



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Loma Bonita

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN E INTEGRIDAD
ACROSOMAL EN EYACULADOS DE CONEJO REFRIGERADOS
A 5 °C DURANTE 24 HORAS EN MEDIO SUPLEMENTADO CON
GSH**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN ZOOTECNIA

PRESENTA:

NEMESIO DEL ANGEL LÓPEZ CALLEJA

ASESOR DE TESIS: DR. SERGIO RAMIREZ ORDOÑES

CO-ASESOR: DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO. JULIO DEL 2015



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Loma Bonita

LA PRESENTE TESIS TITULADA "EVALUACIÓN DE LA CAPACITACIÓN E INTEGRIDAD ACROSOMAL EN EYACULADOS DE CONEJO REFRIGERADOS A 5 °C DURANTE 24 HORAS EN MEDIO SUPLEMENTADO CON GSH" PRESENTADA POR EL PASANTE NEMESIO DEL ANGEL LÓPEZ CALLEJA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SERGIO RAMÍREZ ORDOÑES, HA SIDO ACEPTADA Y REVISADA POR EL JURADO INDICADO PARA SER DEFENDIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN ZOOTECNIA.

JURADO EXAMINADOR

DR. SERGIO RAMÍREZ ORDOÑES
ASESOR

DR. BERTÍN MAURILIO JOAQUÍN TORRES
REVISOR

MC. NICOLÁS VALENZUELA JIMÉNEZ
REVISOR

DRA. LAURA HERNÁNDEZ CRUZ
REVISOR

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO. A JULIO DE 2015

DEDICATORIA

A mis padres

Idalia y Faustino, por creer en mí y darme el mejor ejemplo en esta vida, enseñándome que la mejor herencia que me pueden dejar es el estudio. Gracias porque sin su apoyo incondicional nunca hubiera llegado a alcanzar este logro que también es de ustedes y que definitivamente solo, no hubiese podido ser realidad si no estuvieran a mi lado en esos momentos en los que más los necesité. Los quiero mucho.

A mi hermana y hermanos

Rosita, Carlos y Cesar, les agradezco todo el apoyo y buenos consejos para salir adelante que como hermanos me han brindado.

A mis tíos (as) y primos (as)

Familia López y familia Callejas, jamás cambiaría toda la felicidad que me han dado, todos los buenos y malos momentos que hemos pasado, le agradezco a la vida por permitirme ser parte de estas familias, ya que muchos son un gran ejemplo, lo cual me inspira para llegar a ser un día no muy lejano una gran persona.

A mi novia

Xuñu, quien sin saberlo ni pensarlo ha sido mi más grande motivación en la realización de esta tesis, ya que con tus palabras que para ti fueron en su momento insignificantes, para mi fueron de gran apoyo e inspiración para continuar con este proyecto. Gracias por brindarme tu cariño y amor, pero sobre todo por intentar comprenderme en cada momento, eres lo máximo chaparrita, te amo.

A mis amigos (as)

El gran camarada *Soca*, sin hacer a un lado a mi amigazo el *Gallo*, al pequeño *Beto*, *Vari*, *Pepe*, *Verito*, *Selene*, *Efra*, y mis compañeros que durante el trayecto de mi carrera dejaron una huella, a mis amigos de pasillos, amigos de fiestas y de parrandas, sería una lista enorme mencionar a todos pero están presente en mí. Gracias a todos por su apoyo y amistad.

A mi nueva familia

Xol, *Toño* y *Oscar*, por los buenos momentos que pasamos y por los que a veces no tanto, sobre todo por los consejos que me dieron y por su apoyo incondicional en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la oportunidad de culminar este proyecto, dándome todas las herramientas necesarias para lograr un éxito más en mi vida.

A la Universidad del Papaloapan

Por abrirme sus puertas y brindarme todo su apoyo en conjunto con sus docentes, quienes me dieron una formación académica que me permitirá desarrollarme en mi vida profesional.

A mi co-asesor de tesis

Alfredo Trejo Córdova, quien me dio todas las facilidades durante la realización de mi estudio en el laboratorio de reproducción animal asistida, sin él no fuese posible desarrollar esta tesis. Gracias por confiar en mí.

A mi asesor de tesis

Sergio Ramírez Ordoñez, por su apoyo y su tiempo brindado.

A mis revisores de tesis

Dr. Bertín Maurilio Joaquín Torres, Dra. Laura Hernández cruz y Mc. Nicolás Valenzuela Jiménez, por sus sabios consejos y compartir conmigo sus conocimientos en cada una de sus observaciones, para mejorar la presente tesis.

4.2.	Métodos de crioconservación de semen	9
4.2.1	Refrigeración	9
4.2.1.1.	Efecto de la refrigeración en el espermatozoide.....	10
4.2.2.	Congelación	10
4.2.3.	Vitrificación	11
4.3.	Especies reactivas de oxígeno	11
4.4.	Estrés oxidativo seminal	12
4.5.	Antioxidantes	12
4.5.1.	Glutati3n reducido o GSH	13
4.5.2.	Catalasa	13
4.5.3.	Vitaminas C y E	14
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1.	Localizaci3n del experimento	15
5.1.1.	Clima	15
5.2.	Material biol3gico	15
5.3.	Tratamiento y dise1o experimental	15
5.4.	Desarrollo del experimento	16
5.4.1	Obtenci3n del eyaculado	16
5.4.2	Evaluaci3n del eyaculado	16

5.4.3	Evaluación macroscópica y microscópica del eyaculado	16
5.4.4	Dilución del semen	17
5.5.	Preparación de un buffer para clortetraciclina	17
5.6.	Determinación de la capacitación espermática	18
5.7.	Análisis estadístico	18
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
7.	CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIÓN	24
8.	LITERATURA CITADA	25
9.	APÉNDICE	34

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Valor promedio de los 7 eyaculados de conejo	19

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Anatomía del espermatozoide	6
2	Patrón de fluorescencia en la clasificación de los espermatozoides	9
3	Espermatozoides no capacitados (A), capacitados (B) y con reacción acrosomal (C) a las 0 y 24 h en presencia y ausencia de GSH	20

ÍNDICE DEL APÉNDICE

APÉNDICE	TÍTULO	PÁGINA
A	Vagina artificial de fabricación casera para la obtención del semen	34
B	Colecta del semen mediante vagina artificial	35
C	Espermatozoide capacitado.....	36

