

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA



**Criopreservación de semen ovino
empleando diferentes dilutores y
combinaciones de agentes
crioprotectores permeantes y no
permeantes**

TESIS
para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTORA
Rocío Silvia Sandoval Monzón

LIMA-PERÚ
2005

Dedicatorias

A mi madre, Silvia Monzón y a mi mamita, Carmen Gutiérrez, porque con su coraje e infinito amor, hicieron que termine mi carrera.

A mi familia, mis hermanos y mi tío Alfonso, por apoyarme siempre.

A Felipe, el amor de mi vida y compañero inseparable, porque estuvo siempre a mi lado en el fascinante mundo de la veterinaria.

A mi establo querido, por que fue cómplice de mis logros.

A los ovinos, Zeus, Jacobo, Abraham y Goliat, porque participaron de este trabajo.

A mi Facultad y a San Marcos, mi gratitud eterna.

Agradecimientos

A mi director de tesis y amigo, Alexei Santiani, por apoyarme incondicionalmente en este trabajo y por todas sus enseñanzas.

A Felipe, por su importante participación en este trabajo.

A mis asesores, Víctor Leyva, Luis Coronado y Alfredo Delgado, por sus sugerencias y recomendaciones.

A Katya, María, Antoni y Frank, por colaborar incondicionalmente con este trabajo.

A Milena y Lucía, por apoyarme siempre.

Al Laboratorio de Reproducción Animal, por abrirme sus puertas.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN LITERARIA	3
2.1. Características reproductiva del carnero	3
2.2. Características del semen de carnero	4
2.2.1. Plasma Seminal	4
2.2.2. El espermatozoide de carnero	5
2.3. Fisiología del espermatozoide	6
2.3.1. Procesos metabólicos de los espermatozoides	6
2.3.2. Procesos fisiológicos del espermatozoide	7
2.4. Criopreservación de semen	21
2.4.1. Principios básicos de la criopreservación	21
2.4.2. Métodos de criopreservación	23
2.4.3. Protocolo de criopreservación de semen ovino	24
2.4.4. Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide	25
2.5. Composición de diluyentes para congelar semen	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Procedimiento experimental	37
3.2. Procedimiento metodológico	39
3.3. Análisis Estadístico	43

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Experimento 1: Efecto de tres dilutores hipertónicos	44
4.2. Experimento 2: Efecto de diferentes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes	46
5. CONCLUSIONES	51
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7. APÉNDICES	65

LISTA DE CUADROS

Nº	TÍTULO	PÁG.
Cuadro 1.	Características del semen ovino	4
Cuadro 2.	Componentes químicos del semen ovino	5
Cuadro 3.	Intervalo de capacitación y composición lipídica de espermatozoides de los diferentes mamíferos	12
Cuadro 4.	Características biofísicas de algunos crioprotectores permeantes	32
Cuadro 5.	Características biofísicas de los crioprotectores no permeantes	34
Cuadro 6.	Valoración de la motilidad masal para semen ovino	39
Cuadro 7.	Valores promedio (%) post-descongelamiento de semen ovino criopreservado con tres dilutores diferentes.	45
Cuadro 8.	Valores promedio (%) post-descongelamiento de semen ovino criopreservado con diferentes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes.	47

LISTA DE FIGURAS

Nº	TITULO	PÁG.
Figura 1.	Esquema del cambio de los niveles de colesterol en el espermatozoide durante su traslado por el tracto reproductivo del macho (A) y de la hembra (B).	11
Figura 2.	Esquematación de los principales eventos de la capacitación espermática	14
Figura 3.	Diagrama del proceso de reacción acrosomal espermática	16
Figura 4.	Diagrama de la participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosomal en el espermatozoide	18
Figura 5.	Esquematación del proceso de reacción acrosomal en el espermatozoide.	20

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de cuatro combinaciones de dos agentes crioprotectores permeantes más dos no permeantes sobre la calidad del semen ovino post-descongelamiento. Para esto, primero (Experimento 1) se seleccionó, entre tres dilutores (A, B y C), el más adecuado para ser usado en la segunda parte (Experimento 2), en la cual se evaluaron las siguientes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes: 1) Glicerol - Trehalosa, 2) Glicerol - Sacarosa, 3) Etilenglicol - Trehalosa y 4) Etilenglicol - Sacarosa sobre la calidad del semen ovino post-descongelamiento. Para tal efecto, se realizaron 6 repeticiones para el Experimento 1 y 8 repeticiones para el Experimento 2. Cada repetición constó de 4 eyaculados cada una. En el experimento 1 se encontró que el Dilutor A mantenía mejor la motilidad progresiva y viabilidad e integridad acrosomal post-descongelamiento (69% y 63%) en comparación con el Dilutor B (37% y 35%) y el Dilutor C (23% y 23%). Por lo cual, el Dilutor A fue empleado en el experimento 2. En el experimento 2 se encontró que la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, la termoresistencia y la integridad de membrana plasmática post-descongelamiento fue mejor en los grupos con glicerol-sacarosa (64%; 56%; 40% y 63%) y glicerol-trehalosa (64%; 58%; 38% y 60%) en comparación con los grupos con etilenglicol-sacarosa (48%; 42%; 25% y 37%) y etilenglicol-trehalosa (44%; 38%; 27% y 40%). Lo cual demuestra que el glicerol es un mejor crioprotector permeante en comparación con el etilenglicol. Sin embargo, no existe diferencia en el uso de sacarosa o trehalosa. Se concluye que un dilutor con las características del dilutor A, utilizando glicerol más trehalosa o sacarosa constituye una buena alternativa para la criopreservación de semen ovino.

Palabras claves: Criopreservación de semen, ovinos, agentes crioprotectores permeantes y no permeantes.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of four combinations of two permeant and two non permeant cryoprotectant agents on the quality of post thaw ram semen. In Experiment 1, three extenders were evaluated (A, B, and C) in order to have the better one for the next step. In Experiment 2, different combinations of cryoprotectant agents were evaluated as follows: 1) Glycerol-Trehalose, 2) Glycerol-Sucrose, 3) Ethyleneglycol-Trehalose, and 4) Ethyleneglycol-Sucrose. In this way, 6 assays for Experiment 1 and 8 assays for the Experiment 2 were carried out. In each assay, 4 ejaculates were mixed to work as an original sample. Percentages of motility, viability and acrosomal integrity in extender A were higher (69% and 63%) than extender B (37% and 35%) and extender C (23% and 23%). Therefore, extender A was used for experiment 2. In the experiment 2, motility, viability and acrosomal integrity, thermoresistance, and plasmatic membrane integrity were higher in groups Glycerol-sucrose (64%; 56%; 40%, and 63%) and Glycerol-trehalose (64%; 58%; 38%, and 60%) in comparison with groups Ethyleneglycol-sucrose (48%; 42%; 25% and 37%) and Ethyleneglycol-trehalose (44%; 38%; 27% and 40%). However, there is not significant differences between sucrose or trehalose. In conclusion, an extender with characteristics of extender A, it means, using glycerol plus trehalose or sucrose constitute a good alternative for cryopreservation of ram semen.

Key words: Semen cryopreservation, rams, permeant cryoprotectors agents and non permeants.

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas utilizadas para conseguir un rápido progreso genético. Sin embargo, los resultados de la inseminación artificial con semen congelado resultan hasta ahora insatisfactorios en ovinos, debido a la baja tasa de fertilidad. Este hecho podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación. Dichos daños se producen en las membranas del espermatozoide, lo cual altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y produciendo la capacitación espermática prematura. Consecuentemente, los espermatozoides solo serían viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra, y por lo tanto tendrían una menor oportunidad de poder fecundar a los ovocitos. Dentro de dicho contexto se hace necesario buscar la alternativa para prevenir daños en los espermatozoides durante su criopreservación y así lograr mejores tasas de fertilidad en las ovejas sometidas a la técnica de la inseminación artificial.

Los daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación podrían ser prevenidos parcialmente controlando la velocidad de congelamiento, usando un dilutor adecuado y agregando agentes crioprotectores apropiados. En la criopreservación de semen ovino, se ha venido evaluando diferentes tipos de dilutores y agentes crioprotectores (permeantes y no permeantes) obteniéndose resultados muy variables.

Los crioprotectores permeantes son sustancias que por su bajo peso molecular, pueden atravesar la membrana plasmática, donde tienen la función

de evitar la formación intracelular de cristales de hielo y también evitar la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta. Entre los más utilizados están glicerol y etilenglicol. Siendo el glicerol el que ha mostrado mejores resultados en estudios de criopreservación de semen ovino en relación a la motilidad progresiva post descongelamiento. Sin embargo, en otras especies, el etilenglicol ha mostrado un efecto similar o mejor que el glicerol. En contraste con los anteriores, los crioprotectores no permeantes son sustancias que por su alto peso molecular, resultan útiles cuando se tienden a aplicar velocidades rápidas de congelación. Su acción crioprotectora esta asociada con su actividad deshidratante y su interacción específica con la membrana fosfolipídica. Por lo que suelen usarse en asociación con los agentes permeantes. Los crioprotectores no permeantes más utilizados para la congelación de semen de diferentes especies son: sacarosa, rafinosa, trehalosa y lactosa. La adición de trehalosa y sacarosa al dilutor ha obtenido buenos resultados en la criopreservación de semen ovino.

La presente investigación comprendió un estudio previo (Experimento 1), que tenía por finalidad seleccionar entre tres dilutores (Dilutor A, Dilutor B y Dilutor C), al más adecuado para ser usado en los tratamientos del estudio principal (Experimento 2). Este último consistió en evaluar cuatro combinaciones de 2 agentes crioprotectores permeantes (glicerol y etilenglicol) y 2 agentes crioprotectores no permeantes (trehalosa y sacarosa) sobre los parámetros de calidad espermática post-descongelamiento de semen ovino: motilidad progresiva, viabilidad e integridad acrosomal, integridad de membrana y termoresistencia.

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1. Características reproductivas del carnero

Los ovinos son animales poliestruales estacionales, con una estacionalidad reproductiva regida por el fotoperíodo, su efecto es más marcado en las hembras que en los machos. Los machos no llegan a ser infértiles durante la estación no reproductiva, pero muestran una disminución en el tamaño testicular y con ello una disminución de la producción de espermatozoides. Por tanto, la actividad sexual suele ser más intensa y eficiente durante la estación reproductiva que se da con el fotoperíodo decreciente. Cuando disminuye el número de horas diarias de luz se estimula la secreción de FSH, LH y testosterona (Coy, 1995a). Sin embargo, la actividad sexual puede ser modificada por otros factores como la temperatura, alimentación, enfermedad y el estrés (Jainudeen y col., 2000).

La pubertad en el carnero es una etapa relativamente larga, que se caracteriza por un aumento progresivo de la secreción de testosterona, de la espermatogénesis y del tamaño testicular (Coy, 1995a). Recién entre los 4 a 6 meses de edad se presentan las primeras cópulas con eyaculación de espermatozoides viables, momento en el que alcanzan un 40 a 60 % del peso del animal adulto. Al igual que en el vacuno y caprino, la madurez sexual se correlaciona mejor con el peso corporal que con la edad (Jainudeen y col., 2000). Sin embargo, la producción de semen de un carnero adulto no se alcanza hasta que los testículos pesen alrededor de 100 g (Lapwood, 1986).

2.2. Características del semen de carnero

El semen está conformado por una fracción líquida o plasma seminal y una fracción celular que la conforman los espermatozoides (Garner y Háfez, 2000). A partir de diversos reportes (ver Cuadro 1), se tiene que en promedio el carnero tiende a eyacular una cantidad de semen que oscila entre 0.75 a 2 mL., conteniendo una alta concentración de espermatozoides, los cuales son altamente viables.

Cuadro 1. Características del semen ovino.

Autor y año	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Móviles (%)	Vivos con acrosoma (%)	Integridad de membrana (%)
Garner y Háfez, 2000	0,8 - 1,2	2000-3000	60-80		
Paulenz y col., 2002	0,75 - 2,0	> 3500	> 70		
Gil y col., 2003 ^a	0,75 - 2,0	> 2500	> 70		
Santiani y col., 2004			80-95	83-95	70-90
Aisen y col., 2000			79-88	90-95*	

* Porcentaje de espermatozoides móviles con el acrosoma íntegro

2.2.1. Plasma Seminal

El plasma seminal ovino está compuesto por las secreciones provenientes de la próstata y de las glándulas vesiculares y bulbouretrales. Durante la eyaculación, dichas secreciones son vertidas hacia la uretra generándose así una mezcla con la suspensión de espermatozoides y las secreciones ampulares del conducto deferente (Garner y Hafez, 2000).

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, dado que es posible inducir la preñez por inseminación empleando espermatozoides colectados del epidídimo. Sin embargo, el plasma seminal sí muestra ser un componente esencial en el apareamiento natural porque actúa como portador y protector de los espermatozoides (Garner y Hafez, 2000), situación que es más

importante en el apareamiento de la oveja y la vaca, en las cuales el eyaculado es depositado en la vagina.

Dentro de todos los componentes del plasma seminal ovino descritos en el Cuadro 2, la fructosa y el ácido cítrico vienen a ser los componentes considerados de mayor importancia en los rumiantes.

Cuadro 2. Componentes químicos del semen ovino (Garner y Hafez, 2000)

Componentes químicos	Valores (mg/100 mL)
pH	5.9 – 7.3
Proteína	5000
Fructosa	250
Sorbitol	26 – 170
Ácido cítrico	110 – 270
Inositol	7 – 14
Glicerilfosforilcolina	1 100 – 2 100
Sodio	178 ± 11
Potasio	84 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0.8
Cloruro	86

2.2.2. El espermatozoide de carnero

Los espermatozoides maduros son célula alargadas conformadas por una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular (Garner y Hafez, 2000).

La célula espermática del carnero está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática (Garner y Hafez, 2000), cuya composición lipídica es notablemente diferente a la de las demás células somáticas. Los lípidos vienen a ser las sustancias que confieren la característica de permeabilidad de la membrana espermática (Martínez y Morros, 1996). A su vez juegan un rol importante en los procesos de maduración y de capacitación espermática. Además de estar involucrados en el proceso de fecundación o de fusión celular (Sanocka y Kurpisz, 2004). La composición de la membrana del espermatozoide

de carnero esta conformada por colesterol ($4.33 \text{ mol} \times 10^8$) y principalmente por fosfolípidos ($11.56 \text{ mol} \times 10^8$), que están ligados en su mayoría a ácidos grasos insaturados ($8.79 \text{ mol} \times 10^8$) (Davis, 1981).

Morfológicamente el espermatozoide está conformado por una cabeza, en la cual se encuentra el acrosoma y por un flagelo o cola. La cabeza está conformada por el núcleo, el cual es aplanado y de apariencia oval y que a su vez contiene una cromatina dispuesta de manera muy compacta (Garner y Hafez, 2000). El acrosoma es la parte anterior que recubre al núcleo espermático, es un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo. En el acrosoma están contenidas varias enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de la fecundación, como la proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácido-hidrolasas (Mann y Lutwak-Mann, 1981). La cola espermática está conformada por un cuello y tres segmentos subsiguientes, el medio, el principal y el caudal. El segmento medio está comprendido entre el cuello y el anillo citoplásmico y está conformado por el axonema, las fibras densas y numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal. El segmento principal continúa en sentido posterior al anillo citoplásmico y está conformado por el axonema y las fibras densas asociadas. Finalmente, el segmento caudal está conformado únicamente por el axonema y la membrana plasmática (Garner y Hafez, 2000).

