

01621  
54



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DEL CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO  
SOBRE LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE  
DE BOVINO

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A :**  
**CARMEN OMEGA MARTINEZ OROPEZA**

ASESORES: DRA. MA. DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA  
DR. JAVIER VALENCIA MENDEZ  
DR. JORGE HERNANDEZ ESPINOSA

Autorizo a la Dirección General de Biblioteca  
UNAM a difundir en formato electrónico e im-  
contenido de mi trabajo recepc

MEXICO, D.F.

2003

NOMBRE: Carmen Omega Martinez Oropeza  
FECHA: 17-07-03  
FIRMA: Carmen Omega Martinez Oropeza





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# PAGINACION DISCONTINUA

Journal of Management Studies, 2010, 43(1), 1–12  
© Emerald Group Publishing Limited, ISSN 0275-6688  
DOI: 10.1108/JMS-08-2009-0047

**EFFECTO DEL CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO SOBRE  
LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE DE BOVINO**

**Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista**

por

**Carmen Omega Martínez Oropeza**

**Asesores: Dra. Ma. De Lourdes Juárez Mosqueda  
Dr. Javier Valencia Méndez  
Dr. Jorge Hernández Espinosa**

México D.F. 2003

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## DEDICATORIA

*A todas las mujeres de mi familia por ser las personas más admirables, honestas y valientes que jamás podré conocer.*

*A mi madre*

*Por haber inculcado en sus hijas e hijos tantos valores que nos llenan de satisfacción. Por su inteligencia y gran bondad con todas las personas que la rodean.*

*A mi padre*

*Mi admiración por ser una persona con gran inteligencia.*

*A mis hermanas: Mine y Del.*

*Que al igual que mi madre son dignas de tener toda mi admiración y respeto por ser tan inteligentes y valientes ante la vida, capaces de superar cualquier adversidad. Gracias por haber sido y continuar siendo ejemplos tan positivos.*

*A mis hermanos: Gabi y Ulises.*

*Por su ejemplo de superación, su constante apoyo y palabras de aliento cuando más las necesité.*

*A mis sobrinas y sobrinos: Uri, Lalo, Lau, Sebastián, Mariana, y Citlali.*

*Por dar a nuestra familia tantos momentos de alegría y satisfacción y ser un motivo de lucha constante.*

*A mis cuñados: Lulú y Salvador.*

*Por su cariño, comprensión y gran apoyo moral a la familia en los momentos difíciles.*

*A mis primas y amigas: Eri, Kari, Ara, Eva y Waded.*

*Por haberme permitido pasar con ustedes los mejores momentos de mi niñez y adolescencia.*

*A Ton, Smoky y Mazla.*

*Por ser mis libros vivientes y permitirme aprender tanto. Gracias.*

*Para aquellas amigas y amigos que han compartido conmigo momentos muy agradables, pero que supieron tolerarme y ayudarme aún en los momentos más difíciles. Los estimo mucho de verdad. ¡Gracias por su amistad!*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis asesores: Dra. Ma. De Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Jorge Hernández Espinosa, por su valiosa dirección en la realización del presente trabajo.*

*A los doctores: Eduardo Camors Peieraccini y Whilhem Remberg Bueno, directores del Centro de Procesamiento de Semen de Bovino RECA (El Marquez Querétaro), por la donación de las muestras; y a la Doctora Ma. Elena Reséndiz Juárez, por su amable colaboración en la obtención y congelación de las muestras para el presente trabajo.*

*Al Dr. Oscar Oliveros Belmont por ofrecerme su valiosa amistad.*

*Al Dr. Carlos Gutiérrez por su valiosa contribución y sugerencias para mejorar el presente escrito.*

*A la laboratorista Martha Rodríguez Casillas y al técnico Francisco López López por su apoyo en la realización de este trabajo.*

*A la química Ma. De la Luz Rosales M. responsable de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el apoyo brindado en el presente trabajo.*

*Al programa de becas PROBETEL por su apoyo económico durante la duración de este trabajo.*

*No podrás jamás establecer una falsedad, no solamente por que la verdad gritará y desvirtuará lo falso, sino que la Ley devuelve la treta y destrozará al que trata de levantarla. Así es la Ley de la vida todo se regresará magnificado, por esa razón tanto a mi mejor amigo como al peor de los enemigos os deseo buena ventura y prosperidad por el resto de sus días.*

*Conny Méndez*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
<b>LA CELULA ESPERMATICA.....</b>	<b>4</b>
Estructura de la cabeza.....	5
Estructura del cuello.....	6
Estructura del flagelo.....	7
<b>ESPERMATOGENESIS.....</b>	<b>8</b>
Fase de Golgi.....	10
Fase del Capuchón.....	10
Fase Acrosómica.....	10
Fase de Maduración.....	11
<b>MADURACION ESPERMATICA.....</b>	<b>12</b>
<b>CAPACITACION Y REACCION ACROSOMAL.....</b>	<b>13</b>
<b>FERTILIZACION.....</b>	<b>16</b>
<b>CONGELACION DEL SEMEN.....</b>	<b>17</b>
Antecedentes.....	17
Crioprotectores.....	20
<b>CRIOPRESERVACION DEL SEMEN DE BOVINO.....</b>	<b>22</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN.....</b>	<b>25</b>
<b>EFECTO DE LA CRIOPRESERVACION SOBRE LA</b>	
<b>VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE.....</b>	<b>29</b>

v

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



TECA PERINUCLEAR.....	32
HIPOTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	38
MATERIALES Y METODOS.....	39
Obtención de muestras.....	39
Evaluación del semen.....	39
Triple Tinción.....	40
Prueba Hiposmótica.....	41
Viabilidad Espermática.....	42
Criopreservación del semen.....	42
Descongelación de las pajillas.....	43
Procesamiento para microscopía electrónica.....	43
Análisis Estadístico.....	44
RESULTADOS.....	45
Concentración y movilidad de los espermatozoides.....	45
Diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos.....	45
Integridad de la membrana plasmática.....	46
Integridad del acrosoma.....	46
Integridad de la teca perinuclear.....	47
DISCUSION.....	50
CONCUSIONES.....	55
LITERATURA CITADA.....	56
FIGURAS.....	64
GRAFICAS Y CUADROS.....	70

## RESUMEN

MARTINEZ OROPEZA CARMEN OMEGA. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. (Bajo la dirección de: Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Javier Valencia Méndez y Dr. Jorge Hernández Espinosa).

En la actualidad la industria de la inseminación artificial bovina se ha visto limitada por una pérdida de la viabilidad de las células espermáticas de un 40 a 50% después del proceso de criopreservación. Esta baja en la viabilidad no se ha podido correlacionar con los daños que ocurren en la membrana plasmática ni en el acrosoma. En el presente trabajo se investigó el daño de las células espermáticas ocasionado por el congelamiento y descongelamiento, particularmente en la teca perinuclear ya que es de suma importancia en el proceso de fertilización. Se utilizó el semen de 7 toros de diferentes razas y fines zootécnicos del centro de procesamiento de semen REKA (Querétaro). Antes y después de la criopreservación del semen se evaluó la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (prueba hiposmótica), el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (triple tinción), la integridad del acrosoma (triple tinción) y la integridad de la teca perinuclear (tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión). Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la prueba de T de Student y la prueba de correlación de Pearson y su análisis de regresión. Los resultados mostraron que después de la descongelación del semen la integridad de la teca perinuclear disminuyó de 84.8%

a 47.4%, mientras que los porcentajes de espermatozoides con teca perinuclear alterada y ausente aumentaron considerablemente de 12% a 41.7% y de 3.1% a 10.8% respectivamente. Encontrándose diferencias significativas entre los valores de las muestras previas al congelamiento y posterior al descongelamiento. Adicionalmente, los resultados mostraron que existe una correlación negativa entre espermatozoides que presentan la teca perinuclear ausente y los espermatozoides vivos con acrosoma intacto. Si bien no existió una correlación significativa, poco faltó para que existiera una relación entre la presencia de espermatozoides con teca perinuclear normal y los espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

## **INTRODUCCION**

El método más usual para la conservación del semen involucra la inhibición de la actividad metabólica mediante la reducción de la temperatura. A temperaturas cercanas a cero la motilidad de los espermatozoides se pierde, sin embargo alguna actividad metabólica persiste. La actividad metabólica sólo se suspende totalmente con temperaturas por debajo de los  $-196^{\circ}\text{C}$  (De Alba, 1985).

La criopreservación del semen ha sido aplicada como técnica de rutina en el procesamiento del semen del toro para inseminación artificial (IA) (De Leeuw y col., 1990). La técnica ha procurado ante todo mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide. El uso de diluyentes de semen a base de medios específicos a los que se les añade yema de huevo, leche u otras lipoproteínas y glicerol, han permitido la conservación por largo tiempo de los espermatozoides en nitrógeno líquido. El glicerol suele añadirse para proteger al espermatozoide contra los efectos letales del congelamiento. Sin embargo, la industria de la IA bovina se ha visto limitada por una pérdida de la viabilidad del espermatozoide de un 40 a 50 % después del proceso de criopreservación (Ostermeier y col., 2000).

Factores importantes en la técnica de criopreservación como la velocidad de enfriamiento/congelación, la de descongelación y la presencia de crioprotectores, así como las interacciones entre estas variables y la capacidad protectora de diferentes crioprotectores sobre la célula espermática han sido evaluados por un gran número de investigadores (Pace, 1981; De Leeuw y col., 1990). También han sido valorados algunos factores adicionales que pueden afectar la capacidad fertilizante de la célula espermática, como son el propio medio de criopreservación

y el tiempo de almacenamiento de las muestras. (Iguer-Ouada y col., 2001). Como resultado de estos estudios, las técnicas de almacenaje usadas para el semen del toro han sido mejoradas a través de los años. A pesar de ello, la preservación a baja temperatura aún trae consigo efectos desfavorables sobre la sobrevivencia de los espermatozoides (De Leeuw y col., 1990).

La evaluación de la morfología espermática debe ser un componente importante del estudio de la integridad espermática, que podría ser usada como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de congelamiento y descongelamiento, y de esta manera permitiría evitar el uso de cierto semen para el proceso de IA (Rodríguez-Martínez, 2000).

#### LA CELULA ESPERMATICA

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula muy especializada, que posee un solo juego del número corriente de cromosomas de la especie (Moore, 1985).

La célula espermática madura ha sido dividida en tres regiones (Flesch y col., 2000):

- a) La cabeza, que consiste de un núcleo condensado, la teca perinuclear y el acrosoma.
- b) El cuello, que une a la cabeza con el flagelo.
- c) El flagelo, que contiene el axonema, las mitocondrias y otros elementos estructurales responsables del movimiento de la célula.

### Estructura de la cabeza

La forma de la cabeza es característica de cada especie, esta tiene la forma de hoz en el espermatozoide de la rata y el ratón y es aplanada y redonda en el espermatozoide del hombre y de los animales domésticos. El núcleo espermático de los mamíferos es más condensado y alargado que el de las células somáticas y su forma también es característica de cada especie. Generalmente, la cromatina tiene una densidad uniforme, debido al alto grado de compactación del DNA, pero puede llegar a contener pequeñas áreas claras, llamadas vacuolas nucleares. El arreglo de la cromatina se debe a la presencia de una clase única de proteínas cromosómicas: las protaminas. La envoltura nuclear del espermatozoide de los mamíferos, que se relaciona de manera muy estrecha con la cromatina, posee varios rasgos estructurales poco comunes. Esta consiste de 2 membranas separadas de 7 a 10 nm; cerca del polo caudal de la cabeza espermática, la membrana nuclear y la membrana plasmática se fusionan y forman el anillo posterior, el cual aparentemente actúa como un sello para separar la cabeza y el flagelo en compartimentos. Más abajo del anillo posterior, la envoltura nuclear asume una apariencia más típica, las membranas se separan por 40 a 60 nm y se extienden en la región del cuello lejos de la cromatina. Esta última área recibe el nombre de "envoltura redundante" y contiene los poros nucleares (Bellvé y O'Brien, 1983). La envoltura nuclear que cubre la superficie caudal de la cabeza está de nuevo desprovista de poros, y sus membranas están estrechamente sobrepuestas una a la otra (Fawcett, 1970).

La teca perinuclear es una estructura citoesquelética que rodea al núcleo, excepto donde el flagelo se inserta a la cabeza (Courtenis y col., 1976). Su estructura y función son presentadas más adelante.

El acrosoma es un organelo en forma de capuchón, envuelto en una membrana que se adapta estrechamente a los contornos de la parte anterior del núcleo. La membrana acrosómica interna, la que esta adherida a la envoltura nuclear, se continúa en el margen posterior del capuchón con la membrana acrosomal externa. Las dos membranas corren paralelamente una a la otra en la mayor parte de su curso y rodean una cavidad estrecha que está ocupada por un material amorfo y homogéneo, el contenido acrosómico rico en enzimas como: glucosidasas ácidas, proteasas, esterasas, fosfatasa ácida y arilsulfatasa (Fawcett, 1970). La forma y tamaño del acrosoma varía considerablemente entre las especies. La porción principal del acrosoma se llama segmento principal. Además en todas las especies de mamíferos hay una región caudal especializada, en la que se da un abrupto estrechamiento del capuchón y una ligera condensación de su contenido y se le da el nombre de segmento ecuatorial. El acrosoma juega un papel activo durante la fecundación (Haila y Tulsani, 2000).