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del glutatión reducido en la integridad de la membrana acrosomal del espermatozoide de conejo, durante la refrigeración a 5 °C. Se utilizaron un total de 29 eyaculados de conejo de la raza Nueva Zelanda; 7 eyaculados fueron evaluados en fresco (control, 0 h), 22 eyaculados se dividieron en dos alícuotas para obtener un total de 44 muestras. La mitad de las muestras (n=22) fueron diluidas con medio suplementado con 100 µl de GSH a una concentración de 5 mM y almacenadas a 5 °C durante 24 h y las otras 22 muestras fueron almacenadas por 24 h a 5 °C sin GSH. Después de 24 h de almacenamiento se evaluó la capacitación espermática mediante la técnica de clortetraciclina. En semen fresco (0 h), el 59 % de los espermatozoides presentaron capacitación y el acrosoma intacto, mientras que el 30 % de los espermatozoides no presentaron capacitación y solo el 11 % de los espermatozoides presentó reacción acrosomal. Después de 24 h de refrigeración a 5 °C, el porcentaje de espermatozoides no capacitados y con acrosomal intacto se incrementó a 42 % en presencia de GSH, mientras que solo hubo un incremento de 35 % en ausencia de GSH (glutatión reducido). Mientras el semen refrigerado a 5 °C durante 24 h en presencia de GSH tuvo menor ($P<0.05$) porcentaje de espermatozoides capacitados (48 %) en comparación con el semen fresco con un 59 % y en refrigeración sin GSH, con 55 %. Se concluye que la adición de GSH ayuda en la protección de los espermatozoidez manteniendo la membrana plasmática intacta. Lo cual podría

permitir un incremento en el porcentaje de fertilización en la inseminación artificial.

Palabras clave: Conejo, Capacitación, Semen, Acrosoma

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of reduced glutathione (GSH) on the acrosomal membrane integrity of rabbit sperm during cooling at 5 °C. A total of 29 New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) ejaculates were used. 7 fresh ejaculates (control 0 h) were evaluated, and 22 ejaculates were divided into two aliquots for a total of 44 samples. Half of the samples (n = 22) were diluted and supplemented with 100 ul of GSH at a concentration of 5 mM and stored at 5 °C for 24 h. The other half of the samples were stored for 24 h at 5 °C without GSH. After 24 h of storage, sperm capacitation was evaluated using the chlortetracycline technique (CTC). In fresh semen (0 h), 59 % of sperm showed capacitation and intact acrosomes, while 30 % of sperm showed no capacitation, and only 11 % of sperm showed acrosome reaction. After 24 h of cooling at 5 °C, the percentage of uncapacitated sperm with intact acrosomes increased to 42 % in the presence of GSH, while there was only an increase of 35% in the absence of GSH. Meanwhile, semen refrigerated at 5 °C for 24 h in the presence of GSH had a lower ($P<0.05$) percentage of capacitated sperm (48 %) in comparison to fresh semen (59 %) and semen refrigerated without GSH (55 %). It is concluded that the addition of GSH helps protect sperm by maintaining the plasma membrane intact, which could allow for an increase in the percentage of fertilization in artificial insemination.

Keywords: Rabbit, Capacitation, Semen, Acrosome.

1. INTRODUCCIÓN

La conservación de semen a través de la refrigeración, congelación y vitrificación ha mostrado ocasionar cambios similares a la capacitación espermática *in vivo* en especies tales como bovinos, ovinos y porcinos (McDonald, 1991). La capacitación espermática mediante el proceso de conservación está relacionada con el estrés oxidativo, el cual se produce por el aumento de las especies reactivas de oxígeno. Durante la refrigeración y el periodo de estabilización (congelación) las muestras seminales se llevan a una temperatura de 5 °C. Durante este periodo ocurre un daño a los espermatozoides. Una forma de disminuir los efectos del estrés oxidativo en los espermatozoides es la adición de un antioxidante, al medio de dilución, previo a realizar la congelación. El glutatión reducido o GSH se ha utilizado durante la congelación de semen de bovinos, ovinos y caprinos (Fouchécourt *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen estudios sobre la adición del GSH, al medio de dilución, cuando se va a realizar la refrigeración.

Los diferentes procesos de criopreservación espermática, incluida la refrigeración han mostrado tener efectos en la funcionalidad de los espermatozoides. Por ejemplo, incrementa la tasa de capacitación espermática en especies tales como bovinos, porcinos y ovinos (Bailey *et al.*, 2000; Salamon y Maxwell, 2000). Por tanto, es necesario realizar estudios que permitan disminuir los efectos adversos de la criopreservación.

El GSH, es una enzima antioxidante presente en el líquido seminal que rodea al espermatozoide (Fouchécourt *et al.*, 1999), la cual tiene propiedades

químicas que le permiten actuar frente a diferentes compuestos oxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo; además reduce el radical libre tecoferoxilo y deshidroascorbato (Chiuailaf *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios donde se evalúa el efecto de esta enzima, en la integridad espermática son escasos y están enfocados, principalmente, a la congelación de semen.

Por lo tanto en este estudio se evaluó en semen de conejo, refrigerado durante 24 horas y suplementado con GSH a una concentración de 5 mM, el porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados con acrosoma intacto, y con reacción acrosomal y de esta forma mostrar su efecto de protección en la membrana acrosomal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto del glutatión reducido en la integridad de la membrana acrosomal del espermatozoide de conejo, durante la refrigeración a 5 °C.

2.2. Objetivos particulares

- Determinar mediante la técnica de clortetraciclina la capacitación espermática e integridad del acrosoma en eyaculados frescos de conejo.
- Determinar mediante la técnica de clortetraciclina la capacitación espermática e integridad del acrosoma en eyaculados de conejo con la adición glutatión reducido al medio de dilución y refrigerados durante 24 h a 5 °C.

3. HIPÓTESIS

La adición de glutatión reducido (GSH) al medio de dilución, durante la refrigeración tendrá un efecto positivo sobre la capacitación espermática e integridad de la membrana acrosomal del espermatozoide de conejo.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Características espermatozoide

Los espermatozoides son las células sexuales producidas por los individuos de sexo masculino. Estas células sexuales cuentan con la mitad de los cromosomas por ello se dice que son haploides (Rogers, 2011).

