



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en salud y producción animal sustentable

**Evaluación del efecto de plasma seminal hetero específico (bovino a ovino)
sobre la congelabilidad de semen de carnero.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable.

Presenta LBI. Ximena Vargas Menéndez

Dirigido por:

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Querétaro, Qro Diciembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y producción animal sustentable

**Evaluación del efecto de plasma seminal hetero específico (bovino a ovino)
sobre la congelabilidad de semen de carnero.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en salud y producción animal sustentable

Presenta:

Ximena Vargas Menéndez

Dirigido por:

Dr. Héctor Raymundo Vera

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Presidente

Dr. Héctor Andrade Monte mayor

Secretario

Dr. Héctor Jiménez Severiano

Vocal

Dr. Luis Javier Montiel Olguín

Suplente

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Suplente

Campus Juriquilla, Querétaro, Qro

Diciembre 2019

México

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres.

A mi papá por darme el ejemplo de perseverancia y de amor a la vida y a mi mamá por ser la primera en alentarme a seguir mis sueños y a ser feliz. Por este camino que nos ha hecho aprender uno del otro y de la vida, los amo.

Dirección General de Bibliotecas UAO

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la UAQ por mi formación desde la licenciatura.

A la Facultad de ciencias naturales y a CONACYT sin su apoyo este trabajo no sería posible.

Al Dr. Héctor Vera por su enseñanza y paciencia con mis malas matemáticas.

A mis compañeros de generación y del laboratorio de reproducción.

A Alberto Pérez por resolver mis dudas, por su apoyo incondicional y su amor.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
CONTENIDO.....	III
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Ovino cultura en México.....	3
2.2 Biotecnología reproductiva.....	5
2.3 Semen y sus componentes.....	7
2.3.1 Espermatozoides	7
2.3.2 Movimiento.....	8
2.3.3 Plasma seminal	9
2.4 Proteínas BSP.....	11
2.5 Estrés oxidativo y lipoperoxidación	12
2.6 Procesamiento de semen.....	14
2.6.1 Obtención del eyaculado	14
2.6.2 Empaquetamiento del semen	16
2.6.2.1 Diluyentes	16
2.6.2.2 Curva de enfriamiento	18
2.6.2.3 Congelación	18
2.7 Evaluaciones de eyaculados.....	19
2.7.1 Evaluaciones pre-congelación.....	19
2.7.1 Evaluación post congelación.....	22
2.7.1.1 Prueba hiposmótica	22
2.7.1.2 Motilidad progresiva	23
3 HIPÓTESIS	27
4 OBJETIVOS	27

4.1	Objetivo general	27
4.2	Objetivos específicos	27
5	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1	Ubicación	28
5.2	Población y muestras	28
5.3	Experimento	28
5.3.3	Diseño experimental	33
5.4	Evaluaciones.....	39
5.4.1	Evaluación de patrones de motilidad por sistema computarizado (CASA) 39	
5.4.2	Evaluación de funcionalidad de la membrana plasmática por el método de hinchazón hipo-osmótica (HOST).....	41
5.4.3	Evaluación de integridad del acrosoma por fijación en solución de Hancock. 42	
5.5	Análisis estadístico.....	43
6.	RESULTADOS.....	44
6.1	Concentración de proteína en plasma seminal por LOWRY	44
6.2	Gel de electroforesis SDS-PAGE para plasma seminal de bovino y carnero. 44	
6.3	Patrones de motilidad por análisis computarizado CASA.....	46
6.4	Funcionalidad de membrana por prueba HOST.....	46
6.5	Integridad de acrosoma por fijación en Hancock	47
7	DISCUSIÓN.....	48
8	CONCLUSIÓN.....	54
9	LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Uso de biotecnologías por especie	6
2. Patrones de movimiento de espermatozoides sub fértiles o infértiles.	8
3. Características del semen de carnero	15
4. Parámetros cinéticos de CASA	24
5. Valores reportados en semen de ovino	26
6. Curva estándar utilizada para prueba de Lowry	31
7. Promedio de valores de los eyaculados colectados y utilizados en el experimento	33
8. Concentraciones de plasma seminal de toro utilizadas en el experimento.	35
9. Ejemplo de cálculo del total de diluyente a adicionar por tratamiento.	36
10. Lecturas de la concentración de proteína en plasma seminal de toro (BSP) y plasma seminal de carnero (RSP)	45
11. Resultados de patrones de motilidad por análisis computarizado CASA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Figura	Página
1	Morfología del espermatozoide maduro	7
2	Proceso de lipo peroxidación	12
3	Recolección de semen de carnero	16
4	Conteo en cámara de Neubauer mejorada	21
5	Representación esquemática de diferentes morfologías expuestas a estrés por una solución hiposmótica. a) no alterado. b-g) espermatozoides con diferentes niveles de hinchamiento	23
6	Vagina artificial para carneros	30
7	Escalera de peso molecular de amplio espectro (BioRad)	33
8	Obtención de eyaculados de carnero con vagina artificial en campus Amazcala	35
9	Ejemplo de la preparación del baño maría para realizar una réplica del experimento	37
10	Baño maría individuales en refrigerador	38
11	Empaquetamiento de semen diluido en pajillas.	39
12	Hielera con nitrógeno para congelación con vapor de nitrógeno	39
13	Pajillas en nitrógeno	40
14	Cámara Leja para sistema CASA	41
15	Evaluación en tiempo real de motilidad progresiva	41
16	Campo de observación para prueba HOST	42
17	Campo de evaluación para Hancock	44
18	Gel de electroforesis indicando presencia de diferentes fracciones proteicas en plasma seminal de bovino (BSP) y plasma seminal de carnero (RSP).	47

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de adición de plasma seminal hetero específico (toro a carnero) al diluyente para procesar semen de carnero sobre su viabilidad post descongelado. Se obtuvieron eyaculados de carneros Black Belly adultos de fertilidad probada, los cuales se fraccionaron para procesar/congelar con diluyente al que se adicionó 0 (T0), 5 (T5), 10 (T10) y 20 % (T20) de plasma seminal obtenido de toros con antecedentes de alta resistencia seminal a la congelación; 10 réplicas. Se evaluó con un sistema CASA el porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad progresiva (Vp), porcentaje de espermatozoides estáticos (Ee), velocidad de trayecto (Vt), velocidad de vía (Vv) e índice de linealidad (Li). Asimismo, se determinó el % de espermatozoides con integridad de membrana (H+) en la prueba HOST. El nivel de adición de plasma influyó en la MP (32.6a, 36.1b, 33.9ab, 34.6ab %; P=0.13), Vt (94. 1^a, 93. 3^a, 89.1ab, 85.3b $\mu\text{m}/\text{seg}$; P=0.01) y Vv (193.4^a, 190.1ab, 182.7bc, 174c $\mu\text{m}/\text{seg}$; P=0.004), sin afectar los demás patrones de motilidad. El tratamiento también influyó en el H+ (45.2a, 49.7b, 53.4c, 53.7c %; P=0.0001). El nivel de adición de plasma seminal de 5 % tendió a mejorar la MP post descongelado con respecto al control sin afectar la velocidad espermática e incrementó el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana plasmática. Esto sugiere que el plasma seminal de toros de alta resistencia a la congelación presenta potencial como aditivo del diluyente de congelación para mejorar la viabilidad post descongelado de semen de carnero.

Palabras clave: Semen de carnero, Aditivos para diluyente, Proteínas de plasma seminal

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of addition of hetero specific seminal plasma (bull to ram) to ram semen freezing extender, on sperm cell post thaw viability. Ejaculates were obtained from adult Black Belly rams of proven fertility, which were fractionated and frozen after being extended with a commercial extender added with 0 (T0), 5 (T5), 10 (T10) and 20% (T20) of seminal plasma obtained from bulls with high seminal resistance to freezing; 10 replicates. The percentage of progressive motility (MP), progressive speed (Vp), percentage of static sperm (Ee), path speed (Vt), track speed (Vv) and linearity index (Li) were evaluated with a CASA system. Likewise, the % of spermatozoa with membrane integrity (H +) was determined in the HOST test. The level of plasma addition influenced the MP (32.6a, 36.1b, 33.9ab, 34.6ab %, P = 0.13), Vt (94.1a, 93.3a, 89.1ab, 85.3b $\mu\text{m}/\text{sec}$, P = 0.01) and Vv (193.4^a, 190.1ab, 182.7bc, 174c $\mu\text{m}/\text{sec}$, P = 0.004), without affecting the other motility patterns. The treatment also influenced the H + (45.2a, 49.7b, 53.4c, 53.7c %, P = 0.0001). Addition of 5 % hetero specific seminal plasma to the extender, tended to improve post-thaw MP with respect to the control without affecting sperm cell velocity. Likewise, it increased the percentage of sperm cells with plasma membrane integrity. This suggests that bull seminal plasma obtained from bulls with records of high-resistance to semen freezing, could be used as an additive for ram semen extender to improve post-thaw sperm cell viability.

Keywords: Ram semen, Additives for extenders, Seminal plasma proteins

I. INTRODUCCIÓN

Al realizar la congelación de semen de carnero, la concentración requerida por dosis de inseminación, a diferencia de otras especies, necesita ser mayor (Youngquist & Threlfall, 1997), ya que los espermatozoides sufren mayores daños por lipoperoxidación e inestabilidad de la membrana plasmática. Estos daños se deben a la composición de la membrana plasmática en la especie ovina, la cual contiene mayor concentración de lípidos con doble ligadura o insaturados (Salamon & Maxwell, 2000). Lo anterior, causa que al realizar el proceso de congelación y eventualmente descongelación, se lleven a cabo reacciones acrosómicas prematuras, alteraciones en las funciones espermáticas como la motilidad y eventualmente la muerte celular.

En el plasma seminal del carnero podemos encontrar diferentes sustancias que ayudan a la supervivencia del espermatozoide durante su viaje hasta el sitio donde ocurre la fertilización del óvulo, así mismo ayudan a un mejor transporte y a activar la motilidad del esperma (Maxwell *et al.*, 2007).

Se han hecho múltiples estudios de los componentes más importantes del plasma seminal y de su función, así se ha encontrado que la adición de plasma seminal a espermias de carnero en shock térmico puede revertir las alteraciones membranales por la adhesión de proteínas seminales a la membrana celular de los espermias (Barrios *et al.*, 2000). La presencia de proteínas denominadas BSP en el plasma seminal, ayuda a estabilizar la membrana plasmática, lo cual eventualmente ayuda al esperma a no llevar a cabo las reacciones acrosómicas prematuramente. Estas proteínas son ubicuas en los mamíferos en general. El momento en que actúan es durante la emisión y la eyaculación, cuando se unen específicamente a más del 60% del total de los fosfolípidos de membrana previniendo su movimiento laxo (Manjunath & Thérien, 2002). También se ha observado que las proteínas seminales actúan como factores decapacitantes inhibiendo las reacciones acrosómicas. (Henault *et al.*, 1995). Las proteínas BSP se encuentran en mayor proporción en el plasma seminal de bovinos comparado con los ovinos (Bergeron and Manjunath, 2006). A su vez, dentro de la especie bovina también hay una mayor cantidad de proteínas BSP en machos cuyos eyaculados son de alta resistencia a la congelación/descongelación (Jobim *et al.*, 2004).

Por eso, en este trabajo se planteó utilizar plasma seminal de toros con alta resistencia de células espermáticas a la congelación, como aditivo en un diluyente comercial para procesamiento de semen de carnero, y así tener una mayor protección de los espermatozoides al proceso de congelación/ descongelación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II. ANTECEDENTES

2.1 Ovino cultura en México

México se encuentra entre los paralelos 14° 32' 27" y 32° 43' 06" (INEGI, 2003) que va desde el río bravo en el norte hasta el Suchiate en el sur, esto ayuda a que haya un gran rango de variación en su clima, teniendo todo un abanico de climas secos, cálidos y templados (INEGI, 2005).

Esta amplia gama de climas nos lleva a tener diferentes tipos de producción dependiendo tanto de este factor como del económico.

En México los datos más recientes según la FAO nos indican que la población de ovinos en México en 2014 era de 8,575,908 cabezas habiendo un incremento del 21.08% en los últimos 10 años.