#### Estructura del cuello

Esta región se extiende entre la cabeza y la pieza media del flagelo. La porción más cercana a la cabeza es la llamada pieza de conexión y une a la cabeza con el flagelo. En su extremo anterior esta región (articular) recibe el nombre de capitolio y se une a la placa basal del núcleo por una serie de filamentos finos. En el extremo caudal del cuello, la pieza de conexión esta compuesta de nueve columnas estriadas o segmentadas. Estas columnas están orientadas

longitudinalmente y están compuestas de bandas claras y densas en forma alternada y gradualmente se fusiona con el capitolio. En el interior de la pieza de conexión, inmediatamente por debajo de la superficie articular del capitolio, hay un centriolo proximal orientado transversalmente. En los espermatozoides maduros falta generalmente el centriolo distal. Otras estructuras dentro de la región del cuello incluyen la porción redundante de la envoltura nuclear, una o dos mitocondrias que se extienden de la pieza media del flagelo, los segmentos iniciales de las fibras densas externas y la extensión anterior del par de microtúbulos centrales del axonema. En algunos espermatozoides el cuello puede estar rodeado por una masa de buen tamaño de citoplasma residual, pero en la mayoría de los mamíferos, esta gota citoplásmica o falta en los espermatozoides maduros o se localiza en el extremo distal de la pieza media del flagelo (Fawcett, 1970; Bellvé y O'Brien, 1983).

#### Estructura del flagelo

Es la porción móvil de la célula que se subdivide en tres segmentos: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La característica común de los tres segmentos es la presencia del axonema central con un arreglo típico de 9 dobletes de microtúbulos periféricos y dos microtúbulos centrales ("9+2"). La pieza media se extiende desde el cuello hasta el anillo posterior y constituye la porción más ancha del flagelo. El axonema central aparece rodeado por nueve fibras simples, más gruesas y de contorno irregular, denominadas, "fibras densas externas". Las mismas nacen de las columnas estriadas de la pieza de conexión por lo que también presentan las estriaciones. Por fuera de las fibras densas



externas se encuentran las mitocondrias a manera de collar; es la vaina mitocondrial (Fawcett, 1970).

La pieza principal es el segmento más largo del flagelo. El axonema se mantiene rodeado por las nueve fibras densas externas, las que presentan grandes variaciones de tamaño y suelen desaparecer hacia el final de la pieza. Por fuera de las fibras externas existe la denominada "vainita fibrosa". Esta presenta dos engrosamientos que corren a lo largo de la pieza (columnas longitudinales) y de las que se desprenden las "fibras circunferenciales", que abrazan a las fibras densas externas. Las fibras circunferenciales se ramifican y anastomosan entre sí. En la pieza terminal (la porción más corta del flagelo) solo persiste en el axonema embebido en una matriz amorfa y directamente rodeado por la membrana plasmática (Fouquet y Kann, 1994).

### ESPERMATOGENESIS

La espermatogénesis comprende la serie completa de fenómenos mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides. Clásicamente se divide en tres fases:

- a) Espermatocitogénesis: comprende la proliferación de las espermatogonias para dar origen a los espermaticitos primarios. Simultáneamente, esta proliferación asegura el mantenimiento del número original de espermatogonias (renovación) (Hafez, 1987).
- b) Proceso meiótico: mediante una primera división meiótica los espermaticitos primarios originan a los secundarios. Estos sufren la segunda división meiótica para convertirse en espermátides (Hafez, 1987).

c) Espermioogénesis: las espermátides pasan por un fenómeno de transformación citológica que termina con la formación de los espermatozoides (Hafez, 1987).

Hay que tener en cuenta que la espermatogénesis ya se está preparando en la vida embrionaria mediante la multiplicación de las células germinales primitivas (gonocitos). De este proceso resulta la formación de las espermatogonias que comienzan a poblar los cordones sexuales (Haila y Tulsiani, 2000).

Las espermatogonias, que han estado inactivas en los túbulos seminíferos de los testículos desde el período fetal, comienzan a aumentar de número en la pubertad (Haila y Tulsiani, 2000).

El testículo del animal joven prepúber posee cordones angostos poblados por espermatogonias y células de sostén. La liberación de gonadotrofinas a la sangre por parte de la hipófisis constituye el hecho crucial de la pubertad. Las mismas promueven la diferenciación de las células sustentaculares (células de Sertoli) e inician el proceso espermatogénico al promover la transformación de las espermatogonias en espermatoцитos (Hafez, 1987).

Primero las espermatogonias madres (tipo A) proliferan por división mitótica para perpetuarse a sí mismas y dar a la vez origen a varias generaciones sucesivas de espermatogonias, cada una de las cuales está un poco más diferenciada que la precedente. La división de la última generación de espermatogonias (tipo B) da origen a los espermatoцитos primarios (Haila y Tulsiani, 2000; Moore, 1985). Cada espermatoцитo primario pasa por una larga profase, en la primera división meiótica, (Haila y Tulsiani, 2000) para finalmente dividirse y formar dos espermatoцитos secundarios, los cuales presentarán una segunda división meiótica dando lugar a cuatro espermátides haploides (Moore, 1985). Las

espermátides sufrirá un remodelamiento gradual de los componentes nucleares, que ocasionará que pasen de ser células redondas a células espermáticas con una cabeza (que contiene al núcleo y el acrosoma) y el flagelo, en el proceso llamado espermiogénesis (Haila y Tulsiani, 2000).

La espermiogénesis es un proceso dependiente del ambiente específico que es brindado por las células somáticas del testículo (células de Sertoli y de Leydig) y requiere regulación endocrina y para-autocrina así como de una interacción célula-célula directa (Haila y Tulsiani, 2000).

Es conveniente dividir a la espermiogénesis en cuatro fases: fase de Golgi, fase de capuchón, fase acrosómica y fase de maduración (Fawcett, 1970).

**Fase de Golgi:** Se caracteriza por la formación de gránulos por el aparato de Golgi. Estos pequeños gránulos son secretados y aparecen rodeados de una membrana lisa, que reciben el nombre de vesículas proacrosómicas. Las vesículas coalescen para formar un gránulo único, el gránulo acrosómico. Durante esta fase, el centriolo proximal se acerca al núcleo (Hafez, 1987).

**Fase del capuchón:** Se caracteriza por el aumento y la diseminación del gránulo acrosómico sobre la superficie del núcleo de la espermátide. Este proceso continúa hasta que, cerca de dos terceras partes de la porción anterior del núcleo de la espermátide quedan cubiertas por una delgada membrana de doble pared que se adhiere íntimamente a la envoltura nuclear. Así se forma una estructura homogénea que se ajusta a la superficie nuclear a modo de "sombrero", denominada "casquete o caperuza" (Hafez, 1987).

**Fase acrosómica:** Desde su formación el gránulo acrosómico y el casquete de la espermátide se orientan hacia la lámina propia del túbulo seminífero.

Simultáneamente la masa citoplasmática se desliza hacia el lado opuesto del núcleo de donde se hallan el gránulo y el casquete (sistema acrosómico). El aparato de Golgi se separa del sistema acrosómico y el citoplasma se desplaza hacia la parte caudal del núcleo. Como todo el citoplasma se ha desplazado, la membrana plasmática apoya directamente sobre todo el sistema acrosómico (Delhon y Lawzewitsch, 1985; Hafez, 1987).

Fase de maduración: El acrosoma adquiere gradualmente la forma característica de cada especie. La cromatina se condensa y hace que el núcleo tome el tamaño y la forma típicos de cada especie. En el polo opuesto al acrosoma uno de los centriolos se orienta perpendicularmente a la superficie celular y se encarga de formar al flagelo y se constituye el cuerpo basal del mismo. Este centriolo se denomina "centriolo proximal". Durante la formación del flagelo, el centriolo sufre cambios que lo hacen desaparecer como entidad morfológica. El otro centriolo se orienta perpendicularmente con respecto al anterior y recibe el nombre de centriolo proximal. Al mismo tiempo se producen microtúbulos citoplasmáticos que se asocian lateralmente para formar una estructura llamada "manguito", que se proyecta hacia la parte posterior desde el borde caudal del acrosoma, en donde rodea laxamente al axonema. Justamente con su aparición, la espermátide se alarga de tal manera que la masa fundamental del citoplasma se desplaza atrás del polo caudal del núcleo, donde rodea la parte proximal del flagelo. Dentro del manguito una estructura llamada cuerpo cromatoide, se condensa alrededor del axonema y da lugar a una estructura llamada anillo. El flagelo en este momento está constituido sólo por el axonema. En la diferenciación subsiguiente del flagelo se forman las nueve columnas segmentadas orientadas longitudinalmente en

torno a los centriolos. Estas se unen entre si proximalmente y en la base del núcleo para constituir la pieza de conexión. Distalmente, los nueve elementos estructurales que forman la pieza de conexión se reúnen en nueve fibras densas longitudinales que se desarrollan inmediatamente por fuera de los dobletes del axonema. A medida que se mueve hacia atrás, el manguito desaparece y las mitocondrias se reúnen en torno a la pieza media del flagelo y se van disponiendo helicoidalmente (Flesch, y col., 2000; Haila y Tulsani 2000).

El exceso de citoplasma forma el denominado "cuerpo residual" que permanece cerca de la pieza media del flagelo hasta poco antes de la espermiación (liberación del espermatozoide del epitelio seminífero) (Fawcett, 1970; Haila y Tulsiani, 2000).

El volumen celular de las espermátides se reduce aproximadamente en un 25% de su volumen original debido a pérdida de agua y pérdida de citoplasma, que ocurre justo antes de la liberación y separación del cuerpo residual. Los cuerpos residuales son formados en el momento en que los espermatozoides son liberados del epitelio. Estos cuerpos residuales contienen RNA empaquetado y organelos como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas y peroxisomas (Flesch y col., 2000)

### MADURACION ESPERMATICA

En un inicio los espermatozoides recién liberados del testículo son inmóviles e incapaces de unirse a la cubierta extracelular del huevo, la zona pelúcida, y así fertilizarlo. Para fertilizar un huevo, el espermatozoide debe de sufrir una serie de cambios funcionales y bioquímicos durante su tránsito por el epidídimo (proceso

llamado maduración epididimal) y posteriormente en el tracto genital femenino (proceso llamado capacitación espermática), ya que solamente los espermatozoides maduros y capacitados son capaces de reconocer y unirse a la zona pelúcida (ZP) (Haila y Tulsiani, 2000). En la mayoría de las especies de mamíferos, las células espermáticas alcanzan su completa madurez cuando llegan al final de la cauda del epididimo (Flesch y col., 2000).

Durante el tránsito epididimal los espermatozoides de los mamíferos experimentan algunas modificaciones entre las cuales se pueden mencionar: cambios en la membrana plasmática (Flesch y col., 2000) y la adquisición de movimiento (Hoskins y col., 1978). Este último cambio no depende de la disponibilidad de energía, los efectos estimulantes de la motilidad están mediados por un incremento en el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (Gabers y col., 1973). El efecto del AMPC en la motilidad espermática puede ser directo o mediado por la fosforilación de proteínas. Algunas proteínas del flagelo espermático, como por ejemplo la tubulina y la dineína, son fosforiladas en asociación con la motilidad aumentada (Aitken, 1997).

#### CAPACITACION Y REACCION ACROSOMAL

La capacitación y la reacción acrosomal son dos procesos fisiológicos que el espermatozoide de los mamíferos debe de sufrir en secuencia previo a la fusión con el gameto femenino. *In vivo*, para que el espermatozoide eyaculado pueda fertilizar al óvulo, requiere un periodo de residencia en el tracto reproductor de la hembra (Visconti y col., 1995). Esta adquisición de competencia ha sido definida como capacitación. También la capacitación se define como el conjunto de

cambios que le confiere la habilidad al espermatozoide para sufrir la reacción acrosomal (RA) y fertilizar al óvulo (Visconti y col., 1995). Durante el pasaje del espermatozoide por el tracto de la hembra, éste es sujeto a una serie de modificaciones bioquímicas y funcionales. Los espermatozoides también pueden capacitarse *in vitro* en un medio químicamente definido que contenga albumina, una fuente de energía (glucosa o piruvato) y otros componentes de la solución Krebs-Ringer bicarbonatada (Haila y Tulsiani, 2000). Se sabe que durante la capacitación, en el espermatozoide, ocurre un aumento en la concentración de calcio libre intracelular, así mismo en la fluidez de la membrana plasmática, en el metabolismo energético y en la motilidad del gameto (Yanagimachi, 1994). Estos cambios son el resultado de la remoción de glicoproteínas y/o proteínas adsorbidas en la superficie del espermatozoide eyaculado, la reorganización de moléculas de la superficie y la pérdida de colesterol. El requerimiento de calcio presumiblemente es un reflejo de la dependencia de calcio de la adenilato ciclasa espermática. Esto debido a que se ha observado que durante la capacitación existe una elevación en los niveles de AMPc y en la fosforilación de proteínas espermáticas. Una de las proteínas fosforiladas durante la capacitación es la fosfolipasa C que cataliza la conversión del fosfatidilinositol trifosfato en diacilglicerol e inositol trifosfato, los cuales han sido involucrados en el incremento de la fluidez de la membrana plasmática y también del aumento en su capacidad fusogénica (Aitken, 1997).