2.3. Fisiología del espermatozoide

2.3.1. Procesos metabólicos de los espermatozoides

Aunque los espermatozoides carecen de muchas de las organelas, poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas como la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de electrones (Mann, 1975). La energía requerida para la motilidad proviene de reservas intracelulares de ATP cuyo empleo está regulado por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), compuesto que también interviene directamente sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973).

Los espermatozoides degradan los azúcares, glucosa, fructosa o manosa, a

ácido láctico bajo condiciones anaerobias. Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, dado que la fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias, característica que es importante de considerar durante el almacenamiento de espermatozoides para fines de inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

El espermatozoide utiliza una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, actividad respiratoria que le permite emplear el lactato y el piruvato resultantes de la fructólisis de los azúcares, generando dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis en producir energía. Aunque gran parte del ATP es empleado como fuente de energía para la actividad de motilidad espermática, parte de ésta es destinada al mantenimiento de la integridad de los procesos que intervienen en el transporte activo que se dan a nivel de las membranas del espermatozoide, procesos de transporte activo cuya función es la de mantener la concentración de los componentes iónicos vitales para la célula espermática. De existir ausencia de sustratos exógenos para generar energía (White, 1980), los espermatozoides hacen uso de sus reservas intracelulares de plasmalógeno para dicho fin, pero siendo útil sólo a corto plazo.

2.3.2. Procesos fisiológicos del espermatozoide

2.3.2.1. Proceso de espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los gametos sexuales del macho. Está conformada por dos fases: la espermacitogénesis y la espermiogénesis (Garner y Hafez, 2000).

La espermacitogénesis consiste en una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias. Estas se dividen varias veces antes de formar a los espermatocitos. Las divisiones de la espermatogonia madre no ocurren al mismo tiempo, sino más bien, cada una comienza una propia nueva onda de divisiones a intervalos regulares de tiempo. Así, al comenzar nuevos ciclos, siempre existirá un abastecimiento continuo de espermatocitos (Coy, 1995a). Luego, éstos experimentan una meiosis que reduce su contenido de ADN a la mitad del que

tienen las células somáticas, originándose así las espermátidas (Garner y Hafez, 2000).

Seguidamente, se da inicio de la espermiogénesis, proceso en el cual se da una serie secuencial de cuatro fases de transformaciones morfológicas: a) fase de Golgi, b) fase de capuchón, c) fase acrosomal y d) fase de maduración; generándose como producto final al espermatozoide propiamente dicho. Posterior a esto, se produce la liberación de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos, etapa a la cual se le denomina con el nombre de “espermación”(Garner y Hafez, 2000).

2.3.2.2. Maduración de gametos

Los espermatozoides son luego transportados, desde los testículos, al epidídimo, lugar en el cual han de completar su proceso de maduración a medida que son transportados a través de éste. Durante este proceso adquieren la habilidad potencial para fecundar. En el carnero, el tiempo que dura este proceso es de 16 días (Garner y Hafez, 2000).

La maduración del espermatozoide implica en sí, cuatro cambios funcionales de importancia (Garner y Hafez, 2000): a) desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida, b) cambios metabólicos, c) cambios en la superficie de la membrana plasmática, d) migración distal y pérdida de la inclusión citoplasmática.

Durante el desarrollo de la motilidad espermática se dan cambios cualitativos y cuantitativos en los patrones metabólicos presentes en el aparato flagelar. La motilidad espermática no se manifiesta en el epidídimo, esto se debe a la presencia de sustancias secretadas por las células epiteliales, como es el caso de la “inmovilina” y el “factor de quiescencia”, hecho que probablemente tendría por objetivo el impedir un metabolismo innecesario y con ello, prolongar la vida de los espermatozoides (Garner y Hafez, 2000).

A medida que van progresando a través del epidídimo, el metabolismo de los espermatozoides cambia gradualmente de un metabolismo oxidativo (aerobio) a uno glicolítico (anaerobio). Durante esta etapa, el metabolismo es reducido y por consiguiente ahorran energía (Coy, 1995b). Asimismo, la membrana del acrosoma

es revestida de colesterol, sustancia contenida en grandes cantidades en las vesículas flotantes presentes en los túbulos seminíferos, fortaleciéndola e impidiendo la liberación de sus enzimas. (Guyton y Hall, 2000).

Aunque se dice que los espermatozoides están maduros cuando abandonan el epidídimo, su actividad es frenada por múltiples factores que son secretados por los conductos genitales del macho. Por tanto, inmediatamente después de su expulsión en el semen, son incapaces de hacer su tarea de fecundar el ovocito (Guyton y Hall, 2000).

2.3.2.3. Transporte de gametos

Durante la monta natural en la oveja, el semen es depositado entre el extremo craneal de la vagina y la entrada de la cérvix. El ambiente del tracto genital femenino no es favorable para la supervivencia de los espermatozoides, que son reconocidos por los leucocitos como células extrañas. Aquellos reservorios con condiciones para permitir la sobrevivencia y facilitar el transporte de los espermatozoides dentro del tracto reproductor de la hembra son la cérvix, la unión útero-tubárica y el interior de la propia ampolla oviductal. Se requieren horas para que estos reservorios se vayan llenando y finalmente se liberen poco a poco los espermatozoides almacenados. El transporte se realiza mediante una combinación de la propia motilidad espermática y de los movimientos peristálticos del tracto reproductivo de la hembra (Coy, 1995b).

Durante su transporte en el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides experimentan una serie de cambios que le confieren la habilidad de poder fecundar al ovocito, siendo los tres procesos vitales para que ello ocurra (Coy, P. 1995b), la capacitación espermática, la adquisición de la hipermotilidad espermática y la reacción acrosomal. Seguidamente se detallará cada proceso.

2.3.2.4. Capacitación espermática

En 1951, Chang y Austin sugirieron que existía un proceso de capacitación espermática previo a la fecundación. Actualmente se asume que la capacitación comienza en el útero; sin embargo, el principal sitio de capacitación parece ser el

oviducto (Bazer y col., 2000).

La capacitación es un proceso dinámico y muy complejo que ocurre normalmente en el tracto reproductivo de la hembra y que incluye (Vega y col 2002), entre otros muchos fenómenos, una modificación en las propiedades de la membrana plasmática que le confieren al espermatozoide la capacidad de responder a los estímulos externos que desencadenan la reacción acrosomal y la subsiguiente penetración del ovocito.

Es posible que ciertos componentes de la superficie espermática sean modificados ó eliminados por secreciones del tracto reproductivo de la hembra, lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la activación acrosomal. Tales cambios pueden incluir una disminución del colesterol que se presenta en la superficie del espermatozoide, la modificación de glucosaminoglucanos, y diversos cambios iónicos a medida que el espermatozoide avanza por el tracto reproductivo de la hembra (Bazer y col., 2000).

A) Remoción del Colesterol o de sustancias protectoras de membrana

En los epitelios de los conductos genitales del macho se encuentra una serie de factores decapacitantes entre los cuales se pueden considerar a las vesículas donadoras de colesterol contenidas en el plasma seminal y a las firmes uniones celulares que impiden el ingreso de las proteínas séricas (Davis, 1981). Las secreciones del útero y del oviducto eliminan los factores decapacitantes que mantenían inhibida la actividad de los espermatozoides en el tracto reproductor del macho (Guyton y Hall, 2000). Cuando el espermatozoide llega al útero es expuesto a una infinidad de proteínas séricas que tienen la habilidad de unirse a los lípidos (Martínez y Morros, 1996), y que incluso remueven la barrera de esteroides que impide la entrada de calcio al interior del espermatozoide (Davis, 1981). Existen evidencias experimentales de que la albúmina sérica juega un papel determinante en los cambios membranales que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación (Vega y col 2002)

Según Davis (1978), la capacitación involucra una disminución reversible de la proporción de colesterol en las membranas del espermatozoide. Este despojo

de sustancias es sólo un primer paso y no representa totalmente el proceso de capacitación (Fig. 1).

Parte del colesterol presente en la membrana plasmática se encuentra en forma de sulfoconjugados, como es el caso del sulfato de colesterol (Langlais y Roberts, 1985). El sulfato de colesterol estabiliza las membranas, regula la permeabilidad y previene la disrupción de la membrana plasmática (Martinez y Morros, 1996). La acción de sulfatasas sobre el sulfato de colesterol ha sido postulada como parte del mecanismo de la capacitación. La remoción del colesterol luego de la desulfatación, probablemente incremente la fluidez de membrana y permita el movimiento de proteínas de membrana (Langlais y Roberts, 1985). La remoción del colesterol desestabiliza la membrana plasmática (Benoff, 1993). Esto está asociado con un aumento en la permeabilidad al calcio, lo cual aparentemente dispararía la reacción acrosomal (Langlais y Roberts, 1985), promoviendo su fusión con la membrana subyacente, que está formada por la superficie externa del acrosoma (Davis, 1981).

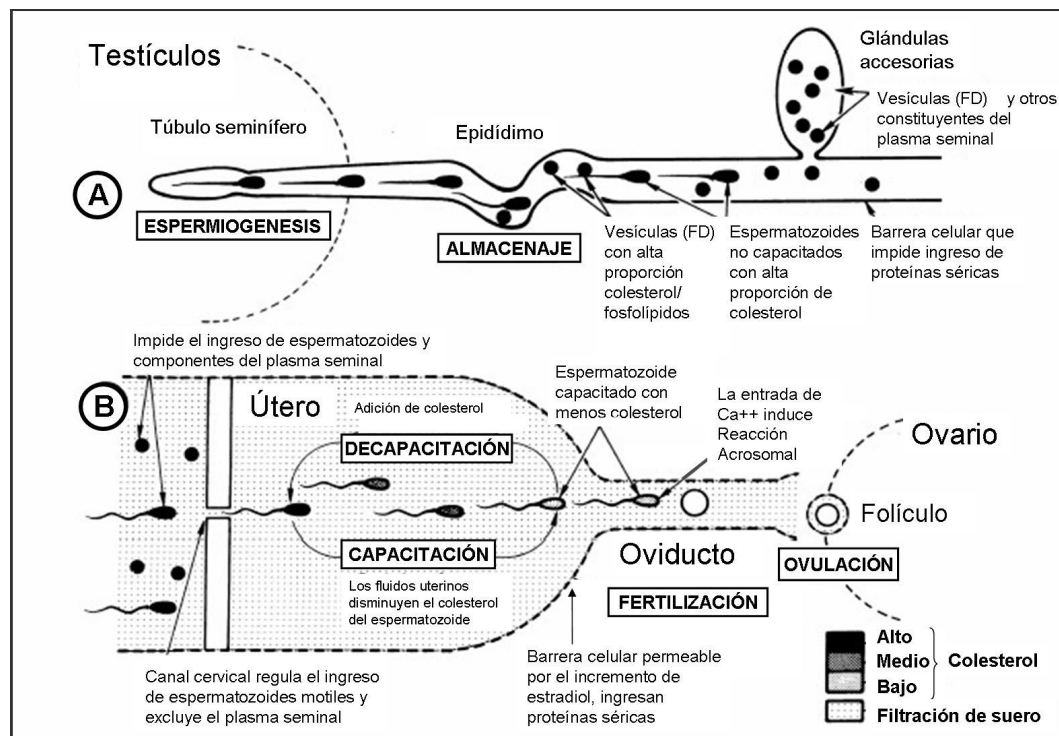


Figura 1. Esquema del cambio de los niveles de colesterol en el espermatozoide durante su traslado por el tracto reproductivo del macho (A) y de la hembra (B).

Se ha demostrado que el tiempo de duración de la capacitación varía en las diferentes especies y que dicha variación está estrechamente correlacionada con la proporción colesterol/fosfolípidos y con los niveles de colesterol en la membrana del espermatozoide (Davis, 1981; Hoshi y col., 1990), dado que la iniciación de la reacción acrosomal esta fisiológicamente regulada con los niveles de colesterol. En el cuadro 3 se puede observar como la proporción colesterol/fosfolípidos viene a ser un determinante molecular fisiológico en la duración de la capacitación espermática. La proporción colesterol/fosfolípidos esta correlacionada positivamente con el tiempo de duración de la capacitación. Además hay un claro, aunque más débil, efecto de las cadenas de ácidos grasos saturados de los fosfolípidos en el intervalo de la capacitación.

Cuadro 3. Intervalo de capacitación y composición lipídica de espermatozoides de los diferentes mamíferos

	<i>IC</i> horas	<i>Col</i> Moléculas x10 ⁸ /espermatozoide	<i>FL</i>	<i>Col+FL</i>	<u>Ácidos grasos de FL</u> <i>AGS</i> <i>TAG</i>		<i>R</i> Col/FL
Carnero	1.5	4.33	11.56	15.89	0.24	19.8	0.37
Verraco	2	5.59	15.83	21.42	0.23	20.2	0.35
Toro	2	5.36	11.99	17.35	0.23	20.0	0.45
Rata	3.75	7.10	12.26	19.36	0.45	17.5	0.58
Conejo	6	8.47	9.67	18.14	0.46	18.8	0.88
Hombre	7	8.63	8.71	17.34	0.49	19.0	0.99

IC: intervalo de capacitación; **Col:** Colesterol; **FL:** Fosfolípidos; **AGS:** ácidos grasos saturados/ total de ácidos grasos; **TAG:** Longitud promedio de cadenas de carbono; **R:** relación Col/FL. (Davis, 1981 y Darin-Bennett, 1977)

B) Cambios en la membrana plasmática del espermatozoide

Otro factor importante para que se de la capacitación del espermatozoide es el referido con los cambios que experimenta la membrana plasmática en cuanto a su distribución y composición de los lípidos y fosfolípidos (Baldi y col., 1996)

La cantidad de fosfolípidos parece no cambiar considerablemente durante la capacitación (Baldi y col., 1996). Sin embargo, la capacitación está asociada

con un aumento en la metilación de los fosfolípidos, en la síntesis de fosfatidilcolina (Llanos y Meizel, 1983), de fosfatidilinositol y de liso-fosfatidilcolina (Snider y Clegg, 1975). Los lisofosfolípidos tienen propiedades fusogénicas y su incremento puede preparar al espermatozoide para la reacción acrosomal (Baldi y col., 1996). La enzima fosfolipasa A₂ genera lisofosfolípidos a través de la hidrólisis de fosfolípidos y parece estar implicada en la capacitación del espermatozoide (Baldi y col., 1996).

C) Modificación de las concentraciones intracelulares del calcio y de otros iones

El cambio en la concentración de Ca²⁺ a nivel intracelular es uno de los eventos bioquímicos que caracteriza plenamente a la capacitación (Baldi y col., 1996). El incremento de la concentración de calcio ha sido demostrado en varias especies de mamíferos (Zhou y col., 1990), habiéndose evidenciado, a partir de experimentos in vitro, de que el Ca²⁺ extracelular parece ser necesario para que se de la capacitación de los espermatozoides (Luconi y col., 1996).