El inventario de ganado se encuentra distribuido por toda la república mexicana, pero en el centro podemos encontrar mayor porcentaje de ovinos, dividido de la siguiente manera; en el estado de México, 12.1%, Hidalgo, 11.2%, Puebla, 8.6%, Guanajuato, 7.5%, Zacatecas, 5.6% y Veracruz, 5% (INEGI, 2007).

La ovino cultura en México es bastante importante, se estima que alrededor de 50,000 productores se dedican a la cría de ovinos, de los cuales el 34% vive totalmente de la producción. Además de las personas que trabajan con la lana, de estos se ven beneficiados 12,000 artesanos (Medrano, 2000).

En el país podemos encontrar en su mayoría ovinos criollos y solamente un porcentaje bajo es de raza pura (INEGI, 2007). Una de las razas que mejor se han acoplado a los diversos climas de México es la raza Black-belly; Esta proviene de la isla de Barbados, donde los holandeses introdujeron al borrego de lana los cuales cruzaron con borregos traídos de África. Es un borrego de zonas tropicales y en México se produce a lo largo de casi toda la república,

desde el trópico hasta las zonas más templadas. Algunas de sus características son, rústico, prolífico, no estacional, abundante producción de leche, y tiene de 2 a 3 crías (Partida *et al.*, 2013) .

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.2 Biotecnología reproductiva

Cuando hablamos de sustentabilidad de la producción y reproducción de animales es importante mencionar a las biotecnologías que pueden hacer más eficientes los procesos y fáciles de monitorear.

Algunos ejemplos son, el sexado del semen, encapsulación del esperma, transcriptómica del esperma, marcadores genéticos del semen, maduración fertilización y cultivo in vitro, inyección intracitoplasmática del esperma, criopreservación de embriones y gametos, tecnología de transferencia de embriones, sexado de embriones, genómica de embriones, transferencia de núcleo somático celular, tecnologías de células madre, nanotecnología entre muchos otros (Choudhary *et al.*, 2016).

Aunque muchas de estas tecnologías ya son utilizadas comúnmente, otras se mantienen con el fin de realizar investigaciones especializadas para poder comprender y mejorar la productividad y funciones de los animales de interés productivo. Muchas de estas tecnologías no son accesibles en países de tercer mundo. Y otras que no son tan costosas no se utilizan tanto como se podría por la falta de información, mano de obra, etc (Rischkowsky & Pilling, 2010).

Aunque se tienen estas limitantes se ha reportado que en la mayoría de los países estas tecnologías se están utilizando y en América Latina en el caso de los bovinos se utiliza en un 100% de los países de los cuales se tienen reportes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Uso de biotecnologías por especie (Rischkowsky & Pilling, 2010).

Región	Inseminación artificial			Trasplante de embriones			Tecnología genética molecular		
	IA con información sobre especies	Proporción de países que emplean la tecnología		IA con información sobre especies	Proporción de países que emplean la tecnología		IA con información sobre especies	Proporción de países que emplean la tecnología	
		Bovinos	Otra especie		Bovinos	Otra especie		Bovinos	Otra especie
América latina y el caribe	21%	100%	71%	12	100%	33%	9%	78%	89%

Todas estas tecnologías se han desarrollado desde antes de que tuvieran el nombre de biotecnologías, la más ampliamente usada, la inseminación artificial, se utilizó en el siglo XII por primera vez; Es una de las más utilizadas y exitosas en especies como los bovinos así como la criopreservación, que se define como el almacenamiento de material biológico a baja temperatura durante largos periodos de tiempo (Restrepo, 2008).

Esta tecnología en conjunto con la inseminación artificial ayuda a que en un corto periodo de tiempo se pueda tener crías con información genética de alto valor que ayude a tener mayores rendimientos productivos.

2.3 Semen y sus componentes

2.3.1 Espermatozoides

Los espermatozoides son los gametos del macho los cuales se producen en los tubos seminales de los testículos. Están conformados por la cabeza y la cola únicamente. La membrana plasmática de los espermatozoides contiene de un 65 a 75 % de fosfolípidos.

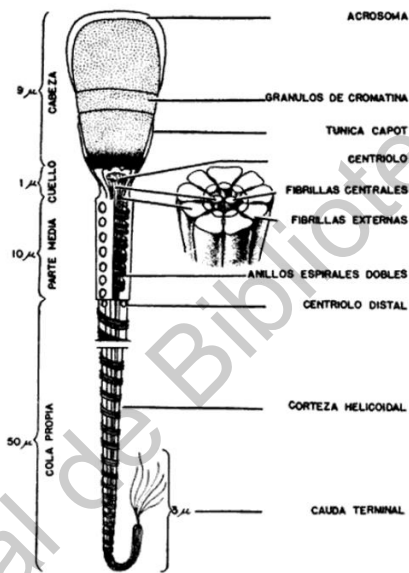


Figura. 1. Morfología del espermatozoide maduro (de Alba, 1964).

El acrosoma es una pequeña membrana que rodea la cabeza del espermatozoide dentro de ella se encuentran diversas enzimas que son necesarias para la fecundación del ovocito.

En la cabeza, dentro del núcleo se encuentran los cromosomas (DNA) los cuáles son los portadores de la información genética que será pasada a la siguiente generación (Moore *et al.*, 2016).

El cuello es una región un poco más gruesa que el flagelo porque ahí se encuentran una serie de mitocondrias que generan la energía necesaria para que el flagelo se pueda mover. En ciertas condiciones de calor o estrés esta parte puede desprenderse de la cabeza.

Y la cola está conformada por dos partes más, la parte principal que es la parte más larga de la cola la cual está conformada por proteínas como fibrinas que son productores de su movimiento particular y la última parte de la cola es una pequeña extensión que no tiene actividad proteica o de energía (Hancock J.L., 1952).

Aproximadamente el tamaño de un espermatozoide de carnero mide 60 μm , la parte más larga es la cola y la cabeza mide aproximadamente 8-10 μm .

2.3.2 Movimiento

Se ha observado en humanos que hay una correlación entre sujetos con baja motilidad progresiva y una alta fragmentación en el DNA (El-Bashir *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Patrones de movimiento de espermatozoides sub fértiles o infértiles (Ax R.L. *et al.*, 2000).

Patrón de movimiento y morfología	Cola del espermatozoide	Cabeza del espermatozoide	Movimiento y progresión del espermatozoide
Circular vibratoria.	Temblor rápido o lento de lado a lado; vibración en general, doblado en curva o inmóvil.	Sin movimiento o vibrando en un solo lugar	Movimiento, sin avanzar, perpendicular, oblicuo, horizontal en sentido o contrasentido de las manecillas del reloj.
Rápido	Vibración y movimiento rápido,	Irregular, propulsora, sin rotar.	Movimiento mínimo y errático, sin rumbo fijo.

Rotacional	Ondulación de poca magnitud.	Rotación del espermatozoide.	Movimiento rápido hacia el frente en línea recta.
Cabeza o cola asimétrica	La amplitud de la cola es asimétrica hacia los dos lados.	Irregular, propulsora, usualmente no rota	Orbita circular si no hay rotación
Espermatozoides con gota citoplasmática	La amplitud de la cola es asimétrica hacia los dos lados; vibración rápida.	Irregular, comúnmente meciéndose, pocas veces rotacional.	Perpendicular, oblicua, pocas veces progresiva.
Espermatozoides aglutinados.	Disminuyendo, movimiento vibratorio, lento.	Lento; propulsión irregular, meciéndose.	Depende de tipo de aglutinación.

Se considera que un eyaculado de alta calidad de carneros tiene menos del 10% de anomalía y una motilidad mayor al 85% (Ax R.L. *et al.*, 2000).

2.3.3 Plasma seminal

El semen es un fluido generado por el macho, el cual contiene a los gametos masculinos los cuales están protegidos por un líquido altamente nutritivo para estas células llamado plasma seminal; su composición varía entre especies.

El plasma seminal está producido de secreciones de los testículos, el epidídimo y otras glándulas sexuales (Aslam *et al.*, 2014).

En el carnero podemos encontrar diferentes sustancias que ayudan a la supervivencia del espermatozoide durante su viaje hasta el óvulo, así mismo ayudan a un mejor transporte, a activar la motilidad del espermatozoide (Maxwell *et al.*, 2007).

También se ha estudiado que las proteínas presentes en el plasma seminal inhiben las reacciones acrosómicas (Henault *et al.*, 1995). Los principales componentes son:

a) Moléculas: fructosa, sorbitol, inositol, ac. cítrico, ac ascórbico, glicerilfosfatidilcolina, prolactina, insulina, colesterol, fosfolípidos, prostaglandinas, una amplia variedad de proteínas.

b) Iones: Na⁺, K⁺, Cl⁻, Zn, Mg, bicarbonato, fosfatos (Celeste & Vilanova, 2015).

Para poder mantener a todas estas sustancias el plasma mantiene un Ph de 7 este también protege a la célula.

Se han hecho múltiples estudios de los componentes más importantes del plasma seminal, así se ha podido probar que la adición de plasma seminal en espermas de carnero en shock térmico puede revertir las alteraciones membranales por medio de la absorción a través de la membrana celular del esperma (Barrios *et al.*, 2000). Se ha probado la adición de plasma seminal autólogo de carnero en el momento de la descongelación mejora la motilidad y la integridad de la membrana (El-Hajj *et al.*, 2007). Según Gunay *et al.* La adición de plasma seminal de toro al diluyente en el proceso de congelación de semen de carnero tiene un efecto positivo en la fertilidad al realizar inseminación artificial (Gunay *et al.*, 2006).

Se han hecho estudios en los cuales se ha agregado plasma seminal tanto heterólogo como autólogo (toro, perro y trucha arcoíris) como medios post descongelación para ayudar en la sobrevivencia y en la fertilidad mostrada por las hembras, aunque no se ha observado una mejoría con plasma seminal de toro y perro y si con el de carnero y trucha (Mataveia *et al.*, 2010; Rovegno *et al.*, 2012; Ustuner *et al.*, 2016).

2.4 Proteínas BSP

Las proteínas de unión al espermatozoide, BSP por sus siglas en inglés, son las proteínas más abundantes encontradas en el plasma seminal de toro este tiene una concentración de 20-40 mg/ml que sería aproximadamente 65% de las proteínas totales (Majunath *et al.*, 1988). Son 4 fracciones diferentes con masas moleculares que van de 15500 a 16500 kDa y P.I de 3.6-5.2 (Majunath, Sairam & Uma, 1987).

Las BSP se unen específicamente a fosfatidilcolina, fosfatidilcolina plasmógeno y esfingomielina, estos representan más del 60% de los fosfolípidos de la membrana (Parks *et al.*, 1987). Se ha mostrado en estudios que los espermatozoides ligados a BSP sufren de hiperactivación y reacciones acrosómicas en presencia de moléculas propias del tracto reproductor femenino (Therién *et al.*, 1995; Therién *et al.*, 1997).

En el momento de la eyaculación los espermatozoides se mezclan con fluidos de las glándulas accesorias en dónde se encuentran presentes las proteínas BSP así estas proteínas cubren la membrana de los espermatozoides estabilizándola por su paso en la mucosa cervical y hacia el útero (Manjunath & Thérien, 2001).

Aunque estas proteínas se encuentran presentes en todos los toros se ha detectado que hay cambios en la concentración de diferentes proteínas BSP entre los toros de alta capacidad de congelación y los de baja (Jobim *et al.*, 2004).

Estas proteínas se encuentran no sólo en los bovinos sino en la mayoría de los mamíferos. En el Carnero estas proteínas representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales del plasma seminal, estas proteínas son denominadas RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa y RSP-24kDa (Bergeron *et al.*, 2005).

Se ha observado que la presencia de plasma seminal de carnero en la congelación de semen de carnero ayuda a revertir los daños causados por el shock térmico al momento de la congelación, puede evitar la capacitación y revertirla (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001).

2.5 Estrés oxidativo y lipoperoxidación

El estrés oxidativo es una respuesta de la célula ante una alta concentración de radicales libres, tales como las especies reactivas de oxígeno, anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas tres moléculas actúan como ácidos, sustrayendo electrones de moléculas esenciales para la célula, como lo son, los ácidos grasos poliinsaturados que encontramos en las membranas celulares, los nucleótidos del DNA, proteínas y carbohidratos (Sies, 1997).