El espermatozoide de conejo, mide alrededor de 45 micras y presenta una velocidad de desplazamiento a partir del oviducto hasta el óvulo de 20 a 35 micras por segundo (McDonal, 1969).

4.1.1. Anatomía del espermatozoide. La anatomía del espermatozoide consiste básicamente de cabeza, cola o flagelo; un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola, la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Figura 1).

Cabeza. Es la parte principal del espermatozoide, su forma va a depender de la especie y ésta consiste en un núcleo aplanado oval, el cual contiene cromatina en forma compacta (Figura 1). La cromatina condensada está formada por ácido desoxirribonucleico que guarda el material genético, así como también una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas y una serie de enzimas que son utilizadas para la degradación de la zona pelúcida, durante la fertilización.

Acrosoma. El acrosoma se localiza en un extremo anterior del núcleo espermático, consiste en un delgado saco membranal de doble capa ubicado

sobre el núcleo, el cual se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide (Figura 1).



Figura 1. Anatomía de un espermatozoide (Hafez, 1996).

Cola. La cola del espermatozoide está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región de la cola entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro del segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, comprende

el axonema, el cual se compone de nueve pares de microtubulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales (Figura 1.). El segmento principal, que continua en el sentido posterior del anillo citoplasmático, se extiende casi hasta la punta de la cola, el cual esta formado por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola. El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que le da motilidad al espermatozoide (Hafez, 1996).

4.1.2. Capacitación espermática. La capacitación espermática es el conjunto de cambios fisiológicos que experimentan los espermatozoides durante su paso a través del tracto reproductor femenino. Este proceso tiene como resultado la activación de la célula germinal para reconocer al ovocito y poder realizar la fertilización (Zaneveld *et al.*, 1991). La capacitación espermática también se puede realizar en sistemas *in vitro* con el propósito de estudiar con mayor profundidad dicho proceso fisiológico. Como consecuencia de la capacitación espermática ocurre un incremento en la motilidad, este proceso es denominado hipermovilidad (Yanagimachi, 1994; Hafez, 1996). El proceso de capacitación también involucra cambios en la composición y orientación de las moléculas de la superficie de la membrana incluyendo, principalmente, las glicoproteínas y a los lípidos, los cuales son muy importantes en el metabolismo; además de que éstos pueden actuar como segundos mensajeros.

Otro cambio que ocurre durante la capacitación espermática es la remoción de las proteínas adquiridas durante la eyaculación y que se localizan en la superficie de la cabeza del espermatozoide (Martínez *et al.*, 1996). Dichas proteínas inhiben la capacitación y se conocen como “factores descapacitantes” (Garde, 1993). Estos cambios son necesarios para que el espermatozoide pueda realizar la reacción acrosomal (Lee y Ahuja, 1987).

4.1.3. Reacción acrosomal. Al terminar la capacitación espermática sigue la reacción acrosomal, la cual ocurre después del encuentro del espermatozoide con el ovocito y libera las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma de las células (Guyton y Hall, 2000) la cual consiste en la vesiculación de la membrana plasmática y acrosomal externa para su posterior desaparición (Coy, 1995).

4.1.3.1. Técnicas para determinar la capacitación espermática. La técnica de clortetraciclina y la tinción triple son procedimientos utilizados para determinar la capacitación espermática (Tamuli y Watson, 1994).

4.1.3.2. Técnica de clortetraciclina. La técnica de la clortetraciclina detecta el estado de la capacitación espermática y la integridad del acrosoma en las células, mediante el uso de un antibiótico fluorescente, el cual se une específicamente al calcio asociado a la membrana plasmática del espermatozoide liberando una fluorescencia intensa dependiendo del estadio de la capacitación en que se encuentre el espermatozoide. Para ello, se utilizan diferentes patrones de fluorescencia: patrón A, designado a espermatozoides

no-capacitados y acrosoma intacto; patrón B, capacitado y acrosoma intacto y patrón AR capacitado y acrosoma reaccionado (Figura 2). Los patrones de fluorescencia de la clortetraciclina reflejan las alteraciones asociadas a nivel del calcio intra-citoplasmático en los espermatozoides de diferentes especies animales, siendo la técnica más utilizada para su análisis (Ward y Storey, 1984; Dasgupta *et al.*, 1993).

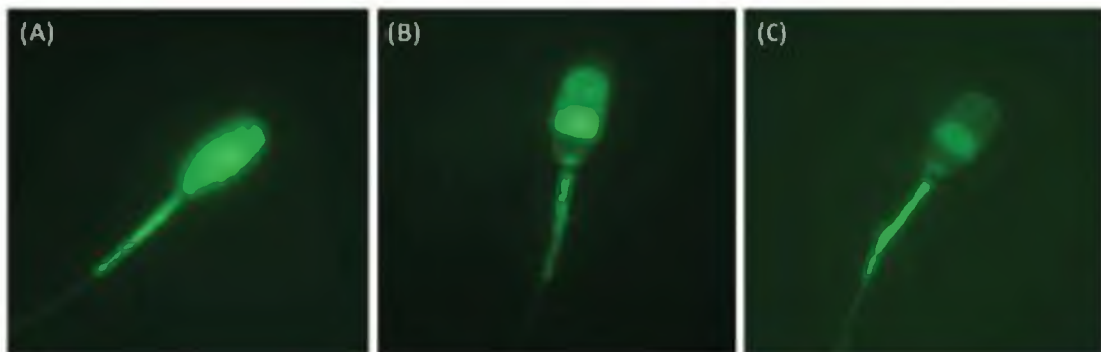


Figura 2. Patrón de fluorescencia en la clasificación de los espermatozoides

4.2. Métodos de crioconservación de semen

4.2.1. Refrigeración. La refrigeración es un método de conservación espermática, donde la reducción de la temperatura produce una disminución de la actividad metabólica y motilidad, incrementando la vida del espermatozoide. Se ha demostrado que la motilidad del espermatozoide se detiene totalmente a los 5 °C, pero se puede restituir si la temperatura se eleva nuevamente a niveles normales, siempre y cuando no se hayan ocasionado daños estructurales por el “choque térmico” (Vivianco, 1998). Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los 0 °C, los espermatozoides son más propensos a sufrir un “choque térmico” que puede causar daños

irreversibles en las células (Salamon y Maxwell, 2000). Al respecto, estudios realizados por Gunzel (1986) mostraron en semen diluido y refrigerado a 5 °C varía en la sobrevivencia y fertilidad en los espermatozoides, ya que con la refrigeración durante 24, 48 y 72 horas se obtuvo 71.0, 65.8 y 56.5 % de fertilidad respectivamente, lo que indica que entre más tiempo están en refrigeración se disminuye su tasa de fertilidad.