Durante la capacitación espermática, el espermatozoide regula sus niveles de calcio intracelular mediante tres vías: a) el *sistema Ca²⁺-ATPasa* que actúa como una bomba de expulsión de Ca²⁺ (Fraser y McDermott, 1992); b) el *sistema Na⁺/Ca²⁺* que permite el ingreso de calcio con salida de sodio; y c) el *sistema Ca²⁺/H⁺*, que permite el ingreso de Ca²⁺ y salida de H⁺ (Fraser, 1995). De estos tres mecanismos moduladores de Ca²⁺, el sistema de Ca²⁺-ATPasa tendría el rol principal en el proceso de capacitación (Fraser y McDermott, 1992). Otro mecanismo del cual también depende el incremento intracitoplasmático de calcio son los almacenes intracelulares de Ca²⁺, que presumiblemente estarían localizados en el acrosoma (Baldi y col., 1996).

Además del Ca²⁺, las concentraciones intracelulares de K⁺, Na⁺, Cl⁻, zinc y de bicarbonato, tienden a variar durante la capacitación (Baldi y col., 1996). Al respecto, ha sido comprobado de que el bicarbonato cumple un papel importante en la capacitación de varias especies de mamíferos (Shi y Roldan, 1995), estimulando a que se de el ciclo de la adenil ciclasa (Baldi y col., 1996).

El hecho de que el pH intracelular del espermatozoide maduro no capacitado sea relativamente ácido, es para prevenirlo de una prematura

capacitación, prolongando así su viabilidad durante su estancia en el epidídimo sin que se de una reacción acrosomal espontánea. En algunas especies de mamíferos existe un incremento del pH a nivel intracelular durante la capacitación (Baldi y col., 1996), pero su papel es incierto, ya que un aumento del pH en los espermatozoides no hace que se acelere la capacitación (Fraser, 1995). Sin embargo, dicho incremento en el pH podría indirectamente estar involucrado en la activación de los canales de K^+ , permitiendo de esta manera un eflujo de iones K^+ , llevando el potencial de reposo del espermatozoide hacia el potencial de equilibrio para este ión e hiperpolarizando consecuentemente la membrana plasmática de las células (Vega y col 2002).

La concentración intracelular de Na^+ aumenta durante la capacitación (Baldi y col., 1996). Tal aumento parece ser importante, ya que un ionóforo de Na^+ , la monesina, promueve este proceso en el espermatozoide de ratón (Fraser, 1995). El zinc pueda jugar un papel en la desestabilización de la membrana plasmática durante la capacitación (Andrews y col., 1994).

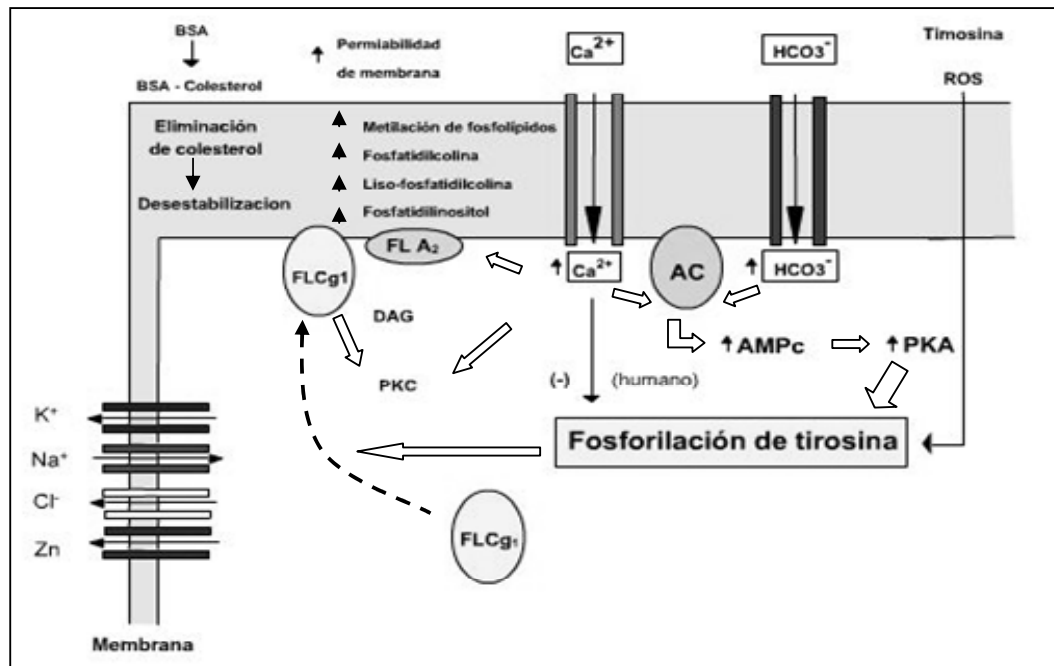


Figura 2. Esquematación de los principales eventos de la capacitación espermática.

En la figura 2 se esquematizan los principales eventos que se dan durante la capacitación, principalmente se aprecia que el incremento en la fluidez de la

membrana, debido a la pérdida del colesterol, produce un aumento en la permeabilidad al Ca^{2+} y HCO_3^- . El incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y HCO_3^- activa la adenil ciclasa, que produce un incremento de AMPc y subsecuentemente se incrementa la PKA. Esto aumenta la fosforilación de tirosina en el espermatozoide. Otro modulador fisiológico de la fosforilación son las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden generarse desde los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Baldi y col., 1996).

2.3.2.5. Hiperactivación espermática

El incremento de la concentración calcio intracelular, que se produce durante la capacitación, modifica la actividad del flagelo, haciendo que tenga una potente actividad de latiguelo, en lugar del débil movimiento ondulante anterior (Guyton y Hall, 2000). A esta motilidad distinta, se le conoce como *hiperactivación espermática*. Se caracteriza por presentar un movimiento flagelar pronunciado, marcado movimiento de la cabeza del espermatozoide hacia los lados y una trayectoria no lineal (Baldi y col., 1996). La hiperactivación espermática es otro de los procesos necesarios para que el espermatozoide alcance al ovocito y pueda llevarse a cabo la reacción acrosomal y la fecundación (Guyton y Hall, 2000).

2.3.2.6. Reacción acrosomal

La capacitación es la fase previa necesaria para que tenga lugar la reacción acrosomal (Guyton y Hall, 2000), y la cual básicamente consiste en una vesiculación y posterior desaparición de la membrana plasmática y la acrosomal externa. De modo que la cabeza espermática queda, en esa zona, sólo cubierta por la membrana acrosomal interna (Coy, P. 1995b). La reacción del acrosoma implica principalmente la liberación de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma del espermatozoide (ver Fig. 3) (Guyton y Hall, 2000).

En el acrosoma del espermatozoide se encuentran almacenadas grandes cantidades de *hialuronidasa* y de *enzimas proteolíticas*. La hialuronidasa despolimeriza los polímeros de ácido hialurónico del cemento intercelular que mantiene unidas las células del cumulus oophorus que rodea al ovocito. Las

enzimas proteolíticas digieren las proteínas de los elementos estructurales de los tejidos que todavía permanecen adheridos al ovocito (Guyton y Hall, 2000). Entre las enzimas proteolíticas tenemos a la *acrosina*, que se encarga de digerir la cubierta acelular que rodea el ovocito, también llamada zona pelúcida (Coy, P. 1995b).

La verdadera reacción acrosomal se da en presencia del ovocito y consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por extensa vesiculación sobre el segmento anterior del acrosoma (Bedford, 1983). Esto difiere de la "falsa" reacción acrosomal que ocurre durante la senescencia o degeneración de los espermatozoides. (Bazer y col., 2000).

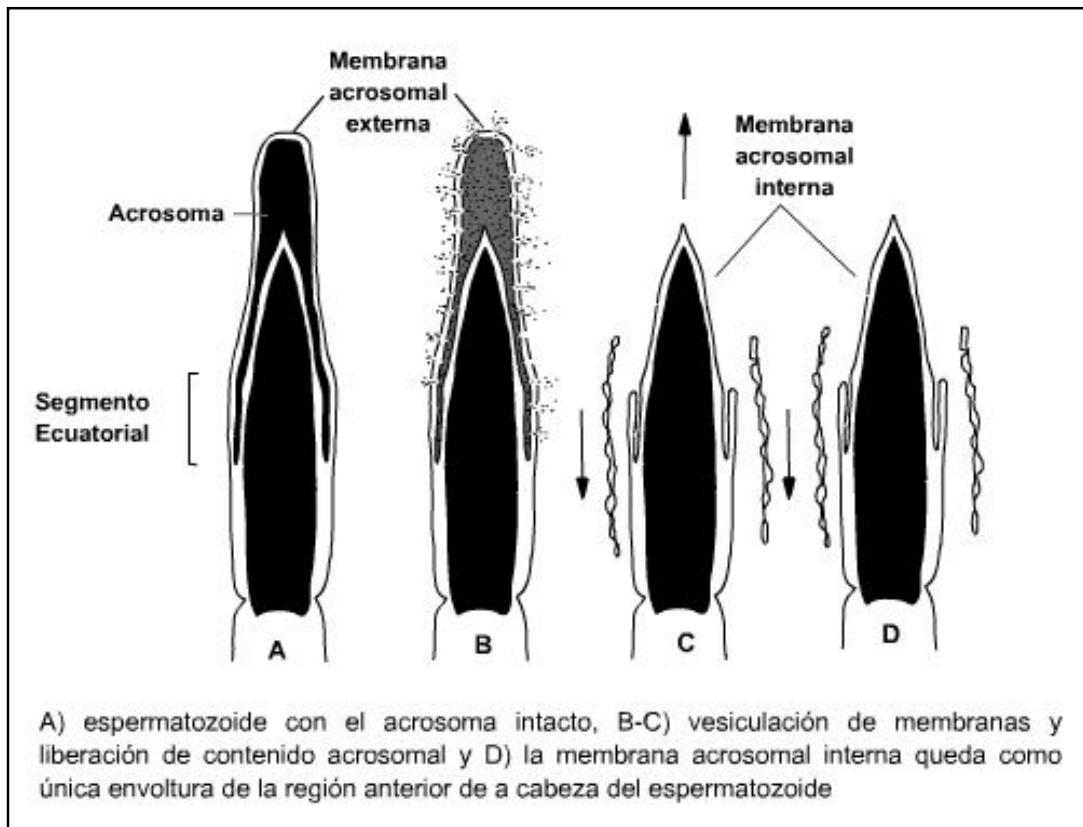


Figura 3. Diagrama del proceso de reacción acrosomal espermática

Los estímulos potenciales de la reacción acrosomal incluyen el fluido oviductal, el fluido folicular y varias proteínas del cumulus oophorus. Es probable que la alta concentración de progesterona y otros esteroides del cumulus

oophorus induzcan la reacción acrosomal durante el proceso de fertilización. Las proteínas de la zona pelúcida y la progesterona inducen sinérgicamente la reacción del acrosoma in vitro (Baldi y col., 1996). En los mamíferos, el factor inductor de la reacción acrosomal es una glucoproteína de la zona pelúcida (ZP) del ovocito, conocida como ZP3 (Vega y col., 2002). Se han postulado como principales receptores de la ZP3 en el espermatozoide a: una proteína de 56 KDa, una tirosina cinasa de 95 KDa, β 1-4 galactosiltransferasa y las espermadesinas (Darszon y col., 1999).

Uno de los primeros eventos que ocurren en los espermatozoides luego del estímulo con ZP3 y la progesterona es la unión a su receptor. Esto es seguido de una cascada de procesos que están involucrados en la inducción de la reacción del acrosoma (Baldi y col., 1996).

A) Incremento intracelular del calcio durante la reacción acrosomal

La reacción del acrosoma depende de la composición iónica del medio e involucra un aumento en la permeabilidad a distintos iones, por lo que durante este proceso el espermatozoide se alcaliniza y sufre cambios en el potencial de membrana (Baldi y col., 1996). El incremento de calcio intracelular está asociado con una salida de H^+ y un incremento del pH intracelular (Baldi y col., 1996).

La unión de la glucoproteína de la zona pelúcida a su receptor produce una despolarización de la membrana. Esta despolarización es capaz de producir un ingreso de Ca^{2+} al espacio intracelular a través de los canales dependientes de voltaje (Darszon y col., 1999). Los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje se activan con despolarizaciones relativamente pequeñas (Publicover y Barratt, 1999). Se ha establecido que las corrientes a través de estos canales son el único tipo de corrientes de Ca^{2+} sensibles al voltaje que se expresan funcionalmente en los espermatozoides (Arnoult y col., 1996).

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ocurren en dos fases distintas (Florman, 1994). La fase rápida se debe probablemente a la activación de los canales dependientes de voltaje (Vega y col., 2002). Por otro lado, existe evidencia experimental que indica que después de la fase rápida es necesario que exista un aumento lento y sostenido en la concentración de Ca^{2+} intracelular

para que se desarrolle la reacción acrosomal. Esta segunda fase probablemente involucra la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares sensibles al segundo mensajero inositol trifosfato (IP_3) (Walensky y Snyder, 1995) y una subsecuente entrada de Ca^{2+} al interior de las células mediada por un tipo particular de canales de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática conocidos como canales capacitivos (Jungnickel y col., 2001).

La liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares se inicia cuando la FLC se activa y comienza a generar IP_3 . Este segundo mensajero activa a sus receptores en la membrana acrosomal (IP_3R), produciendo así la liberación de Ca^{2+} al citosol. Al respecto conviene señalar que el acrosoma entre otras funciones actúa como reservorio para los iones de Ca^{2+} (Vega y col., 2002). El vaciamiento de los reservorios internos de Ca^{2+} produce una entrada adicional de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Este proceso está mediado por canales capacitivos (Vega y col., 2002; Santi y col., 1998; Fig. 4).

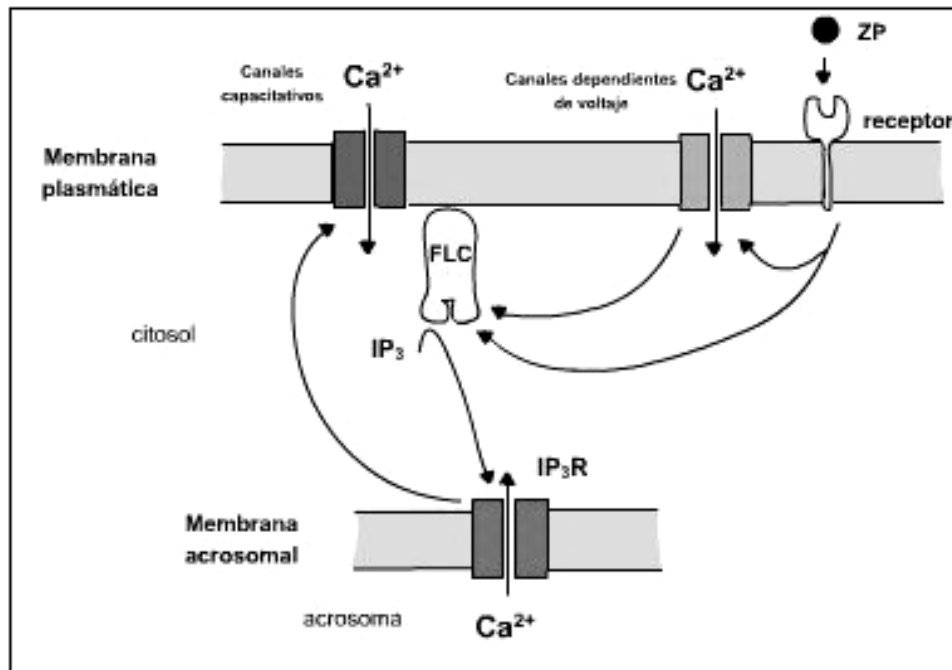


Figura 4. Diagrama de la participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosomal en el espermatozoide

Además, es probable que los iones Ca^{2+} causen alteraciones de la membrana celular que reviste la punta del acrosoma, haciendo que el acrosoma pueda liberar sus enzimas rápida y fácilmente cuando el espermatozoide penetra

en la granulosa que rodea al ovocito y más aún cuando trata de perforar la zona pelúcida del propio ovocito (Guyton y Hall, 2000).