Específicamente en el espermatozoide el estrés oxidativo se da sobre los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la membrana celular. El estrés hace que la membrana se desestabilice por medio de una lipoperoxidación que causa un rompimiento en los dobles enlaces de estos ácidos grasos (Hicks, 2001).

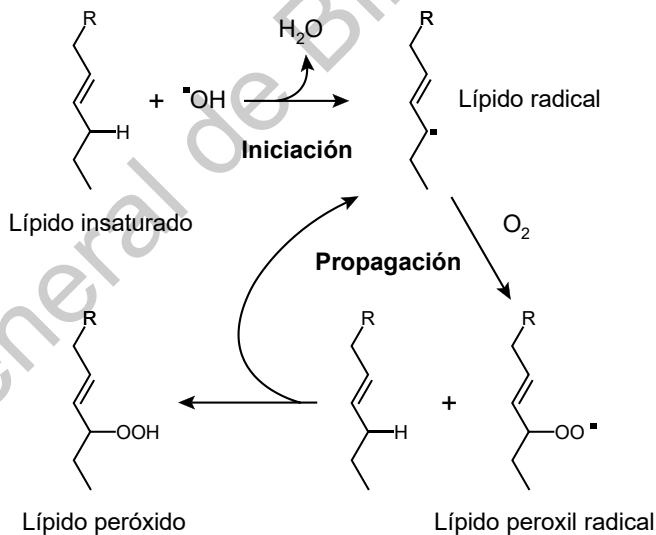


Figura 2: Proceso de lipoperoxidación (Young & McEneny, 2001).

Lo que sucede durante la lipoperoxidación es:

- 1) Un ROS ataca a una cadena de insaturada de ácido graso.
- 2) Dejando un electrón no pareado dentro de la cadena buscando estabilizarse.
- 3) Reacciona rápidamente con el O_2 , formando un radical peróxido.

Estos radicales reaccionan rápidamente con otras cadenas de ac. grasos insaturados robándoles su hidrógeno, haciendo una reacción en cadena con todos los ácidos Grasos cercanos (Hicks, 2001).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.6 Procesamiento de semen.

2.6.1 Obtención del eyaculado

La obtención de semen puede realizarse por diferentes métodos como la utilización de vagina artificial, electro eyaculación y masaje guiado por ultrasonido transrectal a las glándulas accesorias (TUMSAG).

La EE no se usa en muchos países ya, debido a la preocupación por el bienestar animal (Abril-Sánchez et al., 2019). El método más utilizado es el de la vagina artificial, en esta se utiliza un aparato que intenta recrear las condiciones naturales de la vagina. Consta de una vagina artificial, un liner, un cono de recolección y un tubo de recolección

En los carneros el semen tiene una coloración blanca. En un eyaculado se obtienen de 0.5 a 2 ml en machos maduros y en jóvenes de 0.5 a 1.2 ml (Ax et al., 2016). La concentración es de 3.5×10^9 a 6×10^9 espermatozoides/ml

A la VA se le coloca el liner creando una bolsa donde se contiene agua caliente de 41 a 45 °C y puede crearse presión con aire insertado por la boquilla de la VA. Estos dos factores son cruciales para la eyaculación en rumiantes.

Al macho se le deja hacer de 2 a 3 montas falsas para estimulación y así obtener eyaculados de mayor volumen (Caravaca et al., 2003).

Los conos pueden ser desechables o reutilizables. Los reutilizables están hechos de caucho y se pueden lavar y esterilizar. Los desechables son de plástico y no se recomienda utilizar en más de una ocasión.

Los tubos utilizados son comúnmente de vidrio, aunque se pueden utilizar de plástico, se recomienda utilizar tubos que empiecen su graduación desde los 0.5 ml o menos para saber el volumen exacto.

Cuadro 3. Características del semen de carnero (Hafez, 1980).

Características	Carnero
Volumen del eyaculado (ml)	0.8-1.2
Concentración espermática (millones/ml)	2000-3000
Espermas/eyaculado (billones)	1.6-3.6
Espermatozoides motiles (%)	60-80
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	80-95
Proteína (g/100ml)	5
pH	5.9-7.3
Fructosa	250
Sorbitol	26-170
Ácido cítrico	110-260
Inositol	7-14
Gliceril fosforil colina (GPC)	1100-2100
Ergotionina	0
Sodio	178 ± 11
Potasio	89 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0.8
Cloro	86

Los tubos se colocan en baño maría para evitar shock térmico a los espermatozoides. Los eyaculados no deben de exponerse directamente a la luz, por lo tanto, se utiliza una manga que cubre desde la vagina hasta el tubo de baño maría.

A los machos se les puede entrenar previo a la obtención de los eyaculados. Se utiliza una hembra sincronizada previamente para que el macho este incentivado a saltar.

Mientras que el macho es manejado la persona con la VA debe de estar a la altura del borrego y listo con la VA con temperatura y presión adecuada. En el momento del salto se desvía el pene hacia la VA y si el macho salta hacia arriba y adelante se ha obtenido un eyaculado. Si esto no sucede se deja que el macho haga más montas.

Inmediatamente después de la eyaculación este debe ser procesado.

Comúnmente se hace una pre-dilución 1:1 para que el semen este protegido mientras se realizan las pruebas pre-congelación. El tiempo máximo que puede pasar antes de hacer la dilución final no debe de pasar de una hora.



Figura 3: Recolección de semen de carnero

2.6.2 Empaquetamiento del semen

2.6.2.1 Diluyentes

El contenido de los diluyentes en general contiene:

- Antibióticos.

Se utilizan por requerimiento oficial tanto nacional como internacionalmente. Esto se da porque los microorganismos compiten con los espermatozoides por los nutrientes

existentes en el diluyente o por las toxinas subproducto del metabolismo microbiano. También para que al momento de inseminar a las hembras éstas no tengan oportunidad de desarrollar alguna infección con las bacterias presentes en el diluyente. Los antibióticos usados comúnmente en estos productos son: Neomicina, penicilina di-hidro-estreptomicina.

- Proteínas

Las proteínas más utilizadas son la yema de huevo y la leche descremada. La utilización de estas proteínas se debe a la capacidad de protección y nutrición al espermatozoide. La yema de huevo tiene un alto peso molecular y una baja densidad lipoproteica lo cual brinda protección al espermatozoide en el shock térmico y reduce la pérdida de enzimas encontradas en el acrosoma. La leche descremada sirve como nutriente por su composición alta en glucosa y galactosa, también como buffer de pH por su alto contenido de caseína que también ayuda en la quelación de metales pesados (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

También se han empezado a utilizar proteínas de origen vegetal esto por las reglamentaciones internacionales para la exportación o importación de pajillas como medida de bioseguridad. Algunas ventajas es su baja citotoxicidad, y su mayor contenido es de fosfolípidos de tipo L- α -fosfatidilcolina para las proteínas que proviene de la lecitina de soya. (Sharafi *et al.*, 2009)

- Azúcares

Están presentes azúcares de poca permeabilidad a la membrana plasmática, como lactosa, sucrosa, rafinosa, trealosa y diferentes dextranos que sirve como un gradiente para la osmolaridad y sirve para quitar un poco de agua del interior de la célula y así disminuir la cantidad de cristales de hielo en el interior.

También hay azúcares que sirven como alimento para la célula como la glucosa.

- Crio protectores

Pueden ser protectores externos a la membrana o internos.

Estos dos crioprotectores tienen diferentes funciones en cuanto a la protección de la membrana. Los que son de tipo intracelular son permeables a la membrana (glicerol) y los protegen desde adentro evitando que se formen cristales de hielo en el interior y los que son extracelulares (NaCl) disminuyen el estrés osmótico en el medio (Fickel, Wagner & Ludwig, 2007).

- Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que previenen que las especies reactivas de oxígeno cambien la composición de las moléculas, oxidándolas. Para disminuir la pérdida de motilidad y vitalidad así como reducir la proporción de espermatozoides capacitados se han probado antioxidantes como Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinoloxyl) que es un análogo de la enzima superóxido dismutasa o la vitamina E (Mara *et al.*, 2005).

- Buffers

Se utilizan sistemas buffers para mantener el pH ideal para la sobrevivencia del espermatozoide, se utilizan sales como citrato sódico, Bicarbonato sódico, EDTA, cloruro de potasio, ácido cítrico, Tris buffer, HEPES.

2.6.2.2 Curva de enfriamiento

El bajar la temperatura directamente de los 37° a 5° que sería la temperatura en la que se podría empezar a hacer el empaquetamiento se produce un shock térmico.

Está reportado que la temperatura clave para este shock en semen de carnero va de los -10°C a los 25 °C.

La razón de enfriamiento mejor evaluado para carnero es de -15°C/ min a -100°C/min.

2.6.2.3 Congelación

El semen del carnero se puede congelar empleando la metodología convencional (congelación lenta) o la metodología rápida (congelación rápida) pudiendo emplearse

para el efecto pajuelas de plástico, ampollitas o pellets; El semen congelado con la metodología rápida mejora la supervivencia de los espermatozoides (Evans *et al.*, 1990).

El método de congelación de un solo paso es ampliamente empleado en la congelación de semen de carnero por su simplicidad y menor manejo del semen antes de su congelación; para hacer la dilución de un solo paso, el semen se diluye a la dilución final de pre congelación a 30°C con diluyente que contiene glicerol y luego se refrigera a temperatura de 5°C por 1,5 a 2 horas para luego ser expuestas a vapores de nitrógeno líquido y posterior sumergimiento en el mismo (Evans *et al.*, 1990).

2.7 Evaluaciones de eyaculados

2.7.1 Evaluaciones pre-congelación

Las evaluaciones realizadas pueden ser macroscópicas o microscópicas.

Dentro de las macroscópicas podemos encontrar:

a) Licuefacción

Observamos en la muestra total que no se tengan grumos, coágulos.

b) Apariencia

Esta apariencia se refiere a como lo vemos, si es muy traslucido, si tiene alguna coloración en especial. La coloración normal para carneros es blanco-lechoso o crema pálida.

En carneros el eyaculado tiene a ser muy sólido por la alta concentración de espermatozoides y de una coloración blanca-nácar.

c) Volumen

Se mide comúnmente dentro del tubo cónico receptor los ml, no se mide comúnmente con probetas o pipetas por la pérdida de muestra que se puede tener (López-García, Urbano-Felices & Cárdenas-Pavedano, 2012). En carnero el volumen del eyaculado va de 0.5-2 ml.

Los volúmenes cambian dependiendo de la técnica de obtención del semen. Comúnmente cuando se obtiene por medio de electro eyaculación tiende a ser mayor el volumen, pero menor concentración mientras que con la VA se tiene un volumen menor y una concentración mayor.

Las evaluaciones microscópicas son las que se usan para características indetectables a simple vista:

a) Motilidad masal

La motilidad masal es la primera evaluación que se hace al semen. Esta consta en observar una gota de semen en un portaobjeto a 40X. Esa tiene que mostrar una motilidad ondulatoria y constante. Esta evaluación es puramente personal (Ax *et al.*, 2016).

b) Motilidad individual

Para la motilidad progresiva individual se utiliza una gota de semen con 10 ml de diluyente o solución salina, se monta en el portaobjetos y se cubre con cubreobjeto, se observa a 40X. Se evalúa la cantidad de motiles sobre la cantidad de estáticos y se pone una calificación en porcentaje en base a esa observación.

Por ejemplo, si vemos más de la mitad moviéndose vigorosamente en línea recta es un semen que deberíamos de congelar en cambio si observamos que más de la mitad están muertos no se haría una congelación de ese eyaculado.

c) Concentración.

La concentración puede ser medida por diferentes métodos. Por medio de Espectrofotómetro en el cual se calibra haciendo una curva con diferentes concentraciones conocidas de espermatozoides. La longitud de onda utilizada es de 530 nm (Cueto *et al.*, 2016).

Así al hacer la medición se puede comparar la absorbancia conocida con la de la curva patrón. Esto es posible si tenemos un espectro que sea transportable al área de trabajo.