4.2.1.1. Efecto de la refrigeración en el espermatozoide. Durante el proceso de refrigeración se producen diversos daños, principalmente, en la membrana del espermatozoide (Watson, 2000). Cuando las membranas se enfrían por debajo de la temperatura de transición de lípidos que la componen, se produce un cambio en los minerales a fase de cristalización o de gel (Holt, 2000).

4.2.2. Congelación. Básicamente este proceso fue creado con la finalidad de conservar los espermatozoides por periodos de tiempo más largos, en comparación con la técnica de refrigeración, a fin de mantenerlos en buen estado evitando pérdidas de la función de las células, ya que cuando una muestra de líquido seminal es congelada y posteriormente descongelada un gran número de espermatozoides son dañados y, por tanto, son disfuncionales y las células que resisten a este proceso su función es afectada (Watson, 1990).

En general, existe muy poca evidencia en la que el semen congelado y el semen refrigerado tienen buenos resultados de fertilidad, en comparación con el semen fresco, la cual se le atribuye a la concentración

elevada de espermatozoides del semen fresco (Maxwell *et al.*, 1999; Killian *et al.*, 1993).

4.2.3. Vitrificación. En la vitrificación se utiliza un proceso físico de solidificación como método de conservación de los espermatozoides y de órganos o tejidos. Para este proceso se necesita de una solución vitrificante compuesta de una alta concentración de crioprotectores. Al ser enfriados no cristaliza y se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado y similar al vidrio, de ahí proviene su nombre. Esta técnica de criopreservación es la más rápida que existe actualmente, ya que desde el proceso de equilibrio hasta la inmersión de los espermatozoides en nitrógeno líquido no requiere más de 10 minutos (Fahy *et al.*, 1984; Rall y Fahy, 1985).

4.3. Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son especies químicas, las cuales no poseen un electrón apareado y son moléculas muy reactivas (Hicks, 2001); entre estas tenemos a los de hierro, radicales libres de cobre, radicales libres de nitrógeno, así como los de oxígeno (Gilbert y Colton, 1999), y entre las especies reactivas de oxígeno se tienen el anión superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno, este último es el más importante en el daño espermático. La peroxidación lipídica está relacionada con las especies reactivas de oxígeno, las cuales son causantes de la baja movilidad y viabilidad espermática, así como de la integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial (Baumber *et al.*, 2000).

4.4. Estrés oxidativo seminal

El estrés oxidativo es la situación en la que los radicales libres tienden a aumentar de forma descontrolada ocasionando un desequilibrio entre la velocidad de su producción y la velocidad de su destrucción (Desmarchelier y Ciccia, 1998). El estrés oxidativo induce efectos en la célula, tales como oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos y, en consecuencia, producen una acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis (McCord, 2000). Puede presentarse generalmente por una deficiencia en la generación de sustancias protectoras naturales o por una excesiva exposición a agentes generadores de especies reactivas de oxígeno (Chihualaf *et al.*, 2002).

Para que ocurran los procesos fisiológicos de la fertilización del ovocito son necesarias pequeñas y controladas cantidades de especies reactivas de oxígeno (De Lamirande *et al.*, 1997). Por otra parte la producción de especies reactivas de oxígeno aumentan con el tiempo de incubación de los espermatozoides (Ball y Baumber, 2001), produciendo espermatozoides anormales (Aitken *et al.*, 1989) y la presencia de leucocitos (Baumber *et al.*, 2002).

4.5. Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar el daño que ocasionan. Esta acción puede ser endógena (sistema enzimático) o exógena

(sistema no enzimático), las cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (Uttara *et al.*, 2009).

Actúan como donadores de electrones, con la finalidad de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (Hicks *et al.*, 2006) y su acción se realiza en un medio hidrofílico como hidrofóbico y actúan como eliminadores con el fin de mantener un equilibrio prooxidante-antioxidante, es decir son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres (Chiuailaf *et al.*, 2002).

4.5.1. Glutación reducido o GSH. El glutación reducido tiene una función biológica, actúa como un antioxidante, el cual está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide (Blokhina *et al.*, 2003). Es donador de electrones, lo que evita una reacción en cadena de oxído-reducción (Hicks *et al.*, 2006), y lo realiza mediante su desintegración molecular para evitar alteraciones de ciertas moléculas como lípidos, proteínas, ADN, etc., (Venereo, 2002). El glutación reducido es un tripeptido y posee una distribución tisular variable y sus propiedades químicas le facilitan actuar frente a compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno, superóxido e hidroxilo, entre otros (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguin *et al.*, 2004).

4.5.2. Catalasa. La catalasa es una de las enzimas antioxidantes que contiene el líquido seminal y que protege al espermatozoide de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno. La catalasa dismuta el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, evitando así la formación del radical hidroxilo,

el cual es de la especies reactivas de oxígeno más citotóxico que existe. En diversos estudios se ha evaluado el uso de la catalasa como agente preventivo del estrés oxidativo durante la criopreservación. Algunos de estos estudios tuvieron muy buenos resultados como es el caso de los empleados en protocolos de criopreservación de espermatozoides de ovino (Cámara *et al.*, 2011) y humanos (Li *et al.*, 2010).

4.5.3. Vitaminas C y E. Las vitaminas C y E también cumplen con una función antioxidante, al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica (Azzi *et al.*, 2000). La vitamina C al donar electrones al radical tocoperóxido de la vitamina E oxidada, recicla la función antioxidante del α -tocoferol, ayudando a proteger a la membrana lipídica de la peroxidación, por lo cual la vitamina E sólo puede ser efectiva para crioprotección de la célula en combinación con la vitamina C (Carr *et al.*, 2000).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del experimento

El estudio se realizó en la granja "la posta" de la Universidad del Papaloapan, ubicada en la Ciudad de Loma Bonita, Oaxaca., en las coordenadas geográficas 95° 53' 34" longitud oeste y 18° 06' 09" latitud norte (INEGI, 2014).