El Ca^{2+} juega un papel importante en la respuesta mediada por receptores y en la fusión de la membrana del espermatozoide. De igual manera otros iones como el sodio, el potasio, el cloro, el bicarbonato y el cloro pueden estar implicados en este proceso (Baldi y col., 1996; Darszon y col., 1999).

B) Activación de las proteínas cinasas y fosfolipasas durante la reacción.

La unión de la ZP3 a su receptor induce la activación de la cinasa tirosina, que produce un aumento en la fosforilación de tirosina y la autofosforilación del receptor (Breitbart y Spungin, 1997). Esta unión permite que se estimule un nucleótido de guanina ligado a proteína (proteína G), la cual traduce la señal y estimula a la adenil ciclasa y la fosfolipasa C (Baldi y col., 1996). La activación de estas dos enzimas lleva a un aumento en la generación de segundos mensajeros; la adenil ciclasa produce un incremento del AMPc (Baldi y col., 1996) y la fosfolipasa C cataliza la degradación de algunos fosfolípidos de la membrana, en especial al bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) (Guyton y Hall, 2000), produciendo el incremento de otros dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato y el diacilglicerol (Roldan, 1998).

El incremento de AMPc activa a la PKA, y el incremento de diacilglicerol activa a la PKC. Estas proteínas cinasas, como ya es conocido, producen la fosforilación de proteínas. Según algunos estudios el AMPc, también está involucrado con la entrada de Na^+ a la célula (Baldi y col., 1996).

El inositol trifosfato producido por la fosfolipasa C, aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la liberación de Ca^{2+} desde almacenes intracelulares. Se ha reportado que la entrada de Ca^{2+} depende parcialmente de la activación de la cinasa tirosina (Baldi y col., 1996).

La activación de la fosfolipasa A2 (FLA2) y la fosfolipasa D (FLD) dependen del incremento intracelular de Ca^{2+} . Esto produce la generación de segundos mensajeros como el ácido araquidónico (AA), la liso-fosfatidilcolina (LC) y el ácido fosfatídico (AF) desde los fosfolípidos de la membrana. Durante la reacción acrosomal la fosfolipasa D es activada y el ácido fosfatídico es generado. Sin

embargo, la activación de la fosfolipasa D es un evento tardío de la reacción acrosomal y no parece contribuir sustancialmente (Roldan, 1998).

Lo descrito anteriormente produce cambios drásticos en la composición de la membrana lipídica, lo que lleva a la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal y formación de vesículas laminares, llevando a la reacción del acrosoma propiamente dicha (Martínez y Morros, 1996) (Fig. 5).

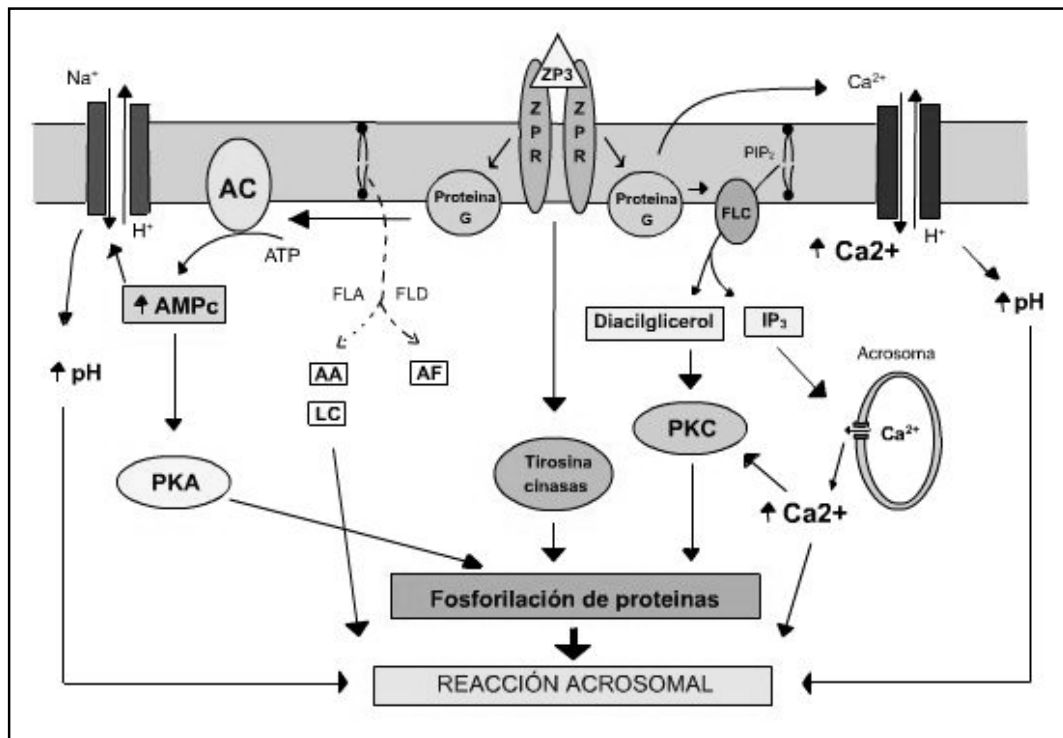


Figura 5. Esquemización del proceso de reacción acrosomal en el espermatozoide.

2.2.2.7. Fecundación

Al alcanzar la zona pelúcida del ovocito, la membrana anterior del espermatozoide se liga específicamente a las proteínas receptoras de la zona pelúcida (Guyton y Hall, 2000). Después se disuelve rápidamente todo el acrosoma y se liberan de inmediato todas las enzimas del mismo. En cuestión de minutos, estas enzimas abren una vía de penetración para el paso de la cabeza del espermatozoide a través de la zona pelúcida hasta el interior del ovocito.

Luego, se fusionan las membranas de la cabeza del espermatozoide y del ovocito, formando una sola célula. Al mismo tiempo, el material genético del espermatozoide y del ovocito se combina para formar un genoma completamente nuevo. Este es el proceso denominado *fecundación* (Guyton y Hall, 2000).

Debido a los cambios que tiene que sufrir el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra, la deposición del semen antes de la ovulación es fundamental para que la fecundación se pueda llevar a cabo. Por esta razón las hembras son sexualmente receptivas durante al menos 24 horas antes de la ovulación. La supervivencia del espermatozoide ovino en el tracto reproductor femenino es de 30 a 48 horas y el ovocito sobrevive de 16 a 24 horas. (Coy, P. 1995b).

2.4. Criopreservación de semen

La criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn y col., 1969). Consecuentemente, es de esperar que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

2.4.1. Principios básicos de la criopreservación

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros y col., 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001).

La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico-

químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984).

Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García, 1983; Holt, 2000).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de criocentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001).

El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991). Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985).

Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso, 2001).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La

supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar y col., 2003).

Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

2.4.2. Métodos de criopreservación

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

La congelación ultrarápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones,

que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

2.4.3. Protocolos de criopreservación de semen ovino

La criopreservación de semen ovino emplea el protocolo de congelación lenta con descongelación rápida. Este protocolo esta conformado por el proceso de enfriamiento, el proceso de congelamiento y el proceso de descongelamiento (Santiani, 2003).

El enfriamiento se da en dos fases, en la primera el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C, para luego, en una segunda fase que permite la estabilización del semen diluido con la adición de sustancias crioprotectoras (Salamon y Maxwell, 2000).

El período de disminución de temperatura entre 35 a 5°C se da entre a 0.5 a 3 horas (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2003a, 2003b) y tiene por finalidad el reducir la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986). Para permitir la estabilización celular, se mantiene el semen a 5°C por un período de 0.5 a 1.5 horas a antes de iniciar el congelamiento (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b). Por otro lado, Santiani (2003) sustenta que el estrés oxidativo se incrementa cuando se mantienen los espermatozoides a 5°C por períodos prolongados, produciéndose una peroxidación lipídica de las membranas.

El proceso de congelamiento empieza cuando la temperatura llega a 5°C y se realiza exponiendo las pajuelas a los vapores de nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000). Durante este proceso se presenta el “rango crítico de temperatura”, que en el caso de espermatozoides ovinos, se produce entre los -10°C a -25°C (Salamon y Maxwell, 1995a), tanto al congelar como al descongelar, y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Mazur, 1965).

Según Byrne y col. (2000), una velocidad de congelamiento de 5°C/minuto entre 5 a -25°C; 50°C/minuto entre -25°C a -130°C y la posterior inmersión en nitrógeno líquido produce la mejor viabilidad en espermatozoides ovinos. Por lo tanto, la reducción de la temperatura a 5°C/minuto durante el rango crítico de congelamiento parece ser la velocidad óptima de congelamiento del semen ovino. Otros sostienen que manteniendo las pajuelas 8 cm encima de nitrógeno líquido

también permite reducir la temperatura dentro de las pajuelas a -150°C en 15 minutos (El-Alamy y Foote, 2001).

Finalmente, el descongelamiento del semen es tan importante como el congelamiento, porque los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 2000). El descongelamiento rápido es necesario para prevenir la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide. En la mayoría de trabajos, la descongelación de pajuelas de semen ovino se ha realizado en baño maría a $37-50^{\circ}\text{C}$ durante algunos segundos hasta 5 minutos (Fiser y col., 1981; Molinia y col., 1994a, 1994b; Aisen y col., 2000; Gil y col., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Gil y col., 2003b; Kumar et al., 2003). Por otro lado, el descongelamiento a una temperatura menor a 37°C previene el estrés osmótico y mantiene la integridad de membrana en espermatozoides bovinos (Correa y col., 1996)

2.4.4. Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad post-descongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000).

La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000). Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante el congelamiento sólo se invierten parcialmente después del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos. Es por eso que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento (Watson, 2000). La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994). Como ya se mencionó anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la

viabilidad espermática. Finalmente la toxicidad de algunas sustancias como el glicerol también producen la muerte de los espermatozoides (Watson, 2000).

Un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes presenta un daño funcional que está relacionado con la calidad de la membrana, daños oxidativos, integridad de los receptores de membrana e integridad de la estructura nuclear, (Watson, 2000). Esto se ve reflejado en la motilidad, capacitación espermática e integridad acrosomal.

Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles (Watson, 2000). La motilidad post descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50% (Molinia y col., 1994a; 1994b; Hellemann y Jara, 1997; El-Alamy y Foote, 2001; Salamon y Maxwell, 2000).

El proceso de criopreservación está relacionado a la capacitación espermática. Los espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento muestran un alto porcentaje de capacitación en comparación con espermatozoides de semen fresco (Pérez y col., 1996; Maxwell y Watson, 1996). En ese sentido, el porcentaje de espermatozoides capacitados en semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90% (Pérez y col., 1996), aunque varía entre 40 a 60% (Apéndice1, Gil y col., 2000, 2003a, 2003b). *In vitro*, la capacidad fecundante de espermatozoides ovinos descongelados es superior en comparación con espermatozoides de semen fresco (Gillan y Maxwell, 1999). Esto estaría confirmando que un alto porcentaje de espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento ya estarían capacitados.

En relación a la integridad acrosomal, la criopreservación aumenta ligeramente la reacción acrosomal en espermatozoides viables de ovinos. Alrededor del 10% (De las Heras y col., 1996; Pérez y col., 1996; D'Alessandro y col., 2001; Gil y col., 2000, 2003a, 2003b) de espermatozoides vivos luego del descongelamiento experimentan reacción acrosomal, en comparación con la reacción acrosomal menor a 4% en semen fresco de ovino (Pérez y col., 1996; Valcárcel y col., 1997; Paulenz y col., 2002)

2.5. Composición de diluyentes para congelar semen

Los dilutores de semen para la criopresevación están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones: a) proveer nutrientes como fuente de energía, b) proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, c) mantener un adecuado equilibrio del pH, d) mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, e) inhibir el crecimiento bacteriano, f) incrementar el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y g) proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Háñez, 2000).

Entre los componentes utilizados para mantener un adecuado pH e incrementar el volumen seminal tenemos:

a) Leche:

La leche, específicamente, leche de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies (Foote y col., 1993; 2002; Salamon y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002; Gil y col., 2000; 2003a, 2003b; Santiani, 2003). Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon y Maxwell, 2000). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote y col., 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000), es por lo que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90 °C, lo cual inactiva a esa proteína (Salamon y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002; Gil y col., 2003a, 2003b).

La leche puede ser usada en forma entera (El-Alamy y Foote, 2001), reconstituida (Fiser y col., 1981; Salamon y Maxwell, 2000; Paulenz y col., 2002) o descremada (Gil y col., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Gil y col., 2003a, 2003b). El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000). Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar

leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil y col., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz y col., 2002; Gil y col., 2003a, 2003b).

b) Tris:

El compuesto tris-[hidroximetil] aminometano ($C_4H_{11}NO_3$), conocido como Tris se emplea en la criopresevación del toro (Anduaga, 1980; Chen y col., 1993; Salamon y Maxwell, 2000), verraco (Salamon y Maxwell, 2000), caprino (Bittencourt y col., 2004; Aboagla y Terada, 2003) y carnero (Molinia y col., 1994a; 1994b; Aisen y col, 1995; 2000; 2002; Salamon y Maxwell, 2000), entre otros. Es una sustancia orgánica, de aspecto cristalino, su peso molecular es de 121.14 g/L., que posee la particularidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno. Posee una constante de disociación básica, tal que una solución de 50 mM de Tris corresponde a un pH de 10.4, el cual protege a los espermatozoides de cambios de pH. Por este motivo para ser utilizado en la criopreservación de semen requiere estar asociado con el ácido cítrico (Anduaga, 1980).

El Tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen para, entre otros aspectos, neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides, y en particular al ácido láctico (Salamon y Maxwell, 1995a). Los espermatozoides ovinos toleran un rango de concentraciones entre 100 a 400 mM (Salamon y Visser, 1972; Molinia y col., 1994b).

En relación a los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de Tris (100, 150, 200, 250 y 300 mM) en la criopreservación de semen de carnero, se ha encontrado una mejor motilidad progresiva a 150 mM (41 %) (Molinia y col., 1994b). Sin embargo, los resultados obtenidos por ese estudio fueron inferiores a los conseguidos por otros autores (Apéndice2; Aisen y col., 1995; Hellmann y Jara, 1997; El-Alamy y Foote, 2001).

Por otro lado, Gil y col (2000) obtuvieron mejores resultados al emplear un medio en base a leche descremada (46.5 %) en comparación a otro en base a Tris (33.7 %).