Otra forma de conocer la concentración es por medio del conteo manual del eyaculado. Se utilizan cámaras especiales para hacer el conteo. Puede ser una cámara de Neubauer mejorada. Esta cámara tiene una capacidad para 100 μl en cada una de sus sub-cámaras. Para cargarlas se puede teñir o no la muestra, y entre el cubreobjetos y el portaobjetos se carga el líquido.

La cámara cuenta con una cuadrícula, comúnmente se utiliza el cuadro central que consta de 25 cuadros de 0.04 mm^2 . En esta cuadrícula se ubican los 4 cuadros de las equinas y el del centro (Ver fig. 4)

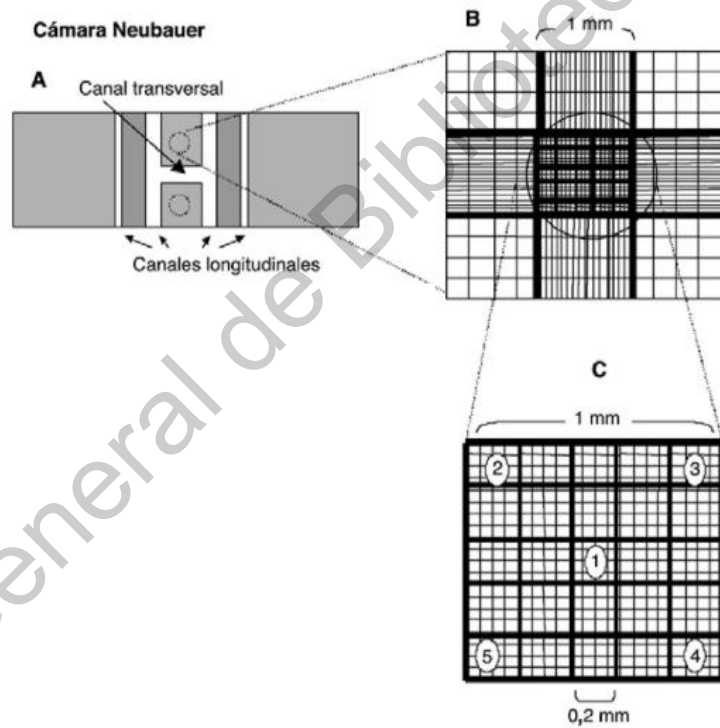


Figura 4. Conteo en cámara de Neubauer mejorada (Cueto *et al.*, 2016).

El conteo se realiza con el objetivo de 40X. Se toman en cuenta todos los espermatozoides contenidos en cada cuadro y los que están en la parte superior y derecha de cada uno, así los que están en la línea inferior e izquierda se cuentan dentro del cuadro lateral o inferior. La diferencia entre el cuadro superior e inferior debe de ser menor al 15%. Si el conteo tuviera una mayor diferencia se tendría que volver a montar la cámara y realizar de nuevo el conteo (Kvist & Björndahl, 2004).

Las tinciones utilizadas para el conteo de espermatozoides puede ser tinciones que se utilizan en células muertas.

La tinción de Rosa de Bengala actúa sobre células muertas tiñéndolas de rosa. La dilución se utiliza 1:100 con suero fisiológico y Rosa de Bengala al 8%.

Para saber la concentración del eyaculado se debe de multiplicar:

$$\text{total de espermatozoides} = \text{Conteo} \times \text{Factor de dilución} \times 5 \text{ cuadros contados}$$

2.7.1 Evaluación post congelación

2.7.1.1 Prueba hiposmótica

La prueba hiposmótica se desarrolló en 1984 por Jeyendran et al en espermatozoides humanos.

Esta prueba se basa en la capacidad de la membrana plasmática para seleccionar las moléculas que la traspasan. En un medio hiposmótico el agua entrará a través de la membrana para poder lograr un equilibrio. Entonces esta prueba nos indica si la membrana esta activa bioquímicamente (Zaneveld *et al.*, 1990).

Visualmente lo que sucede con el espermatozoide realiza un tipo de enrollamiento en la cola, viéndose a demás hinchados de esta área.

Se ha probado la correlación entre la capacidad de equilibrar la membrana de los espermatozoides en un medio hiposmótico y su capacidad de realizar la capacitación y poder fertilizar al ovocito (Bedoya *et al.*, 2003).

La Prueba consta en incubar a 37°C el semen con una solución hiposmótica y posteriormente la observación con microscopia de fases.

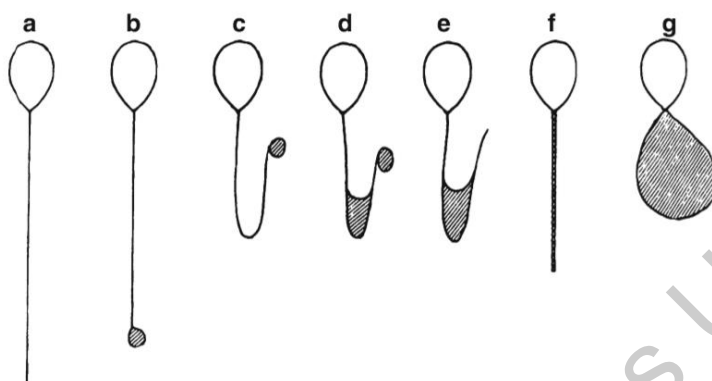


Figura 5. Representación esquemática de diferentes morfologías expuestas a estrés por una solución hiposmótica. a) no alterado. b-g) espermatozoides con diferentes niveles de hinchamiento (Ramu & Jeyendran, 2013).

Es importante realizar este tipo de pruebas ya que se puede observar motilidad, aunque la membrana este dañada e inclusive haciendo únicamente la prueba supra vital podríamos observar sólo las que están rotas, pero podrías estar completas y no funcionales bioquímicamente (Correa & Zavos, 1994).

2.7.1.2 Motilidad progresiva

La motilidad progresiva puede evaluarse de manera manual o con un software especializado, cualquiera de las dos opciones son evaluaciones confiables (Liu *et al.*, 1991). El software CASA (Computer Aided Sperm Análisis) se utiliza desde 1985 y desde entonces hasta la fecha ha tenido cambios para mejorar la evaluación de semen. (Lu *et al.*, 2013)




Este software nos provee de información específica de la velocidad y los patrones de movimiento que tienen los espermatozoides. Los parámetros de movimiento tomados en cuenta en este software (cuadro 4) nos ayudan a evaluar la calidad del semen que hemos congelado, entre otras funciones.

Se han hecho estudios en los cuales se ha intentado correlacionar los valores de movimiento y la capacidad de fertilización in vitro y en vivo teniendo resultados positivos

mostrando que valores como Velocidad de vía (VCL), Velocidad progresiva (VSL), Amplitud lateral (ALH), el porcentaje de espermatozoides con velocidad progresiva rápida, Amplitud lateral (ALH), Linealidad (LIN), Velocidad de trayecto (VAP) son apropiados para predecir esta cualidad (Lu *et al.*, 2013).

En humanos se ha estudiado la relación de VCL, VSL y VAP con la calidad del semen y como factores dañinos como el consumo de tabaco y la exposición a metales pesados afectan estas velocidades (Falzone *et al.*, 2008). También se sabe que el decremento en la velocidad de los espermatozoides es una señal de un metabolismo deficiente y que esto en el momento de la fertilización disminuye su capacidad, parámetros como VCL, VSL y VAP nos muestran esta característica (Holt, 1989).

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de CASA (Versetegen, Iguer-Ouada & Onclin,2002; Lu *et al.*, 2013; Mortimer, 2000).

Parámetros cinéticos de CASA			
Siglas	Nombre	Descripción	Ejemplo
(1) VCL	Velocidad de vía	Velocidad real del espermatozoide.	
(2) VSL	Velocidad progresiva	Velocidad que tuvo el espermatozoide del primer punto de su trayectoria al último. Velocidad en línea recta	
(3) VAP	Velocidad de trayecto	Velocidad que tiene el	

		espermatozoide en todos los cambios de dirección que tiene su cabeza.	
LIN	Linealidad	Es la linealidad de un trayecto curvilíneo. Es la comparación de VSL/VCL.	
STR	Rectitud	Linealidad del camino promedio. Es la comparación de VSL/VAP	
BCF	Frecuencia de pulso	Es que tan seguido el camino curvilíneo cruza el camino promedio. Evalúa el movimiento del flagelo.	
ALH	Amplitud lateral	La amplitud de la distancia que alcanza la cabeza del espermatozoide.	

Otra característica que nos puede mostrar CASA es si el espermatozoide está en un estado hiperactivado (Mortimer, 2000), indicándonos esto que pudiera haber realizado la capacitación antes de tiempo, esto se debe a que el comportamiento del movimiento del espermatozoide cambia, estos estudios se han hecho en humanos y podrían ser efectivos también para animales.

Cuadro 5. Valores reportados en semen de ovino (Santolaria et al, 2015)

Parámetros de motilidad	Rangos (min-max)
Motilidad (%)	26.2-94.6
Motilidad progresiva (%)	14.4-73.6
VCL ($\mu\text{m/s}$)	94.7-174.9
VSL ($\mu\text{m/s}$)	42.0-146.3
VAP ($\mu\text{m/s}$)	57.8-163.8
LIN	41.8-89.2
STR	64.6-92.3
WOB	60.7-95.4
ALH (μm)	1.7-5.2
BCF (Hz)	6.4-13.0

3 HIPÓTESIS

La adición de plasma seminal hetero específico tendrá un efecto positivo sobre la sobrevivencia y viabilidad de espermatozoides de ovino sometidos a congelación/descongelación, debido a un efecto de estabilización de las membranas celulares.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la adición de plasma seminal heteroespecífico, bovino a ovino, sobre la sobrevivencia y funcionalidad post descongelación de espermatozoides de ovino.

4.2 Objetivos específicos

1) Evaluar el efecto de la adición de plasma seminal heteroespecífico sobre la sobrevivencia y motilidad espermática.

2) Evaluar el efecto de adición de plasma seminal heteroespecífico sobre la integridad funcional del acrosoma y de la membrana plasmática.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación

El trabajo se realizó en:

- El trabajo experimental se llevó a cabo en la unidad de producción animal Amazcala (21°40' LN, 99°2' LO, 1900 msnm, 15 °C y 700 mm temperatura y precipitación promedio) en los laboratorios de Reproducción y de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.
- La obtención de plasma seminal de toro y la evaluación de motilidad post descongelación, en LIMPER Congelaciones Profesionales S.A. de C.V. (San José el Alto, Municipio de Querétaro, Qro.).

5.2 Población y muestras

Se utilizaron como donadores de semen carneros de raza Black Belly, en el rango de 2 a 5 años, clínicamente sanos, en buen estado nutricional (Índice de Masa Corporal ≥ 8.5), con calificación de satisfactorio en la evaluación de capacidad reproductiva (Kimberling y Parsons, 2007) y antecedentes de fertilidad normal en condiciones de monta natural.

5.3 Experimento

5.3.1 Preparación del material de laboratorio

Todo el material que entró en contacto con el semen o plasma seminal se preparó de tal manera que no tuviera residuos que afectaran la calidad biológica de la muestra.

En breve el procedimiento fue:

- Lavado con agua corriente limpia y jabón neutro débil sin residuos;
- Enjuagado en agua corriente limpia por 10 veces y posteriormente enjuagado otras 10 veces con agua bidestilada o desionizada;

-Secado por escurrimiento durante aproximadamente 15 min e introducción en horno de secado a 75°C por 12 horas;

-Para el material no resistente al calor, remojo en alcohol etílico por 10 min después del escurrimiento y secado por agitación al aire;

-Empacado y/o sellado para evitar contaminación.

5.3.2 Obtención del plasma seminal.

El plasma seminal fue obtenido de toros con antecedentes de alta congelabilidad de semen, en su mayoría raza Jersey y Holstein. Los eyaculados se obtuvieron por medio vagina artificial (Fig. 6), seleccionando los segundos colectados en cada toro para separar el plasma seminal.



Figura 6: Vagina artificial para carneros

Para evitar degradación de las proteínas seminales, los eyaculados se centrifugaron a temperatura de refrigeración inmediatamente después de colectados (4°C, 15 minutos, 2000 g). Posterior a esta primera centrifugación, se separó la fracción líquida sobrenadante y se conservó a 4°C hasta someterla a una segunda centrifugación (4 °C, 60 min, 10 000 g). Después de la segunda centrifugación se separó de nuevo la fracción líquida sobrenadante o fracción de plasma seminal sin células (Pérez -Pé *et al.*, 2001).