La RA es un proceso de exócitosis del acrosoma que conduce a la liberación de una gran variedad de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, principalmente la acrosina y la hialuronidasa, las cuales son esenciales para que el espermatozoide

atravesase las envolturas el óvulo. La RA también provoca modificaciones de algunas proteínas de la membrana plasmática a nivel del segmento ecuatorial y postacrosomal necesarias para la fusión con la membrana del óvulo. In vivo, la RA es inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida (ZP3) que actúa como un ligando para uno o más receptores espermáticos. La progesterona, secretada por las células que rodean al óvulo (cumulo ovífero) y presente en el fluido folicular, también es un inductor de la RA. El mecanismo por el cual la ZP y la progesterona inducen la RA involucra receptores de la membrana plasmática, vías de señalización y de transducción de señales intracelulares activadas por la interacción entre estos agonistas y sus receptores (Patrat y col., 2000).

Inmediatamente después de la unión del espermatozoide (receptor) a la ZP (ligando), la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la membrana plasmática que recubre al acrosoma, lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal. De manera particular, la membrana plasmática de la región ecuatorial no participa en la fusión con la membrana acrosomal externa (Flesch y col., 2000). La RA es un requisito absoluto para la fusión espermatozoide-óvulo. Esta observación sugiere que, como resultado o concomitantemente con la RA, la membrana plasmática que recubre el segmento ecuatorial sufre un cambio fisiológico mayor que vuelve al espermatozoide competente para fusionarse. Por lo tanto, la membrana sobre el segmento ecuatorial posee una proteína con propiedades fusogénicas. Una molécula de adhesión candidata para este proceso de unión es la proteína espermática cirestestina. La cirestestina pertenece a la familia de proteínas de adhesión a matriz extracelular (ADAMS). Esta proteína se



asocia con la membrana acrosomal interna, y durante el proceso de capacitación y/o RA migra al segmento ecuatorial (Flesch y col., 2000).

### FERTILIZACION

La interacción del espermatozoide y del óvulo inicia una serie de transformaciones que involucran a los componentes citoplásmicos y nucleares de ambos gametos. Estas transformaciones constituyen el proceso de fertilización, la cual ha sido definida como un fenómeno múltiple que comienza con la interacción y subsecuente fusión de los gametos y culmina con la asociación de los cromosomas correspondientes derivados de los dos pronúcleos, uno de origen materno y otro paterno (Flesch y col., 2000).

Los aspectos esenciales de la fertilización son:

- (a) La asociación del genoma materno y del paterno (herencia bipaternal) y
- (b) La activación del óvulo: modificación de su metabolismo que conlleva a la formación del segundo cuerpo polar y a la diferenciación del óvulo fertilizado (cigoto).

Inmediatamente después de la incorporación del espermatozoide al citoplasma del huevo la envoltura nuclear se rompe. Como resultado de este rompimiento la cromatina espermática queda rodeada solo por la teca perinuclear. Esta última representa una barrera para la descondensación del material genético del macho (Kimura y col., 1998).

## CONGELACION DEL SEMEN

El proceso de congelamiento del semen es llamado criopreservación. Como consecuencia de éste proceso, el metabolismo de las células espermáticas se disminuye al mínimo, quedando solamente lo que ellas necesitan para sobrevivir sin perder su capacidad para fertilizar un huevo (Buhr y col., 1989).

La meta final en la conservación del semen es la de obtener, después de la inseminación artificial, tantas gestaciones eficaces como en el apareamiento natural. Adicionalmente, esta técnica permite almacenar el semen de animales valiosos: eliminar las limitaciones de manejo y/o sanitarias que impedirían la utilización de algunos individuos y facilita la transferencia del material genético (Eberhard, 1995; Holt, 1996).

### Antecedentes

El primero en observar que los "animalitos" del semen resistían el congelamiento fue Van Leewenhoek (1677), ya que estos volvían a moverse al descongelarse (Valencia, 1986).

En 1803, Spallanzani demostró que el componente fertilizante del semen podía filtrarse y retenerse aparte del líquido seminal. El investigador encontró que el líquido filtrado era estéril en tanto que el resto era altamente fértil. En ese mismo año, Spallanzani informó que el semen enfriado con nieve no moría sino que solo se tornaba inmóvil hasta que se le exponía al calor, después de lo cual seguía móvil por varias horas (Bearden, 1985).

Davenport (1897) observó que el semen del ser humano también era capaz de sobrevivir al congelamiento (Valencia, 1986).

Phillips y Lardy (1930) de la Universidad de Wisconsin, descubrieron un medio nutritivo amortiguador a base de fosfatos y yema de huevo para diluir el eyaculado, que además de proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento a partir de la temperatura corporal hasta los 5° C, los proveía de una fuente de energía para su metabolismo y prevenía el cambio de pH. Con este diluyente los espermatozoides permanecían viables (capaces de fertilizar a los óvulos) hasta por tres o cuatro días (Bearden, 1985).

Más tarde, Salisbury y colaboradores mejoraron este diluyente al sustituir por citrato de sodio los fosfatos utilizados por Phillips y Lardy. La ventaja de dicho diluyente (citrato-yema de huevo) era la visibilidad del espermatozoide bajo el microscopio, pues permitía una determinación más exacta de la motilidad después de la dilución. Después de la segunda guerra mundial, Alquist, de la Universidad Estatal de Pennsylvania, fue el primero en comunicar el uso de la penicilina para el control de los contaminantes bacterianos del semen (Bearden, 1985).

Jahnel (1938) congeló testículos de conejos sifiliticos y al descongelarlos pudo observar espermatozoides con movimiento (Valencia, 1986).

En 1948, Parkes y Polges desarrollaron con gran éxito un método para congelar y almacenar espermatozoides a temperaturas muy bajas. Descubrieron que el glicerol protegía a los espermatozoides del gallo durante los procesos de congelación y descongelación. Inicialmente este método no tuvo éxito con el semen de mamíferos. Sin embargo, encontraron que si se mezclaba el semen con el glicerol y se dejaba reposar durante una noche antes de la congelación, el método funcionaba. En la actualidad a éste periodo se le conoce como de

equilibrio y en este tiempo los espermatozoides absorben parte del glicerol para reemplazar cierta cantidad de agua en la célula. El glicerol actúa como anticongelante para evitar la formación de cristales de agua durante la congelación. Estos investigadores utilizaron hielo seco como refrigerante y almacenaron los espermatozoides a  $-79^{\circ}\text{C}$  (Bearden, 1985).

En el mismo año, Sorensen introdujo el uso de las pipetas de plástico para el almacenamiento de semen (Bearden, 1985).

La primera publicación en que se ponía de relieve el éxito de congelar y descongelar el semen de gallo, sin que éste perdiera su motilidad, apareció en 1949. Los autores Polge, Smith y Parkes, de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, dieron a conocer al poco tiempo, la sobrevivencia del espermatozoide del toro al congelamiento (De Alba, 1985).

Polge Y Rowson (1952) publican el nacimiento del primer becerro vivo nacido de inseminación con semen congelado (Valencia, 1986).

Pares en 1953, Jakobson en 1956 y Adler en 1959 y 1961, proporcionaron informes sobre semen congelado en pajillas. En 1957, el servicio de Reproductores Americanos inició el uso del nitrógeno líquido como refrigerante para la congelación y el almacenaje del semen al vacío, en tanques de acero inoxidable (Bearden, 1985).

Nagase y col. (1964) desarrollan el método de pellets para congelar a los espermatozoides (Valencia, 1986).

En Francia, Cassous de L'Aigle, padre e hijo, desarrollaron pipetas para la aplicación del semen en tres etapas. En 1968 desarrollaron una pipeta más pequeña, con capacidad de 0.25 ml, lo cual permitió elevar la supervivencia de

espermatozoides, a ésta pipeta se le llamó minipajilla o minipopote (Bearden, 1982).

En 1972 en Estados Unidos algunas organizaciones cambiaron el uso de ampollitas de vidrio a este tipo de pajillas, ya que las últimas permitían una mayor sobrevivencia de los espermatozoides y sólo requerían un tercio del espacio para almacenarse (Bearden, 1982.).

### Crioprotectores

Los crioprotectores, como el glicerol, permiten que un porcentaje substancial de espermatozoides sobrevivan el proceso de congelamiento /descongelamiento y retengan su capacidad fertilizante. Existen dos clases de crioprotectores: 1) crioprotectores penetrantes; estos pasan a través de la membrana espermática y actúan tanto intra como extracelularmente y, 2) crioprotectores no penetrantes; estos actúan sólo extracelularmente. El glicerol es el crioprotector más común aunque el dimetilsilfóxido (DMSO) y el propilenglicol han sido empleados en algunas células. Los crioprotectores no penetrantes incluyen algunas proteínas como la de la leche o la yema de huevo; azúcares como la fructosa, lactosa, manosa, rafinosa o trealosa y polímeros sintéticos, como la polivinilpirrolidona, metil celulosa o amidas. Muchos crioprotectores penetrantes sirven tanto como diluyente y soluto. Todos los crioprotectores no penetrantes, incluyendo proteínas, lípidos y azúcares, son solutos o coloides y no pueden servir como diluyente. Los compuestos colocados en un disolvente, como el agua, que disuelve y forma una solución verdadera o se ioniza, son llamados solutos (De Leeuw y col., 1993).

Todos los solutos o coloides en una solución, ya sea dentro del espermatozoide o en el medio extracelular, contribuyen a la propiedad osmótica de la solución. Una alta concentración de solutos incrementa la presión osmótica de la solución. El glicerol sirve como un soluto en el agua y también penetra al espermatozoide. Ya sea en el diluyente o dentro del espermatozoide, el glicerol contribuye a la presión osmótica del diluyente o de la célula. Un crioprotector no penetrante, como la lactosa, es un soluto y por su naturaleza no atraviesa la membrana plasmática de una célula viva. Así, la lactosa puede contribuir a la presión osmótica del diluyente pero no del espermatozoide. Los crioprotectores no penetrantes sacan agua del espermatozoide lo cual resulta en una deshidratación y encogimiento. Los disolventes crioprotectores como el glicerol son benéficos porque ellos funcionan como un diluyente, con un punto de congelamiento mucho más bajo que el del agua. Conforme el semen diluido se va enfriando se forman cristales de agua pura (congelada en pequeños bloques de hielo) entre los cuales existen canales de diluyente no congelado, permaneciendo disolvente más soluto. El espermatozoide reside en estos canales no congelados. No obstante esto, se piensa que el efecto benéfico primario del glicerol es extracelular. El movimiento del agua hacia fuera del espermatozoide es probablemente bueno porque es un resultado directo de la pérdida de agua, así la posibilidad de daño intracelular por los cristales de hielo es reducida (De Leeuw y col., 1993).

El proceso de descongelación e inseminación es potencialmente el más dañino para el espermatozoide debido al cambio rápido de volumen. Por ejemplo, de un ambiente rico en glicerol, lactosa y sales del semen diluido con una presión osmótica alta ( $> 1000 \text{ mOsmol/kg}$ ), pasa a un ambiente en el cual el diluyente

seminal es diluido en el útero ( $> 300 \text{ mOsmol/kg}$ ) que resulta en un incremento rápido del volumen para el espermatozoide pues el agua se mueve para equilibrarse con la alta concentración intracelular de glicerol. El hinchamiento rápido del espermatozoide puede romper la membrana plasmática. La solución al problema del incremento rápido del volumen, es diluir de manera seriada en glicerol en el medio que rodea al espermatozoide de una manera controlada previo a la inseminación (Krogenaes y col., 1994).

### CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE BOVINO

El medio más adecuado de dilución debe cumplir con las siguientes funciones:

1. Abastecer nutrientes como fuente de energía (carbohidratos) y como fuente de proteína (yema de huevo y leche descremada).
2. Proteger contra el efecto dañino del enfriamiento rápido (crioprotector como el glicerol).
3. Proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios dañinos en el pH cuando se forma ácido láctico (electrolitos).
4. Mantener la presión adecuada y el equilibrio electrolítico correcto.
5. Inhibir el crecimiento bacteriano (antibióticos).
6. Aumentar el volumen del semen de tal manera que puede usarse para múltiples inseminaciones.
7. Proteger a las células espermáticas durante la congelación.

Los diluyentes deberán prepararse en forma aséptica y ser almacenados durante al menos una semana excepto que se congelen. Un carbohidrato simple como la

glucosa se añade al semen como fuente de energía. Se pueden utilizar diferentes amortiguadores para mantener un pH casi neutro y una presión osmótica de unos 300 mOs, la cual es equivalente a la del semen, plasma sanguíneo y leche. Para inhibir el crecimiento de microorganismos en el semen se añaden penicilina, estreptomycin, polimixina B u otras combinaciones de antibióticos de amplio espectro antibacteriano (Hafez, 1987; De Leeuw y col., 1991).

El semen bovino se diluye por lo general con solución de citrato-yema de huevo, leche entera homogeneizada, leche descremada en polvo o fresca, leche de coco o solución de lactosa. También, el semen se puede conservar satisfactoriamente en diluentes basados en amortiguadores orgánicos, como el Tris (hidroximetil aminometano) (Thun y col., 2002).

La preparación de semen mediante enfriamiento a 5° C es semejante ya sea que se use congelado o sin congelar.

El semen fresco puede ser diluido por cualquiera de los dos siguientes métodos:

- a) Dilución en un paso.
- b) Dilución en dos pasos.