Para proveer energía al espermatozoide, los dilutores de semen deben incluir azúcares del tipo monosacáridos. La principal fuente de energía para los espermatozoides es la fructosa, siendo el único carbohidrato presente en el semen ovino. Sin embargo, los espermatozoides también pueden metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Garner y Hafez, 2000). La células glucolizan a la fructosa con mayor rapidez que a la glucosa, esto se debe a que la fructosa no requiere el paso en el metabolismo de glucosa catalizado por la fosfofructocinasa, que es donde se ejerce el control sobre la velocidad del catabolismo de la glucosa (Mayes, 1997a). Otros carbohidratos del tipo polisacáridos no actúan como fuente de energía, pero son utilizados por su habilidad para preservar la motilidad espermática. La mayoría de diluyentes para semen ovino incluyen glucosa o fructosa, aunque también se pueden utilizar la manosa o la maltosa (Salamon y Maxwell, 2000). Según Molinia y col., (1994b) no existe diferencia entre el monosacárido utilizado para la criopreservación de semen. Los resultados obtenidos en la criopreservación de semen de carnero han sido similares tanto con la fructosa o la glucosa como fuente de energía (Apéndice2 y 3).

Para proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento y descongelamiento, se incluyen en los dilutores de semen a la yema de huevo (Watson, 1975; Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). Algunos fosfolípidos de la yema de huevo protegen la membrana espermática (Watson, 1981) al unirse a su superficie (Watson, 1975). De esta manera, la yema de huevo previene el daño peroxidativo (Jones y Mann, 1977). Se ha demostrado que el efecto protector de la yema de huevo es mayor en los espermatozoides de toro en comparación a los espermatozoides de carnero (Salamon y Maxwell, 1995a). En el espermatozoide de carnero hay una débil interacción entre la membrana lipídica y los lípidos que conforman la yema de huevo (Aisen y col., 2000). En el carnero, las dificultades halladas en la criopreservación de semen podrían estar relacionadas a la alta proporción de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y al bajo porcentaje de colesterol en la membrana plasmática (Davis, 1981; Aisen y col, 2000). La yema de huevo también es una fuente de hierro y otros metales. Estos metales pueden intensificar los efectos del peróxido de

hidrógeno por la reacción de Fenton, lo que podría intensificar los efectos de la peroxidación lipídica (Bilodeau y col., 2002).

En ovinos, Gil y col. (2003b) evaluaron diferentes concentraciones (entre 5 a 20 %) de yema de huevo en un dilutor en base a leche descremada. Ellos encontraron que el aumento en la concentración de yema de huevo en el dilutor no mostraba efectos favorables. Con respecto a dilutores en base a Tris, Molinia y col. (1994a) demostraron que con 18% de yema de huevo se obtienen mejores porcentajes de motilidad post descongelamiento. El-Alamy y Foote (2001) encontraron que concentraciones mayores a 20 % de yema de huevo tiene un efecto negativo en la motilidad espermática. Actualmente, se utilizan concentraciones entre 10 a 20% de yema de huevo para congelar semen ovino (Apéndice1; Molinia y col., 1994a; Aisen y col, 1995; 2000; 2002; Hellemann y Jara, 1997; Gil y col., 2000; El Alamy y Foote, 2001).

Para proteger a los espermatozoides durante el congelamiento se emplean agentes crioprotectores (Boiso, 2001). Estas sustancias se encargan de disminuir los efectos nocivos producidos por el proceso de criopreservación y sus propiedades serán discutidas más adelante.

Para inhibir el crecimiento bacteriano se adicionan antibióticos a los dilutores, como la penicilina sódica y la estreptomycin (Salamon y Maxwell, 2000).

Además de las sustancias anteriormente mencionadas también se han adicionado otros compuestos. Uno de ellos es el ácido etildiaminoacético (EDTA) que mejora la acción crioprotectora de los disacáridos en el congelamiento de semen ovino (Salamon y Maxwell, 2000). Esto se produce gracias a la disminución de la temperatura de congelamiento de las soluciones disacáridas producida por el EDTA. En este caso, el EDTA actúa como agente quelante y el calcio puede influir sobre las propiedades crioscópicas de los azúcares (Aisen y col., 2000). La adición de EDTA a los diluyentes puede eliminar la acción inhibitoria del Ca^{2+} sobre la protección de membrana ejercida por los disacáridos (Aisen y col., 2000). Además el EDTA previene la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000). El calcio también tiene un papel en las vías de señalización en la reacción acrosomal, la cual está reducida en presencia de EDTA. (Aisen y col., 2000).

El uso de sustancias tenso activas también ha demostrado tener un efecto protector en la integridad acrosomal. En ovinos, la adición del surfactante Equex STM® a un diluyente en base a Tris mejora en un 60% la integridad acrosomal de los espermatozoides (Hellemann y Jara, 1997).

2.5.1. Agentes crioprotectores

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984), previniendo de esta forma el estrés osmótico. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, de forma que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que estarán sometidos será menor (Boiso, 2001). De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a la mayor deshidratación celular (Medeiros y col., 2002).

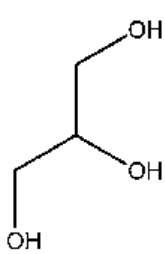
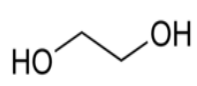
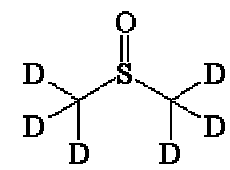
Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos: crioprotectores permeantes y no permeantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Boiso, 2001):

A) Agentes crioprotectores permeantes

Son sustancias permeables a través de la membrana debido a su de bajo peso molecular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (García y Vila, 1984). Si bien el espermatozoide es permeable a estos agentes, su permeabilidad no es de la misma magnitud a la del agua. Sin embargo, atraviesan la membrana plasmática reemplazando el volumen de agua que se encuentra dentro de la célula. Consecuentemente, evitan los daños producidos por la formación de cristales de agua en el interior de la célula y mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros y col., 2002). Por otro lado, los crioprotectores permeantes pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la motilidad espermática (Medeiros y col., 2002).

Entre los más utilizados están el glicerol, el etilenglicol, el propanediol y el dimetilsulfóxido (Cuadro 4; Boiso, 2001).

Cuadro 4. Características biofísicas de algunos crioprotectores permeantes

	Glicerol	Etilenglicol	Dimetilsulfóxido
Fórmula química	$C_3H_5(OH)_3$	$(CH_2OH)_2$	$(CH_3)_2SO$
Estructura química			
Peso molecular	92,10	62,07	78,13
Densidad	1,25	1,10	1,11

a) Glicerol:

El glicerol es el agente crioprotector permeante más usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Maxwell y Watson, 1996; Curry, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Bittencourt y col., 2004). Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento. Esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000). El ingreso del glicerol al espermatozoide se realiza mediante los canales aquaporin 7 (Ishibashi y col., 1997).

La mayoría de trabajos utilizan el glicerol en concentraciones entre 6 a 8% (Helleman y Jara, 1997; Gil y col., 2000, 2003a, 2003b; El-Alamy y Foote, 2001). En un diluyente en base a Tris, la mejor motilidad post descongelamiento se obtiene con 6% de glicerol (Molinia y col., 1994a). Se ha sugerido que la concentración óptima de glicerol en el diluyente está relacionada a su concentración final en el espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000).

La mayoría de protocolos de congelamiento de semen ovino prefiere la adición del glicerol a los 5°C para evitar sus efectos tóxicos (Colas, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). La sensibilidad de espermatozoides a los efectos tóxicos varía en cada especie (Curry, 2000; Bittencourt y col., 2004). Algunos efectos atribuidos al glicerol son cambios en la estructura bioquímica de la membrana plasmática del espermatozoide relacionados a la capacitación y reacción del acrosoma (Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). Se presenta mayor reacción del acrosoma y mayor cantidad de espermatozoides capacitados cuando el glicerol se adiciona a los 15°C en comparación con la adición a los 5°C (Gil y col., 2003b). Por esta razón, el diluyente es dividido en dos fracciones, en donde la segunda fracción contiene el doble de la concentración deseada de glicerol, para que al ser mezclado con igual volumen del semen diluido en la primera fracción, se obtenga la concentración deseada de dicho agente crioprotector.

b) Etilenglicol:

El etilenglicol es un agente crioprotector permeante, de bajo peso molecular que se ha usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Molinia y col., 1994b; Salamon y Maxwell, 2000; Bittencourt y col., 2004). El etilenglicol puede ser una alternativa para los protocolos de criopreservación de semen (Bittencourt y col., 2004).

Se ha demostrado un mejor efecto protector del etilenglicol en comparación con el glicerol en otras especies como humanos (Gilmore y col., 2000; Deppe y col., 2003), equinos (Ball y Vo, 2001), bovinos (Guthrie y col., 2002) y chinchillas (Carrascosa y col., 2001). Asimismo otros estudios indican que el etilenglicol tiene un efecto similar al glicerol y por lo tanto puede sustituirlo (Mantovani y col., 2002, Pereira y col., 2002).

A) Agentes crioprotectores no permeantes

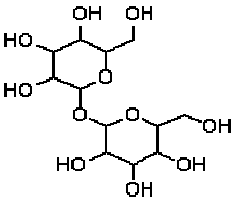
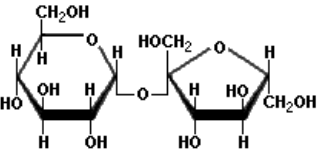
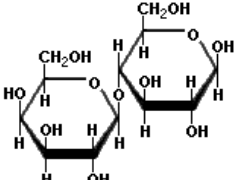
Son sustancias de alto peso molecular que no puede atravesar la membrana plasmática y que son efectivas cuando se emplean altas velocidades de congelación. Como no penetran en la célula, no son crioprotectores

propriadamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular. Estos agentes suelen usarse en combinación a los agentes permeantes (Boiso, 2001).

Los agentes crioprotectores no permeantes como azúcares también han sido estudiados en la congelación de semen ovino (Salamon y Maxwell, 2000).

Su mecanismo de acción consiste en estimular osmóticamente una rápida deshidratación celular y de esta manera disminuir el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros y col., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw y col., 1993). Además estos azúcares pueden interactuar con la membrana formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana plasmática. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw y col., 1993). Los más utilizados son la sacarosa, la trehalosa, la lactosa y la rafinosa (Cuadro 5; Boiso, 2001).

Cuadro 5. Características de algunos crioprotectores no permeantes

	Trehalosa	Sacarosa	Lactosa
Nombre	O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosida	O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructuofuranosido	O- β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucopiranosida
Fórmula química	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Estructura química			
Peso molecular	342.30 g/mol	342.30 g/mol	342.30 g/mol

a) Lactosa:

Es un disacárido ($C_{12}H_{22}O_{11}$) de alto peso molecular, no permeante. También conocido como O- β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucopiranososa o azúcar de la leche (Mayes, 1997b). La lactosa ha sido utilizada en la criopreservación de semen de toro (Palasz y Del Campo, 1995) y de carnero (Aisen y col., 1995; Guerrero, 2004). Según Salamon y Maxwell (1995a), la lactosa disminuye la temperatura de cristalización durante el congelamiento de manera más efectiva que los monosacáridos. Singh y col. (1995) sostienen que la combinación de este disacárido con el glicerol, tiene un mejor efecto crioprotector que cuando se emplea únicamente glicerol. Esto puede deberse a la deshidratación producida por el efecto hipertónico de la lactosa (Aisen y col., 1990; 1995).

b) Trehalosa:

La trehalosa es un disacárido no permeante de alto peso molecular, conocido también como O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosida (Mayes, 1997b). Es un disacárido sintetizado naturalmente por plantas y animales expuestos a bajas temperaturas. Es responsable de la sobrevivencia invernal de algunos batracios (Aisen y col., 2000). Ha sido utilizada en la criopreservación de semen de caprino (Aboagla y Terada, 2003), de toro (Foote y col., 1993) y de carnero (Aisen y col., 1990; 1995; 2000; 2002).

Posee una acción crioprotectora relacionada al efecto osmótico y a su interacción con la membrana, confiriendo una protección adicional contra la deshidratación. La trehalosa puede unirse con el hidrogeno del grupo de cabezas fosfolipídicas de una manera más fuerte que el glicerol (Foote y col., 1993).

Finalmente, se ha demostrado que la adición simultánea de EDTA más trehalosa al dilutor base resulta en la crioprotección óptima, probablemente porque es eliminada la competencia del Ca^{2+} con el disacárido, y porque el disacárido puede reemplazar el ión en la estabilización de la membrana (Aisen y col., 2000).

c) Sacarosa:

Es un disacárido no permeante de alto peso molecular, conocido también como O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructuofuranosido (Mayes, 1997b). En dilutores sin glicerol, la motilidad después del descongelamiento de los espermatozoides de carnero fue más alta en presencia de sacarosa que en presencia de glucosa, indicando un efecto crioprotector de los disacáridos (Aisen y col., 2000). La sacarosa protege la integridad de la membrana y la estructura proteica durante la deshidratación y rehidratación celular (Leslie y col., 1995).

Aparentemente no existen diferencias entre el tipo de azúcar (sacarosa, trehalosa) utilizado en el diluyente sobre la motilidad post descongelamiento de espermatozoides ovinos (Molinia y col., 1994b). En espermatozoides de ratones, la adición de trehalosa confiere un mayor efecto protector que los monosacáridos (Storey y col., 1998; An y col., 2000; Thompson y col., 2001) ó agentes permeantes (De Leeuw y col., 1993; Szein y col., 2001). Sin embargo, Sánchez-Partida y col. (1998) no encuentran efecto de la trehalosa en la motilidad de espermatozoides ovinos post descongelamiento. Molinia y col. (1994c) indican que la motilidad es superior en diluyentes con monosacáridos en comparación con diluyentes que contienen trehalosa y sacarosa.

Finalmente el dilutor debe mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico. Por tal motivo se debe tener en cuenta la osmolaridad del diluyente porque esta afecta a la calidad espermática luego del descongelamiento. Se han obtenido buenos resultados post descongelamiento en medios con una osmolaridad entre 300 a 360 mOsm/kg (Molinia y col., 1994c) ó entre 450 a 750 mOsm/kg (Fiser y col., 1981). La integridad de la membrana plasmática resiste hasta 1000 mOsm/kg en condiciones hiperosmóticas. No obstante, la motilidad y la integridad de membranas de los espermatozoides descongelados se alteran a niveles superiores a 600 mOsm/kg (Curry y Watson, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procedimiento experimental

El estudio consistió en dos fases, donde la primera fue condicional de la segunda. La primera fase (Experimento 1) permitió identificar y seleccionar, entre tres dilutores, al dilutor a ser incorporado en todos los tratamientos de la segunda fase del estudio (Experimento 2). La segunda fase consistió en evaluar la calidad del semen ovino luego de ser criopreservado con cuatro combinaciones de dos agentes crioprotectores permeante y dos agentes crioprotectores no permeantes.

3.1.1. Lugar y Materiales de Estudio

El trabajo se ejecutó entre los meses de agosto de 2004 a febrero de 2005, en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se utilizaron 56 eyaculados (24 para el primer experimento y 32 para el segundo experimento) provenientes de la colección de semen de 4 machos adultos. Las colecciones de semen se realizaron una vez por semana en el Establo de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos utilizando una vagina artificial de ovino, colectándose el semen de los 4 machos el mismo día. Los cuales fueron mezclados para obtener una única muestra.