El plasma seminal obtenido de varios eyaculados/toros se mezcló con el fin de obtener un volumen suficiente para realizar las diferentes pruebas en todas las réplicas del experimento; a partir de esta mezcla se separaron alícuotas de 15 ml las cuáles se congelaron a -70 °C hasta su utilización.

Utilizando el mismo procedimiento se obtuvo plasma seminal de los carneros utilizados como donadores de semen en el experimento.

5.3.2.1 Pruebas al plasma seminal

5.3.2.1.1 Estimación de proteína total

Se determinó el contenido total de proteínas en las mezclas de plasma seminal tanto de bovino como de ovino mediante el método de Lowry.

Para la prueba de Lowry se utilizó el protocolo montado en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se prepararon los reactivos de la siguiente manera:

- A. Carbonato Sódico al 2% en NaOH 0.1M
- B. Sulfato Cúprico $5 \bullet H_2O$ al 1%
- C. Tartrato sódico-potásico al 2%

Al momento de su uso se mezclaron 50 ml de A con 0.5 ml de B y 0.5 ml de C; Se mantuvo protegido de la luz.

Se utilizó el reactivo de fenoles folin-cicalteau comercial.

La proteína estándar fue albúmina de suero bovino [100 mg/ml] (Sigma Aldrich) la cual se mantuvo almacenada a 8°C hasta su uso.

Para realizar la curva estándar se utilizaron las siguientes concentraciones:

Cuadro 6. Curva estándar utilizada para prueba de Lowry

No. Tubo	Proteína Estándar [mg/ml]	Reactivo Lowry (ml)	Reactivo de Fenoles Folin-Ciocalteu (ml)
0	0	2.2	0.1
1	0.0625	2.2	0.1
2	0.125	2.2	0.1
3	0.25	2.2	0.1
4	0.5	2.2	0.1
5	1	2.2	0.1
6	2	2.2	0.1

Antes de hacer las determinaciones, se realizaron pruebas con diferentes diluciones de las muestras de plasma seminal para encontrar la mejor para cada tipo. La determinación de proteína en plasma seminal de carnero se hizo en una dilución 19:1 y en el de toro en una de 40:1; Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Se agregaron a cada uno de los tubos 0.2 ml de muestra más 2.2 ml de reactivo Lowry, se mezcló con vortex y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se agregó 0.1 ml del reactivo Fenoles Folin-Ciocalteu y se mezcló con vortex. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min.

Para la lectura se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific Genesys 10 UV) a una longitud de onda de lectura de 716 nm.

Se determinó la concentración de proteína de la muestra problema, empleando la curva patrón y posteriormente multiplicando por el factor de dilución.

5.3.2.1.2 Electroforesis SDS-PAGE.

Se realizó también una electroforesis tanto del plasma seminal de toro como de carnero para confirmar la presencia de las proteínas BSP en el plasma seminal.

El gel SDS PAGE que se realizó fue de 12 cm de largo y 1 mm de espesor. Las concentraciones usadas 15 y de 3% (p/v) de acrilamida. Se utilizó como polimerizante 0.1% (p/v) TEMED.

La proteína utilizada proveniente del plasma seminal de toro y de carnero se prepararon con buffer de muestra 3.33% (p/v) SDS, 0.067 M Tris-HCl pH6.8, 10% (p/p) glicerol y 0.001% (p/v) Pyronin Y.

Se cargaron aproximadamente 25µg en el caso del plasma seminal de toro y 23.3 µg en el caso del plasma seminal de carnero, se cargaron disolviendo las muestras en 2% (p/v) de SDS, 0.0625 M Tris, 10% (v/v) Glicerol, 0.01 % (p/v) de azul de bromofenol y 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, pH 6.8. Estas muestras se adicionaron con 50 mM de DTT adicionado al buffer de carga y se sometieron a un tratamiento de calor en baño maría por 5 minutos.

La escalera de pesos moleculares utilizados fue SDS- PAGE Molecular weight standars, broad range de BioRad (Ver Fig. 7).

Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	Broad Range	Low Range	High Range
Myosin	200,000	X		X
β-galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000	X	X	
Trypsin inhibitor	21,500	X	X	
Lysozyme	14,400	X	X	
Aprotinin	6,500	X		

Figura 7. Escalera de peso molecular de amplio espectro de BioRad.

Se dejó correr la electroforesis con un centro de carga Mini-proten II (BioRad) con 150 V por una hora hasta que la tinción azul de bromofenol llegó antes del final del gel.

Para la tinción de las proteínas se realizó una inmersión en una solución de azul de Coomassie R-252 10 % (p/v) en ácido triclorídico y 40% de metanol. Para desteñir el gel se utilizó una solución 40 % (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético.

Para la lectura del gel se utilizó un foto-documentador ChemiDoc MP imaging system de BioRad.

5.3.3 Diseño experimental

El periodo experimental abarcó el periodo de septiembre a noviembre de 2018.

Se obtuvieron eyaculados con características de viabilidad consideradas como buenas a partir de 5 carneros Black Belly en edad reproductiva (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedio de valores de los eyaculados colectados y utilizados en el experimento

Identificación del carnero	Volumen (ml)	Motilidad Progresiva Individual (%)
8382	0.97	83.3
4191	0.72	83.8
5899	1.00	81.7
7653	0.77	85.0
S/N	0.75	82.5



Figura 8: Obtención de eyaculados de carnero con vagina artificial en campus Amazcala.

Se realizaron 10 réplicas del experimento y en cada una se obtuvieron al menos 1.5 ml totales de semen con ≥ 70 % de motilidad progresiva individual (evaluación a 400 X en muestra diluida 1:5); el volumen total para cada réplica se obtuvo por la mezcla de eyaculados de diferentes carneros y a partir de la mezcla se obtuvo a su vez la muestra de semen para cada tratamiento.

El diseño experimental constó de 4 tratamientos, con adición de diferentes cantidades de plasma seminal de toro a diluyente comercial para congelar semen de carnero (OPTIDYL, CRYO-VET). De esa manera se obtuvieron concentraciones de 0, 5%, 10% y 20% de plasma seminal (Cuadro 8); para no afectar el efecto crio protector del diluyente se agregó 5 % de glicerol al plasma seminal antes de utilizarlo.

Cuadro 8. Concentraciones de plasma seminal de toro utilizadas en el experimento.

Porcentaje de concentración	0%	5%	10%	20%
Tratamiento	Semen + diluyente comercial	Semen + diluyente comercial + 5% de plasma seminal	Semen + diluyente comercial + 10% de plasma seminal	Semen + diluyente comercial + 20% de plasma seminal

Una vez colectados, los eyaculados se colocaron en baño maría a 35 °C para después proceder a hacer las evaluaciones, mezclas y diluciones necesarias. Asimismo, los diluyentes con las diferentes concentraciones de plasma seminal se mantuvieron en el baño maría hasta su utilización (Fig. 7).

La mezcla de eyaculados se fraccionó en 4 haciendo a su vez una predilución con el tratamiento correspondiente (dilución 1:1, semen: diluyente según tratamiento).

La dilución final en cada tratamiento se hizo de acuerdo con la siguientes fórmulas y constantes:

Volumen por dosis de inseminación (pajilla) = 0.25 ml

Total, de espermatozoides viables por dosis de inseminación = 50×10^6

Predilución 1:1, semen: tratamiento

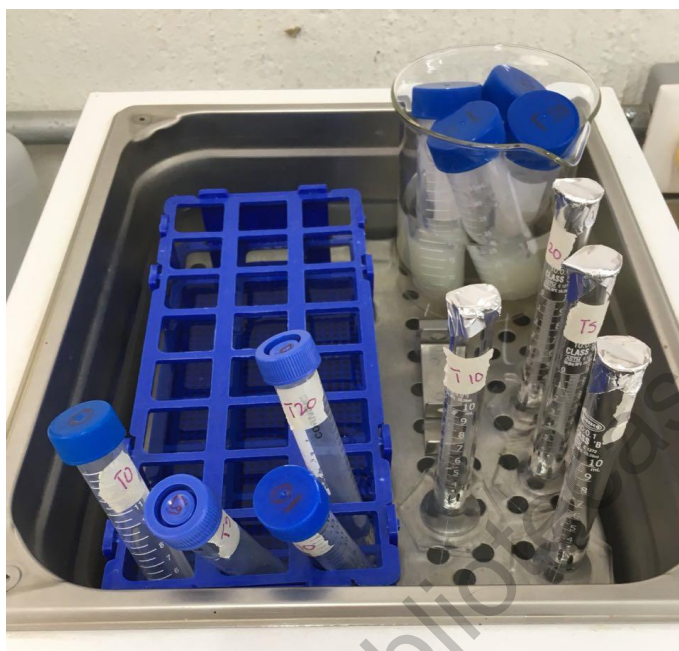


Figura 9: Ejemplo de la preparación del baño maría para realizar una réplica del experimento.

$$\begin{aligned}
 & \text{Total espermatozoides viables en la muestra} \\
 &= (\text{vol muestra (ml)}) (\text{concentración espermática} \\
 & \quad / \text{ml}) (\% \text{ espermatozoides viables (con motilidad progresiva)})
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{Volumen total dilución (semen + diluyente)} \\
 &= \frac{\text{total espermatozoides viables en la muestra}}{\text{espermatozoides viables por dosis}} (\text{volumen de dosis; 0.25 ml})
 \end{aligned}$$

Cuadro 9. Ejemplo de cálculo del total de diluyente a adicionar por tratamiento.

Volumen de Muestra de Semen	de ml	Concentración por	% Espermatozoides Viables
1.5 ml		2000×10^6	70%

$Total\ espermatozoides\ viables = (1.5ml)(2000 \times 10^6)(70\%)$
$Total\ espermatozoides\ viables = (2100 \times 10^6)$
$Vol\ total = \frac{2100 \times 10^6}{50 \times 10^6} (0.25) = 10.5\ ml$

Para completar la dilución final se afora a volumen total cada una de las pre-diluciones 1:1 semen: tratamiento; en el ejemplo el volumen de la pre-dilución sería 3 ml y para completar la dilución se tendrían que agregar $10.5 - 3.0 = 7.5\ ml$.

Posterior a la dilución final se procedió a hacer un enfriamiento gradual de 37 a 5 °C, manteniendo a su vez la dilución a 5 °C por 18 h para equilibrar la concentración intra y extracelular de glicerol; para lo anterior cada tubo de dilución final se colocó en un baño maría individual (agua a 37 °C) dentro de un refrigerador a 5 °C (Fig. 10).

Al término del periodo de equilibrio se procedió al empaquetado en pajillas y a su sellado con alcohol polivinílico, usando un congelador horizontal como cámara fría para mantener todo el material a 5 °C (Fig. 10).



Figura 10: Baños maría individuales en refrigerador.



Figura 11: Empaquetamiento de semen diluido en pajillas.

Las pajillas selladas se colocaron en bastidores para mantenerlas horizontales y separadas al introducirlas a la cámara de congelación (Fig. 11). Los bastidores con las pajillas se colocaron dentro de la cámara de congelación cargada con nitrógeno líquido, a 7 cm del espejo de nitrógeno por 15 min y luego fueron sumergidas y mantenidas en nitrógeno líquido hasta su evaluación (Fig. 13).



Figura 12: Hielera con nitrógeno para congelación con vapor de nitrógeno.



Figura 13: Pajillas en nitrógeno.

5.4 Evaluaciones

5.4.1 Evaluación de patrones de motilidad por sistema computarizado (CASA)

La evaluación se llevó a cabo en las instalaciones de LIMPER congelaciones SA de CV.

El equipo utilizado fue un sistema de análisis computarizado de la motilidad espermática (Hamilton Thorne Bioscience, IVOS, Version 12, USA).

La evaluación se realizó en 3 pajillas por tratamiento por réplica; el promedio de los valores de las 3 pajillas fue el utilizado como resultado en el análisis estadístico.

En resumen, el procedimiento fue:

-Se descongeló una pajilla a la vez en baño maría a 37°C por 40 segundos, la pajilla de 0.25 ml se diluyó 1:4 en solución salina a 37°C.

-Se utilizaron 2 μ l de la solución lo más rápido posible tras su descongelación y se pusieron en celdas especiales Leja de 2 μ l.



Figura 14: Cámara Leja para sistema CASA.

Los patrones de motilidad espermática registrados fueron: porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad progresiva (V_p), porcentaje de espermatozoides estáticos (Ee), velocidad de trayecto (V_t), velocidad de vía (V_v) e índice de linealidad (Li).



Figura 15 Evaluación en tiempo real de motilidad progresiva.

5.4.2 Evaluación de funcionalidad de la membrana plasmática por el método de hinchazón hipo-osmótica (HOST)

El procedimiento se realizó según lo reportado por Mehdipour *et al.* (2016).

La solución hipo-osmótica se preparó mezclando 9 g de Fructosa y 4.9 g de citrato de sodio en 1 l de agua bidestilada; esta solución se almacenó a temperatura ambiente y en un lugar oscuro hasta su uso.

Se descongelaron 4 pajillas por tratamiento por réplica, a 37 °C por 40 segundos. El contenido de cada pajilla se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml que se mantuvo en baño maría a 37 °C hasta obtener la muestra para la prueba HOST; 50 µl de semen + 100 µl de solución hipo-osmótica e incubación por 30 min.

Al término de la incubación se obtuvo una muestra que se observó al microscopio (1000 X) para estimar el porcentaje de células espermáticas con hinchazón (H+, membrana plasmática funcional), en una población de al menos 200 espermatozoides.

El promedio de los valores de las 4 pajillas fue el utilizado como resultado en el análisis estadístico.



Figura 16: Campo de observación para prueba HOST.

5.4.3 Evaluación de integridad del acrosoma por fijación en solución de Hancock.

El procedimiento se realizó según lo reportado por Mehdipour *et al.* (2016).

Composición de la solución de Hancock:

- Formalina (62.5 ml)
- Solución salina (150 ml) *
- Solución buffer (150 ml) **
- Agua bidestilada (500 ml).

*Solución salina, 9.01 g de NaCl en 500 ml de agua bidestilada

**Solución buffer, 100 ml de solución 1 (21.7 g de Na_2HPO_4 en 500 ml de agua bidestilada) + 50 ml de solución 2 (22.54 g de KH_4PO_4 en 500 ml de agua bidestilada).

Se descongelaron 4 pajillas por tratamiento por réplica, a 37 °C por 40 segundos. El contenido de cada pajilla se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml que se mantuvo en baño maría a 37°C hasta obtener la muestra para fijación en Hancock; 250 µl de semen + 250 µl de solución Hancock.

Al término de la dilución en Hancock se obtuvo una muestra que se observó al microscopio con iluminación de contraste de fase (1000 X) para estimar el porcentaje de células espermáticas con acrosoma reaccionado, en una población de al menos 200 espermatozoides.

El promedio de los valores de las 4 pajillas fue el utilizado como resultado en el análisis estadístico.

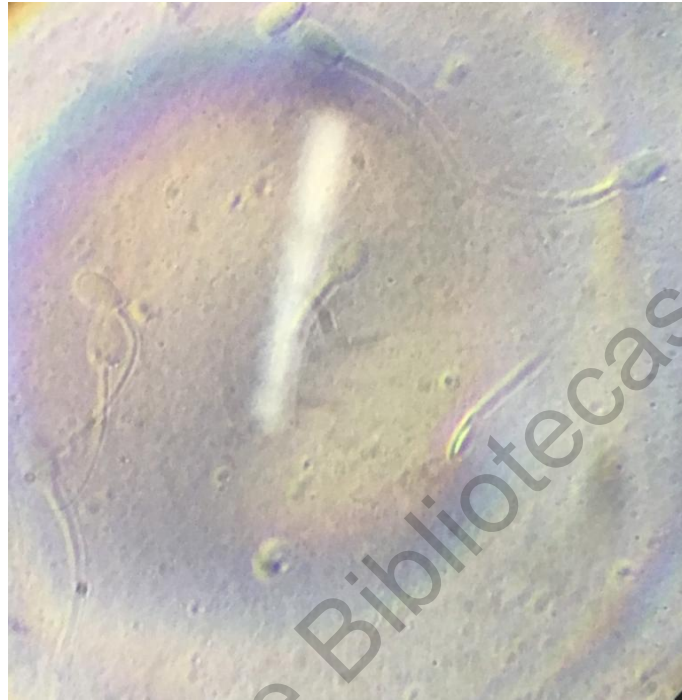


Figura 17: Campo de evaluación para Hancock.

5.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue por análisis de varianza para un diseño de bloques completamente aleatorizados; replica como criterio de bloque. En las variables de respuesta, los valores expresados como porcentaje se transformaron a arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción antes de su análisis para normalizarlos.

6. RESULTADOS.

6.1 Concentración de proteína en plasma seminal por LOWRY

Se obtuvo una R en la curva estándar de 0.96. Con una fórmula $y = 0.6516x + 0.067$.

Se presenta la lectura original y la concentración final (cuadro 9).

Cuadro 10. Lecturas de la concentración de proteína en plasma de toro (BSP) y plasma seminal de carnero (RSP).

	[] proteína lectura	[] proteína mg/ml total
RSP	6.476119403	129.5223881
BSP	3.908955224	156.358209

6.2 Gel de electroforesis SDS-PAGE para plasma seminal de bovino y carnero.

En la figura 17 podemos observar el gel de electroforesis SDS-PAGE para el plasma seminal de toro (BSP) y el plasma seminal de carnero (RSP).

Para BSP vemos 5 bandas marcadas:

Banda 1 a 3 en 40 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posibles NUCB1 y PLA2 G α .

Banda 2 a los 28 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posible BSP5

Banda 3,4 y 5 a los 15 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posible BSP1, BSP3 SPADH1.

Para RSP se reconocen 7 bandas.

Banda 1 a 50 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posibles Albumina.

Banda 2 a los 25 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posible BSP5

Banda 3,4 y 5 a los 18 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posible pGps, Gpxs y TIMP2.

Banda 6 y 7 a los 15 kDa aproximadamente que corresponde a lo reportado como posible RSVP14 y Bdh-2. (Druart et al., 2013)

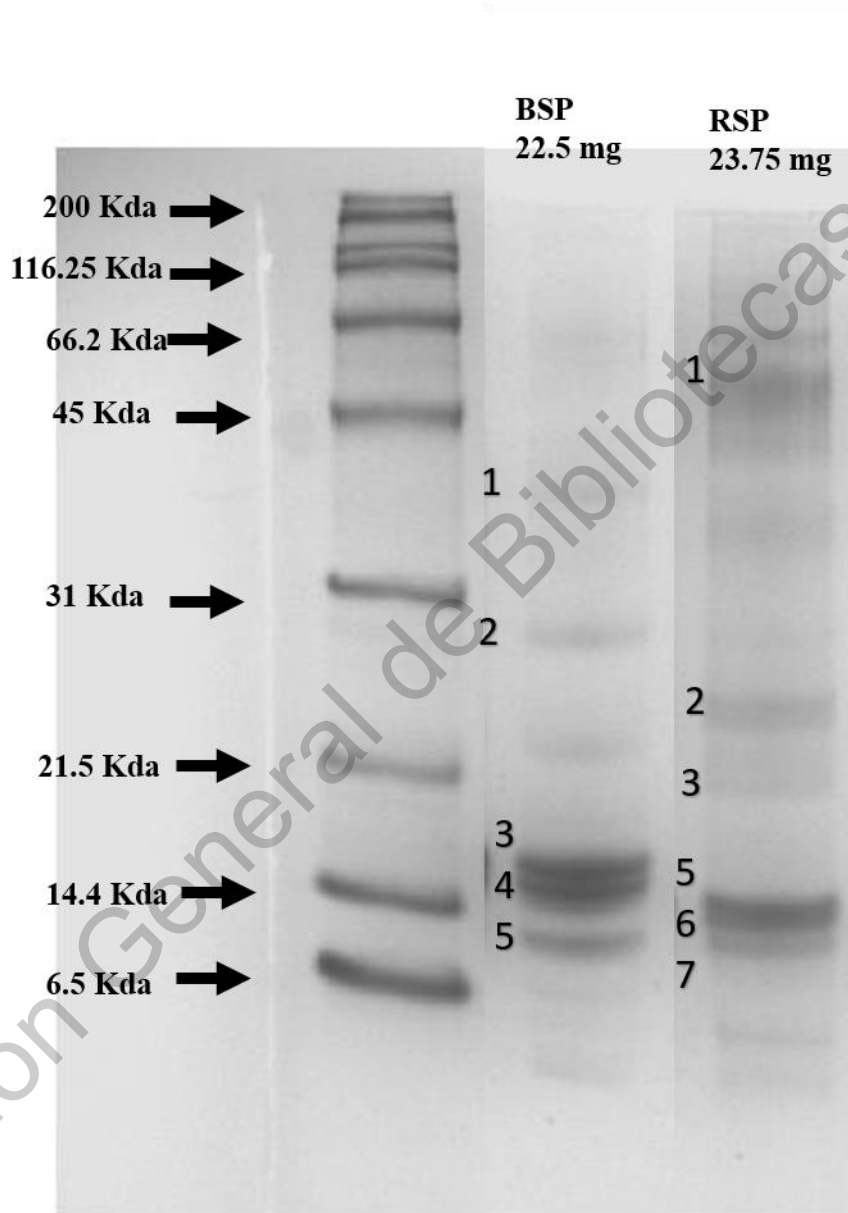


Figura 18. Gel de electroforesis indicando presencia de diferentes fracciones proteicas en plasma seminal de bovino (BSP) y plasma seminal de carnero (RSP).

6.3 Patrones de motilidad por análisis computarizado CASA

En los patrones de motilidad espermática (Cuadro 9), se pudo observar que la adición de plasma seminal influyó ($P \leq 0.01$) en las velocidades de trayecto (Vt) y de vía (Vv) mientras que solo se encontró una tendencia de efecto ($P = 0.13$) para la motilidad progresiva (MP). El resto de los patrones de motilidad no fueron influidos por este factor. El nivel de adición de plasma seminal de 5 % tendió a mejorar la MP con respecto al control sin afectar las Vt y Vv, sin embargo, éstas si fueron afectadas por los niveles mayores de adición de plasma seminal.

Cuadro 11. Resultados de patrones de motilidad por análisis computarizado CASA.

	T0	T5	T10	T20	e.e.m.	P
MP (%)	32.6a	36.1b	33.9ab	34.6ab	1.0	0.13
Ee (%)	40.8	35.5	39.1	38.5	1.7	0.19
Li (%)	33.9	35.1	34.5	35.9	0.7	0.21
Vp (µm/seg)	63.5	64.6	62.95	62.75	1.3	0.72
Vt (µm/seg)	94.1a	93.3a	89.1ab	85.3b	1.8	0.01
Vv (µm/seg)	193.4a	190.1ab	182.7bc	174c	3.6	0.004

^{a, b, c} Literales diferentes dentro de fila indican diferencia estadística

Motilidad progresiva (MP), Espermatozoides estáticos (Ee), Índice de Linealidad (Li) y Velocidades progresiva (Vp), de trayecto (Vt) y de vía (Vv) en semen de carnero post descongelación con adición al diluyente para congelación de 0 (T0), 5 (T5), 10 (T10) y 20 % (T20) de plasma seminal de toro

6.4 Funcionalidad de membrana por prueba HOST

El % de espermatozoides con integridad de membrana (H+) en la prueba HOST fue influido por la adición de plasma seminal heteroespecífico; a partir del nivel de adición de 5 % se aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides con hinchazón hipo-

osmótica como reflejo de integridad funcional de la membrana plasmática (45.2^a, 49.7^b, 53.4^c, 53.7^c % en T0, T5, T10 y T20; P <0.001).

6.5 Integridad de acrosoma por fijación en Hancock

El % de células espermáticas con anomalía en el acrosoma se disminuyó con la adición de 5 % de plasma seminal (11.5^{ab}, 10.0^a, 12.3^{ab}, 13.4^b % en T0, T5, T10 y T20; P=0.07).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

7 DISCUSIÓN

El plasma seminal ha sido largamente estudiado para saber los efectos y las interacciones que tiene sobre los espermatozoides, sobre la fertilidad y en la hembra.

Los contenidos del plasma seminal son diferentes a lo largo de su camino hacia la eyaculación ya que diferentes glándulas acopian nutrientes al líquido, una gran parte corresponde a proteínas que tienen diferentes usos a lo largo del camino (Mann, 1964). Hay proteínas que afectan directamente la fisiología y preservación de los espermatozoides tal es el caso de las proteínas BSP (Binder of sperm proteins) (Manjunath *et al.*, 2009). Las proteínas BSP (Binder of sperm proteins) es una familia de proteínas que tiene una alta conservación entre mamíferos. (Manjunath *et al.*, 2009). Estas proteínas interactúan con la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides y sus pesos moleculares van de los 15 a los 30 kDa.

Dentro del gel de electroforesis SDS-PAGE que se realizó se encontraron proteínas con pesos por debajo de los 25 kDa. Para el plasma seminal de toro se observan bandas muy marcadas en los pesos 15 kDa, así como bandas en los 23 y 29 kDa. Estos pesos ya han sido reportados para plasma seminal de toro identificadas como proteínas BSP5, BSP1, BSP3 y SPADH1 entre otras. Para el plasma seminal de carnero se observan bandas en los pesos 50kDa, 25 kDa y 15 kDa. Estos pesos están reportados para proteínas BSP5, RSVP 14 entre otras proteínas. El 32% de las proteínas presentes en el plasma seminal de toro están compartidas por las presentes en el plasma seminal de carnero. (Druart *et al.*, 2013). La proteína BSP 1 en toro ha sido relacionada con la estimulación en la motilidad de los espermatozoides; BSP 3 así como BP5 están asociado al porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (Menezes *et al.*, 2017), en general estas proteínas se unen al espermatozoide para estabilizar la membrana y mantenerla en un estado decapitado previo al contacto con el tracto vaginal. (Therien *et al.*, 2001). En Carneros se han identificado dos proteínas presentes en el plasma seminal que sirven como protección y reparación para el daño por shock térmico denominadas RSVP14 y 20; Las únicas BSP's encontradas en carnero son las BSP 5 las cuales están asociadas en bovinos a espermatozoides con acrosomas intactos. Sin embargo, si se ha observado en carneros que al adicionar plasma seminal a espermatozoides

que ya han sufrido de capacitación tiene la capacidad de revertir este daño (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pe *et al.*, 2001).

La concentración reportada de BSP en toro es de 39.1 mg/ml mientras que en los carneros es de 15 mg/ml, (Bergeron and Manjunath, 2006) esto concuerda con los resultados obtenidos en el gel, en el cual se observan pocas proteínas BSP en el plasma seminal de carnero y muchas más en el de toro.

El efecto de BSP en diferentes especies de mamíferos nos muestra que no tiene un efecto positivo para la estabilidad de la membrana de los espermatozoides sin embargo en canero se reportan resultados completamente opuestos y se observa que estos efectos negativos dependen tanto de la concentración de estas proteínas como en el momento en el que se adicionan, así como el tiempo de exposición a estas (Plante *et al.*, 2015). Otras proteínas como la SPADH1 también encontrada en el plasma seminal de bovino está relacionada con la regulación del metabolismo del espermatozoide, así como en la protección a la membrana del estrés oxidativo (Schoneck *et al.*, 1996).

Aunque el plasma seminal en general tiene los mismos componentes, azúcares, lípidos, iones y hormonas, sabemos que el contenido de proteínas en bovinos tiene diferencias entre los toros que tiene una buena capacidad de congelación y lo que no, según Jobim *et al* en 2004, reportó que existía una diferencia entre la concentración total de proteínas entre toros que cumplían con los estándares de congelabilidad del Brazilian college of animal reproduction con toros que no cumplían con estos estándares. En el plasma seminal de estos toros con buena congelabilidad se encontraba una mayor proporción de proteínas con pesos entre los 15 y los 17 kDa y que después fueron identificadas como BSP1 y BSP3 (Druart *et al.*, 2013). La presencia de mayor cantidad de proteínas podría indicar que estas tienen un efecto protector de la membrana plasmática de los espermatozoides. Un estudio similar en Jabalíes indica que el plasma seminal entre jabalíes con buena congelabilidad y con mala congelabilidad presentan una diferencia en la concentración de proteínas (Hernández *et al.*, 2007). En cambio, en carneros no se ha observado que haya diferencia entre carneros con

buena congelabilidad y mala con respecto al tipo de proteínas encontrados en su plasma seminal (Soleilhavou *et al.*, 2014).

Los estándares utilizados para decidir que los toros utilizados como donadores de plasma seminal en el experimento fueron; motilidad de más del 85%, cantidad de muertos por abajo del 60% y bajo número de malformaciones, menos del 15%. Los parámetros utilizados por la Brazilian college of animal reproduction, es una motilidad progresiva de 30%, integridad acrosomal 45%, defectos menores al 20% (Jobim *et al.*, 2004). Así sabemos que los machos seleccionados cumplían con valores referentes a una buena congelabilidad.

La baja estacionalidad en Toros los hace un perfecto donador de proteínas en su plasma seminal ya que no se observan cambios tan drásticos en su contenido como en los carneros a lo largo del año.

El efecto de la adición post descongelación a diferentes tiempos del plasma seminal de carnero sobre los espermatozoides que fueron despejados del plasma seminal ha mostrado que la adición del sobrenadante del plasma seminal más que el plasma seminal completo o el pellet tras la centrifugación son mejores para la supervivencia, motilidad y la fertilización (El-Hajj *et al.*, 2007).

Existen muchos métodos para evaluar la viabilidad de los espermatozoides tanto en fresco como después del proceso congelación/descongelación. La motilidad progresiva es una de las primeras pruebas utilizadas ya que se realizaba a simple vista bajo un microscopio. Hoy en día para conocer el comportamiento de movimiento de los espermatozoides se utiliza un sistema computarizado, el cuál fue desarrollado en 1985, llamado CASA (computer aided sperm analysis) y ha ido evolucionando para convertirse en la principal técnica para laboratorios de evaluación en humanos y otros animales (Mortimer, 2000).

Este método evalúa la motilidad progresiva, o sea cuántos espermatozoides se mueven en línea recta. La motilidad progresiva reportada para carneros va de 14.4 a 73.6 % (Santolaria *et al.*, 2015) lo cual indica que todos los datos obtenidos están dentro del rango reportado. Mis resultados no tuvieron una diferencia significativa entre las concentraciones

y el control, pero si se observa una diferencia numérica en la adición de 5% de plasma seminal de toro. Aunque los resultados no muestran una mejoría sobre lo reportado sabemos que la presencia de plasma seminal se cree un factor de mejoría en la motilidad progresiva (Barrios *et al.*, 2000).

Otros valores resultados del análisis CASA también han sido utilizados para conocer la viabilidad de los espermatozoides como V_v y V_p estos dos valores hacen referencia a la velocidad de vía la cual los indica el tiempo que utiliza para llegar del punto a al punto b, y velocidad progresiva, que es la velocidad en línea recta que tuvo en su trayecto (Mortimer, 2000). La velocidad de vía, así como la velocidad progresiva nos indica que a una mayor velocidad se tiene una mayor correlación con una mejor fertilidad (Santolaria *et al.*, 2015), por lo tanto, mis valores para velocidad de trayecto me muestran que hay una diferencia significativa disminuyendo al aumentar la adición de plasma seminal de toro lo cual al realizar la IA podría suponer una menor fertilidad. La velocidad de vía reportada para carneros va de los 94.7 a los 174.9 $\mu\text{m/s}$ (Santolaria *et al.*, 2015), dentro de los valores presentados podemos observar que nuestro valor que tiene una diferencia significativamente menor es el de 20% de plasma seminal de toros sin embargo la adición del 5 y 10% están por encima del valor mayor para esta velocidad.

La prueba hiposmótica se basa en la capacidad de la membrana plasmática de las células viables de dejar entrar un líquido con una concentración mayor a través de ella, esto nos indica que la membrana está activa bioquímicamente (Zaneveld *et al.*, 1990). Esto se observa en un microscopio de fases en el cuál podemos observar diferentes niveles de reacción tras una incubación de los espermatozoides en un medio con altas concentraciones de glucosa. Dentro de los resultados se muestran una diferencia significativa entre tratamientos y el control. Mostrándonos un valor igual o mayor al 50% lo cual está reportado como un valor normal para los espermatozoides viables (Correa & Zavos, 1994). Se ha probado que hay una alta relación entre la concentración de proteínas en el plasma seminal y una alta respuesta a la prueba hiposmótica en semen de carnero. (Almadaly *et al.*, 2016) Recientemente también se ha tratado de correlacionar la prueba HOST con la integridad de

DNA la cual resulta ser una forma de identificación de las células viables en el momento de la fertilización *in vitro* (Stranger *et al.*, 2010).

La prueba Hancock es una fijación en líquido para observar anomalías en las diferentes zonas del espermatozoide. Se utiliza un microscopio de fases para observar la tridimensionalidad de las células. En los resultados presentados se hizo la contabilización de espermatozoides con el acrosoma suelto, esto quiere decir que los espermatozoides que presentan esta anomalía ya realizaron una reacción acrosómica en el proceso de congelación/descongelación y por lo tanto ya no son células viables al momento de la inseminación artificial. Las reacciones acrosómicas se llevan a cabo después de diferentes estímulos que tiene el espermatozoide a lo largo del tracto reproductor femenino, estímulos como la presencia de iones como Ca^+ y Na^+ que activan cadenas de respuesta que inician el proceso de activación e hiperactivación del espermatozoide, también hay estímulo por parte del colesterol que activa a proteínas que están cubriendo a la membrana para secuestrar lípidos y desestabilizar la membrana causando así la reacción acrosómica, esto comúnmente pasa en la cercanía a la zona *pellucida* del óvulo, esto para que en el momento que suceda las enzimas que están atrapadas entre las membranas acrosómica y plasmática puedan ayudar al espermatozoide a realizar la fusión con el óvulo (Olivera *et al.*, 2006). El porcentaje usado para anomalías en espermatozoides debe de ser menor al 15% del total contado. En los resultados presentados se observa una diferencia significativa entre el porcentaje del 5% con relación a los de mayor porcentaje, 10% y 20%, lo cual nos indica que a menor concentración se observa menor cantidad de acrosomas sueltos.

Se sabe que posterior a la monta existe una respuesta inflamatoria en la hembra debido a la presencia del semen con todos sus componentes orgánicos (Schuberth *et al.*, 2008). Esta reacción inmunológica inclusive es necesaria para eliminar cualquier molécula o célula que pudiera desencadenar una reacción inmune en el momento de la implantación, también se ha encontrado que la presencia de parte de la reacción inmune durante las primeras etapas del embarazo tiene un efecto positivo sobre el desarrollo embrionario y la cantidad de embriones y en su viabilidad (O'Leary *et al.*, 2004).

Desde el inicio de la inseminación artificial se han utilizado diluyentes con fracciones proteicas de origen animal tales son los casos de los extenders con yema de huevo o proteína de leche, ahora se han empezado utilizar proteínas de origen vegetal, el uso de estas proteínas de origen animal o vegetal sólo han mostrado un mayor número de neutrófilos, pero todo dentro de la respuesta inmune normal en la hembra (Schuberth *et al.*, 2008).

Al tener una mayor cantidad de células espermáticas vivas y con la membrana funcional hace que se tenga una menor reacción inmune que en dosis con altas cantidades de espermatozoides muertos (Taylor *et al.*, 2008).

Dirección General de Bibliotecas UAG

8 CONCLUSIÓN

1. Se concluye que el uso del 5% de adición de plasma seminal heteroespecífico (toro a carnero) podría ser beneficioso para su conservación. Lo anterior debido a que mejora la integridad de la membrana plasmática y la motilidad progresiva sin alterar sus patrones de velocidad.
2. Se recomienda hacer pruebas con una menor concentración de plasma seminal heteroespecífico ya que el óptimo de los valores fue la menor, pero al aumentar la concentración disminuía el efecto positivo. Por lo tanto, una menor concentración podría beneficiar la supervivencia de los espermatozoides post descongelación.
3. Se recomienda también el uso de estas pajillas en inseminación artificial para medir su fertilidad real en campo.
4. Se recomienda también para futuras pruebas de este macroproyecto implementar técnicas más precisas y modernas como la inmunotinción para marcadores ya encontrados de viabilidad espermática.
5. La presencia de BSP en época estacional es menor en ovinos. Podría probarse en época estacional congelación con plasma seminal para mejorar su congelación.

9 LITERATURA CITADA

Abril-Sánchez S., A. Freitas-de-Melo, J. Giriboni, J. Santiago-Moreno and R. Ungerfeld. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 205:1-9

Almadaly, E.A., F.A. Farrag, I.M. Saadeldin, M.A. El-Magd and I.M.A El-Razek. 2016. Relationship between total protein concentration of seminal plasma and sperm characteristics of highly fertile, fertile and subfertile Barki ram semen collected by electroejaculation. *Small Ruminant Res.* 144:90-99.

Aslam, M.K., A. Kumaresan, K.V. Sharma, M. Tajmul, S. Chhillar, A.K. Chakravarty, A. Manimaran, T.K. Mohanty, A. Srinivasan, and S. Yadav. 2014. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology.* 82:1254-1262.

Ax R.L., M.R. Dally, B.A Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D Varner, B. Hafez and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. In: Hafez B., E.S.E. Hafez. (Ed.) *Reproduction in farm animals.* P. 365. Blackwell publishing, Baltimore, Maryland.

Barrios B., R. Pérez-Pé, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muiño-Blanco and J.A. Cebrián-Pérez. 2000. Seminal Plasma Proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63:1531-1537.

Bedoya N.A., N. Vásquez, M. Rivera, G. Correa and L.E. Trujillo. 2003. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hiposmótico (HOST). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín.* 56:1983-1997.

Caravaca F.P., J.M Castel, J.L. Guzmán, M. Delgado, Y. Mena, M.J. Alcalde, P. González. 2003. *Bases de la reproducción animal.* (1ª Ed.) Servicio de publicaciones de la universidad de Córdoba, Sevilla, España.

Celeste F. and L. Vilanova. 2015. Sperm metabolism. *Gaceta de ciencias veterinarias*. 20:23-32

Choudhary K.K., K.M. Kavya, A. Jerome and R.K. Sharma. 2016. Advances in reproductive biotechnologies. *Vet world*. 9(4):388-395.

Córdova-Izquierdo, A., M.S. Córdova-Jiménez, C.A. Córdova-Jiménez and C.A. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Rev. Vet.* 19:67-79.

Correa J.R. and M.P Zavos. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 42(2):351-360.

Cueto M., A. Gibbons, M.M. Bruno-Galarraga and J. Fernández. 2016. Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. (2ª Ed.) INTA Ediciones, Argentina.

Druart X., J.P. Rickard, S. Mactier, P.L. Khonke, C.M. Kershaw-Young R. Bathgate, Z. Gibb, B. Crossett, G. Tsikis, V. Labas, G. Harichaux, C.G. Grupen, and S.P. De Graaf. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J. Proteomics*. 91:13-22.

El-Bashir S., Y. Magdi, A. Rashed, M.A. Ibrahim, Y. Edris, and A.M. Abdelaziz. 2018. Relationship between sperm progressive motility and DNA integrity in fertile and infertile men. *Middle East Fertility Society Journal*. 23(3):195-198.

El-Hajj R., P.C. Thomson, G. Leahy, G. Evans and W.M.C. Maxwell. 2007. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not In Vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 42(5):541-549.

Evans G. and W.M.C. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Falzone N., C. Huyser, F. Fourie, T. Toivo, D. Leszczynski and D. Franken. 2008. In vitro effect of pulsed 900 MHz GSM radiation on mitochondrial membrane potential and motility of human spermatozoa. *Bioelectromagnetics*. 29(4):268-276.

Fickel J., A. Wagener and A. Ludwig. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildlife Res.* 53(2): 81-89

Gunay U., I. Dogan, Z. Nur, I. Manolov, H. Sagirkaya, K.M. Soylu, C. Kaptan, and L. Akpinar. 2006. Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *B. Vet. I. Pulawy*. 50(4):503-507.

Hancock J.L. 1952. The morphology of bull spermatozoa. *Jour exp biol.* 29:445-453

Henault M.A., G. Killian, J.F. Kavanaugh and L.C. Griel. 1995. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 52 (2):390-397.

Hafez E.S.E. 1980. *Reproduction in farm animals*. (4^a Ed.) Lea & Febiger, Baltimore, Maryland.

Hicks, J.J. 2001. *Bioquímica* (1a Ed.) McGraw-Hill Interamericana, México, D.F.

Holt W.V., F. Shenfield F., T. Leonard, T.D. Hartman, R.D. North and H.D. Moore. 1989. The value of sperm swimming speed measurements in assessing the fertility of human frozen semen. *Hum. Reprod.* 4(3):292-297.

Jobim, M.I.M., E.R. Oberst, C.G. Salbego, D.O Souza, V.B. Wald, F. Tramontina and R.C. Mattos. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 61 (2-3):255-266.

Kimberling C.V and G.A. Parson. 2007. Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram. In: *Current therapy in large animal theriogenology*. (2nd Ed.) Saunder Elsevier USA, PP 20-628.

Kvist U. and L. Björndahl. 2004. Manual de análisis Básico de semen. (3ª Ed.) ESHRE Monografías, Barcelona, España.

Liu D.Y., G.N. Clarke and H.G. Baker. 1991. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates invitro. *J. Androl.* 12(4):231-239.

López-García M.J., A. Urbano-Felices y M. Cárdenas-Povedano. 2012. Manual de laboratorio para el análisis de semen. (1ª Ed.) OmniaScience.

Lu J.C., Y.F. Huang and N.Q. Lü. 2013. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia.* 46(4):329

Manjunath P., L. Baillargeon, Y.L. Marcel, N.G. Seidah, M. Chrétien, and A. Chapdelaine. 1988. Diversity of novel proteins in gonadal fluids. In: Chrétien M and K.W. McKerns (eds) *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems.* Biochemical Endocrinology. Springer, Boston, MA.

Manjunath P., M.R. Sairam and J. Uma. 1987. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Bioscience Rep.* 7(3):231-238.

Manjunath P. and I. Thérien. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Jour Rep Immunology.* 53:109-119.

Manjunath P., A. Bergeron, J. Lefebvre and J. Fan. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol. Reprod.* 80(3):394-397.

Mann T. 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *Agric. Re. Coun.* 23:493.

Mara L., C. Accardo, S. Pilichi, M. Dattena, F. Chessa, B. Branca and Cappai P. 2005. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology*. 63(8):2243-2253.

Mataveia G.A., S.J. Terblanche, J.O. Nöthling and D. Gerber. 2010. Effect of heterologous seminal plasma and semen extender on motility of frozen-thawed ram spermatozoa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 81(3):139-42.

Maxwell W.M.C., S.P. De Graaf, R.E.H. Ghaoui and G. Evans. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc. Reprod. Fertil.* 64:13-38.

Medrano, J.A. 2000 Recursos animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 49(187): 385-390.

Mehdipour, M., H.D. Kia, A. Najafi, H.V. Dodaran and O. García-Álvarez. 2016. Effect of Green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 73(3):297-303.

Menezes, E.B., R.V. De-Oliveira, M.F. Van-Tilburg, E.A. Barbosa, N.V. Nascimento, A.L.M.C.S. Velho, F.B. Moreno, R.A. Moreira, A.C.O. Monteiro-Moreira, G.M.C. Carvalho, A.F. Ramos, E. Memili and A.A. Moura. 2017. Proteomic analysis of seminal plasma from locally-adapted “Curraleiro Pé-Duro bulls” (*Bos taurus*): identifying biomarkers involved in sperm physiology in endangered animals for conservation of biodiversity. *Anim. Reprod Sci.* 183:86-101.

Moore K.L., T.V.N. Persaud and M.G. Torchia. 2016. *Embriología clínica*. (10^a Ed.) Elsevier Saunders, Río de Janeiro.

Mortimer S.T. 2000. CASA – Practical aspects. *J. Androl.* 21:515-524.

O'Leary S, M.J. Jasper, G.M. Warnes, D.T. Armstrong and S.A Robertson.2004. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction*. 128:237–247.

Olivera M., T. Ruiz, A. Tarazona y C. Giraldo. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 19:426-436.

Parks, J.E., J.W. Arion and R.H Foote. 1987. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37:1249–1258.

Partida, D.J.A., Braña, V.D., Jiménez, S.H., Ríos, R.G.F., & Buendía, R.G. 2013. Producción de carne ovina. Libro técnico Núm. 5. INIFAP - CENID Fisiología y Mejoramiento Animal. Ajuchitlán, Querétaro, México.

Pérez-Pé, J.A., Cebrián-Pérez & Muiño-Blanco, T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*. 56:425-434.

Ramu S. & Jeyendran R.S. 2013. The Hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. In: Carell D. and K. Aston. (eds) *Spermatogenesis: Methods in molecular biology (methods and protocols)*, Vol 927. Humana press, Totowa, NJ.

Restrepo G. 2008. *Biotechnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia*. (1ª Ed.) Grupo de investigación en biotecnología animal-GIBA. Medellín, Colombia.

Rischkowsky, B. y D. Pilling. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. FAO, Roma

Rovegno M., W.B. Feitosa, A.M. Rocha, C.M. Mendes, J.A. Visintin, M.E. Ortiz. 2012. Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell tissue bank*. 14:333-339.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C. 2000 Storage of ram semen. *Anim Repro Sci.* 62:77-

Santolaria P., S. Vicente-Fiel, I. Palacín, E. Fantova, E. Blasco, M.E. Silvestre and J.L. Yáñez. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperms subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 163:82-88

Schuberth, H. J., U. Taylor, H. Zerbe, D. Waberski, R. Hunter, and D. Rath. 2008. Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, 70(8):1174–1181.

Sharafi M., M. Forouzanfar, S. Morteza, M. Hajian, S. Ostadhosseini, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H.R. Rahmani, A.R. Javaheri and M.H. Nasr. 2009. In Vitro Comparison of Soybean Lecithin Based-Extender with Commercially Available Extender for Ram Semen Cryopreservation. *Int Jour Fert Ster.* 3:149-152.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. physiol.* 82:291-295.

Soleilhavoup C., G. Tsikis, V. Labas, G. Harichaux, P.L. Kohnke, J.L. Dacheux, Y. Guérin, J.L. Gatti, S.P. de Graaff and X. Druart. 2014. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *J. Proteomics.* 109:245-260.

Stanger, J. D., L. Vo, J.L. Yovich, and G. Almahbobi. 2010. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reprod. Biomed. Online.* 21(4): 474–484.

Taylor U, D. Rath, H. Zerbe and H.J. Schuberth. 2008. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 166–175.

Thérien, I., G. Bleau and P. Manjunath. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52:1372–1379

Thérien, I., S. Soubeyrand and P. Manjunath. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57:1080–1088.

Therien I., D. Bousquet and P. Manjunath. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 65:41-51.

Ustuner B., S. Alcay, M.B. Toker, Z. Nur, E. Gokce, F.A. Sonat, Z. Gul, M. Duman, C. Ceniz, A. Uslu, H. Sagirkaya and M.K. Soylu. 2016. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Anim. Reprod. Sci.* 164:97-104.

Verstegen J., M. Iguer-Ouada and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57:149-179.

De Alba, J. 1964. Reproducción y genética animal. (1ª ed.). Editorial SIC. Turrialba, Costa Rica.

Young, I.S and J. McEneny. 2001. Lipoprotein oxidation and arteriosclerosis. *Biochem. Soc. T.* 29: 358-362.

Zaneveld LJD, Jeyendran RS, Krajeski P, Coetzee K, Kruger TF, Lombard LJ. Hypoosmotic swelling test. In: Acosta AA, Swanson RJ, Ackerman SB, Kruger TF, Van Zyl JA, Menkveld R (eds), *Human spermatozoa in Assisted Reproduction*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1990;223-227.