertilizante del espermatozoide.

## EFFECTO DE LOS PARÁMETROS INDEPENDIENTES EN LA VIABILIDAD, MOVILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL

Antes de evaluar los parámetros de movilidad, viabilidad e integridad acrosomal, se evaluaron diferentes variables como las granjas donde se obtuvieron las muestras, tiempo de eyaculado y raza las cuales no se podían controlar, y podrían afectar directamente los resultados. Esta validación se realizó esta validación, debido a que entre las granjas se pueden producir eyaculados de diferente calidad del eyaculado, esto puede deberse principalmente al manejo de los animales, la alimentación y periodo de abstinencia. De la misma manera se ha observado que entre razas existe variabilidad en la calidad espermática, incluso de individuo a individuo (Hofmo y Grevle, 1999), pero debido a la disponibilidad de la muestra en las diferentes granjas y sementales se adaptaron los estudios a estas condiciones. Aun así se observó que estas condiciones no afectaron directamente las variables evaluadas en ninguna de las dos especies. Por lo tanto se prosiguió a realizar las evaluaciones correspondientes.

### VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS

La viabilidad en el grupo control fue del 80%, y después de la congelación fue del 31%. Los resultados indican que la congelación disminuye la viabilidad de los

espermatozoides porcinos. En un trabajo desarrollado por Flores et al., (2009) se reportan tasas de viabilidad utilizando como diluyente yema de huevo más lactosa, de 48.8%. Otro estudio reportado por Gutiérrez et al., (2009) en el que se utilizan diferentes diluyentes suplementados con glicerol, la tasa más alta de viabilidad obtenida fue de 42.25% en el diluyente que contenía yema de huevo, trehalosa y glicerol. Lo anterior indica que las tasas de viabilidad en la misma especie reportadas en la literatura se encuentran inferiores al 50% siendo similares a los resultados obtenidos. En este trabajo, los resultados son similares a los reportados previamente con el uso de diversos crioprotectores, sin embargo el glicerol es un crioprotector utilizado por otros autores en común con este trabajo. Esto sugiere que el manejo de la muestra, la temperatura óptima de enfriamiento, y la descongelación fueron adecuadas en este trabajo sin embargo la disminución de la viabilidad pudo deberse principalmente al daño causado por EROs, por cristales de hielo que puedan comprometer la integridad de la membrana plasmática y otras estructuras presentes en el espermatozoide, transporte de la muestra, dilución y centrifugación de la misma.

## MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDEOS PORCINOS

Con respecto a los resultados de movilidad en espermatozoides porcinos, en el grupo control se obtuvo 79%. Este porcentaje coincide con los resultados de otros

estudios cuyos datos varían entre 85% (Silva et al., 2015), 82% (Rukmali et al., 2015) y 80.93% (Barranco et al., 2013). En cuanto a la movilidad de los espermatozoides después de la congelación, el porcentaje disminuyó a un 27%. Estos resultados son similares a los reportados por Silva et al., (2015) que van desde un 19.44 a un 38.88% utilizando diferentes tipos de crioprotectores. Otro estudio reporta una tasa de movilidad en espermatozoides porcinos después de la congelación de 18.5%, (Flores et al., 2009). En este trabajo a pesar de la disminución de la movilidad después de la congelación, respecto al grupo control, los resultados obtenidos son superiores a lo reportado.

La disminución de la movilidad de espermatozoides porcinos después de la congelación puede deberse principalmente al aumento en la captación de calcio durante el choque frío (Robertson y Watson 1986), ya que este ion participa en la regulación de varias funciones espermáticas. En este sentido, altas concentraciones intracelulares de calcio, disminuyen la movilidad y el metabolismo celular, además de causar una prematura capacitación e inducir a una RA espontánea, efectos que pueden disminuir si se establece una tasa de enfriamiento óptima.

## INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDEOS PORCINOS

Para evaluar la integridad acrosomal, se cuantificaron aquellos espermatozoides con un acrosoma íntegro. Los resultados de integridad acrosomal en el grupo control en

porcinos fueron de 68%. Estos porcentajes son ligeramente inferiores a los reportados por Silva et al., (2015) de 78%, esta disminución en el grupo control pudo deberse principalmente al manejo de la muestra, en el momento de la eyaculación, a alguna afección en el semental como enfermedades, alimentación, frecuencia de la obtención de los eyaculados, incluso hasta en la eliminación del plasma celular y al intercambio por el diluyente comercial, ya que el plasma seminal existen diversas proteínas y factores descapacitantes que protegen al espermatozoide y lo hacen menos susceptibles a cambios externos (Arenas et al; 2010). Estos factores provocan cambios bioquímicos y fisiológicos negativos durante el almacenamiento del espermatozoide que puede generar la producción de EROs inducida por la degradación de alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas de los espermatozoides (Hong et al., 2010; Lamirande et al., 1997; Maxwell y Salamon, 1993; Vishwanath y Shannon, 2000). Las EROs pueden atacar una variedad de macromoléculas biológicas tales como proteínas y lípidos, causando daño oxidativo (Kelly et al., 1998), afectar la integridad acrosomal y producir la fragmentación del ADN (Gosalvez et al., 2007). Las EROs comprenden una serie de compuestos químicos altamente reactivos, que tienen un electrón desapareado lo que los hace muy inestables. Entre ellos se destacan el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical peróxido (ROO), anión hidroxilo ( $OH^-$ ) y una especie no radical, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) entre otros. El incremento de EROs ha sido asociado a una disminución de la función espermática, especialmente a la pérdida de la fluidez de membrana, inducción de la RA, la cual disminuye la capacidad de fusión al ovocito,

asimismo, el incremento de la fragmentación del ADN que conlleva a fallas en el desarrollo embrionario (Agarwal et al., 2003).

Por otro lado los factores antes mencionados pudieron afectar a estructuras importantes en el espermatozoide, como el acrosoma, o inducir la RA espontánea, por lo cual se observó una disminución en la integridad del acrosoma en el grupo control respecto a lo reportado en la literatura. En cuanto al resultado obtenido de integridad acrosomal en espermatozoides después de la congelación fue de 38%, lo cual coincide con lo reportado por Silva et al., (2015) en la misma especie con un porcentaje de 37.27%. A pesar de que la integridad acrosomal disminuyó respecto al grupo control, los resultados obtenidos en este trabajo, respecto a este parámetro, tal vez serían suficientes para llevar a cabo la FIV, según lo reportado por Gadea et al., (1998), el 10% de espermatozoides con viabilidad, membrana íntegra y acrosoma íntegro son suficientes para obtener resultados satisfactorios en la FIV.

## VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDEOS OVINOS

En este trabajo los resultados de la viabilidad obtenidos en los espermatozoides frescos (grupo control) fue del 87% lo cual coincide con lo reportado por Allai et al., (2015) con 90% de viabilidad. Lo cual muestra una buena calidad espermática. En cuanto al porcentaje de la viabilidad después de la congelación de los espermatozoides fue de 54%, el cual disminuyó respecto al grupo control, esta

disminución pudo deberse a la generación de EROs que resultan del proceso de criopreservación (Aitken, 1995) y a la reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes en el semen, después de un ciclo de congelación (Bucak et al., 2008; Martí et al., 2008), lo cual puede contribuir al daño bioquímico y funcional en los espermatozoides criopreservados. Por lo tanto, los componentes los diluyentes utilizados para congelar espermatozoides son muy importantes para proteger al espermatozoide contra criolesión. A pesar de esta disminución en la viabilidad, estos resultados son superiores a los reportados por Marciane et al., (2010) con 30% de viabilidad, en los que se utilizaron antioxidantes para la congelación.

## MOVILIDAD DE ESPERMATOZOIDES OVINOS

En los resultados obtenidos en la movilidad de espermatozoides se obtuvo 89%, lo cual es similar con lo reportado por Murawski et al., (2015) con una tasa de 87.1% en muestras recién obtenidas. En cuanto al porcentaje obtenido en este trabajo de la movilidad de los espermatozoides después de la congelación fue de 52%. Estos resultados fueron superiores a los reportados por Murawski et al., (2015) con 30.8%. Lo anterior sugiere que el manejo de la muestra, la velocidad de enfriamiento, el procedimiento de congelación y la descongelación fueron adecuadas, sin embargo esta disminución en la viabilidad puede deberse principalmente al efecto de EROs causado directamente sobre las mitocondrias, las cuales son estructuras presentes

en la pieza media del espermatozoide, encargadas de la producción de ATP (Madeiros et al., 2002), el cual se consume en gran medida para la movilidad del espermatozoide, por tal motivo al ser afectadas estas estructuras, la movilidad espermática disminuye.