3.1.2. Tratamientos y mediciones

3.1.2.1. Experimento 1: Efecto de tres dilutores

En el experimento 1 se evaluaron los siguientes dilutores (mas referencias ver Apéndice 4):

1) **Dilutor A** (fracción 1: tris 27.1 g, ácido cítrico 14 g, fructosa 10 g y yema de huevo 10 %, diluidos en agua bidestilada csp. 1 L; y fracción 2: glicerol 6 %, trehalosa 76 g y EDTA 1.5 g, diluidos en la fracción 1 csp. 1 L);

2) **Dilutor B** (fracción 1: tris 18.17 g, ácido cítrico 9.6 g, fructosa 29.72 g y yema de huevo 10 %, diluidos en agua bidestilada csp. 1 L; y fracción 2: glicerol 6%, trehalosa 76 g y EDTA 1.5 g, diluidos en la fracción 1 csp. 1 L); y

3) **Dilutor C** (fracción 1: leche descremada 9.5 mL y yema de huevo 0.5 mL; fracción 2: fructosa 0.49 g, yema de huevo 0.5 mL, trehalosa 0.89 g, EDTA 0.02 g y glicerol 1.47 mL, diluidos en la fracción 1 csp. 10 mL).

Para lo cual, se emplearon 6 muestras obtenidas de las colecciones de 24 eyaculados de semen procedentes de cuatro machos, las cuales fueron divididas entre los tres tratamientos. Se evaluó el efecto de los dilutores sobre los porcentajes de motilidad progresiva y de espermatozoides vivos con acrosoma intacto post-descongelamiento.

3.1.2.2. Experimento 2: Efecto de diferentes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes

En este experimento se empleó como dilutor a aquel dilutor que en el experimento 1 mostró los mayores valores de motilidad progresiva y espermatozoides vivos con acrosoma intacto. Las combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes evaluadas (tratamientos) fueron: 1)Glicerol – Trehalosa, 2)Glicerol – Sacarosa, 3)Etilenglicol – Trehalosa y 4)Etilenglicol – Sacarosa. Las características de la preparación de cada tratamiento se detalla en el Apéndice 5.

Para lo cual, se emplearon 8 muestras obtenidas de las colecciones de 32 eyaculados de semen procedentes de cuatro machos, las cuales fueron

dividas entre los cuatros tratamientos. Se evaluó el efecto de las combinaciones de crioprotectores sobre los porcentajes de motilidad progresiva y de espermatozoides vivos con acrosoma intacto post-descongelamiento, termoresistencia y de espermatozoides con membrana plasmática íntegra.

3.2. Procedimiento metodológico

3.2.1. Obtención de muestras de semen

En cada ensayo, las muestras de semen fueron obtenidas de los 4 machos simultáneamente, para luego ser trasladadas inmediatamente al laboratorio. Posteriormente se evaluó el semen fresco para verificar su calidad.

Se trabajó únicamente con las muestras de semen que tuvieron un volumen mayor a 0.8 mL, una motilidad masal mayor que 3 y una concentración mayor a 1000×10^6 de espermatozoides por mL.

Las muestras de semen que cumplieron los requisitos de calidad, descritos anteriormente, fueron mezcladas para formar un pool de semen, el cual fue utilizado como muestra inicial para el desarrollo de los experimentos.

El volumen fue medido en una probeta de 10 mL. La evaluación de la motilidad masal se realizó mediante la observación directa de una gota de semen fresco en un microscopio óptico a 100x, y fue estimada usando la escala de 0 a 5 (ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Valoración de la motilidad masal para semen ovino (Ax y col., 2000)

Escala	Clase	Patrón de movimiento
0	Muertos	Inmovilidad total
1	Muy pobre	Movimiento individual
2	Pobre	Movimiento de ondas muy lento
3	Regular	Movimiento de ondas general, poca amplitud
4	Bueno	Movimiento rápido de ondas
5	Muy bueno	Movimiento rápido de ondas con remolinos

Para medir la concentración espermática se procedió previamente a diluir el semen fresco (1:400), para facilitar el conteo de espermatozoides mediante el uso de una cámara de Neubauer y con el empleo de un microscopio óptico a 400x. La concentración espermática se expresó en millones de espermatozoides/mL (Ax y col., 2000).

3.2.2. Procedimiento de criopreservación de semen

La criopreservación de semen ovino consistió en los procesos de enfriamiento y congelamiento. El enfriamiento comprendió 2 fases: en la primera, se diluyó el semen con la primera fracción del dilutor a 35°C (en la misma proporción), luego se disminuyó (1°C cada 3 minutos) la temperatura hasta llegar a los 5°C en un lapso de 90 minutos. En la segunda fase se agregó la segunda fracción del dilutor (sustancias crioprotectoras), y luego se incubó a 5°C durante 30 minutos para estabilizar la muestra (Salamon y Maxwell, 2000), obteniendo una concentración final de 300 a 400 millones de espermatozoides/mL. Terminado el periodo de estabilización, las muestras fueron envasadas con ayuda de una jeringa en pajillas de 0.5 mL. A continuación, las pajillas fueron congeladas con los vapores de nitrógeno líquido, para tal efecto se disminuyó la temperatura de 5 a -25°C en un lapso de 6 minutos (5°C/minuto) y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196° C (Byrne y col. 2000).

3.2.3. Mediciones post-descongelamiento

Las variables estudiadas en el Experimento 1 fueron la motilidad progresiva y viabilidad e integridad acrosomal, mientras que en el Experimento 2 además se evaluaron la integridad de la membrana plasmática y la termoresistencia. Dichas evaluaciones se efectuaron 24 horas después de haberse finalizado el proceso de congelación. El descongelamiento se realizó sumergiendo a las pajilla en un recipiente con agua temperada a 37°C por 10 segundos, luego del cual, el semen fue diluido 1:10 con una solución base

isotónica (comprendida por 27.1 g de Tris, 14.0 g de Ácido cítrico, 10.0 g de Fructosa y agua bidestilada csp. 1000 mL.) temperada a 37°C, y luego de 20 minutos se procedió a la evaluación.

3.2.3.1. Motilidad Progresiva

Se diluyó el semen con suero fisiológico a 37°C, a razón de 1:20, luego se colocó una gota de aproximadamente 25 μ L de la dilución sobre una lámina portaobjeto temperada y se cubrió con una lámina cubreobjeto (18 x 18 mm.), después fue observada en microscopio óptico a 400x, calculándose el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, considerándose sólo a aquellos que presentaron un movimiento rápido hacia delante (Ax y col., 2000).

3.2.3.2. Viabilidad e Integridad acrosomal

Para la evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal se procedió al uso de la técnica de doble tinción descrita por Didion y col. (1989), que consistió en la adición de dos colorantes, el primero, Azul Tripan, que nos permitió diferenciar los espermatozoides vivos y muertos, y el segundo, Giemsa, que nos permitió visualizar la membrana acrosomal.

El protocolo fue el siguiente: primero se incubaron, 50 μ L de semen con 50 μ L de Azul Tripan al 2% por 10 minutos a 37°C., luego se realizaron de 2 a 3 lavados con 1 ml de PBS centrifugando a 700 g (1800 rpm) durante 6 minutos. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 200 μ L de PBS, se extendió 20 μ L de la solución en un portaobjetos y se dejó secar en platina temperada a 37 °C. Luego, la lámina fue cubierta con solución Giemsa al 20% (preparado inmediatamente antes de usar) por 40 minutos. Finalmente la lámina fue enjuagada con agua destilada y secada.

Se observó un mínimo de 200 espermatozoides en diferentes campos ópticos con lente de inmersión (1000x). Se consideraron espermatozoides vivos con acrosoma intacto a los que presentaron un coloración pálida o transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y al mismo

tiempo tenían el acrosoma teñido de color fucsia. Luego se procedió a calcular el porcentaje de los espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

3.2.3.3. Termoresistencia

Para medir la termoresistencia se empleó la técnica descrita por Smith y Kaune (2004). Para lo cual, las muestras de semen, una vez descongeladas, fueron inicialmente diluidas en una solución base isotónica (descrita en la sección 3.5) que luego fueron incubadas a 37° C durante 4 horas, para luego ser sometidas a la técnica de la doble tinción (descrita en la sección 3.2.4) y determinar con ello el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto luego del proceso de termoresistencia.

3.2.3.4. Integridad de membrana plasmática

Para determinar la integridad de la membrana plasmática, los espermatozoides fueron expuestos a un medio hipoosmótico (Jeyendran y col., 1984), compuesto por 0.735 g de citrato de sodio dihidratado más 1.351 g de fructosa, disueltos en 100 ml de agua bidestilada. Así, en un tubo de ensayo fueron mezclados 50 µL de la muestra de semen con 715 µL del medio hipoosmótico, previamente temperado a 37 °C, e incubado luego por espacio de una hora a 37° C (Santiani y col., 2004). Posteriormente una gota de dicha solución fue puesta y extendida sobre un portaobjetos, para su lectura, empleando un microscopio óptico en aumento de 400x, se contabilizó un mínimo de 200 espermatozoides por lámina. A partir de los cuales se procedió al cálculo del porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra. Considerándose solo aquellos espermatozoides con membrana plasmática íntegra o funcional, los compatibles con la presencia de la cola hinchada como producto de la prueba hipoosmótica a la cual fueron sometidos.

3.3. Análisis Estadístico

Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico Prism ® versión 3,0. Para determinar si existió diferencia estadística entre los tratamientos se empleó el análisis de varianza (ANOVA), y la prueba de Tukey para determinar entre que tratamientos hubo diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos evaluados (Zar, 1999).

Previamente, todos los porcentajes fueron transformados a valores angulares (ángulo = $\arcseno \sqrt{x}$) para acercar los datos a la distribución normal (Zar, 1999).

Con la finalidad de uniformizar la condición inicial del semen fresco, los resultados se calcularon de la siguiente manera (Aisen y col 2000, 2002):

$$x = \frac{\text{Valor inmediatamente descongelado}}{\text{Valor de semen fresco}} \times 100$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentarán los resultados del presente trabajo, los cuales a la vez serán discutidos. En primera instancia se presentarán los resultados referidos a la evaluación de tres dilutores para la criopreservación de semen ovino, para luego presentar los resultados de la evaluación de cuatro combinaciones de dos agentes crioprotectores permeantes y dos no permeantes.

4.1. Experimento 1: Efecto de tres dilutores.

Los resultados del primer experimento se resumen en el Cuadro 7. Se puede observar que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue superior ($p < 0.05$) cuando se empleó el Dilutor A, siendo casi el doble que con el Dilutor B, y este último, a su vez mayor ($p < 0.05$) que con el Dilutor C. De la misma manera, para el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto se obtuvo similar tendencia y magnitud que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Consiguientemente, el Dilutor A permitió una mayor estabilidad de la motilidad y viabilidad, permitiendo una mayor sobrevivencia post-descongelamiento en comparación con los otros dilutores.

Cuadro 7. Valores promedio (%) post-descongelamiento de semen ovino criopreservado con tres dilutores diferentes.

Dilutores	Motilidad Progresiva	Vivos con acrosoma intacto
Dilutor A	69.29 ± 6.76 ^a	63.12 ± 4.64 ^a
Dilutor B	37.40 ± 5.76 ^b	34.86 ± 6.50 ^b
Dilutor C	23.39 ± 6.58 ^c	23.22 ± 8.23 ^c
Semen Fresco	89.05 ± 3.76	86.58 ± 6.08

Letras ^(a, b, c) diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en columnas.

Los resultados demuestran que los dilutores que contenían tris (Dilutor A y Dilutor B), tuvieron una mejor capacidad de amortiguación, de regulación osmótica y baja toxicidad en comparación con el dilutor que contenía leche descremada (Dilutor C) (Salamon y Maxwell, 1995a). Las diferencias encontradas entre el Dilutor A y el Dilutor B pueden deberse a las diferencias entre las concentraciones de tris empleadas por cada dilutor. Ya que, el mayor porcentaje de motilidad progresiva y de espermatozoides vivos con acrosoma intacto post-descongelamiento se obtuvo con el Dilutor A, que tiene una mayor concentración de tris (224 mM), en comparación con el Dilutor B (150 mM). Por el contrario a lo encontrado por Molinia y col. (1994b), quienes al comparar diferentes concentraciones de tris (de 100 a 300 mM) encontraron una mejor motilidad progresiva a 150 mM de tris. Pero los resultados encontrados por Molinia y col. (1994a) son inferiores a los reportados por Aisen y col (2000), quienes utilizaron un dilutor de las mismas características al Dilutor A. Las diferencias en las concentraciones de ácido cítrico y fructosa entre el Dilutor A y el Dilutor B, por la necesidad de regular el pH y la osmoralidad de dichos dilutores, podrían explicar en parte las tendencias observadas entre ambos.

En lo que concierne al Dilutor C que es en base a leche descremada, los resultados obtenidos en el presente estudio son diferentes a los de otros experimentos donde no se emplearon crioprotectores no permeantes (Gil y col., 2000; 2003b; Santiani, 2003). Así, Gil y col (2000) al emplear un medio en base a leche descremada obtuvieron valores de motilidad progresiva post-

descongelamiento (46.5 %) superiores a un dilutor tris (33.7 %) sin crioprotectores no permeantes. Este hecho presumiblemente se debe a que en nuestro estudio empleamos la Trehalosa como crioprotector no permeante. Esto corrobora que los altos niveles de calcio presente en la leche pueden afectar negativamente la acción crioprotectora de la Trehalosa (Foote y col., 1993; Aisen y col., 2000), lo que alteraría la estabilidad de las membranas de los espermatozoides durante el congelamiento.

4.2. Experimento 2: Efecto de diferentes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes.

En este experimento se utilizó el Dilutor A como dilutor base, dado que resultó ser significativamente mejor que los otros dos dilutores utilizados en el experimento anterior.

Los resultados de este experimento se resumen en el Cuadro 8. Donde podemos apreciar que, independientemente al tipo de crioprotector no permeante empleado, la calidad del semen post-descongelamiento fue significativamente mejor en los grupos que utilizaron glicerol como crioprotector permeante en comparación con los grupos con etilenglicol. Por otro lado, no se observó diferencias entre los grupos glicerol-trehalosa versus glicerol-sacarosa, ni etilenglicol-trehalosa versus etilenglicol-sacarosa. Estos resultados indican que no existen diferencias entre los agentes crioprotectores no permeantes.

Los resultados de motilidad progresiva fueron mejores en los grupos glicerol-sacarosa y glicerol-trehalosa, en comparación con los grupos etilenglicol-sacarosa y etilenglicol-trehalosa. La ventaja del uso del glicerol sobre el etilenglicol, como crioprotector permeante en prevenir parcialmente la pérdida de la motilidad progresiva post descongelamiento en semen de ovinos, ha sido corroborada en estudios realizados tanto por Molinia y col. (1994a) como por Santiani (2003). Asimismo, en semen de caprinos también se ha encontrado una mejor motilidad progresiva post descongelamiento con glicerol en comparación con etilenglicol (Bittencourt y col., 2004). Sin embargo, en protocolos de criopreservación de semen de otras especies, como humanos (Gilmore y col., 2000; Deppe y col., 2003), equinos (Ball y Vo, 2001), bovinos

Cuadro 8. Valores promedio (%) post-descongelamiento de semen ovino criopreservado con diferentes combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes.