5.1.1. Clima. El clima es cálido húmedo con lluvias abundantes en verano. La temperatura y precipitación anual promedio es de 25 °C y 1,845.2 mm, respectivamente (FAM, 2014).

5.2. Material biológico

Se utilizaron tres conejos machos adultos de la raza Nueva Zelanda, los cuales fueron mantenidos en la unidad de producción cunicola de la posta zootécnica de la Universidad del Papaloapan campus Loma Bonita. Dichos animales estuvieron bajo un sistema semi-intensivo en jaulas con una alimentación a base de concentrados comerciales y agua *ad-libitum*.

5.3. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluó la capacitación espermática a las 0 h en siete eyaculados de semen fresco (T0) y las 24 h con GSH (T1) y sin GSH (T2). Cada eyaculado se dividió en dos alícuotas que correspondieron a los tratamientos T1 y T2. Así, se utilizaron un total de 22 repeticiones por cada tratamiento, bajo un diseño

completamente al azar. En total se utilizaron 29 eyaculados procedentes de tres conejos.

5.4. Desarrollo del experimento

5.4.1. Obtención del eyaculado. La recolección de semen se realizó mediante una vagina artificial que consistió en un tubo cilíndrico, en cuyo interior contiene una cámara de aire construida con un globo de latex, donde fue depositada agua a 45 °C y se selló con un tapón de goma, en la salida del tubo se colocó a presión otro tubo de 15 ml, donde se depositó el eyaculado (Figura 5). Para estimular al conejo se utilizó una hembra para monta directa, cuando el macho desenvaino su pene se le colocó la vagina artificial para que eyaculara dentro de ella. Posteriormente, el eyaculado se depositó en un tubo eppendorf y se cubrió para evitar que fuera expuesto a la luz.

5.4.2. Evaluación del eyaculado. Los 29 eyaculados obtenidos se mantuvieron a 37.5 °C y transportados en tubos eppendorf al laboratorio de reproducción animal asistida de la Universidad del Papaloapan, los cuales se depositaron en la incubadora para mantener dicha temperatura hasta el tiempo de evaluación.

5.4.3. Evaluación macroscópica y microscópica del eyaculado. En cada eyaculado se determinó el volumen y color (características macroscópicas). El volumen se midió directamente al ser depositado el eyaculado en el tubo eppendorf de 1.5 ml. Al mismo tiempo se determinó el color; si el eyaculado tenía una tonalidad clara la calidad era mala y no se

usaba; mientras que si la muestra tenía una tonalidad blanca cremosa la muestra era buena. También se realizó la determinación de la movilidad y viabilidad espermática (características microscópicas). Para determinar la movilidad se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos y se observó con el objetivo de 40x del microscopio. La viabilidad se determinó utilizando una gota de eosina-nigrosina al 5 %.

5.4.4. Dilución del semen. De los 29 eyaculados 22 se dividieron en dos alícuotas, mientras los otros siete permanecieron como control, las cuales solo se evaluaron en fresco, y fueron centrifugados a 60 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, a la muestra se le retiró todo el sobrenadante (fluido seminal) y se añadió 1 ml de solución TCM-199, la cual es un diluyente comercial, una vez diluido, a una muestra se le agregó 100 µl de GSH a 5 mM y a las muestras del T2 no se le agregó GSH y se colocaron en refrigeración a 5°C durante 24 h.

5.5. Preparación de un buffer para clortetraciclina

La solución buffer, donde se disolvió la clortetraciclina se preparó de la manera siguiente: a 5 ml de agua destilada se le agregó 0.0379 mg de cloruro de sodio. Posteriormente, se adicionó 0.0030 mg de cisteína y finalmente se añadió 0.0157 mg de tris, todo fue mezclado con la ayuda de un agitador magnético. De la solución buffer se tomó 1 ml, el cual se colocó en un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio, y se agregó 0.0005 mg de clortetraciclina. Dicha solución se agitó y filtró.

5.6. Determinación de la capacitación espermática

Para esta variable se siguió el procedimiento siguiente: en un portaobjetos se colocaron 5 μ l de la muestra de semen ya diluida y se le agregó 5 μ l de clortetraciclina. Posteriormente, se dejó reposar durante 10 minutos y se procedió a evaluar la capacitación espermática mediante un microscopio de inmunofluorescencia en oscuridad absoluta. Se realizó un conteo de 100 espermatozoides y se clasificaron de acuerdo a un patrón de fluorescencia como se indica a continuación.

Patrón A: Fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto, las cuales son características de espermatozoides sin capacitar y acrosoma intacto.

Patrón B: La fluorescencia se concentra en la región acrosomal y una banda sin fluorescencia en la región post-acrosomal. Estas características son de un espermatozoide capacitado con el acrosoma intacto.

Patrón C: No presenta fluorescencia en la cabeza, excepto una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial. Esta última es la característica de un espermatozoide que sufrió una reacción acrosomal.

5.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza de una vía para probar diferencias entre ellos. La comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para dicho análisis se utilizó el programa estadístico SAS (1998).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio de las características de los eyaculados obtenidos a través de la vagina artificial, se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Valores promedio de las características de los siete eyaculados de conejo

Número de eyaculados (n)	Volumen (ml)	Color	Movilidad (%)	Viabilidad (%)
7	0.80	Blanco	89.3	91.1

Donde se observa que el volumen promedio de los eyaculados fue de 0.80 ml, lo cual está dentro del rango reportado como normal por otros investigadores 0.3-1.0 ml (Alvariño, 1993). Los eyaculados frescos tuvieron una movilidad de 89.3 %, superior a lo reportado por Mathur *et al.* (1993) y Hernández *et al.* (2008), quienes reportan 63.4 y 82.7 % de movilidad, respectivamente, en eyaculados de conejo. Un eyaculado de buena calidad debe tener una movilidad de 60 a 70 % (Alvariño, 1993). El porcentaje de espermatozoides vivos en los eyaculados frescos fue de 91.1 %, similar a lo reportado por Hernández *et al.* (2008) con un valor de 90.9 % y superior a lo reportado por Mathur *et al.* (1993) que fue de 70.9 % en semen fresco de conejo.

La Figura 3, muestra los resultados obtenidos de espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto (A), capacitados y con acrosoma intacto (B) y con reacción acrosomal (C) en semen fresco (n=7 eyaculados) y almacenado por 24 h en presencia o ausencia de GSH (n=22 eyaculados). La mejor respuesta se presentó con el tratamiento T1 a las 24 h con GSH, con un valor

de 42 % de espermatozoides no capacitados y con el acrosoma intacto con diferencias estadísticas significativas ($P<0.5$), respecto al tratamiento T0 (control) y el T2 sin GSH refrigerado a las 24 h con valores de 30 % y 35 %, respectivamente.

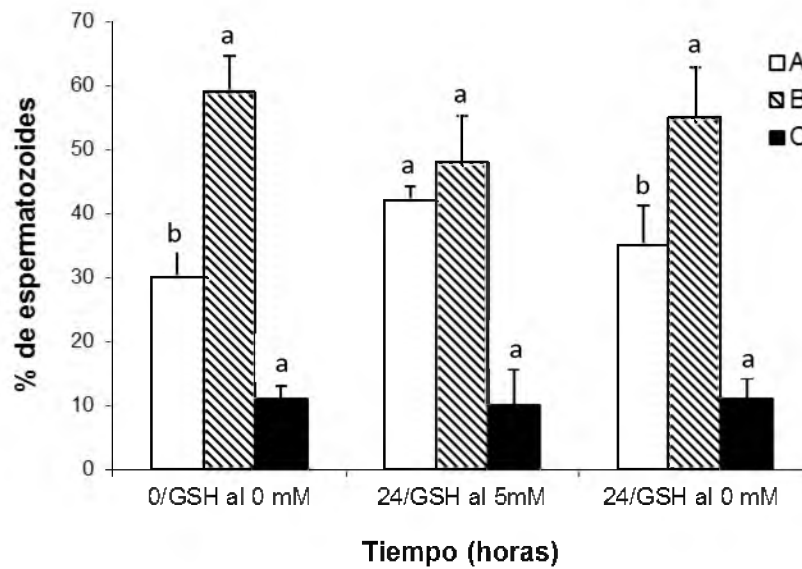


Figura 3. Espermatozoides no capacitados (A) capacitados (B) y con reacción acrosomal (C) a las 0 y 24 h (en presencia y ausencia de GSH).

Al realizarse la criopreservación de semen mediante la refrigeración a 5 °C da lugar a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo causado por el exceso de especies reactivas de oxígeno, está relacionado con una disminución de motilidad y viabilidad, es decir una baja fertilidad espermática (El-Sissy *et al.*, 2007).

En este estudio la adición de glutatión reducido (GSH) en una concentración de 5 mM adicionando 100 µl a las muestras de semen de conejo mejoró significativamente la cantidad de espermatozoides sin capacitar (42 %) a

las 24 h de conservación a 5 °C. Al respecto, algunos estudios realizados reportan efectos positivos del GSH en la calidad del semen en otras especies animales. Por ejemplo, Sinha *et al.* (1996) reportaron que la adición de 5 mM de GSH en diluyentes de semen de cabra incrementó la viabilidad espermática hasta en un 55.7 %.

El 42 % de espermatozoides no capacitados que se obtuvo al refrigerar el semen en presencia de GSH a una concentración de 5 mM, es inferior a lo reportado por Marco-Jiménez *et al.* (2006) quienes al criopreservar semen de conejo utilizando medio suplementado con GSH a una concentración 0.5 mM obtuvieron un 48 % de espermatozoides no capacitados. Sin embargo, nuestros resultado fueron superiores a lo reportado por Gadea *et al.* (2005) en espermatozoides de borrego (40.8 %).

Las diferencias observadas con respecto a los resultados obtenidos por Marco-Jiménez *et al.* (2006) podría deberse a la concentración utilizada de GSH (0.5 vs 5.0 mM). Este efecto del GSH coincide con los efectos reportados cuando se suplementa el medio de dilución durante el proceso de congelación o refrigeración (Gadea *et al.*, 2013).

El semen refrigerado a 5 °C durante 24 h en presencia de GSH, tuvo menor porcentaje de espermatozoides capacitados (B) (48 %) en comparación con el semen fresco y refrigerado sin GSH (59 y 55 %, respectivamente). De acuerdo a Bailey *et al.* (2002), los cambios que ocurren en la membrana celular debido a las temperaturas de refrigeración causan un aumento en los niveles de

Ca²⁺ similar a lo que ocurre durante la capacitación espermática (Cormier y Bailey, 2003).

Los procesos de refrigeración y/o congelación están asociadas con un daño en la función espermática ocasionando una disminución de la fertilización exitosa del ovocito (Bailey *et al.*, 2000). Durante los procesos de criopreservación se lleva a cabo un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Bilodeau *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2001), lo cual puede inducir cambios en la estructura y función de la membrana del espermatozoide. La función básica del GSH en semen de mamíferos es su interacción con otros sistemas como un mecanismo preventivo contra especies reactivas de oxígeno, esta función ayuda a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en células espermáticas, lo cual podría resultar en un daño en la movilidad, capacitación espermática e integridad genómica.

La membrana acrosomal tiene un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse durante los procesos de conservación como son la refrigeración, congelación y descongelamiento. Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción

acrosomal (con acrosoma intacto) de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con éste para formar un embrión (Januskauskas *et al.*, 2000). Fraser (1994) ya había demostrado en espermatozoides de ratón que sólo aquellos con acrosoma intacto pueden unirse a la membrana pelúcida. La integridad de la membrana plasmática y acrosomal mejoraron la viabilidad espermática; mientras el proceso de criopreservación podría afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004).

7. CONCLUSION Y RECOMENDACIÓN

Se concluye que la suplementación con 100 µl de GSH a una concentración 5 mM tiene un efecto benéfico en la disminución de la capacitación de los espermatozoides de conejo refrigerados a 5 °C durante 24 horas.

Logrando incrementar el porcentajes de espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto patrón A y disminuye el porcentaje de los espermatozoides capacitados con cromosoma intacto patrón B.

Se recomienda suplementar los medios de dilución con 100 µl de GSH a una concentración 5 mM, cuando se realice la refrigeración de semen de conejo a 5 °C durante 24 horas.

Así mismo realizar estudios a otras concentraciones de GSH y a distintos tiempos ya sea en refrigeración, congelación o vitrificación, con los cuales poder obtener más información.

Se recomienda realizar investigaciones sobre fertilidad en hembras inseminadas con semen refrigerado y suplementado con GSH.

8. LITERATURA CITADA

- Aitken, R., Clarkson, J. y Fshel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biología Reproducción*. 40:183-197
- Alvariño, M. R. 1993. Control de la reproducción en el conejo. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 137 p.
- Azzi, A., Breyer, I., Feher, M., Pastori, M., Ricciarelli, R., Spycher, S., Staffieri, M., Stocker, A., Zimmer, S. y Zingg, J. 2000. Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *Journal Nutrition*. 130:1649-1652.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F. y Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21:1-7.
- Bailey, J., Morrier, A. y Cormier, N. 2002. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *In: Amino Acids: Meat, Milk and More! Improving Animal Production with Reproductive Physiology*. Symposium. Canadian. Societi. Animal Sience., Quebec, Canada. pp: 87–95.
- Ball, B., Vo, A. y Baumber, J. 2001. Generation of reactive oxygen specie by equine spermatozoa. *Veteri Reproduction*. 62:508-515.
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Media, V. y Davies-Morel, M. C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal Andrology*. 21:895-902.

- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, y B. 2002. Generation of reactive oxygen specie by equine neutrophils and their effect on motility de equine spermatozoa. *Theriogenogy* 57:1025-1033
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C. y Sirad, M. A. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction Development*. 55: 282- 288.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany*. 91:179-194.
- Carr, A. C., Zhu, B. Z. y Frei, B. 2000. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha- tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*. 87:349-354.
- Câmara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nuñez, J. F. y Guerra, M. M. P. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76:342-350.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A. y Winttwer, F. G. 2002. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Veterinaria Mexico*. 33:265-283.
- Cormier, N. y Bailey, J. L. 2003. A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology Reproduction*. 69:177-185.

- Coy, P., García, A., Castejón, F., de la Cruz, L., Gonzalez, J., Murillo, M. y Salido, G. 1995, Reproducción en ovejas y cabras. Fisiología Veterinaria. Editorial Mc Graw-Hill – Interamericana, Madrid, pp 937-950.
- Dasgupta, S., Mills, C. L. y Fraser, L. R. 1993. Ca²⁺ related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99:135-143.
- Desmarchelier, C. y Ciccía, G. 1998. Antioxidantes de origen vegetal. *Ciencia Hoy*. 8(44):33-8.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. y Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reproduction*. 2:48-54.
- El-Sissy, G. A., El-Nattat, W. S. y El-Sheshtawy, R. I. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. *Online*. 11:55-61.
- Fahy, G., Macfarlane, D. Angell, C. Meryman, H. 1984. Vitrification as an approach to cryoconservation. *Cryobiology*. 21:407-426.
- FAM. 2014. Fuerza Aérea Mexicana. Estadística Meteorológica Mensual. Dirección de Servicio Meteorológico. Estación Loma Bonita, Oaxaca, México.
- Fouchécourt, S., Dacheux, F. y Dacheux, J. L. 1999. Glutathione-independent prostaglandin D₂ synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. *Biology Reproduction*. 60:558-566.

- Fraser, L. R. 1994. Functional changes ejaculatory sperm fertilization. Ares-Serono Symposia. 8:46-66.
- Gadea, J., Gumbao, D., Gómez-Giménez, B. y Gardón, J. C. 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. Sciencedirect. 13:24-33.
- Gadea, J., García-Vazquez, F. A., Matas, C., Gardón, J.C., Canovas, S. y Gumbao, D. 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. Journal Andrology. 26:396–404.
- Garde, K. 1993. The aspect of gender-once again. Journal of Animal Science. 155(49):4022-4023
- Gilbert, D. L. y Colton, C. A. 1999. flavonoids suppress the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide. reactiva oxygen species in biological systems: En Interdisciplinary Approach. Kluwer Academic. Plenum Publishers. Nueva York, EUA. pp 1096-1096.
- Gunzel, A. R. 1986. Semen collection, evaluation and preservation and artificial insemination in dog. Tierarztliche-Praxis. 14:275-282.
- Guyton, A. y Hall, J. 2000. Treaty of medical physiology. 10th edition McGraw-Hill Interamericana. Madrid Spain. 1280 p.
- Hafez, S. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª ed. Editorial Interamericana. Kiawah Islan, South Carolina, EUA, 542 p.

- Hernández, P. J. E, Fernandez, R. F., Rodríguez, S. J. L., Negrete, R. M., Soto, M. Y. G. y García, R. A. D. 2008. Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. Revista. Salud Animal. 34(3):188-191.
- Hicks J. J. 2001. Bioquímica. McGraw-Hill. México. 900 p.
- Hicks, J. J., Torres, R. Y. y Sierra, V. M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. Revista de Endocrinología y Nutrición. 14(4)223-226.
- Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 53:47-58.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2010. Censo de Población y Vivienda, 2010. Principales resultados por localidades (ITER). En:<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/estatal/oax/m044/index.htm>. Consultado: Abril del 2014
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L. y Rodríguez-Martínez, H. 2000. Assessment sperm after thawing characteristics and response to calcium ionophore regarding fertility in dairy Swedish. Theriogenology. 53:859-875.
- Killian, G. J., Chapman, D. A. y Rogowski, L. A. 1993. Fertility-associated proteins Holstein bull seminal plasma. Biología de la Reproducción. 49(6):1202-1207.
- Lee, S. H. y Ahuja, K. 1987. An investigation using lectins of glycocomponents of mouse spermatozoa during capacitation and sperm zona binding. Journal of Reproduction y Fertilidad. 80:65-74.

- Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W. y Liu, W. 2010. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal Andrology*. 31:437-444.
- Marco-Jiménez. F., Viudes-de-Castro M. P., Balasch, S., Mocé, E., Silvestre, M. A., Gomez, E. A. y Vicente, J. S. 2006. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*. 52:295-304.
- Martínez, E., Vazquez, J. M. y Roca, J. 1996. Fecundación in vitro en la especie porcina. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicada a la reproducción animal. Coordinación. Garde, L. B. J. y Gallego, M. L. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca. pp. 139-159.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S. y Mcphie, C. A. 1999. Normal fertility in ewes aftercervical insemination with frozen-thawedspermatozoa supplemented withseminal plasma. *Reproduction and Fertility Development*. 11:123-126.
- McCord, J. M. 2000. Evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine*. 108(8):652-659.
- McDonald, L. E. 1991. *Endocrinología*. 4ª edición. Editorial Interamericana McGraw Hill. 538p.
- McDonald, L. E. 1969. *Endocrinología veterinaria y Reproducción*. Editorial Interamericana Journal Medicine. Philadelphia. 460p.

- Mathur, A. K., Srivastava, R. S. y Rawat, P. S. 1993. Effect de larger volumes frozen on round and flat glass surfaces on cryosurvival of ram spermatozoa. *Indian Journal Animal Science*. 63:427-429.
- Olguin, C. G., Guiller, G. M., Zuñiga, R. R. A. y Pasquetti, P. A. 2004. Antioxidants and atherosclerosis. *Journal of Endocrinology and Nutrision* 12(4):199-206.
- Peña, A. y Linde-Forsberg, C. 2000. Effect of concentration and after dilution rate thaw sperm survival post-thaw sperm dog. *Theriogenology*. 54:703-718.
- Rall, W. y Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrificación. *Nature*. 313:573-575.
- Rogers, K. 2011. Reproduction and pregnancy, In; the reproductive system, 1st Edition. Britannica, Nueva York, pp 89.
- Salamon, S. y Maxwell, W. M. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62:77-111.
- SAS. 1998. SAS UsersGuiede. SAS institute, Cary, N.C.
- Sinha, M. P., Sinha, A. K., Singh, .K. y Prasad, P. L. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Theriogenology*. 41:237-243.
- Tamuli, M. y Watson, P. 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science*. 35:247-254.

- Tartaglione C. M. y Ritta, M. N. 2004. Prognostic value spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of semen frozen-thawed bull. *Theriogenology*. 62(7):1245-1252
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. y Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases. A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 7(1):65-74.
- Venereo, G. J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2):126-33.
- Vivianco, M. W. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. 26-27 de octubre. Chapingo, México. pp.41-48.
- Ward, C. R. y Storey, B. T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chortetracycline fluorescence assay. *Devel Biology*. 104:287-296.
- Watson, P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's Phvsiology of Reproduction*. 2: Reproduction in the male. Editorial Edimburgo. pp. 747-869.
- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Journal Animal Reproduction Science*. 60-61:481-492.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. In: Knobil, E. y Neil, J. D (eds). New York: Raven Press. pp.189-317.

Zaneveld, L. J., De Jonge, C. J., Anderson, R. A. y Mack, S. R., 1991. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction*. 6(9):1265-74.

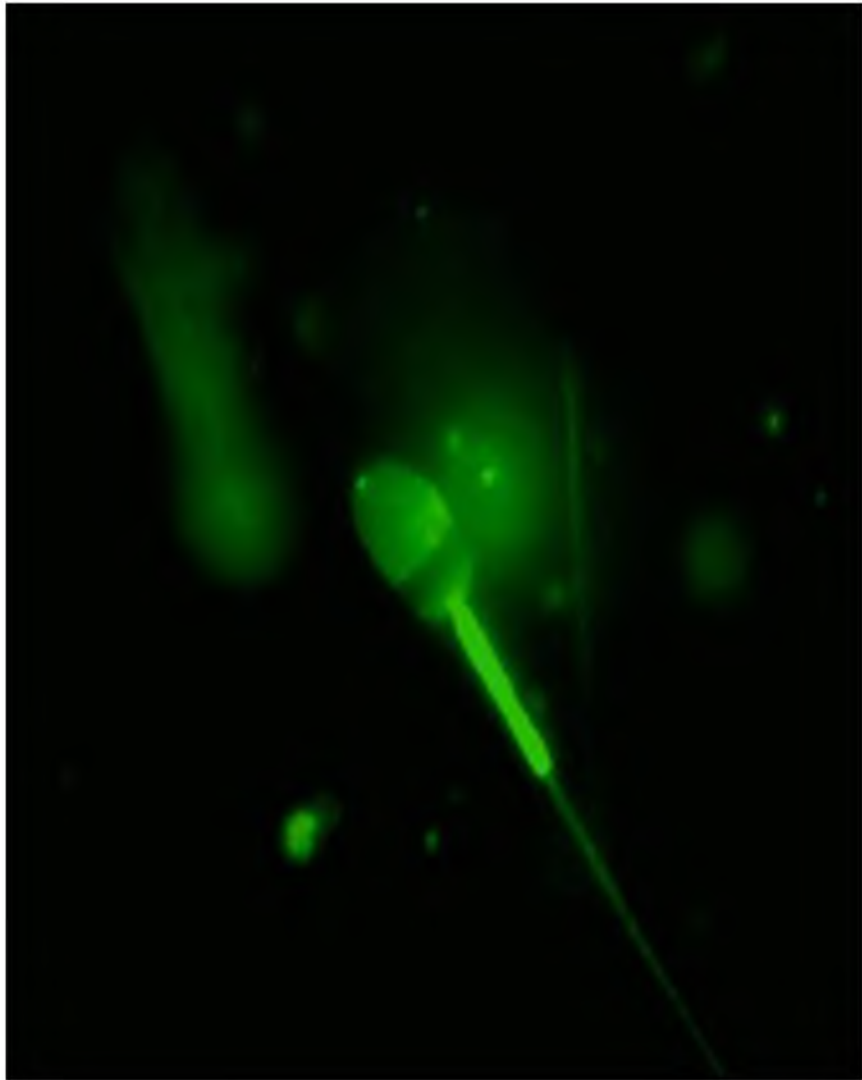
9. APÉNDICE



A. Vagina artificial de fabricación casera para la obtención del semen



B. Colecta del semen mediante vagina artificial



C. Espermatozoide capacitado