En el método de dilución en dos pasos se llevan a cabo los siguientes procedimientos:

1. Colectar el eyaculado fresco.
2. Evaluar la motilidad y la morfología.
3. Dilución previa del semen, agregando diluyente sin glicerol.
4. Estimar la concentración.
5. Agregar el diluyente con glicerol, a la concentración deseada y llenar las pajillas.



6. Congelamiento inicial en vapor de nitrógeno líquido.

7. Congelamiento rápido a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido.

La recolección de semen se realiza, en el mayor de los casos, por medio de una vagina artificial y con un receptáculo precalentado a la temperatura corporal para evitar el choque térmico de los espermatozoides. Inmediatamente después de la recolección el eyaculado se debe incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ . En algunas ocasiones, si se recolecta el eyaculado completo, para la separación de los espermatozoides del plasma seminal el semen deberá ser centrifugado. Antes de la centrifugación, la muestra será mezclada con el diluyente para hacer a los espermatozoides más resistentes a los factores estresantes como el frío y las fuerzas de centrifugación. Además de separar a los espermatozoides del resto del eyaculado la centrifugación también permite concentrar a los espermatozoides en un menor volumen. El diluyente para separar por centrifugación a las células espermáticas puede ser, por ejemplo, glucosa-leche descremada el cual se utiliza también para transportar semen fresco. Un método diferente para separar las células espermáticas del resto del eyaculado es utilizando una vagina artificial y colectando solo la fracción rica en espermatozoides. Inmediatamente después de la recolección, el eyaculado se debe incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  (Hafez, 1987).

Después de la recolección el semen debe mantenerse tibio 30 minutos antes de la dilución para evitar un choque térmico. Una alícuota de semen deberá prepararse para evaluar la muestra y el resto puede mezclarse con tres a cuatro partes de diluyente (adicionado con glicerol) a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda que el semen se mantenga durante 30 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  para aumentar la acción antibiótica del diluyente. La mezcla se enfría gradualmente hasta alcanzar  $5^{\circ}\text{C}$ . el

enfriamiento deberá ser lento, tomando por lo menos una hora para enfriar la mezcla de 30° a 5° C (De Alba, 1985).

La calidad del eyaculado se evalúa en un microscopio óptico, empleando para ello la motilidad espermática, la cual es un estimador del porcentaje de espermatozoides viables y también se recurre a la evaluación de la morfología normal o anormal de las células espermáticas (Kjaestad y col., 1993).

Después de la centrifugación, se determina la concentración espermática para calcular el número de pajillas que se pueden llenar con un número definido de espermatozoides. La muestra concentrada se diluye para obtener el volumen deseado de acuerdo con el número de pajillas estimadas. Esto se puede hacer manualmente o con una unidad automática. (De Alba, 1985; Hafez, 1987).

El sistema más común para almacenar el semen es el de pajillas de plástico de 5 ml o de 0.5 ml. Una vez que las pajillas fueron llenadas y selladas se exponen al vapor del nitrógeno líquido para el congelamiento inicial para posteriormente sumergirlas en el nitrógeno líquido el cual instantáneamente disminuye la temperatura a -196° C, después de que las muestras hayan alcanzado esa temperatura, pueden ser almacenadas hasta su uso. (Bearden, 1985).

#### DETERMINACION DE LA CALIDAD DEL SEMEN

De manera tradicional, por ser un método sencillo y rápido, la motilidad de los espermatozoides, antes y después de su congelación, ha constituido el parámetro de elección para determinar el grado de integridad celular y por tanto la fertilidad del semen de toro para IA. Sin embargo, y a pesar de que algunos centros de IA han incorporado analizadores computarizados de motilidad espermática, dicha

evaluación es realizada, comúnmente, en forma subjetiva, por medio de la observación de un frotis húmedo en un microscopio de luz equipado con una óptica de contraste de fases (Buhr, 1989; Rodríguez-Martínez, 2000).

Más aún, se ha observado que las evaluaciones rutinarias realizadas en los centros de IA presentan ciertos problemas cuando se les compara con las tasas de fertilidad que se presentan directamente en los ranchos (Córdova, 1990).

Las bajas tasas de concepción después de la IA utilizando semen almacenado bajo congelación, la falta de criorresistencia de algunos machos fértiles, o la falla en la fecundación, a pesar de una buena motilidad aparente después de la descongelación, aumentan las preguntas acerca del daño celular al espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación (Royere y col., 1988). Otros parámetros espermáticos tomados en cuenta cuando se trabaja con semen, ya sea fresco, tratado o congelado, son el volumen y la concentración de espermatozoides/ml, la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma y capacidad de unión al ovocito (Kjaestad y col., 1993).

La determinación del volumen se realiza por simple apreciación visual del colector graduado. La determinación de la concentración espermática se realiza por recuento en cámara (hemocitometría) previa dilución de la muestra seminal (1:100 v:v) en una solución de glutaraldehído al 2% (Hafez, 1987).

La morfología espermática puede evaluarse mediante microscopía de interferencia (Saacke y col., 1968) o contraste de fases, utilizando frotis de las células fijadas (Pursel y col., 1974) y tinciones con Giemsa (Watson, 1975) o lectinas fluorescentes, las cuales son particularmente eficientes para detectar integridad del acrosoma (Cross, y Meizel, 1989). Adicionalmente, existen métodos que

permiten distinguir en una misma preparación la viabilidad de las células y su integridad morfológica (Talbot y col., 1981). La morfología espermática se clasifica de la siguiente manera: células normales, con anomalías de cabeza, pieza intermedia, o en el resto del flagelo. Se considera también la presencia de flagelos enrollados y/o gotas citoplasmáticas. Tras realizar el recuento de 100 espermatozoides en cada una de las muestras analizadas, el resultado se expresa como el porcentaje de cada una de las anomalías morfológicas presentes sobre el total (Watson, 1975; Tamuli y Watson, 1994).

Para la valoración de la movilidad se toma una muestra de semen puro que se deposita sobre un portaobjetos atemperado observándose al microscopio óptico de campo claro (100x), provisto de una platina termorregulada. La valoración de la movilidad, se puede realizar según la clasificación de Evans y Maxwell (1987), estableciendo una categorización de 0 a 5 puntos, según la calidad y vigor de las ondas que produce la masa espermática en movimiento. Si bien esta es una técnica simple, rápida y barata, es muy subjetiva y su subjetividad puede variar entre un 30 a un 60%, dependiendo de los individuos y de los laboratorios que la realicen. Es por eso que en los últimos años se ha puesto atención en métodos más objetivos para la evaluación de esta característica espermática, como los sistemas de análisis del semen asistido por computadora (CASA), mediante el cual se pueden evaluar de manera objetiva varias características de la motilidad espermática, las cuales pueden predecir más objetivamente las tasas de fertilidad de los machos reproductores (Holt, 1996).

Para distinguir células vivas y muertas se han utilizado una variedad de métodos tales como la tinción con eosina y nigrosina (Hancock, J. 1951), o las sondas

fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína y de yoduro de propidio (Garner y col., 1986; Harrison y Vickers, 1990) o el Hoechst 33258 (De Leeuw, 1991).

La integridad de la membrana plasmática se evalúa mediante una prueba de la ósmosis celular, que consiste en someter a los espermatozoides a una presión osmótica de 100 mOsm/kg (Vázquez, 1980). Se considera que el espermatozoide ha reaccionado positivamente a esta prueba cuando presentaba torsión helicoidal de la cola, expresándose el resultado como el porcentaje de éstos con respecto al total (Vázquez, 1980).

Aparte de la motilidad, ya que el acrosoma es de vital importancia funcional en el mecanismo de la fecundación, su evaluación morfológica es ampliamente usada como un indicador de la viabilidad de los espermatozoides congelados-descongelados (Larsson, 1985). El estado del acrosoma del espermatozoide ha sido determinado por una variedad de diferentes técnicas, basadas principalmente en la fluorescencia. Sin embargo, estas técnicas requieren de tiempo y/o equipo especial. Normalmente, usando el microscopio de contraste de fases, el acrosoma forma una protuberancia uniforme en la porción apical de la cabeza espermática. Este método es bastante conveniente para usarse con espermatozoides con acrosomas grandes tales como los de cobayo, pero más difícil, aunque posible, para espermatozoides que poseen acrosomas más pequeños como por ejemplo, el del bovino. Adicionalmente, esta técnica puede ser subjetiva en algunos casos, lo cual puede influir en los resultados (Córdova, 1990). Diversos estudios ultraestructurales de la célula espermática se han realizado en diferentes niveles: membrana plasmática, acrosoma y flagelo. Sin embargo, los resultados obtenidos no han revelado una clara relación en la alteración de

estas estructuras y la baja de fertilidad observada en el espermatozoide congelado-descongelado (Vázquez, y col., 1998).

Adicionalmente, el análisis químico del semen también ha sido tomado en cuenta para estimar el potencial de fertilidad de un macho. Cuando la célula espermática se daña, sus membranas se alteran o se destruyen y las enzimas intracelulares, como la aspartato aminotransferasa y la lactato deshidrogenasa aumentan su concentración en el medio extracelular. La liberación de estas enzimas al medio extracelular está relacionada, por tanto, con las lesiones sufridas por los espermatozoides (Mann y col., 1981).

Por otra parte, aunque las pruebas de penetración *in vitro* podrían ser uno de los métodos más importantes en el estudio de la calidad seminal y una herramienta útil en los estudios y protocolos de la preservación del semen (Vázquez y col., 1998), sin embargo, estas toman mucho tiempo y son relativamente costosas. Por ello, en la actualidad se están experimentando nuevas tecnologías (por ejemplo la citometría de flujo) con el fin de obtener una evaluación más objetiva de la calidad seminal en relación a la fertilidad de los machos (Boixo, 1994).

### EFECTO DE LA CRIOPRESERVACION SOBRE LA VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula terminal, cuyo papel único o principal es el de transportar el genoma paterno hasta el óvulo. Para llevar a cabo su función, el espermatozoide maduro está equipado con estructuras especializadas como son: una membrana plasmática organizada en distintos dominios funcionales, la vaina mitocondrial, el flagelo, el acrosoma y la teca perinuclear, que constituye un

citoesqueleto único (Fouquet y Kann, 1994).

Se conoce que la congelación y descongelación daña a las células, siendo numerosas las investigaciones que se han realizado para investigar la naturaleza del daño. Una conclusión general de estos estudios es que la membrana plasmática es el sitio primario de daño por el congelamiento. (Locksley y col., 1988; Buhr, 1989; De Leeuw y col., 1990). Otros investigadores han propuesto a las mitocondrias, los lisosomas y otros organelos como sitios de daño por el congelamiento (McGann y col., 1989).

Diversas investigaciones señalan que durante la criopreservación las células pueden dañarse debido a la formación intracelular de cristales de hielo grandes y por los cambios que acompañan a dicho proceso y que dan como resultado la deshidratación de las células. Si bien, la congelación rápida reduce al mínimo el daño por los efectos de la solución, ello conduce a la formación de cristales de hielo grandes que causan un grave daño mecánico. Por otro lado aunque la congelación lenta evita la formación de grandes cristales de hielo, esta conduce a un incremento del daño profundo por los efectos de la solución (Jones y Stewart, 1979).

Debido a que la integridad de la membrana plasmática es de crucial importancia para el funcionamiento de cualquier célula, especialmente para el espermatozoide, numerosos estudios han sido enfocados sobre la ultraestructura de la membrana plasmática antes y después del proceso de congelamiento (De Leeuw y col., 1990). Si bien, las técnicas morfológicas han proporcionado detalles de los daños ocasionados a la membrana plasmática, los resultados no siempre han estado correlacionados con el porcentaje de fertilidad del toro en cuestión, a menos que el

daño presente sea muy importante. Adicionalmente, muchas de ellas son tediosas, costosas o ambas, y dichos resultados podrían ser fácilmente determinados usando pruebas más sencillas como las de resistencia a cambios osmóticos (Rodríguez, 1997).

Por otra parte, también se ha utilizado la integridad del acrosoma para predecir la habilidad fertilizante del semen congelado (Buhr, 1989). Varias técnicas han sido desarrolladas para estimar la integridad del acrosoma. Sin embargo, el aumento en el tamaño del acrosoma, la ruptura de la membrana acrosomal externa o la vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, no se han podido correlacionar con la disminución de la viabilidad del espermatozoide. Ello es debido a que los porcentajes de alteraciones encontrados han sido menores (28% o menos) a los reportados de disminución de la viabilidad (Watson y col., 1985; Heras y col., 1996). Adicionalmente, aunque el daño acrosomal disminuya el porcentaje de fertilidad del espermatozoide este no interfiere con su motilidad (Tasseron, 1977).

También la integridad del acrosoma post-descongelado puede ser determinada morfológicamente, a niveles de microscopía óptica, tanto en muestras no teñidas como teñidas con diferentes métodos. Estudios nucleares realizados antes y después de la fertilización han demostrado que la condensación y descondensación de la cromatina espermática constituyen un evento importante en la fisiología reproductiva (Pasteur y col., 1991). Por lo tanto, la estabilidad de la cromatina espermática puede revelar la capacidad funcional del espermatozoide. En esta estabilidad se incluyen: (a) la correcta compactación de material genético durante la espermiogénesis, (b) su estabilización durante la maduración



espermática, (c) su protección durante el viaje del espermatozoide al sitio de fertilización y, después de la penetración dentro del óvulo, (d) la formación adecuada del pronúcleo masculino (Hingst y col., 1995).

Royere y col. (1988), sugirieron que la congelación-descongelación del semen puede alterar la cromatina nuclear espermática, via un estado llamado "hipercondensación", lo cual podría demorar la descondensación nuclear paterna durante la fertilización y así explicar el retraso de la segmentación y/o mortalidad embrionaria temprana que se ha observado cuando se emplea semen congelado-descongelado.

#### LA TECA PERINUCLEAR

Para asegurar la transmisión eficiente del genoma paterno durante la fertilización, el espermatozoide de los mamíferos necesita proteger su material genético (Bedford, 1991). La principal barrera que impide la descondensación de la cromatina espermática es la teca perinuclear (TP). La TP o sustancia perinuclear es un elemento citoesquelético estructuralmente continuo que envuelve al núcleo, excepto en su base donde el cuello del espermatozoide se implanta (Courstens y col., 1976; Lalli y Clermont, 1981; Oko, y Clermont, 1988, 1991). Morfológicamente a este citoesqueleto perinuclear se le ha dividido en dos regiones, la capa subacrosomal, que llena el espacio entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y la capa postacrosomal o cáliz que es la extensión caudal a la anterior que llena el espacio entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática (Oko y Clermont, 1991; Fouquet y Kann, 1994; Oko y Morales, 1994b; Aul y Oko, 2001). Se ha reportado que existe una continuidad estructural entre la matriz

nuclear (estructura citoesquelética que conforma y da forma al núcleo) y la TP (Bellvé y col., 1992).

Jager y col. (1990) observaron que el núcleo del espermatozoide intacto del ser humano no es susceptible a la descondensación por agentes externos, como la heparina, aun cuando la membrana celular se encuentre dañada, sin embargo si las células previamente sufren un proceso de congelación y descongelación, la cromatina si experimenta una descondensación. Los autores consideran que la congelación y la descongelación ocasionan una alteración mayor en la célula espermática, a la cual se refieren como una posible lesión en el citoplasma.

Se ha demostrado que una TP intacta puede prevenir el acceso de los factores citoplásmicos del huevo al DNA espermático, bloqueando así la descondensación del núcleo espermático (Sutovsky y col., 1997).

Recientemente se identificó una subestructura en la región apical de la hoja postacrosomal de la TP del espermatozoide del cobayo. De los resultados de su localización, su etapa de formación (tránsito del espermatozoide por el epidídimo) y de su pérdida (reacción acrosomal), se ha sugerido que esta podría actuar como un regulador de la integridad de la TP y posiblemente está involucrada con la adecuada descondensación del genoma paterno en la fertilización (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). El núcleo espermático penetra al óvulo protegido por la membranas nuclear, la membrana acrosomal interna y por la teca perinuclear. Después de su incorporación al citoplasma del óvulo, se observa un rompimiento de la envoltura nuclear del espermatozoide que inicia a nivel del segmento ecuatorial y procede de manera antero posterior. Posteriormente el material de la teca comienza a mezclarse con el citoplasma del óvulo antes de que la

descondensación del núcleo espermático se haga aparente. La destrucción de la teca comienza a partir de la porción apical de la región postacrosomal (Yanagimachi 1994) y se ha reportado que la descondensación del núcleo espermático también comienza en la porción apical de la región postacrosomal. (Fouquet y Kann. 1994).

De manera adicional, la TP participa en otras funciones como:

a) En la estructuración del núcleo durante la espermiogénesis. Se ha reportado que durante la espermiogénesis la TP se asocia con las membranas acrosomal y nuclear (Longo y Cook, 1991; Oko y Maraveli, 1995). La TP podría contribuir a la asociación núcleo-acrosoma por proveer una clase de cemento intramembranoso (Bellvé y O'Brien, 1983, Courtens y col., 1976). De hecho, fallas en la diferenciación de la TP han sido asociadas a los espermatozoides con cabeza redonda carentes de acrosoma (Escalier, 1990).

b) En el mantenimiento de dominios en la superficie de la membrana plasmática. Durante la capacitación y la reacción acrosomal ocurren rearreglos específicos de partículas intramembranas, quedando localizadas en dominios diferentes. Moléculas de señalización de superficie y receptores implicados en la fertilización y desarrollo están ancladas en la membrana plasmática del espermatozoide. Los espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal muestran un nuevo dominio de membrana en la región ecuatorial del acrosoma (Yanagimachi, 1994), la cual es reconocida por la membrana plasmática del huevo para unirse y fusionarse durante la fertilización. La posición y la motilidad de proteínas transmembranales están controladas por vínculos entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Mújica y col., 2003)

c) En la penetración del espermatozoide a través de las vestimentas del óvulo. La hoja subacrosomal le confiere un carácter rígido a la porción anterior de la cabeza espermática, que puede ser muy significativo en la penetración de las vestimentas del óvulo (Yagi y Paranko, 1995).

d) En la activación del huevo (Yagi y Paranko, 1995). Posterior a la penetración del espermatozoide al huevo, la teca perinuclear espermática es removida y las proteínas de la teca son liberadas al ooplasma. Simultáneamente, el núcleo espermático se descondensa y se forma el pronúcleo masculino, las microvellosidades y los factores ooplásmicos están involucrados en la remoción de la teca perinuclear. (Sutovsky y col., 1997). Cuando cabezas espermáticas con la TP expuesta son microinyectadas al citoplasma del óvulo, estas forman un pronúcleo bien desarrollado y el óvulo se activa. Sin embargo, los óvulos microinyectados con núcleos espermáticos sin TP no se activa. Por lo tanto, se puede decir que el citoplasma del huevo tiene la capacidad de descondensar a la teca perinuclear, y los productos de la teca perinuclear tienen la propiedad de activar al huevo (Kimura y col., 1998).

Anteriormente, se ha mencionado que parámetros como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática o del acrosoma no tienen una correlación significativa con la viabilidad espermática o con la fertilidad de la muestra del semen criopreservado, ya que posiblemente otros aspectos de la estructura espermática pueden estar alterándose durante el proceso de congelación/descongelación (Ostermeier y col., 2000). De manera concreta, la TP puede verse afectada durante este proceso.

El espermatozoide del bovino, al igual que otras especies (conejo, carnero,

borrego). también presenta una subestructura similar en la misma región de la TP (Koehler. 1970). La subestructura podría ser usada como un marcador morfológico de la integridad de la TP y por tanto de la capacidad fertilizante del espermatozoide de los mamíferos.

Hoy en día las técnicas de rutina para evaluar la calidad de un eyaculado que deba ser procesado para la técnica de IA, son incapaces de detectar espermatozoides con viabilidad reducida, especialmente debido a las condiciones que involucran a los elementos citoesqueléticos de la cabeza espermática (Ward y col., 1999; Ward y Kishikawa, 2000).

De hecho, uno de los desafíos actuales para el almacenamiento y conservación del semen por congelación para su uso en IA es el de asegurar la viabilidad de las células espermáticas. Por ello, es de suma importancia el investigar o indagar qué otras alteraciones de la morfología espermática, relacionadas con la viabilidad (como la TP), se estén alterando por el procesamiento. Lo anterior podría permitir diseñar u optimizar las técnicas usadas para la criopreservación del semen.

### **HIPOTESIS**

El proceso de criopreservación del semen de bovino para IA ocasiona un daño irreversible en la teca perinuclear del espermatozoide.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL:** Evaluar a nivel ultraestructural el efecto de la criopreservación del semen de bovino sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Valorar la integridad de la teca perinuclear en los espermatozoides antes del procesamiento para su criopreservación.
2. Valorar la integridad de la teca en los espermatozoides después del procesamiento de criopreservación.
3. Correlacionar los cambios en la teca perinuclear con los parámetros de la calidad del semen (motilidad, concentración, viabilidad de membrana, integridad del acrosoma) pre y post descongelación.

## **MATERIALES Y METODOS**

Lugar de obtención de las muestras. Las muestras fueron proporcionadas por el Centro de Procesamiento de Semen REKA, ubicado en el Km 23.2 de la carretera a Chichimequillas, Santa María Begoña, El Marqués, en el estado de Querétaro.

Obtención de las muestras. Se obtuvo el semen de 7 toros de diferentes razas y fines zootécnicos, mediante la técnica de vagina artificial.

Evaluación del semen: La valoración de la calidad del semen, para proceder a la congelación, fue realizada por el personal del centro, empleando para ello el método tradicional (movimiento progresivo de los espermatozoides y concentración espermática). El movimiento de los espermatozoides fue evaluado mediante su observación en frotis secos en un microscopio de luz marca Olympus, adaptado con una platina para regular la temperatura a 37°C y a un aumento total de 200x.

La concentración espermática fue evaluada mediante el empleo de un espectrofotómetro, para lo cual 10 µl de cada eyaculado obtenido fueron adicionados a 5.8 ml de solución salina fisiológica.

Adicional a las pruebas de valoración realizadas en el centro, se valoró la viabilidad espermática (eosina al 2%), la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática (prueba hiposmótica) y la integridad del acrosoma (triple tinción). Estas pruebas se realizaron antes y después del congelamiento de los espermatozoides. Para ello, los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en solución salina (154 mM) a una temperatura de 37° C y a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml.



Tinción triple. La triple tinción permite diferenciar entre células vivas y muertas. Una vez resuspendidos los espermatozoides a una concentración de  $35 \times 10^6$  células/ml, se tomó una muestra de 0.5 ml a la cual se le adicionó un volumen igual de azul de tripan al 2% en amortiguador de fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCL 2.7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM, pH 7.4) y se incubaron a  $37^\circ \text{C}$  durante 15 min. Posteriormente la muestra fue centrifugada en una centrifuga clínica a 1200 rpm durante 5–10 min y el sobrenadante fue descartado. Las muestras fueron resuspendidas y lavadas con PBS por centrifugación/resuspensión hasta que el sobrenadante se observó transparente. La muestra fue fijada en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilatos al 0.1 M, pH 7.4, durante 15 min a una temperatura de  $37^\circ \text{C}$ . Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5-10 min y lavadas dos veces con agua desionizada. Posteriormente se realizó un frotis de cada muestra y se dejaron secar al aire. Los frotis fueron incubados con café Bismarck al 0.8% en solución acuosa, pH 1.8 durante 5 min a  $37^\circ \text{C}$ , se lavaron con agua desionizada, se dejaron secar al aire y se incubaron con rosa de Bengala al 0.8% en amortiguador de Tris 0.1 M, pH 5.3 por 40 seg a  $37^\circ \text{C}$ . Finalmente se lavaron con agua desionizada y nuevamente se dejaron secar al aire. Su observación se realizó en microscopio fotónico marca Olympus a un aumento total de 1000X (Vázquez y Carrizosa, 1980).

Se observaron un total de 100 células espermáticas por cada muestra y se clasificaron y contabilizaron de acuerdo a los patrones de afinidad y reacción tintorial de esta prueba.

Los criterios de clasificación fueron los siguientes:

Rosa/azul = Acrosoma intacto, muerto

Rosa/café = Acrosoma intacto, vivo

Blanco/azul = Sin acrosoma, muerto

Blanco/café = Reacción acrosomal, vivo

El número de células obtenido para cada caso se expresó en porcentaje.

*Prueba hiposmótica:* Mediante esta prueba fue posible evaluar la integridad y la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide.

El medio hipotónico fue hecho de la siguiente manera: Se elaboró una solución con 0.5ml de citrato de sodio (1.46%) y 0.5ml de fructosa (2.7%) y se incubó durante 10 min a 37° C. De una muestra de semen de 20 $\mu$ l, a una concentración de 35 X 10<sup>6</sup> células/ml, 10 $\mu$ l fueron colocados en un portaobjetos, con la finalidad de evaluar el enrollamiento de los flagelos, se contaron 100 espermatozoides. El resto de la muestra (10 $\mu$ l) fue adicionada con un volumen igual de la solución hipotónica (100 mOsm) y se incubó durante una hora a 37° C. Posteriormente, 10  $\mu$ l de la muestra incubada fueron tomados y depositados sobre un portaobjetos para ser observados al microscopio de luz, a un aumento total de 600X; se contaron un total de 100 espermatozoides para evaluar el enrollamiento del flagelo (positivos a la prueba).

El porcentaje de los espermatozoides positivos a esta prueba se obtuvo sustrayendo el número de las células con algún grado de enrollamiento del flagelo, antes de su incubación en el medio, al número de células positivas contabilizadas en el medio hipotónico (Rodríguez, 1997)

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

Un porcentaje menor del 50% indica que la membrana espermática presenta una inadecuada integridad y funcionalidad.

Del 50% al 59% la funcionalidad es dudosa.

Mayor del 60% hay una adecuada integridad y funcionalidad de la membrana.

Viabilidad espermática: 10  $\mu$ l de muestra espermática a una concentración de 35 X 10<sup>6</sup> células/ml fueron depositados en un portaobjetos junto con 10  $\mu$ l de eosina al 2% en PBS o de azul de tripán al 2% en PBS y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación al microscopio de luz. Su observación se realizó en un microscopio fotónico marca Olympus a un aumento total de 150X.

Las células teñidas se consideran muertas puesto que el colorante penetró al interior por alguna discontinuidad de la membrana celular.

Criopreservación del semen: El semen fue depositado en un recipiente que contenía 40 ml de diluyente (leche descremada ultra pasteurizada y cualquiera de los siguientes antibióticos: gentamicina, tilosina o lincomicina) y se enfrió paulatinamente hasta llegar a los 5° C. Posteriormente, el semen fue diluido cada 10 minutos mediante la adición del criopreservador (leche descremada ultrapasteurizada con antibiótico y glicerol) hasta obtener una concentración de 45 X 10<sup>6</sup> espermatozoides/ 0.5 ml. El semen diluido se introdujo en una cámara fría a 5° C durante 2 horas para su posterior envasado y congelación en pajillas de 0.5ml. Lo anterior se realizó de manera gradual iniciando de 5° C (cámara fría) hasta alcanzar los -190° C en N líquido.

Descongelación de las pajillas: Las pajillas fueron sumergidas por 30 segundos en baño María a 35° C. Enseguida los espermatozoides fueron recolectados y procesados para la valoración de su integridad empleando los mismos métodos que se utilizaron para evaluar a las células antes de su congelamiento.

Procesamiento para microscopía electrónica: Tanto las muestras de semen recién obtenidas como las que fueron criopreservadas se procesaron para la valoración de la teca perinuclear al microscopio electrónico de transmisión, mediante la técnica de tinción negativa. Para exponer la superficie de la TP los espermatozoides resuspendidos a una concentración de  $35 \times 10^8$  células/ml fueron añadidas de una solución acuosa de Brij 36-T al 10% (70 $\mu$ l /0.5ml de suspensión) y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. El detergente Brij 36-T solubiliza la membrana plasmática y el acrosoma. Las células se centrifugaron a 2500 rpm por 3 minutos y se lavaron con agua desionizada. Las muestras espermáticas fueron fijadas en Karnovsky (Karnovsky, 1965) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 3 minutos, lavadas 2 veces en PBS, dos veces en agua desionizada y resuspendidas en ésta última en su volumen inicial. Después de lavadas, las muestras espermáticas se adsorbieron en rejillas de cobre de 200 mesh cubiertas con membranas de soporte colodión-carbón. Para ello, con la cara cubierta de la rejilla se tocó la superficie de una gota de la suspensión espermática. Se esperaron entre 5 y 10 min para que los espermatozoides quedaran adheridos a la membrana. Se retiró el exceso de muestra y se dejaron secar. Las muestras

fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 0.02% en solución acuosa durante 3 minutos y se enjuagaron pasando la rejilla en una gota de agua destilada. Las rejillas se colocaron sobre papel filtro en cajas de Petri y se cubrieron para permitir que secaran. El procesamiento de estas muestras se realizó en el Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM) y las muestras se observaron en la Unidad de Microscopia Electrónica de la FMVZ, UNAM, en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM-9.

La toma de fotografías de todas las muestras preparadas para microscopia de luz se realizaron en el Departamento de Morfología de la FMVZ, UNAM, empleando para ello un microscopio marca LEICA modelo DMLS, adaptado a un sistema de fotografía digital a una cámara JVC modelo KY-F70B y el software Automontage de Syncroscopy y con un fotomicroscopio marca Leitz modelo Laborlux D con cámara fotográfica de 35mm.

Análisis estadístico: Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de t de Student y la prueba de correlación de Pearson y análisis de regresión con el programa de cómputo SAS.

## **RESULTADOS**

### **Concentración y movilidad de los espermatozoides**

La valoración de la concentración espermática únicamente se realizó en los eyaculados recién obtenidos. En promedio la concentración espermática de los 7 eyaculados que fueron considerados en este estudio fue de  $1.568 \times 10^6$  células/ml, variando de 500 a  $2.200 \times 10^6$  células/ml. Para su congelación los eyaculados fueron diluidos a una concentración de  $45 \times 10^6$  espermatozoides/ 0.5 ml.

Los espermatozoides de los 7 eyaculados que fueron congelados presentaron un mínimo de  $70 \pm 0.85\%$  de movimiento progresivo y una calificación de 2 o 3 de movimiento en masa. Después de su descongelación los espermatozoides presentaron un  $55 \pm 1.03\%$  de movimiento progresivo.

### **Diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos (viabilidad espermática)**

Los resultados obtenidos para la valoración de la viabilidad de los espermatozoides mediante la tinción de eosina al 2%, antes y después del congelamiento, no fueron satisfactorios, ya que todas las células se observaron teñidas con el colorante empleado. Por tal motivo, para realizar esta valoración se decidió utilizar la triple tinción, ya que esta técnica también permite evaluar el porcentaje de mortalidad por contener un colorante supravital (azul de tripan). Empleando ésta prueba los espermatozoides vivos se diferenciaron de los muertos por su afinidad a los colorantes. En el caso de los espermatozoides vivos

la región posacrosomal se tiñe de color café (café de Bismark) (Fig. 1) y en los espermatozoides muertos esta misma región se tiñe de color azul (azul tripan) (Fig. 2).

El porcentaje promedio de viabilidad obtenido para los espermatozoides antes de la congelación fue de 67.43 (variando del 64% al 72%) y para los espermatozoides descongelados el porcentaje fue de 53.14% (variando del 49 al 58%) (Grafica 1). El porcentaje observado fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ,  $t = 86.96$ ).

#### **Integridad de la membrana plasmática**

Empleando la prueba hipósotica para la valoración de la integridad de la membrana plasmática, (ver Material y Métodos) se encontró que los espermatozoides descongelados exhiben un mayor daño en la membrana plasmática. ( $p < 0.05$ ,  $t = 9.36$ ). Antes del congelamiento el porcentaje promedio de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra fue del  $67.8 \pm 0.61\%$  y después de descongelados fue de  $54.3 \pm 2.59\%$  (Gráfica 2). Estos resultados fueron diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ,  $t = 24.78$ ). En la figura 3 se muestran las imágenes espermáticas obtenidas con esta prueba.

#### **Integridad del acrosoma**

Para valorar la integridad del acrosoma se utilizó la triple tinción (ver Material y Métodos). En promedio antes del congelamiento el 90.6% de los espermatozoides presentaron el acrosoma íntegro, de este porcentaje el  $63.1 \pm 1.07\%$  correspondió

a espermatozoides vivos y el  $27.5 \pm 0.95\%$  a espermatozoides muertos (Grafica 3); del 9.3% de los espermatozoides que no presentaron el acrosoma,  $4.3 \pm 0.75\%$  correspondió a espermatozoides vivos (espermatozoides con reacción acrosomal) y  $5 \pm 1.02\%$  a espermatozoides muertos (Gráfica 3). Después de la descongelación el 59.1% de los espermatozoides presentaron el acrosoma intacto ( $43.7 \pm 1.43\%$  vivos y  $15.4 \pm 1.15\%$  muertos) (Grafica 3) y del 40.9% que no presentaron el acrosoma,  $9.4 \pm 0.37\%$  correspondió a espermatozoides con reacción acrosomal (vivos) y  $31.4 \pm 0.99\%$  a espermatozoides muertos (Grafica 3). En todos los datos anteriores hubo una diferencia estadística significativa al hacer la comparación entre medias. La figura 4 muestra el patrón de tinción para cada una de las características evaluadas.

#### **Integridad de la teca perinuclear**

Para la evaluación de la TP se emplearon espermatozoides desmembrados y procesados para su observación al microscopio electrónico de transmisión por la técnica de tinción negativa (ver Material y Métodos). La característica que se tomó en consideración para la valoración de la TP fue la apariencia morfológica de la subestructura de la hoja postacrosomal. De acuerdo a esto, las muestras fueron clasificadas como: "teca integra o normal" cuando la subestructura era en forma de grecas continuas (Fig. 5); "teca alterada" cuando la subestructura presentó algún daño, como la falta de grecas y/o interrupciones en su continuidad (Fig. 6); y "teca ausente" fueron clasificadas las células que no presentaron a la subestructura (Fig. 7).



En las muestras previas al congelamiento, el porcentaje promedio de espermatozoides que presentaron a la subestructura íntegra o normal fue de  $84.8 \pm 1.62\%$ ,  $12 \pm 0.87\%$  presentaron alteraciones en la teca y  $3.2 \pm 3.13\%$  no mostraron a la subestructura (Gráfica 4). El porcentaje para estos mismos parámetros en las muestras descongeladas fue de  $47.4 \pm 2.6\%$ ,  $41.7 \pm 1.87\%$  y  $10.8 \pm 3.46\%$  respectivamente (Gráfica 4). La comparación de medias mostró una diferencia significativa entre las muestras congeladas con respecto a las descongeladas ( $p < 0.05$ ).

En el cuadro 1 se muestra la correlación entre la integridad de la teca perinuclear y los parámetros de la calidad del semen en los espermatozoides antes del congelamiento. Los coeficientes de correlación indican que existió una muy buena correlación ( $r=0.93$ ,  $p<0.05$ ) entre los espermatozoides vivos con reacción acrosomal y el número de espermatozoides positivos a la prueba hiposmótica. En contraste, los espermatozoides con teca perinuclear alterada o ausente ( $r= -0.73$ ,  $r= -0.85$  respectivamente,  $p<0.05$ ) tuvieron una correlación negativa con los espermatozoides con la teca perinuclear normal. No se encontró ninguna correlación entre la integridad de la teca perinuclear y los demás parámetros en estudio (porcentaje de espermatozoides vivos, integridad de membrana y reacción acrosomal).

En las muestras descongeladas, el análisis de correlación (Cuadro 2) mostró un grado de correlación muy bueno entre los espermatozoides vivos y los espermatozoides vivos con acrosoma íntegro, ( $r= 0.97$ ,  $P<0.05$ ). Así mismo, hubo un aumento en el grado de significancia entre el porcentaje de espermatozoides

con la teca perinuclear ausente y el número de espermatozoides vivos. ( $r = -0.76$ ,  $p < 0.05$ ). Igualmente, los espermatozoides con la teca perinuclear ausente presentaron una correlación negativa con el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto ( $r = -0.81$ ,  $p < 0.5$ ) y con el porcentaje de espermatozoides con teca perinuclear normal ( $r = -0.84$ ,  $p < 0.05$ ).

**DISCUSIÓN**

La importancia económica de una alta eficiencia reproductiva en el ganado bovino enfatiza los beneficios de una predicción exacta de la fertilidad del semen post-descongelación. El problema de la criopreservación es que aún con las mejores técnicas de preservación la viabilidad del semen después del congelamiento disminuye al 50%. La baja fertilidad del semen congelado se ha atribuido a una falla en el transporte de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino o al daño que sufren las membranas durante el proceso de la criopreservación. En el espermatozoide las membranas afectadas por la criopreservación incluyen a la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa y las membranas mitocondriales (Watson y col., 1972).

Estudios previos han sido realizados para evaluar el efecto de la criopreservación sobre la ultraestructura del espermatozoide del toro y de otras especies. Sin embargo, estos estudios no han podido correlacionar los parámetros estudiados (integridad de la membrana plasmática y del acrosoma) con la baja de fertilidad observada del semen criopreservado. Este estudio se enfocó a evaluar el daño que es provocado por el proceso de criopreservación sobre la teca perinuclear (TP) del espermatozoide del bovino. Los resultados mostraron que la congelación y la descongelación causaron cambios estructurales en la TP en un alto porcentaje de los espermatozoides ( $52.5 \pm 2.66\%$ ). Los cambios consistieron en alteraciones de la morfología de la subestructura de la TP o en su pérdida. Estos hallazgos concuerdan con la propuesta de que la baja en la fertilidad del semen criopreservado podría ser atribuida no solo a un daño primario de la membrana

plasmática, sino también a daños en otras estructuras sensibles dentro de la célula, resultantes en daños secundarios a la membrana plasmática (Locksley y col., 1988; Jager y col., 1990). Al respecto, se menciona que las lesiones en el espermatozoide pueden ser causadas por los cristales intracelulares que se forman durante el proceso de congelación de las células (Krogenaes y col., 1994; Mazur y Koshimoto, 2002). Como otro posible efecto de la criopreservación, Krogenaes y col., (1994), reflexionan sobre la posible interacción del glicerol con los componentes celulares.

La integridad de la TP es de crucial importancia para el funcionamiento del espermatozoide. En los últimos años diversas investigaciones señalan la participación de la TP en importantes funciones espermáticas como el mantenimiento de dominios de la membrana plasmática de la cabeza, en la integridad del acrosoma y del núcleo y la activación del huevo, entre otras. La membrana que rodea a la cabeza espermática sufre cambios estructurales considerables durante los pasos finales que preceden a la fertilización. Daños en la estructura fina de la membrana plasmática de la cabeza espermática pueden interferir con la capacitación, la RA y la viabilidad del espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra (Buhr, 1989). En este estudio se encontró que después del proceso de descongelación del semen bovino el porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó 21%, en contraste el porcentaje de espermatozoides con teca perinuclear íntegra disminuyó en 44%. Igualmente, el análisis de correlación mostró que los espermatozoides vivos tienen el menor porcentaje de espermatozoides con teca perinuclear ausente o alterada ( $r = -0.76$ ). Contrario a nuestros resultados, Krogenaes y col. (1994) al valorar la integridad de

la membrana plasmática por microscopía electrónica de barrido, después de la descongelación, encontraron un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana íntegra (90%). Sin embargo, cuando realizaron la fertilización *in vitro* con este tipo de espermatozoides, una tercera parte de las células mostraron una pérdida marcada de la membrana plasmática, un hinchamiento notable de la porción anterior del acrosoma y la vesiculación de la matriz acrosomal. De Leeuw y col. (1990) mencionan que la fijación química y la deshidratación de las muestras ya sea para microscopía electrónica de barrido o de transmisión, pueden dar como resultado una serie de artefactos e inclusive que este tipo de métodos no generan una información completa de la ultraestructura de la membrana plasmática. En el presente trabajo se empleó una técnica para microscopía electrónica de transmisión que permitió valorar la superficie de la TP del espermatozoide sin manipular demasiado a la célula.

Se ha reportado que la fertilidad del semen congelado del toro está estrechamente relacionada con la integridad del acrosoma (Saacke y White, 1972). Los resultados mostraron que después de la descongelación del semen un porcentaje alto de espermatozoides ( $59.13 \pm 1.28\%$ ) presentaron el acrosoma, sin embargo sólo el  $43.7 \pm 1.42\%$  de ellos estuvieron vivos. Este último porcentaje coincidió con el porcentaje de espermatozoides que presentaron la TP íntegra ( $47.4 \pm 2.64\%$ ). La TP tiene un importante papel durante la RA. Inmediatamente después del primer contacto entre el espermatozoide y la zona pelúcida del óvulo se inicia la RA. La membrana plasmática de la porción apical de la cabeza espermática inicia su fusión en múltiples sitios con la membrana acrosomal

externa subyacente lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal. De manera importante, la membrana plasmática de la región ecuatorial del acrosoma no participa en el proceso de fusión y es en este sitio donde el espermatozoide interactúa con el óvulo (Flesch y col., 2000). Diversos estudios señalan que este dominio de reconocimiento es mantenido por la TP, ya que es la única estructura en contacto con la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna (sitio inicial de localización de las proteínas espermáticas que interaccionan con la membrana del óvulo). Cabe señalar que aunque la correlación que existió entre los espermatozoides que conservaron la TP normal y los espermatozoides vivos con el acrosoma intacto no fue muy significativa ( $p=0.08$ ) se podría inferir que si un espermatozoide conserva la teca perinuclear intacta, éste mantendrá el acrosoma también íntegro. Para valorar esta relación sería necesario incrementar el número de muestras en estudio. De igual manera, una correlación negativa existió entre el número de espermatozoides con teca perinuclear ausente y el número de espermatozoides vivos con reacción acrosomal, estos datos son consistentes con las con las observaciones realizadas en el espermatozoide del cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999), quienes reportan una pérdida de la subestructura en los espermatozoides que experimentan la RA.

En este estudio la diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos con y sin acrosoma se hizo mediante el uso de la triple tinción. Algunos investigadores señalan que las tinciones supravitales clásicas no son apropiadas para predecir la viabilidad de los espermatozoides descongelados ya que la presencia del glicerol interfiere con la tinción diferencial entre células vivas y muertas (Way, 1995). Los resultados del presente estudio no coinciden con lo anterior pues, el uso de la

triple tinción fue una valiosa herramienta que permitió la identificación de los espermatozoides con y sin acrosoma y de estos diferenciar el porcentaje de vivos y muertos. Una gran desventaja de la técnica es el tiempo que se requiere para la valoración de las muestras de semen. En base a los datos de correlación entre espermatozoides vivos con acrosoma intacto y TP normal, esta técnica podría ser de utilidad en la valoración de la calidad espermática.

### **CONCLUSIONES**

En conclusión, el presente estudio reveló que la TP del espermatozoide del bovino experimenta un daño por el proceso de criopreservación, y que entre mayor sea el porcentaje de espermatozoides con la TP ausente, menor será el número de espermatozoides vivos. Los datos sugieren que posiblemente la baja de fertilidad observada en el semen descongelado esté relacionada con los daños que se producen en la TP. Futuras investigaciones deberán estar diseñadas para tratar de probar esta sugerencia.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- o Aitken, R.: The cell Biology of Fertilization. *The fate of the male germ cell*, edited by Ivell and Holstein Plenum Press. New York, 291-299 (1997).
- o Aul, R.B., y Oko, R.J.: The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev. Biol.*, 239: 376-387 (2001).
- o Bearden, H. Reproducción animal aplicada. El manual moderno. México. 1985.
- o Bedford, J. M.: The coevaluation of mammalian gametes in a comparative overview of mammalian fertilization. B. S. and M.G. A. Editores. Plenum Press. New York. p.p: 3 - 35 (1991).
- o Bellvé, A., O'Brien, D.. Mechanisms and control of animal fertilization. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. Academic Press. United States of America. (1983).
- o Bellvé, A., Chandrika, R., Martinova, Y., Barth, A.: The perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol. Reprod.*, 47: 451 - 465. (1992).
- o Boixo, L., Pérez-Holanda J.: Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. 7ª Jornadas Internacionales de la Reproducción. Murcia España p.p: 61-69 (1994).
- o Buhr, M., Carvin, A., Bauley, L.: Effects of Semen Preservation on Boar Spermatozoa Head Membranes. *Gamete Research.* 23: 441 - 449. (1989).
- o Córdova, A., Pérez, J., Ailb, S., García C. Leob., Saltijeral, O. Hernández, E., Reyes F.: La valoración seminal y la fertilidad de los verracos. (1990).
- o Courtens J. L., Courot M., Flechon, J.: The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J. Ultrastruct. Research.* 57 54 - 64 (1976).

- o Cross, N., Meizel, S.: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod.* 41: 635-641. (1989).
- o De Alba, J.: Reproducción animal. La prensa Médica Mexicana, S.A. México. 1985.
- o De Leeuw, F., Chen, H., Colenberd, L.: Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*. 27. 171-183. (1990).
- o De Leeuw, A., den Daas, J., Woelders, H.: The fix vital stain method. Simultaneous determination of variability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J. Androl.* 12, 112-118. (1991).
- o De Leew A., Dass J., Colenbrander, B. Verkleij, A.: Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 27. 171-183. (1993).
- o Delholn, G., Lawzewitsch, Y. *Leciones de Histologia Veterinaria*. Edit. Hemisferio Sur. Argentina. 1985.
- o Eberhard, T.: Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. *Trends in ecology and evolution*. 10. 438-443 (1995).
- o Escalier, D.: Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round headed human spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 34:287-297 (1990).
- o Fawcett, D.: A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Rep. Suppl.* 2. 90-127 (1970).
- o Fleisch, F., Gadella, B.: Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. et Bio. Acta*. 1469 197-235 (2000).
- o Fouquet J., Kann, M.: The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. 81: 89 – 93 (1994).

- o Gabers, D., First, N., Lardy, H., The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Biol. Reprod.*, 8:598-98 (1973).
- o Garner, D. Prinkel, D. Johnson, L. and Pace M.: Assesment od spermatozoal duntion using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol. Reprod.*, 34: 127-138.(1986).
- o Hafez, E.: Reproducción e inseminación artificial en animales. 5° Edición. Interamericana —McGraw-Hill. México. 1987.
- o Haila, A., Tulsiani, D.: Mammalian sperm acrosome: Formation, contens and function. *Arch. Bioch. Bio.*, 379, No. 2, July 15. 173-182 (2000) .
- o Hancock, J.: A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, 167: 323. (1951).
- o Harrison, R., Vickers, S.: Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88:343-352 (1990).
- o Heras, M., Valcarcel, A., Furnus, C., Perez, L., Moses, D., Baldassarre H.: Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing / thawing, not detected by light microscopy. *Anim. Reprod. Sci.*, 45: 81 – 89 (1996).
- o Hingst, O., Blottner, S., Franz, C.: Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia*, 27: 275-279 (1995).
- o Holt, W.: Can we predict fertility rates? Making sence of sperm motility. *Reprod. Som. Anim.* 31: 17-24 (1996).
- o Hoskins, D., Brandt, H., Acott, T.: Initiation of sperm motility in the mammalian espididymis. *Fed. Proc.* 37: 2534-42 (1978).

- o Iguer- Ouada, M., Verstegen, J.: Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriology*. 55: 671 -84 (2001).
- o Jager, S., Wijchman, J., Kremer, J.: Studies on the descondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zoo.*, 256: 315 - 322 (1990).
- o Juárez - Mosqueda, M., Mujica, A.: A perinuclear theca substructure is formed during epididymal Guinea pg sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J. Struct. Biol.*, 128: 225 - 236 (1999).
- o Jones, R., Stewart, D.: The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 56: 233 - 238 (1979).
- o Karnovsky, M.: A formaldehyde - Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Bio.*, 27: 137A (1965).
- o Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Borkiewicz, H., Perry, A., Yanagimachi, H.: Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, 58: 1407-1415 (1998).
- o Kjaestad, H., Ropstad, E., Andersen, K.: Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vett. Scand.*, 34: 299-303. ( 1993).
- o Koehler, A.: A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J. Ultrastruct. Res.* 35: 598-614 (1970).
- o Krogenaes, K., Berg, A., Hafne, A., Engeland, E: Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Vet. Scand.*, 35: 17-26 (1994).
- o Lalli, M., Clemont, Y.: Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am. J. Ant.*, 160: 419 - 343 (1981).

- o Larson, K.: Boar sperm viability after freezing and thawing on deep freezing of boar semen. Uppsala Sweden. p.p. 177-187 (1985).
- o Locksley, E., Yang, H., Walterson, M.: Manifestations of Cell Damage After Freezing and Thawing. *Cryobiology*, 25: 178 – 185 (1988).
- o Longo, F., Cook, S.: Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:380-393 (1991).
- o Mc. Gann, L., Yand, H., Walterson, M.: Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology*, 25: 178 - 185 (1989).
- o Mann, T., Lutwak, M.: Male reproductive function and denme. Springer-Verlog. New York (1981).
- o Mazur, P., Koshimoto, C.: Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates?. *Biol. Reprod.* 66: 1485-1490 (2002).
- o Moore, K.: Embriologia Clínica. 2ª impresión, Interamericana. México. 1985.
- o Mújica, A., Navarro-García, F., Hernández-González, O., Juárez Mosqueda, M.: Perinuclear Theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique*, 61:76-87 (2003).
- o Oko, R., Clermont, Y.: Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 39: 673 – 687 (1988).
- o Oko, R., Clermont, Y.: Origin and distribution of perforatorial proteins during spermatogenesis of the rat: an immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 230: 489 – 501 (1991).
- o Oko, R., Maravei, D.: Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 50: 1000 – 1014 (1995).

- o Oko, R., Morales.: A novel testicular protein with sequence similarities to a family of lipid binding proteins is a mayor component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev. Biol.*, 166: 235-245 (1994 b).
- o Ostermeier, G., Sartor, R., Susko, L., Parrish, J., B.: Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag. Biotech. Net.*, Vol. 2 Sept. (2000).
- o Pace, M.: Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French Straws. *J. Anim. Sci.*, 53: 3 693 –701 (1981).
- o Pasteur, M., Sabido, O., Maubon, I., Perrin\_Cottier, M., Laurent, M.: Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing. A flow citometric study. *Anal. Quanti. Cytol. Histol.*, 13: 383-390 (1991).
- o Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P.: The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Cell.*, 92: 255-266 (2000).
- o Pursel, V., Johnson, G.: Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrate semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40 (1). 99-102. (1974).
- o Rodriguez-Martinez, H.: Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. *International Veterinary Information Service*, 10 – Jul. (2000).
- o Rodriguez-Martinez, H., Laarson, B., Pertof, H.: Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9: 297-308 ( 1997).
- o Royere, D., Hamaman, A., Nicolle, S., Bartheleny, J., Lansac, J., Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and feulgen DNA cytophometric studies. *Gamete Research*, 21: 51-57 (1988).

- o Saacke, R., Marshall, C.: Observación on the acrosomal cap of the fixed and onfixed bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 16: 511-514 (1968).
- o Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G.: The removal of the sperm perinuclear theca and it's association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Developmental Biology*, 188: 75-84 (1997).
- o Talbot, P., Chacon, R.: A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*, 215, 201-208. (1981).
- o Tamuli, M., Watson, P., Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub population. *Animal Reproduction Science*, 35: 247-254 (1994).
- o Tasseron, F., Amir, D., Schindler, H.: Acrosome damage on ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J Reproduction Fertility* 51: 461 – 462 (1977).
- o Thun, R., Hurtado, M., Janett, F.: Comparision of biociphos-Plus and TRIS-eg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57: 1087-1094 (2002).
- o Valencia J.: Inseminación Artificial. En Galina, C. Sltiel, A. *Reproducción de animales domésticos* Editorial Noriega Editores Limusa. México, 1986.
- o Vazquez, J., Carrizosa, J.: Identificación del estado del acrosoma y viabilidad de los espermatozoides por una técnica de triple tinción. 4as jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Leon Comunicaciones: 35-38. (1980).
- o Vazquez, J., Martinez, E., Roca, J., Matas, C., Blanco, O.: The fertilizing ability aessment of fresh and stored boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 267-270. (1988).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- o Visconti G., Bailey, G., Leclerc, P., Connors, S., Pan, D., Kopf, G., *Development*, 121. 1139-1150 (1995).
- o Ward, W., Kimura, Y., Yanagimachi, R.: An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development, *Biology of Reproduction*, 60: 702-706 (1999).
- o Ward, W., Kishikawa, B.: Further evidence that sperm nuclear protein are necessary for embryogenesis. *Zigote*, 8: 51-56 ( 2000).
- o Watson, P., Martin, C.: A comparison of changes in the acrosomes of Deep Frozen Ram and Bull Spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28: 99 – 101 (1972).
- o Watson P. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record*, 97: 12-15 (1975)
- o Watson, P., Plummer, J. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In "First International conference on deep freezing of boar semen. (L.A. Johnson and K. Laarson Eds). p.p. 199-222. Uppsala. (1985).
- o Way, A. Henailt, M., Killan, G., Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculates and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1301-16 (1995 ).
- o Yagi, A., Paranko, J.: *Anat. Rec.* 233, 61-74. (1995).
- o Yanagimachi, R., Mamalian fertilization. In E. knobil and J.D. Neill (editors). The physiology of repeeduction. Vol 1 Raven Press, New York, p.p: 189-318. (1994).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



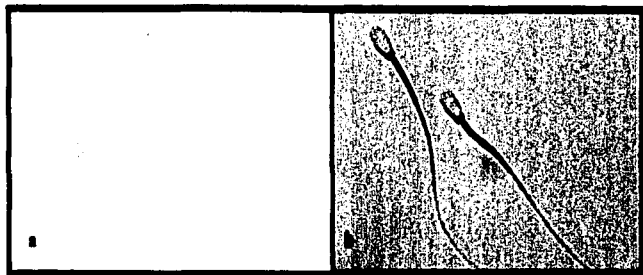
## **FIGURAS Y GRAFICAS**

**Figura 1.** Fotomicrografía de un espermatozoide vivo de bovino teñido con la técnica de la triple tinción. La región postacrosomal se observa teñida de color café y la región del acrosoma sin teñir. Los espermatozoides teñidos con este patrón se clasificaron como vivos con reacción acrosomal. 1250X.



**Figura 2.** Fotomicrografía de un espermatozoide muerto de bovino (flecha). Los espermatozoides fueron teñidos con la técnica de la triple tinción. La región postacrosomal se tiñó de color azul y la región acrosomal permaneció sin teñir. Este tipo de células fueron clasificadas como espermatozoides muertos sin acrosoma. 1250X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3. Integridad de la membrana plasmática valorada con la prueba hipoosmótica. Sólo los espermatozoides con la membrana plasmática íntegra responden de manera positiva a esta prueba a) Espermatozoide positivo a la prueba, observe el enrollamiento del flagelo a nivel de la pieza media (800X). b) Espermatozoide negativo a la prueba (500X).**

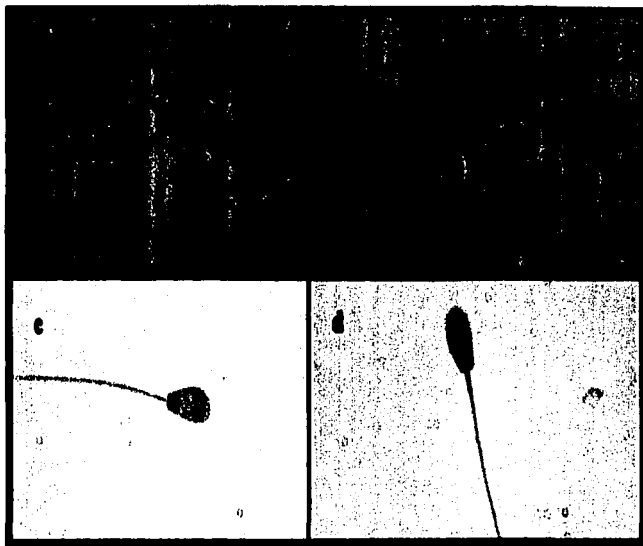


Figura 4. Fotomicrografías mostrando las cuatro categorías espermáticas determinadas por la técnica de la triple tinción para valorar el acrosoma. a) Espermatozoide vivo con el acrosoma íntegro; b) espermatozoide vivo sin acrosoma (e) (con reacción acrosomal); c) espermatozoide muerto con acrosoma; d) espermatozoide muerto sin acrosoma.

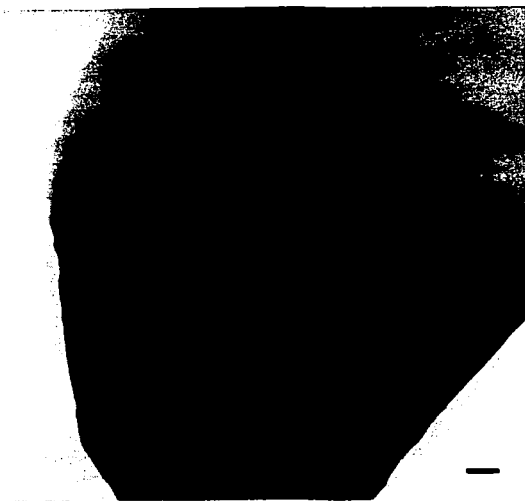


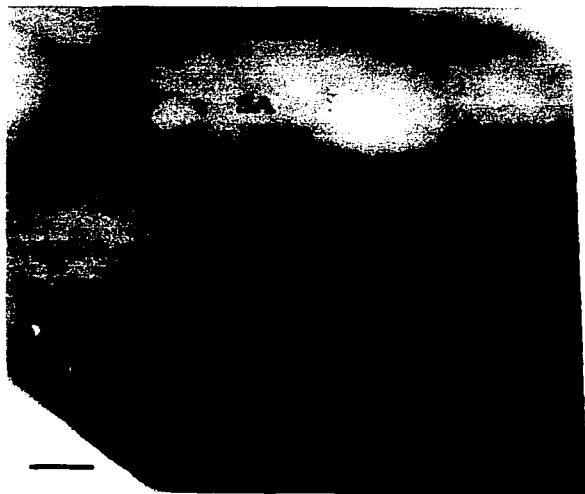
Figura 5. Microcopia electrónica de la cabeza de un espermatozoide de bovino con la teca perinuclear expuesta. Las flechas señalan la forma característica de la subestructura íntica en el espermatozoide del bovino. SA: hoja subcrosomal; PA: hoja postcrosomal. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



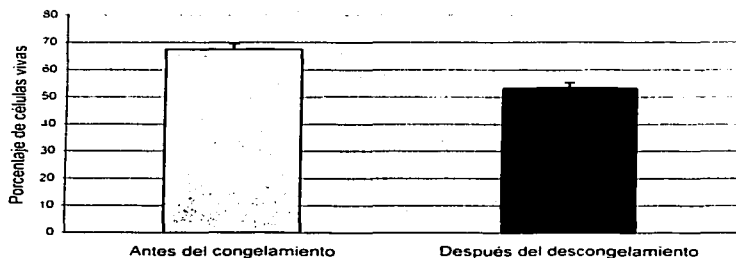
Figura 6. Tinción negativa de la cabeza de un espermatozoide desmembrado de bovino. Las flechas señalan las alteraciones morfológicas que se presentaron en la subestructura de la teca perinuclear. SA: hoja subacrosomal; PA: hoja postacrosomal. Barra 500nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

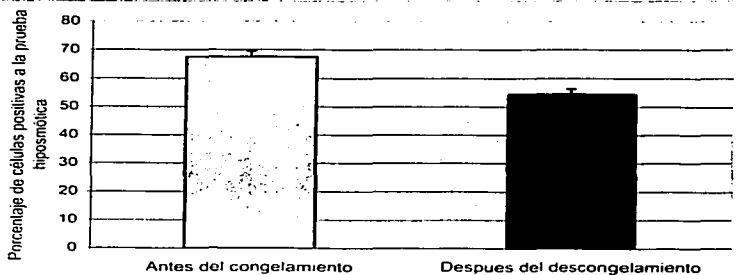


**Figura 7.** Tinción negativa de un espermatozoide desmembrado de bovino. Observe la ausencia de la subestructura en la región apical de la hoja postacrosomal (flecha). SA: hoja subacrosomal; PA: hoja postacrosomal. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

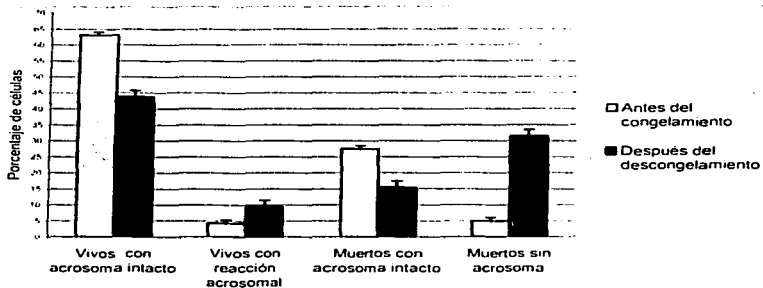


**Gráfica 1.** Porcentaje promedio de espermatozoides vivos antes y después del proceso de criopreservación del semen de bovino. Los espermatozoides fueron evaluados con la técnica de la triple tinción. Existió una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos porcentajes. Error Estándar (E.E) en las muestras antes del congelamiento = 0.97, en las muestras después del congelamiento E.E = 1.18

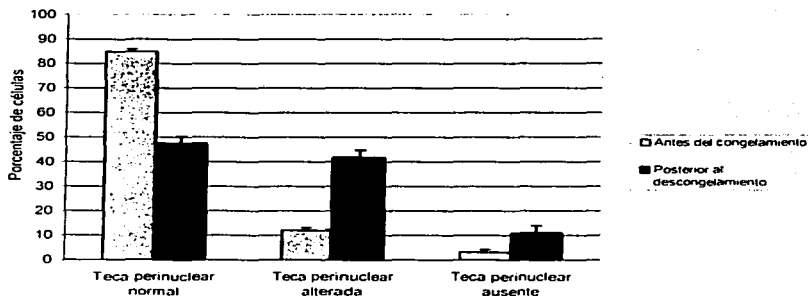


**Gráfica 2.** Porcentaje promedio de espermatozoides que presentaron la membrana plasmática íntegra antes de la congelación y después de la congelación del semen. La prueba utilizada para valorar la funcionalidad de la membrana plasmática fue la prueba hiposmótica. La diferencia entre medias fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) Error Estándar (E.E) en las muestras antes del congelamiento = 0.61, en las muestras después del congelamiento E.E = 2.59

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 3.** Integridad del acrosoma en los espermatozoides antes y después del proceso de criopreservación del semen de bovino. Los espermatozoides fueron teñidos con la técnica de la triple tinción y evaluados al microscopio de luz. Se encontró una diferencia significativa entre medias ( $p < 0.05$ ). E.E. en muestras antes del congelamiento: 1.07, 0.74, 0.94, 1.02 respectivamente. E.E. en las muestras descongeladas: 1.42, 0.36, 1.15, 0.99, respectivamente.



**Gráfica 4.** Integridad de la teca perinuclear, tomando como marcado morfológico la integridad de la subestructura de la hoja postacrosomal, antes del congelamiento del semen y posterior a su descongelación. La evaluación se realizó en el microscopio electrónico de transmisión en muestras desmembradas y procesadas por tinción negativa. Existió diferencia significativa entre muestras ( $p < 0.05$ ). E.E. en muestras antes del congelamiento: 1.62, 0.87, 1.14 respectivamente. E.E. en las muestras descongeladas: 2.64, 1.87, 3.46 respectivamente.



**Cuadro 1.** Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en las muestras descongeladas. Los cuadros sombreados indican las correlaciones significativas. ( $p < 0.05$ )

	Vivos	Int. Membrana	VAI	VRA	TP Normal	TP Alterada	TP Ausente
Vivos	1	0.05 P=0.91	0.73 P=0.05	0.23 P=0.61	0.02 P=0.96	-0.22 P=0.62	0.14 P=0.76
Int. Memb.			-0.59 P=0.15	0.93 P=0.002	0.34 P=0.44	0.08 P=0.84	-0.56 P=0.18
VAI				0.48 P=0.27	0.22 P=0.62	-0.1 P=0.82	0.4 P=0.37
VRA					0.35 P=0.42	-0.14 P=0.75	-0.39 P=0.37
TP Normal						-0.73 P=0.05	-0.85 P=0.01
TP Alterada							0.28 P=0.53
TP Ausente							1

\*Int. Mem: Integridad de membrana

\*VAI: Vivos con acrosoma intacto

\*VRA: Vivos con reacción acrosomal

\*TP: Teca perinuclear

**Cuadro 2.** Coeficientes de correlación obtenidos mediante la prueba de correlación de Pearson en las muestras descongeladas. Los cuadros sombreados indican las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ )

	Vivos	Int. Memb	VAI	VRA	TP Normal	TP Alterada	TP Ausente
Vivos	1	0.14 P=0.75	0.97 P=0.0002	-0.56 P=0.18	0.64 P=0.11	0.49 P=0.25	-0.76 P=0.04
Int. Memb.			0.003 P=0.99	0.45 P=0.31	0.25 P=0.58	-0.38 P=0.25	0.01 P=0.97
VAI				-0.73 P=0.06	0.69 P=0.08	0.51 P=0.24	-0.81 P=0.02
VRA					-0.64 P=0.12	-0.38 P=0.39	0.69 P=0.08
TP Normal						0.14 P=0.75	-0.84 P=0.01
TP Alterada							-0.65 P=0.11
TP Ausente							1

\*Int. Mem: Integridad de membrana

\*VAI: Vivos con acrosoma intacto

\*VRA: Vivos con reacción acrosomal

\*TP: Teca perinuclear

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**