Crioprotectores Permeante + No permeante	Motilidad progresiva	Vivos con acrosoma intacto	Termo-resistencia	Integridad de membrana
Glicerol + Trehalosa	64.12 ± 4.83 ^a	57.80 ± 6.91 ^a	40.36 ± 4.38 ^a	62.71 ± 2.75 ^a
Glicerol + Sacarosa	64.16 ± 4.44 ^a	55.65 ± 6.19 ^a	37.68 ± 6.14 ^a	59.62 ± 1.33 ^a
Etilenglicol + Trehalosa	44.06 ± 4.33 ^b	37.52 ± 3.94 ^b	26.73 ± 6.57 ^b	40.30 ± 8.31 ^b
Etilenglicol + Sacarosa	48.52 ± 3.53 ^b	41.53 ± 4.05 ^b	24.89 ± 3.14 ^b	37.46 ± 3.64 ^b
Semen Fresco	83.57 ± 7.78	82.50 ± 2.67		66.88 ± 3.59

Letras ^(a, b) diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en columnas.

(Guthrie y col., 2002) y de chinchillas (Carrascosa y col., 2001) se han encontrado mejores resultados al usar etilenglicol. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican al glicerol como un crioprotector permeante efectivo para prevenir parcialmente la pérdida de motilidad progresiva de los espermatozoides de ovinos al ser sometidas a un proceso de criopreservación.

Se debe tener presente que el semen criopreservado siempre tiene una menor capacidad fecundante que el semen fresco. La reducción de la capacidad fecundante del semen criopreservado no sólo se debe a una disminución de la viabilidad espermática, sino que también a los trastornos subletales que experimentan los espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000). Por lo que es de suma importancia el evaluar la viabilidad e integridad acrosomal, dado que nos brinda un indicativo aproximado de la real capacidad fecundante que poseen los espermatozoides post-descongelamiento. En tal sentido, el semen que fue criopreservado con glicerol, como crioprotector permeante (más trehalosa ó sacarosa), resulta poseer una mayor proporción de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en comparación con el semen criopreservado con etilenglicol (más trehalosa ó sacarosa).

De la misma manera, los agentes crioprotectores permeantes empleados en este estudio influyeron significativamente sobre la integridad de membrana plasmática. Se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra cuando se utilizó glicerol en comparación con etilenglicol. Este parámetro es un indicativo de la funcionabilidad fisiológica de las membranas espermáticas. La alteración en la capacidad de regular el flujo de iones y agua por la membrana plasmática de los espermatozoides, produciría cambios relacionados con la capacitación prematura y la exocitosis acrosomal en el tracto reproductor de la hembra (Sanocka y Kurpysz, 2004).

El proceso de fecundación requiere que el espermatozoide pueda sobrevivir un periodo de tiempo prolongado en el tracto reproductivo de la hembra (Jainudeen y col., 2000), por lo cual, es de importancia evaluar la termoresistencia del semen criopreservado. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto post-termoresistencia fue mejor cuando se utilizó glicerol como crioprotector permeante con trehalosa y con sacarosa, frente a los obtenidos con etilenglicol-trehalosa y con etilenglicol-sacarosa.

Lo descrito anteriormente demuestra que el glicerol posee una mejor capacidad crioprotectora que el etilenglicol en espermatozoides ovinos. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de los espermatozoides ovinos a los efectos tóxicos que podrían tener las altas concentraciones de etilenglicol, por lo que sería interesante probar el etilenglicol a una menor concentración a la usada en el presente trabajo (2.25%). En trabajos previos, que compararon glicerol con etilenglicol, ya indicaban que el glicerol tiene un mejor efecto crioprotector para la criopreservación de semen ovino (Molinia y col., 1994a; 1994b; Santiani, 2003). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos sólo se había evaluado la motilidad progresiva. A diferencia de los anteriores, en el presente trabajo se evaluaron parámetros mucho más especializados como la viabilidad e integridad acrosomal, integridad de membrana y termoresistencia.

Con respecto a los crioprotectores no permeantes (trehalosa y sacarosa), estos no mostraron diferencia estadística significativa en lo concerniente a la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal, integridad de membrana y termoresistencia. Hecho que coincide con lo reportado en otros experimentos, en los cuales se demuestra que estos crioprotectores protegen muy bien a las células espermáticas del efecto de la criopreservación (Aisen y col., 1990; 1995; 2000; 2002; Molinia y col., 1994b). En ese sentido, Aisen y col. (2000) encontraron que la adición de trehalosa en un dilutor en base de Tris mejoró la motilidad progresiva en un 19 %. La trehalosa es un protector específico de las membranas espermáticas, como resultado de su interacción con los fosfolípidos (Aisen y col., 2000; 2002), puede unirse con el hidrogeno de las cabezas fosfolipídicas de la membrana de una manera mas fuerte que el glicerol (Foote y col., 1993) y además posee una acción crioprotectora relacionada al efecto osmótico, protege al espermatozoide del congelamiento por su interacción con la membrana (Aisen y col., 2002). Los resultados del presente experimento demuestran que la sacarosa tiene las mismas cualidades de protección que la trehalosa en el espermatozoide ovino durante el proceso de criopreservación. Esto se corrobora con otros estudios, donde no existe diferencia entre el tipo de azúcar (sacarosa, trehalosa) utilizado en el diluyente sobre la motilidad post descongelamiento de espermatozoides ovinos (Molinia y col., 1994b). Adicionalmente, Aisen y col. (1995) manifiestan que la trehalosa

posee una capacidad protectora específica de la membrana que no poseen otros disacáridos como la lactosa.

En los que respecta a la combinación de distintos agentes crioprotectores permeantes y no permeantes, se ha llegado a la conclusión que tanto la combinación glicerol con trehalosa y glicerol con sacarosa obtienen la mejor calidad de semen ovino criopreservado en dilutores en base a tris.

El presente trabajo es importante para comprender mejor el desempeño de los diferentes dilutores y agentes crioprotectores usados en la criopreservación de semen ovino. Sin embargo, aún se requieren otros estudios para mejorar la capacidad fecundante del semen criopreservado. Se concluye que un dilutor con las características del dilutor A, utilizando glicerol más trehalosa o sacarosa constituye una buena alternativa para la criopreservación de semen ovino.

V. CONCLUSIONES

- El Dilutor A, que contiene tris, ácido cítrico, fructosa, yema de huevo, trehalosa, glicerol y edta a una concentración determinada, tuvo un mejor desempeño en la criopreservación de semen ovino.
- El glicerol muestra ser el crioprotector permeante más eficaz en proteger al espermatozoide durante el proceso de criopreservación en comparación con el etilenglicol.
- La sacarosa y la trehalosa presentan cualidades crioprotectoras similares en la criopreservación de semen ovino.
- Por lo tanto, el Dilutor A utilizando glicerol más trehalosa o sacarosa constituyen una buena alternativa para la criopreservación de semen ovino

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablin, R. (1974). Immunologic properties of sex accessory tissue components. En: Male Accessory Sex Organs. D. Brandes (ed.). New York, Academic Press.
- Aboagla, E. y Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69, 1245–1250.
- Aisen, E.; Álvarez, H.; Venturino, A. y Larreguy, D. (1995). Efecto comparativo de los diluyoconservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación de semen ovino. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal.* 10, 223-231.
- Aisen, E.; Cisale, H. y Fernandez, H. (1990). Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. *Veterinaria Argentina.* 7, 176-182.
- Aisen, E.; Medina, V. y Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology.* 57, 1801-1808.
- Aisen, E.G., Álvarez, H.L., Venturino, A. y Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology.* 53, 1053-1061.
- An, T.Z., Iwakiri, M., Edashige, K., Sakurai, T. y Kasai, M. (2000). Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology.* 40, 237-249.

- Andrews, J., Nolan, J., Hammerstedt, R. y Bavister, B. (1994). Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 51, 1238-1247.
- Anduaga, J. (1980). Estudio comparativo de la congelación de semen bovino con el dilutor Tris (hidroximetil-aminometano). Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Arnoult, C.; Cardullo, R.; Lemos, J. y Florman, H. (1996) Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *PNAS.* 93: 13004-13009.
- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Háfiez, B. y Bellin, M.E. (2000). Semen evaluation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds), *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 365-375.
- Bailey, J. y Buhr, M. (1994). Cryopreservation alters the Ca^{++} flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M. y Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.* . 12, 323-330.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C. y Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience.* 1, 189-205.
- Ball, B.A. y Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* . 22, 1061-1069.
- Bazer, F.; Geisert, R. y Zavy, M. (2000). Fecundation, excision and implantation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds), *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 172-181.
- Bedford, J.M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 28, 108-120.

- Benoff, S. (1993). The role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Human Reproduction*. 8, 2001-2008.
- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N. y Sirard, M.A. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender. Protection by piruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*. 57, 1105-1122.
- Bittencourt, R.; Ribeiro, A.; Santos, A.; Fürst, R.; Teixeera, R. y Chalhoub, M. (2004). Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 487p.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 18, 127-131.
- Breitbart, H. y Spungin, B. (1997). The biochemistry of the acrosome reaction molecular. *Human Reproduction*. 3, 195–202.
- Byrne, G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J.P. y Boland, M.P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Repro. Sci.* 62, 265-275.
- Carrascosa, R.E., Martini, A.C., Ponzio, M.F., Busso, J.M., Ponce, A.A. y Lacuara, J.L. (2001). Storage of Chinchilla lanigera semen at 4 degrees C for 24 or 72 h with two different cryoprotectants. *Cryobiology*. 42, 301-306.
- Chen, Y.; Foote, R.; Tobback, C.; Zhang, L. y Hough, S. (1993). Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk- tris and whole milk extenders. *J. Dairy Sci.* 76, 1028-1034.
- Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod. Fertil.* 42, 277-285.
- Colas, G.; Guerin, Y., Briois, M. y Ortavani, R. (1987). Photoperiodic control of testicular growth in the ram lamb. *Anim. Repro. Sci.* 13, 255-262.
- Correa, J.R., Rodríguez, M.C., Patterson, D.J. y Zavos, P.M. (1996). Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and

their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*. 46, 413-420.

- Coy F., P. (1995a). Reproducción en ovejas y cabras. En: Garcia S., A.; Castejón M., F.; de la Cruz P., L.; Gonzalez G., J.; Murillo L. y M.; Salido R., G. (eds). *Fisiología Veterinaria*. Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 937-950.
- Coy F., P. (1995b). Fisiología de la gestación. En: Garcia S., A.; Castejón M., F.; de la Cruz P., L.; Gonzalez G., J.; Murillo L. y M.; Salido R., G. (eds). *Fisiología Veterinaria*. Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 861-874.
- Curry, M. (2000). Criopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5, 46-52.
- Curry, M.R. y Watson, P.F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 31, 39-46.
- D'Alessandro, A.G., Maternucci, A.G., Colonna, M.A. y Belliti, A. (2001). Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*. 55, 1159-1170.
- Darin-Bennett, A. y White, I. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. Y Espinosa, F. (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews*. 79, 481-510.
- Davis, B. (1981). Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval *Cell Biology*. 78, 7560-7564.
- Davis, B. K. (1978). Symp. Pharmacological Effects of Lipids, *Am. Oil Chem. Soc. Monograph No. 5* (Champaign, IL), pp.145-157.
- De las Heras, M.A., Valcárcel, A., Furnus, C., Pérez, L., Moses, D. y Baldassarre. (1996). Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Anim. Repro. Sci.* 45, 81-89.

- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, H.G., Colenbrader, B. y Werkleij, A.J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30, 32-44.
- Deppe, M., Ortloff, C., Salinas, G., Bravo, D. y Sánchez, R., 2003. Efecto de agentes crioprotectores sobre la preservación del acrosoma. II Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción, Temuco, Chile.
- Didion, B.A., Dabrinisky, J., Giles, J. y Graves, C.N. (1989) Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*. 22, 51-57.
- El-Alamy, M. y Foote, R.H. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Repro. Sci.* 65, 245-254.
- Fiser, P.S. y Fairfull, R.W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock). of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*. 23, 518-524.
- Fiser, P.S., Ainsworth, L. y Langford, G.A. (1981). Effect of osmolarity of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 18, 399-403.
- Florman, H. (1994). Sequential Focal and Global Elevations of Sperm Intracellular Ca^{2+} Are Initiated by the Zona Pellucida during Acrosomal Exocytosis. *Dev. Biol.* 165, 152-164.
- Foote, R.; Chen, Y.; Brockett, C. y Kaproth, M. (1993). Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalosa, taurine, or blood serum. *J. Dairy Sci.* 76, 1908-1913.
- Foote, R.H., Brockett, C.C. y Kaproth, M.T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Repro. Sci.* 71, 13-23.
- Fraser, L. (1995). Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. En: Human sperm acrosome reaction. Eds: Fenichel P., Parinaud J., Colloque/INSERIM John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, France, 236, 17-33

- Fraser, L. y McDermott C. (1992). Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. *J Reprod Fertil.* 96, 363-377
- García, J. y Vila, L. (1984). Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica.* 6, 219-225.
- Garner, D.L. y Háfiez, E.S.E (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
- Gerbers, D., Tubb, D. y Hyne, R. (1982). Requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem.* 257, 8980-8984
- Guthrie, H.D., Liu, J. y Critser, J.K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 67, 1811-1816.
- Gilmore, J.A., Liu, J., Woods, E.J., Peter, A.T. y Critser, J.K. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction.* 15, 335-343.
- Gil, J., Rodríguez-leazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003a). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology.* 59, 1157-1170.
- Gil, J., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology.* 54, 93-108.
- Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. (2003b). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.* 59, 1241-1255.
- Gillan, L. y Maxwell, W.M. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil. Supplement* 54, 271-283.
- Grossmann, M., Santaló, J. (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol.* 42, 87-108.

- Guyton , A.; Hall, J. (2000). tratado de Fisiologia Medica. Mc Graw-Hill – Interamericana de España, Madrid. 10^{ma} edición, pp 1280.
- Guerrero, H. (2004). Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Háfez, E.S.E. (2000). Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. En: Háfez, E.S.E. and Háfez. B (eds)., Reproduction in farm animals, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 431-442.
- Helleman, C. y Jara, C. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. Archivos de medicina veterinaria. 29, 153-160.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53, 47-58.
- Hoshi, K., Aita, T., Yanagida, K., Yoshimatsu, N. y Sato, A. (1990). Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. Human Reproduction. 5, 71-74.
- Hoskins, D. y Casillas, E. (1973). Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington D.C., American Physiological Society, pp. 453-460.
- Ishibashi, K.; Kuwanhara, M.; Gu, Y.; Kageyama, Y.; Tohsaka, A.; Suzuki, F.; Marumo, F. y Sasaki, S. (1997). Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. Journal of Biological Chemistry. 272, 20782–20786.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. y Zaneveld, L. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert. 70, 219-228.
- Jones, R. y Mann, T. (1977). Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. J Reprod Fertil. 50, 261-268.

- Jungnickel, M.; Marrero, H.; Birnbaumer, L.; Lemos J. y Florman, H. (2001) Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell. Biol.* 3, 499 – 502.
- Langlais, J. y Roberts, K.D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosomal reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research.* 12, 183-224.
- Kumar, S., Millar, J.D. y Watson, P.F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 46, 246-253.
- Langlais, J. y Roberts, K.D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosomal reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research.* 12, 183-224.
- Leslie, S.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J. y Crowe, L. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology.* 61, 3592–3597.
- Llanos, M. y Meizel, S. (1983). Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm in vitro. *Biol Reprod.* 28, 1043-1051.
- Luconi, M., Baldi, E., Krausz, C. y Forti, G. (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 55, 207-216.
- Mann, T. (1975). Biochemistry of semen. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System.* R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington, DC, American Physiological Society.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). *Male Reproductive Function and Semen.* New York, Springer- Verlag.
- Martínez, P. y Morros, A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Frontiers in Bioscience.* 1, 103-117.
- Maxwell, W. y Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 42, 55-65.