## INTEGRIDAD ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES OVINOS

En la integridad acrosomal, en espermatozoides frescos se obtuvo 56 % el cual es similar (60.9%) a lo reportado en otro estudio en la misma especie (Del Valle et al., 2013). En cuanto a la integridad acrosomal en los espermatozoides después de la congelación fue de 36%, donde se observa una diferencia significativa con el grupo control; a pesar de la disminución en el porcentaje de la integridad acrosomal después de la congelación, los resultados obtenidos por Del Valle et al., (2013) con 27% son inferiores a los obtenidos en este trabajo, lo cual indicaría que el procedimiento realizado para esta especie en este trabajo fue el adecuado. Esta disminución podría afectar al porcentaje de FIV ya que a diferencia de la especie porcina en donde las células de la granulosa son removidas para facilitar la penetración del espermatozoide, en ovinos no se remueven estas células, por lo cual si el acrosoma está dañado puede afectar aún más la penetración del ovocito en esta especie, debido a que el acrosoma es una estructura que facilita la penetración de las capas del ovocito. Sin embargo el porcentaje obtenido en este trabajo en la

integridad acrosomal es podría ser suficiente para llevar a cabo la FIV, para ello se requieren más estudios para realizar pruebas de FIV.

## DIFERENCIAS EN LA CONGELACIÓN ENTRE ESPERMATOZOIDES OVINOS Y PORCINOS

En cuanto a los resultados de viabilidad en los espermatozoide frescos de porcinos y ovinos, no se observaron diferencias significativas entre las dos especies sin embargo, el porcentaje obtenido en la viabilidad después de la congelación se obtuvo un mayor porcentaje en los espermatozoides de ovino en donde se observaron diferencias significativas entre las especies, por lo cual se puede observar que el espermatozoide de los ovinos son más resistentes al proceso de congelación.

En la movilidad espermática entre las dos especies se observó un mayor porcentaje en el ovino, esto puede deberse principalmente a la variación que existía entre el tiempo de eyaculado entre las dos especies, debido a que en los porcinos, la disponibilidad de muestra era difícil de obtener, por lo cual se procesaron muestras hasta dos días después de eyaculado, mientras que las muestras de ovino eran obtenidas y procesadas el mismo día, por lo tanto esto pudo afectar directamente el porcentaje obtenido en los porcinos. Otro factor que pudo alterar directamente los resultados obtenidos en este trabajo es que la muestra porcina era obtenida en granjas comerciales por lo cual la muestra era diluida con diluyentes comerciales, y

transportada al laboratorio en el mismo diluyente, por lo que tenía que realizarse un lavado por centrifugación, para eliminar el diluyente y agregar el que sería utilizado para el proceso de congelación, a diferencia de la muestra de ovino, la cual era obtenida y diluida con el diluyente que sería utilizado para la congelación; por lo tanto esta centrifugación puede generar daños a estructuras como la membrana plasmática y flagelo del espermatozoide, el cual confiere la capacidad de movimiento además de que esta centrifugación puede estar generando EROs que afecten directamente la pieza media y mitocondrias del espermatozoide, reduciendo así el porcentaje de movilidad en esta especie.

En cuanto a los resultados obtenidos en la integridad acrosomal de espermatozoides de ovino y porcino en el grupo control se pudieron observar diferencias significativas entre especies, presentando los porcinos el mayor porcentaje de integridad acrosomal, en comparación con los ovinos, lo cual puede deberse principalmente a la variación que existía entre los sementales de esta especie, siendo unos porcentajes más altos y otros más bajos en los diferentes ensayos realizados en esta especie, incluso se pudieron observar diferencias en sementales de la misma raza y entre muestras del mismo semental. Esta diferencia en la variación de esta especie puede deberse principalmente al manejo de las muestras y del semental, la estacionalidad y la secreción de melatonina, ya que ésta desempeña un papel central en de ajuste ritmos circadianos y los cambios estacionales a través de su aumento nocturno en la sangre (fotoperiodo) (Malpaux et al., 1996). Este fotoperiodo marca cambios en los ciclos reproductivos, por medio de señales temporales al sistema reproductivo, que

son controladas por el ritmo diario de la producción de la melatonina (Malpaux et al., 1996). Esta estacionalidad es menos marcada en machos que en hembras, sin embargo sus efectos pueden alterar perfiles hormonales, el comportamiento sexual, capacidad antioxidante y la calidad del semen (Avdi et al., 2004). Por otra parte también se evaluaron las diferencias entre especies en el parámetro de integridad acrosomal en espermatozoides después de la congelación en donde se observaron diferencias significativas entre especies, siendo la porcina la que mantiene un mayor porcentaje de integridad acrosomal, en comparación con la ovina.

Por lo tanto es importante resaltar que en los parámetros de viabilidad y movilidad evaluados en este trabajo, los espermatozoides de ovino fueron los más resistentes respecto a los porcinos después de la congelación. En cuanto a la integridad acrosomal, la especie porcina fue superior a la ovina, posterior a la congelación, sin embargo esto puede deberse principalmente a los bajos porcentajes de integridad acrosomal en el grupo control en esta especie, en comparación con la porcina; también es importante mencionar que el porcentaje de daño al acrosoma después de la congelación en la especie ovina fue menor en comparación con la porcina, respecto a sus grupos controles, por lo que la especie porcina sufrió más daño durante el proceso de congelación. Por lo tanto puede decirse que la especie ovina es más resistente al proceso de congelación, esto puede deberse principalmente a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que posee la membrana plasmática del espermatozoide porcino (Parks y Lynch, 1992), lo cual los hace menos tolerantes al daño por frío, principalmente debido a la generación de EROs durante el proceso

de congelación, los cuales atacan directamente a estos ácidos grasos poliinsaturados, generando una reacción en cadena y a su vez un daño por lipoperoxidación.

## **XI.- CONCLUSIONES**

- ❖ El manejo de la muestra antes de la congelación fue satisfactorio, lo cual permitió obtener porcentajes de viabilidad y movilidad e integridad acrosomal de buena calidad, lo cual permitió que la muestra fuera adecuada para la congelación de espermatozoides.
- ❖ El procedimiento empleado de congelación en este trabajo fue el adecuado, el cual permitió obtener un porcentaje de espermatozoides funcionales para poder ser utilizados en procedimientos de FIV.
- ❖ La tasa de enfriamiento, el equilibrio de la muestra, la concentración del crioprotector y la tasa de descongelación fueron adecuados para obtener resultados satisfactorios en los tres parámetros evaluados.
- ❖ El proceso de congelación disminuye la funcionalidad de los espermatozoides.
- ❖ Existen diferencias significativas entre especies, siendo la especie ovina la más resistente al proceso de congelación en cuanto a la viabilidad y movilidad, mientras que la integridad acrosomal se mantuvo similar.

- ❖ Es necesario realizar futuros estudios para estandarizar un procedimiento de congelación en base a las características específicas presentes en el espermatozoide de cada especie.
- 

## **XII.- BIBLIOGRAFÍA**

- Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Rodríguez-Martínez H, Sato E. 2005. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biology of Reproduction*. 72: 1416-1420.
- Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79: 829–843.
- Aisen E, Medina V, Venturino A. 2002. Cryopreservation and postthawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 57: 1801-1808.
- Aitken R. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction Fertility and Development*. 7: 659–668.
- Allai L, Druart X, Contell J, Louanjli N, Badi A, Essamadi A, Nasser B, Amiri A. 2015. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal Reproduction Science*. 160: 57-67.
- Alvarenga M, Landim-Alvarenga F, Moreira R, Cesarino M. 2000. Acrossosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal* 32: 541-545.

- Anchordoguy T, Rudolph A, Carpenter J, Crowe J. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology*. 24: 324-331.
- Arenas R, Ruiz C, Ambríz G, Zúñiga R, Rodríguez T, Rosado G. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos*. 78: 5-11.
- Arenas R, León G, Rosado G. 2012. Espermatogénesis, maduración y almacenamiento epididimario de espermatozoides en mamíferos en *Avances en biología de la reproducción*. Universidad Autónoma Metropolitana. Pp. 13-45.
- Arruda R, Celenghini C, Andrade A, García A, Nascimento J, Raphael C, Souza L. 2000. Importância da qualidade do semen em programas de IATF e TETF. *Simpósio internacional de reprodução animal aplicada*. 1º Laboratorio de biotecnología do semen e andrología. Centro de biotecnología em reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. Pp.166-179.
- Avdi M, Banos G, Stefos K, Chemineau P. 2004. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Seres rams. *Theriogenology*. 62: 275–282.
- Ávila L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero M. 2006. Fundamentos de Crioconservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57: 291-300.
- Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Lozano J, Reguero M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57: 291-300.
- Bailey J, Bilodeau J, Cormier N. 2000. Semen criopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21: 1-7.
- Bajo J. 2009. *Fundamentos de reproducción*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pp. 269-280.

- Baracaldo M, Barth A, Bertrand W. 2007. Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. International Veterinary Information Service, Ithaca NY. Pp. 365.
- Barranco I, Ortega M, Martínez-Alborcia M, Vázquez J, Martínez E, Roca J. 2013. Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. *Cryobiology*. 67: 299-304.
- Bedford J, Calvin H, Cooper G. 1973. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement.18: 199-213.
- Berrios O, Sánchez R. 2011. Ultra Rapid Freezing in Human Spermatozoa: Effect on Sperm Function and Reactive Oxygen Species Production. *International Journal of Morphology*. 29: 899-906.
- Betancourt M, Fierro R, Ambriz D. 1993. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 40: 1155-1160.
- Boerke A, Brouwers J, Olkkonen M, Van L, Chris H, Sostaric E, Schoevers J, Helms B, Gadella M. 2013. Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. *Biology of Reproduction*. 88: 1–18.
- Bonilla F, Douz M, Moreno J, Raga F. 2009. Reproducción Asistida: abordaje en la práctica. Editorial medica panamericana. Buenos Aires, Madrid. Pp. 337.
- Briz M, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Campus R. 1995. Comparative study of boar sperm coming from caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of Andrology*. 16: 175-188.
- Bucak M, Atessahin A, Varisli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A. 2008. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 67: 1060–1067.

- Cavestany D. 1994. Procesamiento y Congelación de Semen de Toro. Montevideo. Santa Catalina. Pp. 23.
- Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction Development*. 59: 451–458.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. 2006. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmolytic supports. *Theriogenology*. 65: 1875-1890.
- Chávez S, Chávez D, Montoya G, Vergara Z. 2008. El efecto del medio M-199 y Sperm-talp sobre la capacitación espermática y fertilización de ovocitos de bovino madurados in vitro. *Revista Internacional de Andrología*. 12: 456-464.
- Colas G, Brice G. 1970. Fertilité des brebis traitées avec de l'acétate de fluorogestone et inséminées artificiellement avec du sperme congelé: résultats préliminaires. *Archivos de Zootecnia*. 19: 353-357.
- Conejo N. 2003. Estado funcional de la membrana, capacitación in vitro, reacción acrosomal y capacidad de fertilización in vitro de espermatozoides porcinos almacenados en un diluyente de larga duración. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez C, Betancourt M. 2003. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Archives of Andrology* 49: 287-295.
- Cooper T, Yeung C. 2006. Sper maturation in the human epididymis. En: De Jonge y Barrat, ed. *The sperm cell, production, fertilization, regeneration*, primera edición. Cambridge University press. EUA. Pp. 72-107.
- Cooter P, Goolsby H, Priend S. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 40: 98-99.

- Corti R. 2006. Criopreservación...¿y después? Soluciones acuosas sobreenfriadas y vitrificadas. *Revista Ciencia Hoy*. 15: 26-39.
- Córdova A, Ducolomb Y, Jiménez I, Casas E, Bonilla E, Betancourt M. 1997. Fertility results using boar freezing semen. *Theriogenology*. 47: 1309- 1317.
- Córdova A, Peláez J, Domínguez J, Peña F, Alegre B. 1999. Posibilidades Futuras del Uso de Semen Congelado. *Visión Técnica*. 3: 12-14.
- Córdova A Pérez J, Martín R. 2000. Temperatura de descongelación del semen de verraco capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides congelados en pajillas de 5 ml. *Visión Técnica*. 5: 32-35.
- Crowe J, Crowe L, Carpenter J, Aurellwistrom C. 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal*. 242: 1-10.
- De Leeuw F, De Leeuw A, Den Daas J, Colenbrander B, Verkleij A. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30: 32-44.
- Del Río M, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés M, Moreno R, Vigil P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances Recientes. *Revista internacional de andrología*. 5: 368-367.
- Del Valle I, Souter A, Maxwell W, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*. 138: 213-219.
- EcheGARAY A. 2003. ¿Para cuándo el semen de porcino congelado?. *Venezuela Porcina*. 48: 3-5.
- Elkhawagah A, Longobardi V, Neglia G, Salzano A, Zullo G, Sosa G, Campanile G, Gasparri B. 2015. Effect of Relaxin on Fertility Parameters of Frozen-Thawed Buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 50: 756-762.
- Evans G, Maxwell W. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. *Biology of Reproduction*. 42: 123-137.

- Evans G, Maxwell W. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia. Zaragoza. Pp. 139.
- Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*. 45: 432-437.
- Eynard A, Valentich M, Rovasio R. 2008. *Histología y embriología del ser humano: Bases celulares y moleculares*. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 134-139.
- Flores E, Fernández-Novell J, Peña A, Rodríguez-Gil J. 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 72: 784-797.
- Fontecha E. 2006. Estandarización de un protocolo para la criopreservación de semen porcino con congelador programable (CI-8800), Trabajo de grado (Médico Veterinario Zootecnista), Universidad de los Llanos. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villavicencio, Colombia. Pp 42.
- Freitas-Dell' Aqua C, Crespilho A, Papa F, Dell'Aqua J. 2009. Metodología de avaliação laboratorial do semen congelado bovino. *Reproduction Animal*, Belo Horizonte. 33: 213-222.
- Freshney R. 1987. *Culture of animal cells. A manual of basic techniques*. 2a. Alan R. Liss. New York, USA. Pp. 69-75.
- Funahashi H. 2015. Methods for Improving In Vitro and In Vivo Boar Sperm Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 50: 40-47.
- Gadea J, Matas C, Lucas X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP assay. *Animal Reproduction Science* 56: 95-108.

- Gadea J, Ruiz S, Coy P, Poto A, Peinado B, Romar R, Campos I, Zubillaga O. 1998. In vitro fertilization with frozen boar semen. *Archivos de Zootecnia* 47: 299-304.
- Galina C, Valencia J. 2009. *Reproducción de Animales Domésticos*. Limusa S.A. México. Pp. 345.
- Gatti J, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux J. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*. 83: 321-339.
- Gilbert S. 2005. *Biología del desarrollo*. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 859.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International. 45: 156-174.
- Gosalvez J, Fernandez J, Gosalbez A, Arrollo F, Agarwal A, Lopez-Fernandez C. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertility and Sterility*. 88: 365- 368.
- Grasa P, Cebrián- Pérez J, Muiño-Blanco T. 2006. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. *Reproduction* 132: 721-732.
- Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino R, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R. 2014. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development, *Theriogenology*, 82: 587-592.
- Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda M, Uribe C, Trujillo O. 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*. 58: 287-292.
- Hafez E, Hafez B. 2004. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-Hill Inteamericana. Mexico. Pp .322.
- Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm – what ask them to survive. *Journal Andrology*. 11: 73–88.

- Hess R, De Franca L. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. En: Molecular mechanism in spermatogenesis. Bioscience/Springer Science. Pp. 1-15.
- Hinton B, Pryor J, Hirsch A, Setchell B. 1981. The concentration of some inorganic ions and organic compounds in the luminal fluid of the human ducts deferents. *International Journal Andrology*. 4: 457-461.
- Hofmo P, Grevle I. 1999. Development and commercial use of frozen boar semen in Norway. In *Boar Semen Preservation III*, Ed. La Johnson & HD Guthrie. Larwence, USA. Pp 71–77.
- Holt W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58.
- Hong L, Hailing M, Hui Z, Guijie Y, Leyan Y. 2010. Effect of vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. *Animal Reproduction Science*. 117: 90–94.
- Hotamisligil S, Toner M, Powers D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biology of Reproduction* 55: 161-168.
- Illera M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. AEDOS. Madrid. Pp. 345.
- Isachenko V, Alabart L, Dattena M, Nawroth F, Cappai P, Isachenko E, Cocero J, Olivera J, Roche A, Accardo C, Krivokharchenko A, Folch J. 2005. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, 59: 109-118.
- Januskauskas A, Zilinskas H. 2002 Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bulls fertility. *Veterinarijair Zootechnika* 39:1-8.
- Jiménez G, Merchant L. 2003. *Biología celular y molecular*. Ed. Pearson Educación. México. Pp. 902.

- Kelly A, Havrilla C, Brady T, Abramo K, Levin E. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*. 106: 375–384.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 300-308.
- Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3: 175–194.
- Larsen W. 2002. *Embriología humana Paso a paso* (3, ilustrada edición). Ed. Elsevier, España. Pp. 39 – 75.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 113-141.
- Malpaux B, Viguie C, Skinner D, Thiery A, Pelletier J, Chemineau P. 1996. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*. 42: 109–117.
- Marciane da Silva M, Sony D, Sicherle C, Rodello L, Gallego I. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 122: 118–123.
- Marina S, Marina F, Torres P, Fosas N, Martin P, Alcolea R, Pérez N, Fernández S, Arrendó N, Jové I, Hochman M, Suñol J. 2002. Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 19: 59-68.
- Martí E, Martí J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *Journal Andrology*. 29: 459–467.

- Mathur O, Mathur, C. 1989. Feeding of protected protein and urea supplementation for enhanced growth and feed utilization in Magra lambs. *Indian Journal of Animal Nutrition*. 6: 274-278
- Maxwell W, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility and Development*. 5: 613–638.
- Mayren F, Vergara M, Juárez M, Toledano Á, Rosales A, Ávalos A. 2012. Participación de enzimas translocasas en la reacción acrosomal del espermatozoide del conejo. *Revista electrónica de Veterinaria*. 13: 1-11.
- Mazon, E. 2011. Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos. Universidad Federal de Goiás. Brazil. Pp.122.
- Mazur P, Katkov I, Schreuders P, Critser J. 1998. Influence of mechanical sensitivity, glycerol concentration, and oxygen concentration on the cryopreservation of mouse sperm: background. *Cryobiology*. 37: 414–415.
- Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology*. 57: 327–344.
- Medrano A, Holt W. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Archivos de Zootecnia*. 47: 319-327.
- Moore K, Persaud T, Mark G. 2008. *Embriología Clínica* 8va ed. Elsevier Saunders. Barcelona, España. Pp. 522.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton N. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*. 57: 1695- 1706.
- Murawski M, Schwarz T, Grygier J, Patkowski K, Oszczęda Z, Jelkin I, Kosiek A, Gruszecki T, Szymanowska A, Skrzypek T, Zieba D, Bartlewski P. 2015. The utility of nanowater for ram semen cryopreservation. *Experimental biology and medical*. 240: 611- 617.
- Myles D, Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction*. 56: 320-327.

- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19: 34-39.
- Palma G. 2001. *Biología de la Reproducción*. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Argentina. Pp. 660.
- Parks, E, Graham J. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Parks J, Lynch D. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29: 255–266.
- Petters M, Wells D. 1993. Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48: 61-73.
- Polge C, Smith A, Parkes A. 1949. Revival the spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*. 164-166.
- Robertson L, Watson P. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *Journal Reproduction Fertility*. 77: 177-185.
- Rodríguez-Martínez H. 2006. Can we increase the estimative value of semen assessment?. *Animal Reproduction Domestic*. 41: 2-10.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña F. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 70: 1242-1250.
- Rojas C, Palomo J, Albarracín L, Mogas T. 2004. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: Study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiology*. 49: 211-220.
- Rukmali A, Sumireloki P, Hiroaki F. 2015. Rapid thawing and stabilizing procedure improve postthaw survival and in vitro penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a glycerol-free trehalose-based extender. *Theriogenology*. 84: 940-947.
- Sadler T. 2007. *embriología médica: con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana. Pp. 386.

- Salamon S, Maxwell W. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science*. 2: 373-385.
- Salamon S, Maxwell W. 1995. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 38: 1-36.
- Salamon S, Visser D. 1972. Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal of Biological Sciences*. 25: 605-618.
- Sánchez R, Cartagena P, Berland O. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 17: 1-7.
- Sandoval R, Santiani A, Ruiz L, Leyva V, Coronado L, Delgado A. 2007. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 18: 107-114.
- Schreuders P, Jetton A, Baker J, Critser J, Mazur P. 1996. Mechanical and chill sensitivity of mouse sperm. *Cryobiology*. 33: 676-677.
- Sigma. 2006-2007. Bioquímica, reactivos y kits. Para la investigación en Ciencias de la Vida. México. Pp. 867-868.
- Silva C, Cunha E, Blume G, Malaquias J, Bão S, Martins C. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*. 70: 90-94.
- Somfai T, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Ozawa M, Kashiwazaki N, Egerszegi I, Ratky J, Nagai T, Kikuchi K. 2010. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 73:147-156.

- Stornelli M, Tittarelli C, Savignone C, Stornelli M. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Revista Analecta Veterinaria* 25: 28-35.
- Urbina M, Lerner B. 2008. Fertilidad y reproducción asistida. Ed. Médica Panamericana. Caracas, Venezuela. Pp. 596.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of the domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 60: 357-364.
- Valdés V, Pérez N, García R, López G. 2010. Embriología Humana. Ed. Ciencias Médicas. La Habana. Pp. 288.
- Viser D, Salamon S. 1974. Fertility following inseminations with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Australian Journal of Biological Sciences*. 27: 423-425.
- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62: 23–53.
- Watson P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 7: 871-891.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60: 481-492.
- Wayne D. 2008. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. 4ª. LIMUSA, México: Pp. 588-599.
- Wilhelm K, Graham J, Squires E. 1996. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. *Cryobiology*. 33: 320-329.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD, editors. New York: Raven Press. Pp. 189-317.

- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology 54: 579-585.

## **ANEXOS**

### **Tinción Eosina- Nigrosina**

Dado que los espermatozoides inmóviles pueden estar vivos, solo una coloración supravital de eosina nigrosina puede establecer esa diferencia.

### **Coloración supravital**

Los espermatozoides muertos o en proceso de muerte, poseen sus membranas permeables a los colorantes. Por tal razón se emplea esta propiedad para la determinación de los espermatozoides vivos.

### **Coloración con eosina/nigrosina:**

#### Preparación de la solución colorante

##### Solución de eosina al 2%

- 0.2 g eosina
- 0.3 g citrato de sodio dihidratado
- 10mL agua destilada

## **Metodología de coloración**

- Los frotis deben mantenerse en un lugar seco. La humedad deteriora las pruebas.
- Los colorantes deben mantenerse durante su uso a  $\approx 30^{\circ}\text{C}$  (platina térmica o estufa) para evitar el shock térmico y de esta forma datos falsos.
- Luego de extraído el semen y después de observar la motilidad en masa, se toma una gota, y se la coloca sobre portaobjetos. Se agrega una gota del colorante de eosina-nigrosina y se homogeniza la mezcla con un cubreobjetos.
- Luego de 1 minuto se realiza el frotis.
- Se observa, al cabo de 2 min, sin cubreobjetos con aumento 40x

## **Recuento de células vivas y muertas**

- Con microscopio óptico, recorrer el frotis y contar 200 células distribuidas en el preparado.
- Estimar el porcentaje de vivos (o muertos), a partir de las 200 células contadas.
- Los espermatozoides vivos en el momento de la coloración no se teñirán. Los muertos se observarán de color rosado.

## **Tinción con FITC- PNA**

Recientemente se ha incorporado la utilización de lectinas asociadas a fluoresceínas como marcadores de acrosoma y de modificaciones plasmáticas de los

espermatozoides. Las lectinas son glicoproteínas que se unen específicamente a terminales azúcares ubicados en las estructuras celulares y, por lo mismo, se han utilizado como marcadores específicos de glicoconjugados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal.

Alícuotas de 100  $\mu$ L de la muestra espermática se complementaron con 5  $\mu$ L de fluoresceína aglutinina de cacahuete marcado con isotiocianato de (FITC-PNA; 200 g / mL) y 5  $\mu$ L de IP (200 g / mL) y se mantuvieron a 38 ° C durante 5 minutos y finalmente se fijaron con 10  $\mu$ l de paraformaldehído (1% vol / vol en solución salina). Los espermatozoides fueron examinados bajo un microscopio de epifluorescencia y se divide en 4 categorías según su patrón de tinción IP/FITC-PNA, como sigue: a) espermatozoides vivos con acrosoma intactos, espermatozoides con FITC-PNA y sin tinción IP; b) espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado, espermatozoides sin tinción FITC-PNA y IP; c) los espermatozoides muertos con acrosoma intacto, espermatozoides con tinción nuclear IP; y d) los espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado, espermatozoides con tinción nuclear IP y sin tinción FITC-PNA (Figura 7).

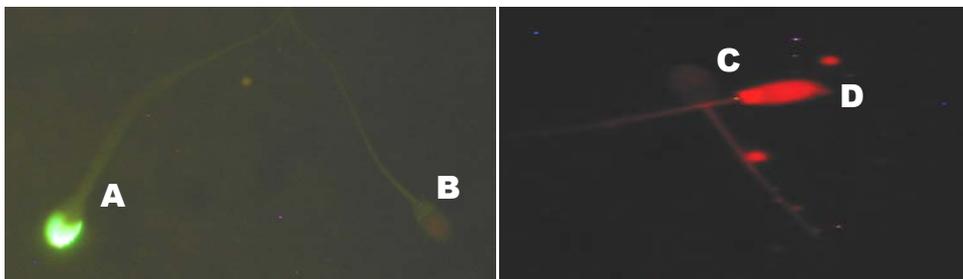
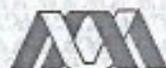


Figura 7. Fotografía de espermatozoides de ovino con tinción FICT-PNA/IP observados en microscopio de epifluorescencia a 40x. A. Espermatozoide con acrosoma intacto. B. Espermatozoide reaccionado. C. Espermatozoide vivo. D. Espermatozoide muerto. A y B. tinción FITC-PNA; C y D. tinción IP.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00022

Matrícula: 233801348

EFECTO DE LA CONGELACION  
SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE  
ESPERMATOZOIDES PORCINOS Y  
OVINOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD DE IXTAPALAPA

01 DIC 2015

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día 30 del mes de noviembre del año 2015 en la Unidad Ixtapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMIREZ  
DRA. EDITH ARENAS RIOS  
DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS  
DR. FILIBERTO FERNANDEZ REYES



ITZEL PLANCARTE HERNANDEZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ITZEL PLANCARTE HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALOUCIRA

PRESIDENTE

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB  
RAMIREZ

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

SECRETARIO

DR. FILIBERTO FERNANDEZ REYES