- Mayes, P. (1997a). Vía de la pentosa fosfato y otras vías del metabolismo de hexosas. En: Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (eds)., Bioquímica de Harper, 24^a edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. pp 245-256.
- Mayes, P. (1997b). Carbohidratos de importancia fisiológica. En: Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (eds)., Bioquímica de Harper, 24^a edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. pp 165-176.
- Mazur, P. (1965). Causes of injury in frozen and thawed cells. *Journal of General Physiology*. 47, 347-369.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanism and implications. *The American Journal of Physiology*. 247, 125-142.
- Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T. y Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57, 327-344.
- Miller, S.J. (1986). Artificial breeding techniques in sheep. En: Fieldeb (ed)., *Ovine, Morrow, D.A., Current Therapy in Theriogenology 2*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 884-887.
- Molinia, F.C., Evans, G. y Maxwell, W.M. (1994a). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42, 849-858.
- Molinia, F.C., Evans, G. y Maxwell, W.M. (1994c). In vitro evaluation of switterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction, Nutrition, Development*. 34, 491-500.
- Molinia, F.C., Evans, G., Quintana Casares, P.I. y Maxwell, W.M. (1994b). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Repro. Sci.* 36, 113-122.
- Mantovani, R., Rora, A., Falomo, M.E., Bailoni, L. y Vicenti, L. (2002). Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction, Nutrition, Development*. 42, 217-226.

- Naz, R. 1996. Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Frontiers in Bioscience*. 1, 206-213.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. y Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57, 823-836.
- Pereira, S.M., Rigon, R.C., Mezzalira, A. y Cecim, M. (2002). Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural*. 32, 649-655.
- Pérez, L.J., Valcárcel, A., De las Heras, M.A., Moses, D. y Baldassarre, H. (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46, 131-140.
- Prado, V., Orihuela, A., Lozano, S. y Pérez-León, I. (2002). Management of the female stimulus during semen collection and its association with libido re-establishment and semen characteristics of goats. *J. Anim. Sci.* 80, 1520-1523.
- Palasz, A. y Del Campo, M. (1995). Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. En: *Seminario Internacional de Transferencia de Embriones: Biotecnologías y Técnicas Avanzadas*. Montevideo, Uruguay. 78-85.
- Publicover, S. y Barratt, C. (1999). Voltage-operated Ca^{2+} channels and the acrosome reaction: which channels are presents and what do they do? *Human Reproduction*. 14, 873-879.
- Quinn, P.J., White, I.G. y Cleland, R.W. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil*. 18, 209-220.
- Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313, 573-575.
- Roldan, E. (1998). Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience*. 3, 1109-1119.
- Salamon, S. y Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62, 77-111.

- Salamon, S. y Maxwell, W. (1995a). Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Repro. Sci.* 37, 185-249.
- Salamon, S. y Maxwell, W. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Repro. Sci.* 38, 1-36.
- Salamon, S. y Viser (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust J Biol Sci.* 25, 605-618.
- Sánchez-Partida, L.G., Setchell, B.P. y Maxwell, W.M. (1998). Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reproduction, Fertility, and Development.* 10, 347-357.
- Sanocka, D. y Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2, 12-18.
- Santi, C.; Santos, T.; Hernández-Cruz, A. y Darszon A. (1998) Properties of a Novel pH-dependent Ca^{2+} Permeation Pathway Present in Male Germ Cells with Possible Roles in Spermatogenesis and Mature Sperm Function. *J. Gen. Physiol.* 112, 33-53.
- Santiani, A. (2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile.
- Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L., Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. XXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Piura, Perú, 20 al 24 de setiembre.
- Shi, Q. y Roldan, E. (1995). Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesteroneinduced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod.* 52, 540- 546.
- Shivaji, S., Bharagava, P. y Scheit, K. (1984). Immunological identification of

seminalplasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biol. Reprod.* 30, 1237-1241.

- Smith, R. y Kaune, H. (2004) Ensayos de función espermática. En: Curso Teórico-Práctico: Entrenamiento en técnicas de análisis seminal. ISA-SAGACH, Temuco, Chile.
- Snider, D. y Clegg, E. (1975). Alteration of phospholipids in porcine spermatozoa during in vivo uterus and oviduct incubation. *J Anim Sci.* 40, 269-274.
- Storey, B., Noiles, E. y Thompson, K. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalosa, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 37, 46-58.
- Sztein, J., Noble, K., Farley, J. y Mobraaten, L. (2001). Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 42, 28-39.
- Thompson, K., Richa, J., Liebhaber, S. y Storey, B. (2001). Dialysis addition of trehalosa/glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young. *J Androl.* . 22, 339-244.
- Trounson, A. (1986). Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 4, 1-12.
- Tomes, C., McMaster, C. y Saling, P. (1996). Activation of mouse PIP2-PLC by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev.* 43, 196-204.
- Vega, A., Treviño, C. y Félix, R. (2002). Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva.* 21, 89-95.
- Vila, L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol.* 6, 227-236.
- Vila, L. y Carretero, F. (1985). Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol.* 7, 61-67.
- Vila, L. y García, T. (1983). Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin*

Hematol. 5, 135-142.

- Valcárcel, A., De las Heras, M., Pérez, L., Moses, D. y Baldassarre, F. (1997). Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim. Repro. Sci.* 45, 299-309.
- Walensky, L. y Snyder, S. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 130, 857-869.
- Watson, P. (1975). The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fertil.* 42, 105-111.
- Watson, P. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil.* 62, 483-492.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 60-61, 481-492.
- Watson, P. y Martin, I. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Science.* 28, 153-159.
- White, I. (1980). Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.
- Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhou, R., Sky, B., Chou, K., Oswald, M. y Hang, A. (1990). Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitation medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 47-53.

VIII. APÉNDICES

Apéndice 1. Capacitación espermática y reacción acrosomal en semen de ovino fresco y congelado

Autor	No capacitados	Capacitados	Rx. acrosomal
Semen Fresco			
Maxwell y Watson, 1996	60%	18%	19%
Pérez y col., 1996	75-80%	20%	4%
Paulenz y col., 2002	85-90%	5-15%	1-2%
Semen Congelado			
Maxwell y Watson, 1996	5%	65%	25-30%
Pérez y col., 1996	15%	80-90%	6%
Gil y col., 2000	34-49%	50-54%	10-11%
Gil y col., 2003a	26-28%	61-62%	10-12%
Gil y col., 2003b	47-60%	35-56%	3-8%
D'Alessandro y col., 2001			9,7%
Molinia y col., 1994b	48-52% de acrosoma intacto		
Hellemann y Jara, 1997	40-60% de acrosoma intacto		
Aisen y col., 2000	70-75% de acrosoma intacto		

Apéndice 2. Motilidad progresiva de semen ovino post-descongelamiento obtenida con diferentes dilutores

Autores	Dilutor	Complementos	Mot
Molinia y col, 1994b	Tris 100 mM	Ac. cítrico-Yema de huevo- glucosa- glicerol	36.2
	Tris 150 mM	Ac. cítrico-Yema de huevo- glucosa- glicerol	41.0
	Tris 200 mM	Ac. cítrico-Yema de huevo- glucosa- glicerol	39.3
	Tris 250 mM	Ac. cítrico-Yema de huevo- glucosa- glicerol	38.0
	Tris 300 mM	Ac. cítrico-Yema de huevo- glucosa- glicerol	35.7
Gil y col., 2003b	Leche descremada	Yema de huevo 5%- Fructosa- Glicerol.	63
		Yema de huevo 10%-Fructosa- Glicerol.	61
		Yema de huevo 15%-Fructosa- Glicerol.	60
		Yema de huevo 20%-Fructosa- Glicerol.	57
El-Alamy y Foote, 2001	Tris	Yema de huevo 20 %- ac. cítrico- glucosa-glicerol- equex-STM.	47
		Yema de huevo 30 %- ac. cítrico- glucosa-glicerol- equex-STM.	41
		Yema de huevo 40 %- ac. cítrico- glucosa-glicerol- equex-STM.	27
Hellmann y Jara, 1997	Tris	Ac. cítrico-Yema de huevo- fructosa- glicerol	46.7
		Ac. cítrico-Yema de huevo- fructosa- glicerol- Equex- STM	51.7
	Citrato de sodio	Ac. cítrico-Yema de huevo- glicerol	29.2
		Ac. cítrico-Yema de huevo- glicerol- Equex-STM	43.7
Gil y col., 2000	Leche descremada	Yema de huevo- glicerol- fructosa	46.5

	Tris	Ac. cítrico-Yema de huevo- fructosa- glicerol	33.7
Aisen y col., 1995	Tris	Ac. cítrico-Yema de huevo- fructosa- glicerol- trehalosa	80
	Tes-Tris	Glucosa- yema de huevo- glicerol	61
Molinia y col, 1994a	Tris	Yema de huevo 4.5 %- Ac. cítrico- glucosa- glicerol	27.4
	Tris	Yema de huevo 18 %- Ac. cítrico- glucosa- glicerol	30.5

Apéndice 3. Motilidad e integridad acrosomal de espermatozoides ovinos post - descongelamiento empleando diferentes crioprotectores

Autores	CP	CNP	Móviles	Integridad Acrosomal	Observaciones
Aisen y col., 2002*	Glicerol 3%		49	67	Dilutor en base de Tris- Ac. cítrico- Fructosa- Yema de huevo. Osmolaridad 875 mOsm.
	Glicerol 3%	Trehalosa 50 mM	52	68	Osmolaridad 900 mOsm.
	Glicerol 3%	Trehalosa 100 mM	65	75	Osmolaridad 925 mOsm
	Glicerol 3%	Trehalosa 200 mM	29	58	Osmolaridad 975 mOsm
	Glicerol 3%	Trehalosa 400 mM	12	52	Osmolaridad 1075 mOsm
Aisen y col., 2000**	Glicerol 3%		58	63	Dilutor en base de Tris- Ac. cítrico- Fructosa- Yema de huevo.
	Glicerol 3%		52	68	Dilutor +EDTA
	Glicerol 3%	Trehalosa	64	68	
	Glicerol 3%	Trehalosa	71	72	Dilutor +EDTA

Molinia y col., 1994b		Sacarosa	29.8		Dilutor en base de Tris- Ac. cítrico- Glucosa- Yema de huevo.
		Trehalosa	25.3		
	Glicerol 2.5 %	Sacarosa	39.2		
	Glicerol 2.5%	Trehalosa	37.7		
	Glicerol 5%	Sacarosa	38.9		
	Glicerol 5%	Trehalosa	38.7		
Molinia y col, 1994a	Dimetil-sulfóxido 1.5%		8		Dilutor en base de Tris- Ac. cítrico- Glucosa- Yema de huevo.
	Dimetil-sulfóxido 3%		4.9		
	Dimetil-sulfóxido 6%		4.4		
	Etilenglicol 1.5 %		35.3		
	Etilenglicol 3 %		44.7		
	Etilenglicol 6 %		32.8		
	Glicerol 1.5 %		40.9		
	Glicerol 3 %		44.6		
	Glicerol 6 %		51.7		

	Propanodio 1.5%		34.4		
	Propanodio 3%		32.7		
	Propanodio 6%		13.1		
Santiani, 2003***	Etilenglicol		11.7	3.5	Leche descremada- Yema de huevo- glicerol- fructosa
	Dimetil- sulfóxido		1.9	8	
	Glicerol		37.9	26.3	
	Glicerol		52.2	40.8	Dilutor + 1 mM Tempo
	Glicerol		48.3	35.9	Dilutor + 1 mM Tempol
Guerrero, 2005	Glicerol	Trehalosa	40.3		Tris- Ac. cítrico- Fructosa- Glicina- Yema de huevo
	Glicerol	Lactosa	30.0		
Aisen y col., 1995	Glicerol	Dextrano- Lactosa- Rafinosa	50	48	Tris- Ac. cítrico- fructosa- yema de huevo- glicina- citrato de sodio
	Glicerol		61	57	Tes- Tris- glucosa- yema de huevo
	Glicerol	Lactosa	50	48	Tris- Ac. cítrico- fructosa- yema de huevo
	Glicerol	Trehalosa	80	74	Tris- Ac. cítrico- fructosa- yema de huevo

* Valores sobre el porcentaje del semen fresco: 80% motilidad, 93.7% integridad de acrosoma, 80.1% integridad de membrana.

** Valores sobre el porcentaje del semen fresco: 83.8% motilidad, 92.5% integridad de acrosoma.

*** Valores de viabilidad e integridad del acrosoma.

Nota: **CP**: Crioprotector permeante; **CNP**: Crioprotector no permeante

Apéndice 4. Preparación de dilutores utilizados en el experimento 1

1) Dilutor A descrito por Aisen y col. Col. (2000):

a) Fracción 1:

Tris	27.1 g	Amresco (826)
Ácido cítrico	14.0 g	Sigma (C0759)
Fructosa	10.0 g	Labgaurd (7756)
Yema de huevo	100 mL	
Agua bidestilada csp.	1000 mL	Trifarma

b) Fracción 2:

Glicerol	60 mL	Merck (1.04094)
EDTA	1.5 g	Sigma (ED4S)
Trehalosa	76.0 g	Merck (1.08216)
Primera fracción csp	1000 mL	

2) Dilutor B adaptado de Molinia y col. (1994b):

a) Fracción 1:

Tris	18.17 g	Amresco (826)
Ácido cítrico	9.6 g	Sigma (C0759)
Fructosa	29.72 g	Labgaurd (7756)
Yema de huevo	100 mL	
Agua bidestilada csp.	1000 mL	Trifarma

b) Fracción 2:

Glicerol	60 mL	Merck (1.04094)
EDTA	1.5 g	Sigma (ED4S)
Trehalosa	76.0 g	Merck (1.08216)
Primera fracción csp	1000 mL	

3) Dilutor C adaptado de Santiani (2003):

a) Fracción 1 (10 mL):

Leche descremada	9.5 mL
Yema de huevo	0.5 mL

b) Fracción 2 (10 mL):

Fructosa	0.49 g	Labgaurd (7756)
Yema de huevo	0.5 mL	
Trehalosa	0.89 g	Merck (1.08216)
EDTA	0.02 g	Sigma (ED4S)
Fracción 1 csp.	10.00 mL	
Retirar de la solución anterior	1.47 mL	
Glicerol	1.47 mL	Merck (1.04094)

Apéndice 5. Preparación de dilutores con glicerol-trehalosa, glicerol-sacarosa, etilenglicol-trehalosa y etilenglicol-sacarosa utilizados en el experimento 2

a) Fracción 1:

Tris	27.1 g	Amresco (826)
Ácido cítrico	14.0 g	Sigma (C0759)
Fructosa	10.0 g	Labgaurd (7756)
Yema de huevo	100 mL	
Agua bidestilada csp.	1000 mL	Trifarma

b) Fracción 2:

		Glicerol + Trehalosa	Glicerol + Sacarosa	Etilenglicol + Trehalosa	Etilenglicol + Sacarosa
Glicerol	Merck (1.04094)	60 mL	60 mL		
Etilenglicol	Merck (1.09621)			45 mL	45 mL
Trehalosa	Merck (1.08216)	76.0 g		76.0 g	
Sacarosa	Sigma (S8501)		76.0 g		76.0 g
EDTA	Sigma (ED4S)	1.5 g	1.5 g	1.5 g	1.5 g
1 ^{ra} Fracción csp		1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL