



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“ESTRÉS HIPEROSMÓTICO DURANTE LOS PROCESOS DE CONGELACIÓN
DE SEMEN PORCINO”**

MEMORIA TÉCNICA

Previa a la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR:

ROBERTO CARLOS JARA VERA

TRIBUNAL:

DIRECTOR: Ing. M.C. Edgar Washington Hernández Cevallos.

ASESOR: Ing. M.C. Guillermo Fernando Villa Samaniego.

Riobamba – Ecuador

2012

Esta memoria técnica fue aprobada por el siguiente Tribunal

Dr. M.C. Georgina Hipatia Moreno Andrade.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.C. Edgar Washington Hernández Cevallos.

DIRECTOR

Ing. M.C. Guillermo Fernando Villa Samaniego.

ASESOR

Riobamba, 16 de Abril del 2012.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios y a la Virgen Purísima de Macas por ser quienes guían mis pasos. Quiero extender un sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han prestado su apoyo y colaboración para este logro tan importante.

A la ESPOCH, Facultad de Ciencias Pecuarias y mi querida Escuela de Ingeniería Zootécnica por haberme acogido en sus aulas en donde compartí tantos momentos inolvidables. A mis profesores por su compromiso con la formación académica de calidad y a mis compañeros y amigos por estar siempre presentes incondicionalmente. En fin a todas las personas que de una u otra manera forman parte de este logro tan anhelado.

Nunca los olvidare...

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro profesional a las personas que estuvieron detrás de mí todos estos años brindándome su apoyo día a día. a mi padre Arturo por ser un ejemplo de trabajo y responsabilidad, a mi madre Teresa por ser la impulsora de cada uno de mis proyectos, a mi hermana Diana por estar siempre al lado mío y a mi hermano Adrián por permitirme ser parte de su formación. Así mismo a toda mi familia y amigos por nunca dejarme solo en este tiempo.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISION DE LITERATURA</u>	3
A. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE MEMBRANA Y ACROSOMA EN EL SEMEN DE VERRACO.	3
1. <u>Técnicas de tinción para determinar calidad de membrana</u>	3
a. Tinción vital con Tripán Azul.	3
b. Tinción vital con Eosina – Nigrosina.	3
2. <u>Análisis del estado del acrosóma</u>	4
a. Técnica de visualización del acrosoma	5
b. Técnicas de detección de la reacción acrosómica.	5
3. <u>Test de resistencia osmótica (ORT)</u>	6
4. <u>Prueba de hipo osmosis HOST</u>	9
5. <u>Test de termoresistencia TTR</u>	12
B. CONGELACIÓN DEL SEMEN PORCINO	12
1. <u>Ventajas de la utilización de semen congelado</u>	12
2. <u>Estrés osmótico</u>	16
3. <u>Estrés mecánico</u>	16
4. <u>Estrés térmico</u>	17
5. <u>Protocolo de congelamiento de semen porcino</u>	18
6. <u>Comportamiento espermatozoides post descongelamiento</u>	22
7. <u>Comportamiento intrauterino de zoospermos descongelados.</u>	23
C. SOLUCIONES HIPEROSMÓTICAS EMPLEADAS PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA OSMOTICA DE LA MEMBRANA ESPERMATICAS	24
D. EFECTOS DEL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO SOBRE LOS ZOOSPERMOS EN LA CONGELACION	27
1. <u>Estrés osmótico</u>	27

2. <u>Daño acrosomal.</u>	29
3. <u>Daño en la membrana espermática.</u>	29
III. <u>DISCUSIÓN</u>	30
A. EFICIENCIA DE LOS CRIOPROTECTORES EMPLEADOS PARA LA CONGELACION DE SEMEN PORCINO	30
1. <u>Test de Endosmosis</u>	30
B. PUNTOS DURANTE LOS PROCESOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN PORCINO	31
C. PROPUESTA BIOTECNOLÓGICA PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE SEMEN DE VERRACO	31
IV. <u>CONCLUSIONES</u>	33
V. <u>RECOMENDACIONES</u>	34
VI. <u>LITERATURA CITADA</u>	35
ANEXOS	1

RESUMEN

Aunque la congelación de espermatozoides de cerdo es una técnica con más de 20 años de experiencia, las técnicas actuales presentan solo un 30-40% de supervivencia tras la congelación. Por otra parte la fertilidad de los espermatozoides congelados es significativamente más baja que en el semen fresco y refrigerado. Existen métodos en el laboratorio destinados a evaluar daños espermáticos a nivel de membrana celular y acrosoma necesarios en diferentes protocolos de congelación empleados. Las suspensiones celulares, al enfriarse gradualmente por debajo del punto de congelación de la solución se congelan y empieza la formación de cristales de hielo en el exterior, aumentando la concentración de solutos en el medio extracelular. Es así que se forma un ambiente hipoosmótico produciendo la salida de agua del interior del espermatozoide, la cual está influenciada por la calidad espermática, velocidad de enfriamiento y el crioprotector utilizado. Para poder contrarrestar estos efectos como medidas biotecnológicas alternativas se recomienda el uso de mezcla de crioprotectores y velocidades de enfriamiento lenta en especial con consideraciones especiales cuando el semen se encuentre en temperaturas de 10 a 5 °C. Es así que (Camacho, D. 2000), en su investigación realizada concluye que el promedio de los espermatozoides reaccionaron positivos al test hipoosmótico HOST tras descongelación en los diferentes protocolos fue de $53,73 \pm 12,30\%$ considerándola aceptable.

ABSTRACT

HYPEROSMOTIC STRESS DURING THE FREEZING PROCESSES OF THE SWINE SEMEN

Although freezing of spermatozoids of pigs is a technique with more than 20 years of experience, the actual techniques present only a 30-40% survival after freezing. On the other hand, the fertility of the frozen spermatozoids is significantly lower than in the fresh and refrigerated semen. There are methods in the laboratory destined to evaluate the spermatic damage at the cell and acrosome membrane level necessary in different protocols of freezing used. The cell suspensions, upon freezing gradually below the freezing point of the solution freeze and the formation of ice crystals in the interior begins increasing the solute concentration in the extracellular environment. Thus a hypoosmotic environment is formed producing the water outlet from the interior of the spermatozoid, which is influenced by the spermatic quality, freezing speed and the used crioprotector. To counteract these effects as alternative measures the use of a mixture of crioprotectors and slow freezing speeds with special considerations is recommended taking care of the semen at 10 to 5 °C temperature. Thus Camacho, D. (2000) in this investigation concludes that the average of spermatozoids reacted positive at the hypoosmotic test HOST after freezing in the different protocols with 53.73 ± 12.30 % being considered acceptable

LISTA DE CUADROS

Nº	Pág.
1. SOLUCIÓN DE GLUTARALDEIDO.	5
2. SOLUCIONES FORMALDEHIDO.	5
3. CATEGORIA DE ORT EN BASE A LAS CARACTERISTICAS DE SEMEN PORCINO.	7
4. CLASIFICACION EN FUNCION AL GRADO DE REACCION DE LA COLA DEL ESPERMATOZOIDE.	11
5. FACTORES QUE AYUDAN A LA CRIOPRESERVACIÓN EXITOSA DE SEMEN.	15
6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SOLUCIÓN DE ENDÓSMOSIS.	27

LISTA DE GRÁFICOS

Nº	Pág.
1. Diferentes formas de endosmosis.	10
2. Grado de resistencia osmótica.	11

LISTA DE ANEXOS

Nº

1. Glosario tomado del manual Merck.

I. INTRODUCCIÓN

Aunque la congelación de espermatozoides de cerdo es una técnica con más de 20 años de experiencia, las técnicas actuales presentan solo un 30-40% de supervivencia tras la congelación (Almilid, T. et al., 1987). Por otra parte la fertilidad de los espermatozoides congelados es significativamente más baja que en el semen fresco y refrigerado. (Johnson, L. et al, 2000). Para mejorar estos resultados es necesario un mejor conocimiento de los mecanismos relacionados con la resistencia de los espermatozoides a la congelación. Las alteraciones inducidas durante la congelación están relacionadas con fuertes cambios de presión osmótica producidos durante el proceso.

Así, durante la congelación se forman en el interior de las células cristales de hielo. La formación de cristales intracelulares dependerá básicamente de la hiperosmolaridad inicial del medio externo, y de la velocidad del enfriamiento. Si ambas condiciones permiten la salida de agua intracelular de manera regular, los cristales intracelulares no serán lo suficientemente grandes como para provocar lesiones celulares graves (Mazúr, P. 1997). Así, la capacidad del espermatozoide de ajustarse a ambientes con incremento de presión osmótica mediante su deshidratación es un punto vital para la supervivencia a la congelación.

Las células eucariotas tienen diferentes mecanismos, además de la simple difusión, para reaccionar contra los cambios de osmolaridad del medio. Así, la actividad de las bombas iónicas más importantes es la ATP-asa dependiente de la Na^+/K^+ . Este podría ser un mecanismo involucrado en la adaptación osmótica de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación. Además, puesto que el enfriamiento induce cambios en el pH del medio, al ir alcanzando, los solutos salinos, de forma progresiva, su punto de solubilidad (Fishbein, J. Y Winkert, O. 1988), es posible que otras bombas, como el antiporter de Na^+/H^+ , puedan estar relacionados con la resistencia osmótica de los espermatozoides.

La baja tasa de supervivencia de los espermatozoides de cerdo después de la congelación y la descongelación podría estar relacionada con una falta de

capacidad de estas células para una correcta adaptación de los cambios osmóticos relacionados con estas técnicas. En relación con este punto, diversos autores han podido tipificar la resistencia de espermatozoides a cambios bruscos de osmolaridad en el medio a diferentes temperaturas, relacionando sus resultados con la capacidad de estas células de resistir a la congelación.

Sería de gran utilidad conocer el alcance de los daños celulares observados en espermatozoides de verraco sometidos, tanto a condiciones hiperosmóticas, como a un cambio brusco de presión osmótica del medio (estrés hiperosmótico). Este conocimiento permitirá entender mejor la extensión de las lesiones observadas en esta especie tras la congelación.

Sin embargo la resistencia osmótica de los espermatozoides es un parámetro que depende como mínimo de cuatro parámetros diferentes: 1), el tiempo de incubación; 2), la temperatura de incubación; 3), el tipo de soluto en la solución hipertónica; y 4), la concentración del soluto en la solución hiperosmótica (Gao, P. et al., 1995). Por lo tanto los estudios sobre el estrés hiperosmótico tienen que tener en cuenta todos estos parámetros, por lo que la presente memoria técnica estuvo encaminada a cumplir con los siguientes objetivos:

- Describir los mecanismos de estrés hiperosmótico experimentados por los espermatozoides durante los Procesos de Congelación de Semen Porcino.
- Identificar los puntos críticos del proceso de Congelación de Semen Porcino en los cuales es superior el estrés hiperosmótico de acuerdo a las diferentes investigaciones realizadas.
- Proponer mecanismos biotecnológicos que permitan obtener mayor eficiencia en el Proceso de Congelación de Semen Porcino.

II. REVISION DE LITERATURA

A. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE MEMBRANA Y ACROSOMA EN EL SEMEN DE VERRACO.

Dentro de los métodos utilizados en laboratorio para determinar la calidad de una muestra seminal se encuentran técnicas de tinción. La realización de estos procedimientos, permiten el estudio de la célula espermática tanto a nivel estructural como de vitalidad. Existen diversos medios de coloración unos, se emplean simplemente con el fin de destacar más claramente la morfología general de los espermatozoides (coloraciones totales), mientras otros permiten diferenciar entre espermatozoides vivos y muertos (coloraciones vitales).

1. Técnicas de tinción para determinar calidad de membrana

a. Tinción vital con Tripán Azul.

Para esta técnica se requiere del colorante Tripán azul 2 grs, en 100cc de diluyente. se diluye Tripán azul en el mismo medio de dilución que los espermatozoides.

- La muestra espermática se mezcla con un volumen igual de solución (Tripán azul), (v/v).
- Incubación de la dilución durante 15 minutos a 37°C.
- Extensión sobre un porta atemperado y se seca al aire.

Se observarán en microscopio de campo claro espermatozoides en blancos (sin teñir), correspondiendo a espermatozoides vivos y espermatozoides de color azulado (teñidos), clasificándolos como espermatozoides muertos.

b. Tinción vital con Eosina – Nigrosina.

Colorantes:

- Eosina 0,5 grs en 100cc de H₂O destilada.
- Nigrosina 10 grs en 10 cc de H₂O destilada.

Estas soluciones estarán en frascos separados, no mezclándose hasta el momento de su utilización.

Método:

- Sobre un vial se depositan cuatro gotas de eosina ocho gotas de nigrosina y dos gotas de semen.
- Se efectúa la extensión sobre un porta atemperado a 37^aC y se seca al aire.

Sobre fondo violáceo oscuro se observan en blanco, sin teñir los espermatozoides que estaban vivos en el momento de hacer la preparación y teñidos por la eosina en color rojo, los espermatozoides que estaban muertos. Esencialmente, una célula con la membrana plasmática funcional impide el paso del colorante, mientras que una célula con alteración en la membrana permite el paso del mismo.

2. Análisis del estado del acrosóma

El acrosoma es una estructura del espermatozoide situado en la parte anterior y que juega un papel crucial en la fecundación. Su análisis queda supeditado a laboratorios especializados que tengan microscopio de contraste de fases y personal más cualificado que realice e intérprete este tipo de análisis.

Material necesario:

- Viales de 2ml.
- Gradillas.
- Pipetas de 1 ml.
- Solución de glutaraldehído.
- Portaobjetos.

- Cubreobjetos.
- Contador celular.
- Microscopio de contraste de fases.

La composición del glutaraldehído se indica en el cuadro 1, en tanto que la composición del formaldehído se indica en el cuadro 2.

Cuadro 1. SOLUCIÓN DE GLUTARALDEIDO.

INGREDIENTE	CANTIDAD
Glucosa	2.9 gr
Citrato de sodio	1.0 gr
Bicarbonato de sodio	0.2gr
Agua destilada	100ml
Glutaldeido (25%de pureza)	8 ml

Fuente: Perez, F. (1991).

Cuadro 2. SOLUCIONES FORMALDEHIDO.

INGREDIENTE	CANTIDAD
Citrato sódico	2.9 gr
Formaldehido (40%)	4 ml
Agua destilada	100 ml

Fuente: Pérez, F. (1991).

a. Técnica de visualización del acrosoma

Se coloca en los viales aproximadamente 1 ml de solución de glutaraldeido o de formaldehído y se añade de 0.2 a 0.5 ml de semen dependiendo de la concentración del mismo (a mayor concentración de espermatozoides menor cantidad para añadir).

b. Técnicas de detección de la reacción acrosómica.

El análisis de los cambios ocurridos en el espermatozoide durante la reacción

acrosómica bajo condiciones “in vivo” o “in vitro”, requiere la utilización de diversos métodos de detección del estado acrosoma (Cummins, C. 1994). La determinación de este proceso exocitósico es complicado, ya que las características del acrosoma espermático varían en función de la especie en estudio, debiendo de adaptar cada técnica de análisis según la especie. Además, los espermatozoides muertos pueden sufrir cambios degenerativos en su acrosoma similares a los observados durante la reacción acrosómica, de ahí la importancia de determinar la presencia o ausencia del acrosoma en espermatozoides viables y/o no viables (muertos). La mayoría de los estudios realizados sobre el estado del acrosoma en espermatozoides se basan en la utilización de técnicas de microscopia electrónica y de fluorescencia, determinando la presencia, forma y/o tamaño del acrosoma. La microscopia óptica y de contraste de fases, si bien revelan información útil sobre éste liposoma modificado, se muestran como técnicas poco precisas en un estudio detallado del estatus acrosomal. Sin embargo, la microscopia electrónica y de fluorescencia requiere equipos costosos y un entrenamiento del personal técnico (Cummins, C. 1994), por lo que su uso generalmente, se restringe a determinados estudios y no como metodología de rutina.

La utilización de la microscopia de fluorescencia suele ir asociada a la utilización de lecitinas vegetales (Cummins, C. 1994), o anticuerpos, unidos normalmente a marcadores fluorescentes (ej. fluoresceína, isotiocianato fluorescente). Tanto las lecitinas como los anticuerpos se pueden dirigir contra el contenido acrosómico o contra la membrana del acrosoma. Las lecitinas determinan la presencia y distribución de determinados azúcares en la membrana plasmática (Rivera, R. 1997).

3. Test de resistencia osmótica (ORT)

La frecuencia de espermatozoides criopreservados con membrana plasmáticas intactas pueden ser fácilmente determinados con test muy sencillos y prácticos como el de resistencia a cambios osmóticos, que se basa en la reacción de la membrana de los espermatozoides cuando se exponen a soluciones salinas hipo osmóticas. (Camacho, D. 2000).

Esta prueba se basa en la integridad de la membrana del acrosoma sometida a un choque osmótico, la cual permite hacer la predicción del comportamiento de estos espermatozoides en proceso de conservación a los que se va a someter asumiendo que las técnicas y medio utilizados son los correctos.

Este tés permite hacer una valorización de la resistencia de la membrana del espermatozoide atreves de una prueba de resistencia frente a la temperatura durante el periodo prolongado de incubación frente a un choque osmótico con lo que queda de manifiesto la integridad de espermatozoides.

Esta prueba tiene una valorización muy alta en un laboratorio de inseminación artificial puesto a que se ha demostrado que tiene corrección con Capacidad de conservación. Resultado de fertilidad y prolificidad (Schillin, M. et al., 1986). Formación de grupos para el uso de semen heterospórico, en el cuadro 3, se indica la categoría de ORT.

Cuadro 3. CATEGORIA DE ORT EN BASE A LAS CARACTERISTICAS DE SEMEN PORCINO.

CLASE	% AN	% FERTILIDAD	CARACTERISTICAS DEL SEMEN
1	80-82	81.3	Congelable
2	69-79		Conservable en diluyente
3	58-68	70	Para uso en fresco
4	47-57		Mediana calidad (Desechar)
5	36-46	40	Mala calidad (Desechar)

Fuente: Camacho, D. (2000).

La categoría 1 corresponde a los grupos 4 y 5 la categoría 2 corresponde al grupo 3 y la categoría 3 a los grupos 1 y 2 de la clasificación (Schilling, M. 1986). De esta preparación se sitúa una gota pequeña sobre el porta objetos y se lo

cubre con el cubre objetos se deja reposar unos segundos para que se fije y se lo visualice el estado del cromosoma a partir de 1.000 aumentos en el microscopio de contraste de fase.

Los distintos estados de cromosomas son los siguientes:

- Acrosomas normales.
- Acrosomas dañado.
- Acrosomas perdiendo.
- Acrosomas perdido.

Materiales necesarios:

- Tubo de ensayo.
- Viales de 2 ml.
- Gradilla.
- Pipeta de 1 ml.
- Diluyente isosmotico (MR-A).
- Diluyente Hipotónico a 50ml de diluyente.
- Solución de glutealdeido o formaldehido.
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Contador celular.
- Microscopio de contraste de fases.

Metodología:

- Antes de recoger el semen colocar 3ml de diluyente isosmotico en un tubo de ensayo y en otro 3ml de diluyente hiposmótico a 37 C.
- Se añade 0.2 ml de la fracción espermática de eyaculado en cada tubo de los diluyentes preparados anteriormente y se mantienen en baño de maría a 37 C.
- A los 15 minutos de incubación se toma una muestra de la dilución con el

diluyente isosmótico se fija con la solución de glutaraldeído o formaldeído y se acumula en los porcentajes de los cromosomas normales (a).

- A las 2 horas de incubación se toma una muestra de dilución con diluyente hipoosmótico se fija con la solución glutaraldeído o formaldeído y se calcula el porcentaje de cromosomas normales (B).

El cálculo de valor O.R.T se realiza con la medida de los dos contajes:

$$\text{O.R.T} = \frac{\% \text{ de Acrosomas A} + \% \text{ Acrosomas B}}{2}$$

El objetivo del presente trabajo ha sido comparar las pruebas de Resistencia Osmótica (ORT), y de Endósmosis (HOST), para establecer su equivalencia en la determinación de la funcionalidad de la membrana de espermatozoides de verraco. Para tal fin se trabajó con semen fresco y congelado de dos machos adultos en rutina de extracción. Las pruebas de valoración de las muestras incluyeron porcentaje de espermatozoides vivos, motilidad progresiva individual, integridad acrosomal, ORT y HOST. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico que no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), entre el HOST y el ORT, tanto para el semen fresco como congelado, indicando que el HOST sería más adecuado dada su sencillez, rapidez y costo.

4. Prueba de hipo osmosis HOST

Es una prueba para la evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, asociada a su capacidad de penetración en el ovulo. Este ensayo permite medir la habilidad de la membrana del espermatozoide para transportar fluidos y constituye una herramienta adicional al análisis de semen (Muños, P. et al., 2005).

Este test mide la integridad funcional de la membrana espermática basado, en la incubación del espermatozoide en un medio hipoosmótico, si la membrana está intacta el agua entrara en la célula para alcanzar el equilibrio osmótico. El influjo de agua causa un hinchamiento del espermatozoide y proporciona a la membrana

plasmática la suficiente elasticidad como para acomodarse a este influjo, habrá un repentino incremento del volumen celular, manifestándose en un enrollamiento del flagelo como se puede observar en la gráfico 1, (Camacho, D. 2000).

La capacidad de enroscamiento de la cola del espermatozoide es un seguro de que el transporte a través de la membrana es normal siendo un indicador tanto de la integridad como de la funcionalidad de la membrana (Camacho, D. 2000).

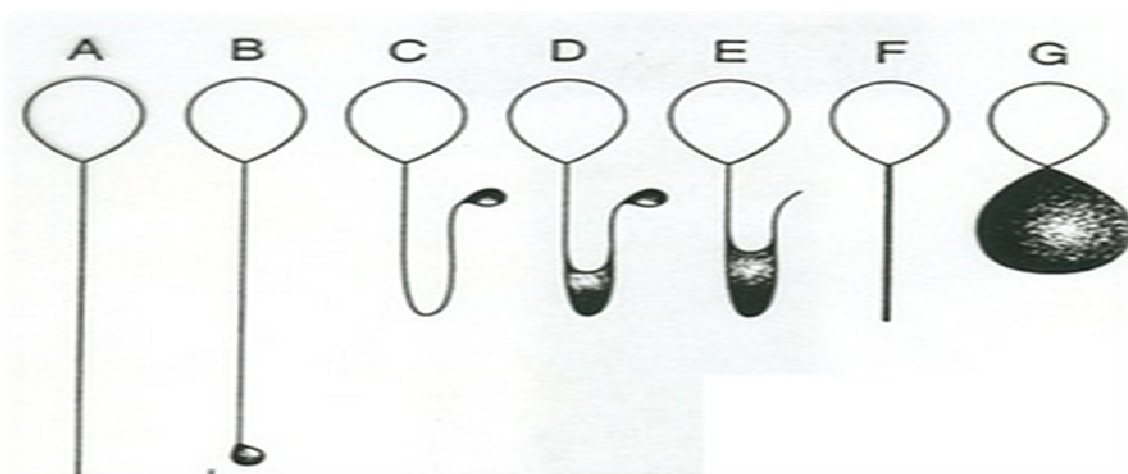


Grafico 1. Diferentes formas de endosmosis.

Prueba de endosmosis: representación esquemática de los cambios morfológicos en los zoospermos de verracos tras someterlo a estrés hipoosmotico. A), Endosmosis negativa, B-G), distintos cambios morfológicos en la cola del flagelo que se corresponden en una endosmosis positiva.

Las muestras son evaluadas bajo microscopio de contraste con el lente de mayor aumento, clasificándose los espermatozoides en función del grado de reacción de la cola, en el cuadro 4, se muestra una clasificación en función al grado de reacción de la cola del espermatozoide, en tanto que en la gráfico 2, se muestra el grado de resistencia osmótica del espermatozoide (Camacho, D. 2000).

Cuadro 4. CLASIFICACION EN FUNCION AL GRADO DE REACCION DE LA COLA DEL ESPERMATOZOIDE.

REACCION 1	Espermatozoides sin reacción o negativos
REACCION 2	Espermatozoides con reacción en la posición final de la cola
REACCION 3	Espermatozoides con colas en forma de látigo
REACCION 4	Espermatozoides con colas en forma de ovillo

Fuente: Camacho, D. (2000).

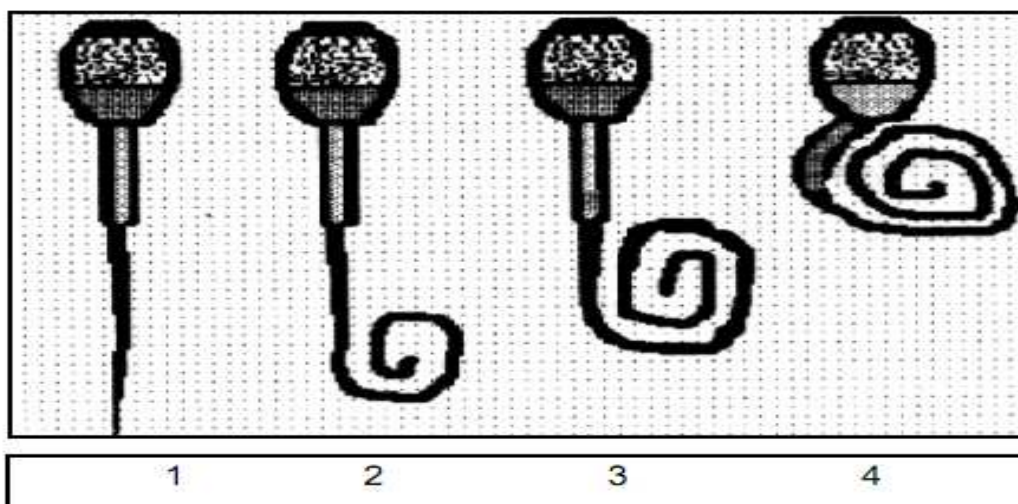


Gráfico 2. Grado de resistencia osmótica.

En condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipoosmótica es un indicador más preciso que las condiciones supra vitales.

Se realiza a través de la mezcla de 100 ml de semen fresco con 1 ml, de solución hipoosmótica. Se incuba a 37°C, por 30 minutos en una solución hipoosmótica. Se realizan frotis en láminas de microscopía, permitiendo que se saquen al ambiente siempre protegidos de la luz. Luego son fijados por 30 segundos al metanol, manteniéndose a 20°C y se dejan secar nuevamente. Se realizan observaciones seriadas (30 minutos una y dos horas), se fijan la muestra determinándose el

porcentaje de espermatozoides vivos los cuales reaccionan al shock osmótico enrollándose la cola, a mayor porcentaje de estos, mayor será la calidad de la muestra.

Se consideran valores normales de un 62% de espermatozoides hinchados, valores inferiores al 60% se consideran patológicos (Camacho, D. 2000).

5. Test de termoresistencia TTR

Consiste en subir y bajar la temperatura del semen e ir haciendo evaluaciones ha medido que pasa el tiempo. Después de cierto tiempo se examina al microscopio observando el porcentaje de motilidad progresiva. Obteniendo así la estimación de la viabilidad, fertilidad y capacidad de almacenamiento. (Camacho, D. 2000).

B. CONGELACIÓN DEL SEMEN PORCINO.

La congelación del esperma de verraco debe considerarse hoy día como un método en estudio, ya que quedan por resolver muchos aspectos en lo que se refiere a la obtención de un porcentaje adecuado de formas zoospermas vivas y fecundantes después de la congelación.

1. Ventajas de la utilización de semen congelado

Echegaray, J. (2003) menciona que la utilización de semen congelado en el sistema de inseminación puede ofrecer unas ventajas adicionales.

- Permite el intercambio de material genético de última generación a larga distancia y durante un periodo muy largo (años), delimitando con precisión el efecto del semen congelado en cuanto al número de lechones nacidos (método de evaluación BLUP-Best linear Unbiased Predictor). Este periodo de tiempo puede ser crucial para efectuar un control sanitario o genético del semen del verraco antes de su uso. Eso es posible hoy con el diagnóstico de enfermedades infecciosas basado en el estudio de la presencia de ADN del agente infeccioso mediante técnicas de PCR (Reacción de polimerasa en

cadena), y el desarrollo de marcadores genéticos asociados a la producción es un proceso creciente.

- Creación de bancos genéticos. De interés evidente en el caso de la conservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o extirpes de especial interés.
- Estos bancos de genes también pueden ser importantes a nivel comercial por ejemplo para asegurar la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (epizootía, incapacidad para recogida, infertilidad/subfertilidad por altas temperaturas, etc.).
- A nivel práctico permite el introducir material genético de alto valor sin los riesgos derivados de la introducción de nuevos animales en la explotación. Especialmente aplicable a la líneas puras (abuelas).
- Poder tener en Colombia material proveniente de países libres de fiebre aftosa sin vacunación, enfermedad vesicular del cerdo, enfermedad de Teschen, estomatitis vesicular y peste porcina clásica.
- Los centros de inseminación artificial donde se produce el semen congelado están debidamente autorizados y cumplen con las normas sanitarias recomendadas y actualizadas por la O.I.E. para la exportación.
- Los centros tienen que ser libres de la enfermedad de Aujeszky y no usan vacuna para esta enfermedad.
- Los animales residentes en los centros de producción del semen congelado son sometidos a inspección permanente de salud por los médicos veterinarios y estos certifican que no se haya presentado sintomatología clínica de enfermedades contagiosas durante un periodo de doce meses anteriores a las primeras colecciones.
- Todos los genitores deben dar resultado negativo a las pruebas diagnósticas de acuerdo con los estándares del país de orígenes efectuados con una periodicidad de al menos cada doce meses en: Leptospirosis, Brucelosis,

gastroenteritis transmisible, PRRS, tuberculosis y encefalitis por enterovirus.

- Las diluciones del semen se debe realizar con diluyentes estériles a los cuales se les ha agregado antibióticos en cantidades adecuadas de acuerdo a los estándares internacionales de la O.I.E. No se debe utilizar proteína de rumiantes y el producto deberá ser exento de gérmenes patógenos o ser esterilizado.
- Finalmente se demuestra que no existe ninguna diferencia de importancia en cuanto a la fertilidad luego de la utilización de semen fresco o congelado cuando se practican dos inseminaciones sucesivas. Por el contrario, esta disminuye cuando solo se procede a una inseminación con semen congelado. La segunda inseminación es necesaria, en especial en el caso de las cerdas viejas para cubrir de la mejor manera el momento de la ovulación. Los resultados menos buenos registrados durante una inseminación simple se puede explicar en parte por una intervención demasiado tardía (o por el hecho de que algunos animales presenten un celo más corto), por el contrario, las cerdas fecundadas, inseminadas con una o dos dosis, dieron nacimiento al mismo número de lechones (CIAP. 2006). Resulta entonces probable que los espermatozoides congelados tengan una supervivencia más reducida (9 horas vs. 18 horas frescos), y que por consiguiente, el plazo entre la inseminación y la ovulación sea más corto que cuando se utiliza semen fresco. El proceso de congelamiento y descongelamiento dañan en parte la membrana y los componentes celulares, perturbando así el metabolismo, y de este modo, la duración de la capacidad fecundadora de los espermatozoides. Si el momento de la ovulación es bien confirmado, se puede reducir el número de espermatozoides que se utilicen.

Echegaray, J. (2003), afirma que para congelar semen de verraco es absolutamente necesario realizar una selección previa de los animales que se van a utilizar: 1. Selección de los verracos por buena calidad seminal (motilidad superior al 80%, calidad de movimiento 4, 80% acrosomas normales). 2. Selección de los verracos por buena congelabilidad. Sólo el 20-30% de los verracos pueden ser donantes de semen para congelación con resultados

satisfactorios, considerándose como un mínimo exigible, que las dosis descongeladas de los mismos presenten, al menos un 35% de motilidad individual, en el cuadro 5, se indican los factores que ayudan a la criopreservación exitosa de semen.

Cuadro 5. FACTORES QUE AYUDAN A LA CRIOPRESERVACIÓN EXITOSA DE SEMEN.

Factor importante en crio preservación	Substancias o condiciones usualmente utilizadas
Procesamiento de semen	Inmediatamente después de la recolección
Macromoléculas para proteger al esperma contra el shock-frio de la precongelación	Yema de huevo buferizadaLeche caliente
Tasa de enfriamiento y tiempo de precongelación	Enfriar en 1-2 hrs El tiempo de precongelación varia con el diluyente y la especie
Crioprotector especial	Usualmente glicerol
Tasa de congelación	Varia: de + 5 °C a - 100 °C en 10 minutos
Temperatura de almacenamiento	-196 °C en nitrógeno liquido
Tasa o temperatura de descongelamiento	Usualmente se descongela de 30-37 °C

Fuente: Banch, E. (1997).

El proceso de congelación de los espermatozoides consta de varios pasos (descenso de temperatura hasta 5°C, adición del crioprotector y envasado en pajuelas, congelación, almacenamiento y descongelación e inseminación o dilución), que producen en la célula espermática cambios de volumen y cambios de temperatura que alteran las propiedades físico-químicas de su membrana plasmática (Banch, E. 1997). Los daños que sufren las células espermáticas cuando son sometidas al proceso de congelación son debidos a:

- Estrés osmótico: adición/eliminación del crioprotector y congelación del agua extracelular.
- Estrés mecánico: formación de hielo intra/extracelular.
- Estrés térmico: descenso de temperatura hasta 5°C.

A continuación, se exponen detalladamente los daños inducidos en los espermatozoides durante el proceso de crioconservación:

2. Estrés osmótico

Durante el proceso de congelación las células sufren cambios de volumen durante la adición y eliminación de los crioprotectores permeables, así como durante la congelación y descongelación del agua extracelular. Los crioprotectores permeables son capaces de atravesar la membrana plasmática, pero su paso es más lento que el del agua, debido a su peso molecular. Esta respuesta osmótica puede ser potencialmente letal si la célula alcanza sus límites de tolerancia osmótica.

Durante la adición del crioprotector las células disminuyen de tamaño transitoriamente al perder el agua intracelular debido al ambiente hiperosmótico que se crea. Poco a poco, las células recuperan su tamaño original al equilibrarse las condiciones osmóticas dentro y fuera de la célula. Este proceso se revierte cuando el crioprotector es diluido (cuando se realiza la inseminación artificial). Además, las células son sometidas a condiciones de estrés osmótico durante la congelación y descongelación del agua extracelular, tal y como se explica posteriormente. En comparación con los espermatozoides de otros mamíferos, los espermatozoides de verraco son muy sensibles a los cambios osmóticos. Sólo toleran cambios de volumen de 1,02 a 0,97 veces su volumen inicial, manteniendo un 70% de su motilidad (Gilmore, J. et al., 1998).

3. Estrés mecánico

Cuando los espermatozoides son enfriados por debajo del punto de congelación de la solución en la que se encuentran comienzan a formarse cristales de hielo en

el medio extracelular. Debido al diferencial de la presión osmótica, el agua intracelular comienza a salir de la célula y a congelarse. Este fenómeno está influenciado por la permeabilidad de la membrana plasmática la concentración de crioprotector y, sobre todo, por la velocidad de congelación y descongelación (que deben estar en concordancia), (Banch, E. 1997).

- Con una velocidad de congelación demasiado lenta el espermatozoide pierde toda el agua intracelular, de manera que no se forman cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, los espermatozoides son sometidos a condiciones hiperosmóticas.

Durante mucho tiempo, por lo que se dañan.- Con una velocidad de congelación demasiado rápida el agua intracelular no llega a salir del espermatozoide y se forma hielo intracelular (Johnson, L. et al., 2000).

4. Estrés térmico

Durante el enfriamiento hasta 5°C la membrana plasmática sufre una reorganización de sus componentes (Hammerstedt, R. et al., 1990). La membrana consta de un bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. Cada una de las especies de fosfolípidos presenta una temperatura de transición de fase diferente. Cuando la membrana es sometida a un descenso de temperatura, se produce un cambio de fase de los fosfolípidos de fase líquida-cristalina a fase de gel y las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y paralelas. Se forman dominios de gel a medida que las diferentes familias de fosfolípidos llegan a su temperatura de transición de fase (mientras los fosfolípidos de otras familias siguen en fase líquida), de manera que se rompen las asociaciones normales de los fosfolípidos (entre ellos y con las proteínas de membrana), y el resultado final es una agrupación de lípidos por familias, una redistribución de las proteínas, y una mayor rigidez de membrana (Johnson, L. 2000). Cuando la membrana es devuelta a la temperatura inicial, los fosfolípidos vuelven al estado líquido, pero ni éstos ni las proteínas vuelven a su localización inicial, produciendo una alteración en la función de la membrana plasmática. Así, se observa un incremento de la

permeabilidad a cationes y agua, interferencias en los procesos de difusión en los que se encuentran implicadas las proteínas integrales, actividad reducida de los enzimas asociadas a la membrana, etc.

La cantidad de colesterol presente en la membrana influye en el comportamiento termotrópico de la misma y sus componentes (Johnson, L. et al., 2000), ya que el colesterol interactúa con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Watson, P. 1990), inhibiendo la cristalización de los hidrocarburos a bajas temperaturas. Con altos niveles de colesterol en membrana se reduce o incluso se elimina la transición de fase de los fosfolípidos (Pursel, V. y Johnson, L. 1975).

Purdy, L. et al. (2000), observó en espermatozoides de humano que la fluidez de membrana antes de la crioconservación está relacionada con la supervivencia a la congelación. El colesterol modula la fluidez de membrana: por encima de las temperaturas de transición de los lípidos que componen la membrana, el colesterol disminuye la fluidez de membrana, mientras que cuando la temperatura desciende por debajo de las temperaturas de transición el colesterol ejerce el efecto contrario.

5. Protocolo de congelamiento de semen porcino

Teóricamente la congelación, de acuerdo con los conocimientos clásicos, significaba la muerte de la materia viva y, en este caso, de los zoospermos. La vitrificación o formación de cristales, era tanto como la desnaturalización de la materia orgánica que, por lo mismo, dejaría de ser viva después de la congelación. Un protocolo de congelación es una técnica utilizada que busca preservar la materia espermática contenida en el semen, que nos ayudara a reducir al mínimo posible la muerte de zoospermos e involucra tanto al congelado con al descongelado de semen (Perez, F. 1969).

Existen diferentes protocolos de congelación de semen porcino en los que se consideró:

La congelación del esperma, puesto en práctica por Polge, R. y Rowson, H.

(1952), en Inglaterra, con particular éxito como método de conservación del material seminal en el toro y, teniendo en cuenta los excelentes resultados conseguidos a tal efecto, fue difundido y probado en otras especies animales concretamente, en el verraco. Si bien hay que tener en cuenta que, por razones inherentes a la composición natural del eyaculado, la congelación del esperma es un método de mayor posibilidad cuando se trabaja con eyaculado muy concentrado (de escaso volumen, gran actividad espermiocinética y escaso contenido de electrólitos), circunstancias que se reúnen en el eyaculado procedente de rumiantes y aves, mientras que los resultados son bien diferentes cuando se trata del esperma procedente de sementales de eyaculación uterina (équidos, suidos y cánidos). Polge, ha experimentado la congelación del esperma suino, llegando a demostrar, en primer término, que temperaturas de -79°C resultan mortales para el eyaculado puro, mientras que la adición de glicerina significaba una clara protección de los zoospermos frente al efecto nocivo de las bajas temperaturas.

Polge, R. y Rowson, H. (1952), comprobaron que la congelación del eyaculado porcino llevada a cabo con la misma técnica aplicada al esperma de toro, daba como resultado la muerte de gran número de zoospermos en el curso de la congelación, alcanzando a casi la totalidad de los supervivientes en el momento de la descongelación.

Así mismo los autores recomiendan para el verraco el siguiente método de congelación espermática: en primer lugar se diluye a partes iguales con una solución de glucosa al 20% que, por lo general, lleva un 25% de yema de huevo. A continuación se comienza a refrigerar la mezcla resultante hasta llegar a la temperatura de 15°C - 10°C ; luego, se vuelve a diluir con solución de glicerina, de modo que la concentración total de la misma quede establecida en un 8-10%. Es preciso cuidar que tanto las soluciones como el eyaculado antes de la mezcla se encuentren a la misma temperatura. La solución glicerina debe añadirse muy lentamente para evitar cambios de presión osmótica que pudieran ser perjudiciales para los zoospermos.

A continuación, se deja en reposo la mezcla y, 2-3 horas después, se hace el

envase en viales de vidrio para proceder a la congelación. La técnica a tal efecto es la misma que se sigue para la congelación del esperma de toro. En todo caso, los resultados no pueden considerarse como ideales, ya que por lo general no se obtiene la reanimación más que de un 25% de zoospermos tras la descongelación.

En cuanto a la conservación a largo plazo del material congelado, se ha podido comprobar que el mayor inconveniente radica en la glicerina, puesto que concentraciones inferiores al 5% no protegen debidamente frente al choque térmico y, en general, a los efectos nocivos que las bajas temperaturas acarrearán sobre los espermatozoides y, por el contrario, concentraciones superiores de glicerina son tóxicas para los espermatozoides.

El protocolo de congelamiento de semen porcino por Pursel V. y Johnson, L. (1975), indica que las muestras se mantuvieron 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente fueron centrifugadas y el sobrenadante fue eliminado. Los espermatozoides fueron diluidos con medio BF5 sin glicerol y enfriados lentamente hasta 5 ° C. La fracción glicerolada del diluyente se agregó entonces para ajustar la concentración final de glicerol (1 p.100), y la concentración espermática (120 X 10⁶/ml). Para hacer los pellets se colocaron pequeñas gotas de semen diluido (0.1-0.2ml), en pequeñas cavidades excavadas en la superficie de un bloque de CO₂. El semen permaneció en CO₂ por 3-4 minutos, posteriormente fue depositado en tubos de plástico y fue almacenado en nitrógeno líquido. El descongelado de los pellets se hizo mezclando estos con Beltsville Thawing Solution (BTS), a 41°C durante 2-3 minutos. El semen descongelado fue filtrado en columnas de sephadex y los espermatozoides fueron retenidos en filtros Millipore de tal manera que el medio BTS fue separado de ellos. Los espermatozoides fueron recobrados lavando los filtros con medio de Tyrode (con bicarbonato de sodio), posteriormente fueron incubados por una hora a 39°C en 5 p.100 C O₂. Los marcadores fluorescentes SYBR14 (100 nM), y yoduro de propidio (12 µM), (Molecular Probes, Oregon), fueron empleados como indicadores de la integridad de la membrana. El número de células positivas a SYBR14 y a yoduro de propidio (PI), se estimó de cintas grabadas del microscopio con luz fluorescente.

Fuentes, H. et al., (2003), describen un proceso de congelación y descongelación del semen que se ha adoptado a una tecnología que presenta pocas modificaciones, por lo que, aseguran que la base de los protocolos actuales de congelación siguen siendo las siguientes:

- Para Congelación: 1.- Recolección de semen, tomando la fracción rica del eyaculado y mezclando con diluyente a 32° C. 2.- Se calcula la concentración seminal, y a partir de esta cifra, las dosis que se pueden obtener el eyaculado y cantidad de diluyente de congelación a emplear. 3.- Equilibrio previo a la centrifugación (23° C y 15° C). 4.- Centrifugación a 800 g por 10 minutos en centrifuga refrigerada a 15° C. 5.- Resuspensión y eliminación de plasma seminal. 6.- Adición de diluyente a 15° C para evitar shock térmico. 7.-Equilibrio térmico a 5° C (3 horas). 8.- Adición de diluyente con 3% de glicerol. 9.- Envasado. 10.- Congelación. 11.- Almacenamiento en nitrógeno líquido a - 196° C.
- Para Descongelación: Además de la descongelación, es necesario restituir el volumen de las dosis antes de la inseminación, para lo cual se utiliza un diluyente capaz de proteger las células espermáticas de daños durante la descongelación y proveer de sustancias que aumenten la supervivencia, viabilidad y poder fecundante (Fuentes, H. 2003). Diversas investigaciones se han orientado a la evaluación de diferentes tipos de diluyentes destinados a mejorar la conservación del semen. Con el objeto de determinar la concentración óptima de espermatozoides y glicerol para la congelación de semen de cerdo, utilizó diferentes concentraciones de glicerol (2%, 5% y 7%), y diferentes concentraciones espermáticas (200, 400 y 600 x 10⁶ espermatozoides/cc), la evaluación de motilidad espermática se efectuó también a varias temperaturas (-26 °C, -80°C, -170° C y 196°C). Los resultados reflejaron que independientemente de la temperatura de evaluación del semen, la motilidad espermática aumenta a medida que se incrementa el nivel de concentración y la tasa de glicerol. En consecuencia, se sugiere utilizar 5 a 7 % de glicerol y 600 x 10⁶ espermatozoides/cc, cuando se intente congelar semen de cerdo en nitrógeno líquido.

Finalmente Gadea, J. et al., (2005), menciona que en el proceso de congelamiento utilizado, el semen fue enfriado lentamente hasta 16°C durante 2 horas y, posteriormente, centrifugado a 800 g durante 10 minutos a 16°C. Se eliminó el plasma seminal y el pellet fue resuspendido con diluyente LEY atemperado a 16°C hasta una concentración de 225 x 10 espermatozoides/ml, Después de una segunda fase de enfriamiento lento hasta 5°C durante 2 horas, los espermatozoides fueron diluidos con medio LEYGO atemperado a 5°C (2:1; vol/vol), hasta llegar a una concentración final de 150 x 10 espermatozoides/mL y 3% glicerol, con una fase de equilibrado de 15 minutos antes de ser envasado en pajuelas de 0,5 ml, Tras sellar las pajuelas éstas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido, suspendiendo las pajuelas a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 20 minutos, siendo posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en baño de agua a 39°C durante 30 segundos.

6. Comportamiento espermatozoides post descongelamiento

Mazúr, P. (1997), menciona que para el descongelamiento de semen porcino se aconseja en un baño maría a 50°C por 13 segundos con el propósito de dar a la muestra una temperatura de 20-25°C. Después del proceso de descongelación, las muestras se prepararon para las evaluaciones de movilidad individual y de integridad de membrana como se describe a continuación. Así mismo para evaluar la movilidad individual pre y pos congelación se realizaron al microscopio de luz (40X), dotado de platina térmica a 39°C, en una gota de semen de aproximadamente 3mm de diámetro colocada en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos, ambos precalentados a 39°C; la calidad de movimiento se calificó en forma subjetiva por un mismo evaluador en un mínimo de cinco campos, como el porcentaje de espermatozoides que mostraron un patrón de movilidad vigorosa. Para observar los cambios de movilidad a través del tiempo, la movilidad individual se midió de nuevo 30 minutos después de la descongelación del semen incubado a 36°C. La evaluación poscongelación se realizó después de una semana de permanencia del semen dentro del contenedor a -196°C.

Camacho, D. (2000), en su investigación realizada concluye que el promedio de los espermatozoides porcinos frescos que reaccionaron positivos al HOST fue de 57.74%. Este porcentaje se tuvo como referencia para comparar el daño de membrana sufrido por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación. Después de la descongelación del semen el promedio y la desviación estándar de los espermatozoides que reaccionaron positivos al test hipoosmótico en los diferentes tratamientos fue de $53,73 \pm 12,30\%$.

7. Comportamiento intrauterino de zoospermos descongelados.

En base a la investigación de Buranaamnuay, K. (2010), quien realizó un estudio para evaluar la tasa de no retorno (NR), el índice de partos (IP), y el número de lechones nacidos totales (NT), tras la inseminación intrauterina (IIU), con un bajo número de espermatozoides descongelados. Durante el estudio se utilizaron dosis de semen criopreservado individualmente en un mismo vial de 0,5 ml a una concentración de 1×10^9 espermatozoides/ml procedente de 6 verracos y 40 cerdas multíparas con un intervalo destete-estro de 3 a 7 días. Las cerdas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos: ovulación espontánea (grupo 1; $n=20$), u ovulación inducida mediante inyección con 750 IU de hCG vía intramuscular inmediatamente en la detección de celo (grupo 2; $n=20$). En el grupo 1 las cerdas fueron inseminadas a las 24 h después de la detección del celo y se repitió cada 12 h hasta la ovulación mientras que las cerdas del grupo 2 fueron inseminadas a las 36, 42 y/o 48 h después del tratamiento con hCG.

El intervalo inmovilidad-ovulación fue significativamente diferente entre grupos (40,2 h y 35,6 h para los grupos 1 y 2, respectivamente), siendo la variación entre cerdas para este intervalo menor en el grupo 2 que en el grupo 1. El número de IIU por cerda fue de $2,9 \pm 0,6$ veces en el grupo 1 y de $2,4 \pm 0,5$ veces en el grupo 2. No hubo diferencias significativas para la NR (80 vs 85%), IP (60 vs 65%), y NT ($8,0 \pm 2,8$ vs $9,4 \pm 3,7$ lechones/camada).

Estos resultados indican que las dosis múltiples de IIU con un número bajo de espermatozoides congelados-descongelados proporcionan una tasa de no retorno bastante buena y unos índices de partos y nacidos totales razonables tanto en

cerdas con ovulación espontánea como inducida. El número de inseminaciones necesarias para conseguir unos índices de fertilidad aceptables tendió a ser menor en las cerdas destetadas con ovulación inducida.

C. SOLUCIONES HIPEROSMÓTICAS EMPLEADAS PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA OSMÓTICA DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICAS

Letard, P. (1961), demostró la acción nociva del agua destilada sobre los espermatozoides; dicho autor pudo demostrar, al mismo tiempo, el efecto espermio lítico de soluciones hipotónicas e hipertónicas, llegando a la conclusión de que las soluciones de cloruro sódico al 7% resultaban nocivas para los zoospermos. FUMAGALLI, en el año 1944, experimentó con esperma situado en líquido Ringer, solución hipotónica (7%), de ClNa y agua bidestilada. Este autor pudo comprobar que, a la hora de conservación en líquido de Ringer, los zoospermos mantenían su integridad morfológica, mientras que en la solución hipotónica y en el agua bidestilada, ya a los 10 minutos se apreciaba un 70% de formas morfológicamente alteradas.

Gadea, J. (2005), demostró que las variaciones de presión osmótica son mejor toleradas cuando se presentan paulatinamente. (Gôtze, R. 1960), aconseja la determinación del índice crioscópico en los menstros como garantía de su normalidad. A estas mismas consideraciones llegan los rusos Ivanov, Milovanov y Celvanova. El profesor Gôtze recomienda valorar el grado de ósmosis en cada uno de los medios líquidos mediante unas escalas de concentración variable, a las que se añade el esperma problema, para constatar, de este modo, la concentración mejor tolerada por el material espermático problema; circunstancia de gran interés, si tenemos en cuenta que la composición química de cada eyaculado es distinta, aunque con escasas variaciones, cuando procede de un mismo semental. Como ha demostrado Dimitropolus, N. estas variaciones pueden ser notables entre eyaculados procedentes de diferentes animales y, en este caso, pueden ser la causa de fracaso en la dilución espermática.

Fuentes, H. (2003), considera suficiente para prevenir los accidentes de presión osmótica el empleo de sustancias electrolíticas comprendidas entre el 0,8 y 1% ,

que darán soluciones perfectamente toleradas por los zoospermos, teniendo en cuenta que, en los eyaculados de mayor concentración y escaso volumen (toro, morueco y aves), su pobreza en electrólitos permite utilizar líquidos de concentración en tal sentido un poco mayor; por el contrario, el eyaculado procedente de animal de tipo uterino (caballo, perro y cerdo), debe cuidarse y reducir al mínimo la adición de electrólitos al medio espermático, sobre todo rico en dichos elementos.

En relación con sustancias de carácter hidrocarbonado (manosas), Fiser, F. (1989), aconsejan concentraciones de 5,25% para el caballo, llegando a la conclusión, compartida por Gotze, de admitir la concentración del 4.8 y 5% como la ideal, si bien modernamente hay tendencia a reducir la concentración de azúcares hasta un 3-3.3%. Por el contrario, se ha demostrado marcada nocividad en las concentraciones de azúcares superiores al 6%.

La motilidad y la integridad de la membrana parecen estar afectadas de modo distinto por el estrés osmótico, así que la motilidad es mucho más sensible a las condiciones anisoosmóticas que la integridad de membrana, especialmente en condiciones hipotónicas frente a hipertónicas (Gao, P. et al., 1995). Tras la exposición a condiciones de estrés hipo-osmótico, los daños en el espermatozoide no revierten por la exposición posterior a condiciones isoosmóticas, ya que la motilidad no mejora después del restablecimiento de la osmolaridad normal. Además, el potencial de membrana de las mitocondrias está afectado por las situaciones de estrés osmótico. Por tanto, las lesiones en la membrana plasmática y en las mitocondrias pueden estar asociadas al declive de la motilidad observado en el estrés osmótico. La tolerancia osmótica relativa del espermatozoide parece diferir entre especies, dado que la capacidad relativa del espermatozoide para sobrevivir al estrés osmótico está relacionada, en parte, con la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a la crio preservación (Gilmore; J. et al., 1998).

Cuando las células son congeladas, se encuentran sometidas a un estrés resultante de la interacción agua-soluto y a la elevación de la cristalización del hielo. La cristalización induce la formación de cavidades descongeladas de

solución hiperosmótica, mientras que el enfriamiento progresa aproximadamente a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este proceso conlleva a la salida de agua intracelular, con la subsiguiente contracción de la célula. El proceso de descongelación involucra una reversión de estos efectos y el consecuente flujo de agua hacia el interior de la célula, puede causar disrupción de la membrana celular (Visintin, P. et al., 2002).

Algunos diluyentes utilizados para la preservación de semen a largo plazo son hipertónicos (370-380 mOsmol), con respecto al plasma seminal (304 ± 7 mOsmol/kg).

Según Schilling, M. (1986), ya que bajo estas condiciones el espermatozoide se deshidrata ligeramente y supuestamente se conserva mejor. Contrariamente, algunos trabajos establecen que la motilidad espermática se preserva mejor en diluyentes ligeramente hipotónicos, mientras que en otros, se indica que la fertilidad es superior en medios isotónicos. Los espermatozoides actúan como osmómetros ideales, es decir, el volumen de la célula espermática cambia linealmente como el recíproco de la osmolaridad (tonicidad), del medio o solución externa, esto es especialmente verdadero entre osmolaridades de 210 a 500 mOsmol. Así que las alteraciones de la integridad morfológica y funcional espermática se producen en rangos diferentes a los antes mencionados, esto es cuando la tonicidad se desvía considerablemente de la de los espermatozoides o por cambios bruscos de presión osmótica, como cuando se someten a la congelación.

Según Letard, P. (1961), quien usó una solución hipotónica de citrato sódico (100 mOsm/Kg), (cuadro 6), para la determinación del porcentaje de endósmosis. La solución empleada fue almacenada a $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo no superior a los 30 días.

Cuadro 6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SOLUCIÓN DE ENDÓSMOSIS.

INGREDIENTE	CANTIDAD
Citrato trisodico	1 gr
Agua purificada	10 ml.
P:O. 100 sOsm/Kg.	

Fuente: Letar, P. (1961).

La determinación de la integridad de la membrana plasmática consiste en someter al espermatozoide a una solución hipoosmótica, provocando el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior de la célula espermática para lograr el equilibrio osmótico. La prueba de endósmosis varía en cuanto a la P.O. de la solución y tiempo de exposición de los espermatozoides a la misma, dependiendo de la especie utilizada: verraco y morueco, conejo y caprino (Echegaray, J. 2003).

Se mezclaron 200 ui. de cada alícuota con 200 ui. de la solución hipoosmótica de 100 mOsm/kg durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron mediante la inclusión de las mismas en glutaraldehído al 2%. Se observó el porcentaje de espermatozoides con torsión de la cola parcial y total, así como los que no sufrieron ningún cambio morfológico a nivel de flagelo espermático. Se contabiliza un total de 200 espermatozoides por muestras mediante la utilización de un microscopio de contraste de fase a 40x, expresando el porcentaje de espermatozoides con reacción osmótica.

D. EFECTOS DEL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO SOBRE LOS ZOOSPERMOS EN LA CONGELACION.

1. Estrés osmótico

Durante el proceso de congelación las células sufren cambios de volumen durante la adición y eliminación de los crioprotectores permeables, así como durante la congelación y descongelación del agua extracelular.

Las suspensiones celulares, al enfriarse gradualmente por debajo del punto de

congelación de la solución se congelan y empieza la formación de cristales de hielo en el exterior, aumentando la concentración de solutos en el medio extracelular (Mazúr, P. 1997). Sin embargo, el contenido de las células quedan sin congelar ya que la membrana celular bloquea la explosión del hielo ya que casi siempre se forma en la solución externa. A medida que disminuye la temperatura externa y se congela. Uno de los factores externos que pueden manipularse para la regulación de esta exosmosis es la velocidad de congelación. Cuando la tasa de congelación es lo suficientemente lenta, los espermatozoides pierden agua congelable por exosmosis evitándose así, la formación de hielo extracelular; sin embargo, si las células se enfrían rápidamente el agua celular no abandona la célula antes de que se congele entonces tiene lugar a la formación de cristales intracelulares.

Curry, J. (2000), reporta que las membranas citoplasmáticas del espermatozoide congelado tiene una menor capacidad de resistir un estrés osmótico que un espermatozoide fresco.

En este trabajo, la resistencia de los espermatozoides de cerdo ha sido probado en medios con tres solutos diferentes: 1), NaCl soluto iónico no permeable; 2), glicerol el crioprotector más usado con propiedades permeables y 3), glucosa, soluto no iónico y no permeable. Además los espermatozoides han sido sometidos a condiciones hiperosmóticas y a un estrés osmótico en presencia de ouabaina y amiloride, con objetivo de conocer el papel de la ATP-asa dependiente de Na^+/K^+ y antiporter de la Na^+/H^+ en la resistencia osmótica de los espermatozoides de cerdo.

La supervivencia del espermatozoide descongelado puede estar influenciada por el modo en que el glicerol es adicionado antes de la congelación (Fiser, F. 1989), y por cómo es eliminado tras la descongelación, ya que ambas operaciones pueden crear un considerable estrés osmótico, resultando en daños celulares (Gao, P. et al., 1995). El estrés osmótico está relacionado con las diferencias en la permeabilidad relativa al glicerol y al agua de la membrana plasmática. Tras la exposición a un soluto permeable, como es el caso del glicerol, el espermatozoide encoge debido a la pérdida del agua y después se hincha, así que el agua y dicho

soluto permeable entran en la célula. Cuando estas células se suspenden en un medio isoosmótico, inicialmente se hinchan ya que el agua entra en la célula y después encogen debido a que tanto el agua y como el soluto se mueven hacia el exterior de la célula.

2. Daño acrosomal.

Los procesos de crio preservación afectan la integridad acrosómica. El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización. La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lecitinas marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (Fiser, F. et al., 1989).

3. Daño en la membrana espermática.

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática. Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundantes en la población de espermatozoides sobrevivientes luego del proceso de criopreservación (Gadea, J. et al., 2005).

III. DISCUSIÓN

A. EFICIENCIA DE LOS CRIOPROTECTORES EMPLEADOS PARA LA CONGELACION DE SEMEN PORCINO.

Algunos de los crioprotectores utilizados son: dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol, metanol, propanediol, etyl glicol, acetamida, tetralosa, metil celulosa, yema de huevo y leche descremada estos crioprotectores funcionan ya que son de bajo peso molecular y penetran la membrana del esperma (Polge, R. y Rowsom, H. , W. et al., 1952).

Cummins, C. (1994), al igual que Mazúr, P. et al., (1997), mencionan que la adición de glicerol y la pérdida intracelular de agua durante la congelación reducen casi a la mitad el volumen (isotónico), del espermatozoide mientras que durante la descongelación, cuando se suspende en una solución isotónica, la célula expande dos veces su volumen.

El hecho de que el glicerol también puede ser nocivo en la descongelación fue observado por Amann, R. y Pickett, K. (1998), quienes sostienen que durante la descongelación, al contrario que en la refrigeración y la congelación, el glicerol se desplaza del interior hacia el exterior de la célula. Cuando la permeabilidad de la membrana es insuficiente, para acomodar este movimiento, resultan daños permanentes que estarán seguramente exacerbados cuando el espermatozoide se coloca en el tracto genital femenino, que es hipoosmótico frente al diluyente. Recientes estudios demuestran que aun las células espermáticas que resisten a estos procesos pueden ver su función afectada (Watson, P. 1990), actualmente y a la vista de los trabajos realizados por diferentes autores se puede deducir que los fenómenos acontecen en torno a la congelación van a alterar la fisiología de las células espermáticas, desencadenando un estado de hiperosmosis de forma acelerada reduciendo con ello la viabilidad celular y por lo tanto el poder fecundante de dichas células.

1. Test de Endosmosis

El estudio realizado por Perez, F. (1956), comprobó que no existen diferencias significativas ($P < 0,05$), en los distintos tiempos de lectura empleados en el Test

de Endósmosis. Asimismo los resultados han sido homogéneos entre los distintos tipos de diluyentes empleados. En función de esto y dado la importancia de efectuar una valoración de la calidad del semen utilizado en los centros de inseminación artificial consideramos ventajoso la realización del Test de Endósmosis, aprovechando la posibilidad de efectuar la lectura en aquellos días en que no existe una concentración del trabajo de elaboración de dosis seminales. De esta manera no se vería afectada la rutina ni sería necesario aumentar la mano de obra calificada para realizar una valoración seminal completa.

B. PUNTOS DURANTE LOS PROCESOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN PORCINO.

El proceso de congelación/descongelación provoca lesiones en cualquier tipo de célula, pero los espermatozoides son especialmente sensibles a las bajas temperaturas, sufriendo el proceso que se denomina “choque por frío”. Las particularidades que presenta el espermatozoide porcino hacen que sea muy sensible al choque por frío (Polge, R. y Rowson, H. 1952), que produce una alteración de funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se ve comprometida. Estas alteraciones del espermatozoide suponen que la vida media del mismo se ve acortada, es decir, se reduce el tiempo en el cual el espermatozoide puede ser fértil. De tal manera que al usarse en inseminación artificial se obtenían resultados inferiores a los obtenidos con semen refrigerado como el clásico trabajo (Johnson, L. et al. 2000). En él, se concluía que la fertilidad del semen congelado era sensiblemente menor a la obtenida con semen refrigerado y que podría estimarse en una reducción media del 20% en la tasa de semen fresco diluido.

C. PROPUESTA BIOTECNOLÓGICA PARA INCREMENTAR LA FERTILIDAD EN EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE SEMEN DE VERRACO

Mezclas de crioprotectores tienen menos toxicidad y son más eficaces que un solo agente crioprotectores. Una mezcla de formamida con DMSO, propilenglicol y un coloide fue durante muchos años la forma más eficaz de todas las creadas

artificialmente crioprotectores. Crioprotector mezclas se han utilizado para la vitrificación, es decir, sin ningún tipo de solidificación, formación de cristales de hielo.

Mazúr, P. (1997), propuso que durante la congelación existen dos factores con dependencia opuesta de la velocidad de enfriamiento que van a ser causantes de los daños producidos por este fenómeno en cualquier tipo celular, existiendo una velocidad optima de congelación fuera de la cual la supervivencia celular se ve comprometida. El empleo de velocidades de congelación superiores a la óptima impide el agua intracelular abandonar la célula antes de congelarse y congelarse, provocando la muerte celular por la formación de cristales de hielo.

Este teoría se ve reforzada por Watson, P. (1990), menciona que cuando se emplean tasas sub óptimas de congelación las lesiones se originan por la deshidratación y aumento de la concentración del crioprotector, por ende afectando la presión osmótica resultante una solución hiperosmótica, además de cambios de pH precipitación de sales.

IV. CONCLUSIONES

- Dentro de los múltiples protocolos de congelación y descongelación de semen porcino existe una alteración de las densidades tanto intra como extra celulares. Esta alteración conlleva a una serie de efectos nocivos para la vitalidad de los espermatozoides. En sí el estrés hipoosmótico se da cuanto ingresa agua al interior de la célula espermática y se produce un hinchamiento resultando ya sea en la explosión y destrucción celular o en la formación de cristales de hielo por el mismo efecto de la temperatura.
- Basándome en diferentes autores como Gilmore, J. Jhonson, F. y Perez, F. los cuales identifican que durante el proceso de congelación el mayor estrés osmótico se alcanza a niveles por debajo de los 10°C, siempre y cuando no se hayan presentado problemas en la adición de crio protectores durante la preparación de las soluciones ya que en estos procesos también juegan un papel importante las densidades de los líquidos.
- Dentro de las alternativas que buscan mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides del verraco a procesos de congelación se analizan varias técnicas como la correcta aplicación de los protocolos de congelación, la adición de crio protectores que penetren la membrana plasmática, y así mismo la mezcla adecuada de estos representan alternativas muy recomendadas.
- La crioservación de semen porcino representa un alto costo para los procesos de producción y mantenimiento es así que esta técnica es utilizada generalmente para la preservación de razas o líneas porcinas importantes, como por ejemplo nuestra criolla ecuatoriana.

V. RECOMENDACIONES

- Los daños a membrana plasmática y acrosoma de la célula del esperma produce un descenso significativo de la vitalidad (menor 20% que la tasa de semen fresco, Johnson, L. 2000), de los espermatozoides después de los proceso de congelación. Para lograr eficiencia en el proceso de conservación de semen de verraco por congelación se debe escoger un protocolo adecuado de congelación así como un buen crioprotector o a su vez la mezcla de estos, con ello evitaremos someter a los espermatozoides a procesos de estrés mecánico, térmico y sobre todo osmótico.
- El campo de la crioconservación de semen porcino no es nuevo, ha venido evolucionando desde décadas atrás, así mismo día a día se siguen descubriendo procesos más eficientes y aplicables a nivel de campo, es así que dentro de nuestra facultad se debería investigar más en este tema muy interesante y que aportaría significativamente al mejoramiento genético de nuestras piasas.

VI. LITERATURA CITADA

1. AMANN, R. PICKETT, R. 1998. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. J Androl ; pp. 397-406.
2. ALMILID, T. 1987. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws, J. Anim. Sci, pp.89-99.
3. BLANCH, E. 1997. modificación de la membrana de los espermatozoides de verraco para mejorar su supervivencia a la crioconservación, Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España pp. 302-355.
4. BURANAAMNUAY, K. 2010. Intra-uterine insemination with low numbers of frozen-thawed boar spermatozoa in spontaneous and induced ovulating sows under field conditions. Livestock Science. v. 131 pp. 115-118.
5. CAMACHO, D. 2000. Valoración de la calidad de semen porcino utilizados en el test de endosmosis y el test de resistencia osmótica, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia v 24 pp. 33 - 34.
6. CUMMINS, C. 1994. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry Theriogenology 70: pp. 251-275.
7. CURRY, J. (2005). The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. En: "Deep freezing of boar semen". Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Pp. 113-115.
8. ECHEGARAY, J. 2003. Reproducción animal, inseminación artificial y trasplante de embriones. 1a edición, España, Científico médica pp. 302-355.

9. FISER, F. (1989). The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.*, pp. 190-195.
10. FUENTES, H. 2003. Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Universidad de León. Tesis Doctoral. pp. 53-75.
11. GADEA, J. 2005. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hiVP), assay, *Anim Reprod, Sci*, pp. 95-108.
12. GAO, D. (1995). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. En: "Reproductive tissue banking: scientific principles". Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic press, San Diego, EEUU. Pp: 263-328.
13. GILMORE, J. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance of cryopreservation. *Biol Reprod*, v 5 pp. 28-36.
14. GOTZE, R. 1960. Bessamun und unfruchtbarkeit der haussaugetiere, Verlag, M & H Schaper, Hannover p. 14.
15. HAMMERSTEDT, R. 1990. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. *Biol Reprod*; v 18: pp. 686-696.
16. JOHNSON, L. 2000. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa on *Animal Reproduction And Artificial Insemination*,. *Anim. Reprod. Sci.*, pp. 4-19.
17. LETARD, P. 1961. Estudios sobre la dilución y conservación de semen suido, *veterinaria*, p. 25.
18. MAZÚR, P. 1997. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*; v 14 pp. 251-272.
19. MERK, S. 1993. El manual MERK de veterinaria, 4ta edición, Centrum Moyam, Cuba pp. 27 - 29.

20. MUÑOS, P. 2005. Normas existentes para la congelación de semen en Colombia, Facultad de Veterinaria y zootecnia pp. 59 – 102.
21. PÉREZ, F. 1969. Reproducción e inseminación artificial ganadera; 1era edición, ed. Revolucionaria pp. 394-395.
22. PÉREZ, M. 1991. Conferencias sobre producción espermática, Curso de producción porcina, I.N.I.A, España pp. 56-79.
23. POLGE, R. Y ROWSON, H. 1952. Influence Of Incubation Time And Cooling Rate On Chilling Sensitivity Of Diluted Boar Semen. Iv Boar Semen Preservation (Beltsville, USA); pp. 29-51.
24. PURDY, L. 2005. Nozioni di fisiol.d. riproduz e di fecond artif,. Milan pp. 17, 19, 46.
25. PURSEL, V. Y JOHNSON, L. 1987. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J Anim Sci; pp. 99-112.
26. RIVERA, R. 1997. Evaluación de tres diluyentes de semen porcino para uso a 96 y 129 horas posteriores a la colecta, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia pp. 13 - 20.
27. SCHILLIN, M. 1986. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press, traducido por traslate optim, editorial BIOTEGS 2000: pp. 189-218.
28. VISINTIN, P. 2002. Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. Biol Reprod; pp.1-6.
29. WATSON, P. 1990. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci, traducido por traslate optim, editorial BIOTEGS 2000; pp. 60-61:481-492.

ANEXOS

Anexo 1. Glosario tomado del manual Merck.

- **Álbúmina:** Es una proteína que se encuentra en gran abundancia en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre. Es sintetizada en el hígado. La concentración normal de albúmina en la sangre humana oscila entre 3,5 y 5,0 gramos por decilitro, y supone alrededor del 50% de la proteína plasmática. El resto de proteínas presentes en el plasma se llaman en conjunto globulinas. La albúmina es fundamental para el mantenimiento de la presión oncótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos. La albúmina tiene carga eléctrica negativa. La membrana basal del glomérulo renal, también está cargada negativamente, lo que impide la filtración glomerular de la albúmina a la orina. En el síndrome nefrótico, esta propiedad es menor, y se pierde gran cantidad de albúmina por la orina.
- **Acrosoma:** Es un pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide y que contiene enzimas hidrolíticas. La misión de éstas es el debilitamiento y ruptura -por efecto colaborativo de varios espermatozoides- de las distintas paredes que envuelven al óvulo. Está limitado por la membrana acrosomal externa (adosada a la membrana celular), y por la membrana acrosomal interna (adosada a la membrana nuclear).
- **Medio hiperosmótico.-** Cuando se trata de soluciones o fluidos corporales, concentración de solutos en el medio extracelular (o intersticial), muy superior a la existente a nivel intracelular.
- **Medio hipoosmótico.-** Se dice de las soluciones o fluidos corporales que poseen una alta proporción de agua y una baja concentración de solutos comparado con el interior de la célula o ambiente corporal interno.
- **Resistencia osmótica .-** Susceptibilidad de los eritrocitos a la hemólisis cuando se exponen crecientemente a una solución salina hipotónica. El agua penetra en el interior del eritrocito que se hincha, hasta que la capacidad de la membrana celular se sobrepasa y estalla. Esta prueba se utiliza en el diagnóstico de anemia hemolítica.

- **Acrosoma.-** Es un pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide y que contiene enzimas hidrolíticas, principalmente la hialuronidasa, cuya misión es la separación progresiva -por efecto colaborativo de varios espermatozoides- de las células del cúmulo que rodean al ovocito, mediante la hidrólisis del polímero que las mantiene unidas, el ácido hialurónico.
- **Bomba sodio-potasio.-** Es una proteína de membrana fundamental en la fisiología de las células que se encuentra en todas nuestras membranas celulares. Su función es el transporte de los iones inorgánicos más importantes en biología (el sodio y el potasio), entre el medio extracelular y el citoplasma, proceso fundamental en todo el reino animal.
- **Antibiótico:** Es un medicamento que se utiliza para tratar una infección bacteriana, y que por su efecto, mata o impide el crecimiento de ciertas clases de bacterias, pero que normalmente es inofensivo para el huésped (aunque ocasionalmente puede producirse una reacción adversa a medicamento o puede afectar a la flora bacteriana normal del organismo).
- **Ácido cítrico:** Es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula química es $C_6H_8O_7$. Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos como las conservas vegetales enlatadas. En bioquímica aparece como una molécula intermediaria en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos.
- **Biofísica:** Es la ciencia que estudia la biología con los principios y métodos de la física. Se discute si la biofísica es una rama de la física o de la biología. Desde un punto de vista puede concebirse que los conocimientos y enfoques acumulados en la física "pura" pueden aplicarse al estudio de los sistemas biológicos. En ese caso la biofísica le aporta conocimientos a la biología, pero no a la física. Ejemplos en ese sentido son la física de la audición, la biomecánica, etc.

- **Bioquímica:** Es la rama de la Química que estudia los seres vivos, especialmente de la estructura y función de sus componentes químicos específicos, como son las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, además de otras pequeñas moléculas presentes en las células. La bioquímica se basa en el concepto de que todo ser vivo contiene carbono y en general están compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre.
- **Buffer o Tampón químico:** En términos químicos, también es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad "tamponante", es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto), en una disolución acuosa.
- **Carbohidratos:** Son una clase básica de compuestos químicos en bioquímica. Son la forma transgenaria primaria de almacén o consumo de energía; otras formas son las grasas y las proteínas. El término *hidrato de carbono* es poco apropiado, ya que estas moléculas no son átomos de carbono hidratados, es decir, enlazados a moléculas de agua, sino de átomos de carbono unidos a otros grupos funcionales químicos. Este nombre proviene de la nomenclatura química del siglo XIX, ya que las primeras sustancias aisladas respondían a la fórmula elemental $C_n(H_2O)_n$, n (donde "n" es un entero=1,2,3... según el número de átomos). De aquí el término "carbono-hidratado" se haya mantenido, si bien posteriormente se vio que otras moléculas con las mismas características químicas no se corresponden con esta fórmula.
- **Cloranfenicol (o "cloramfenicol"):** Es un antibiótico derivado de la bacteria *Streptomyces venezuelae* y en la actualidad se produce sintéticamente. El cloranfenicol es efectivo frente a un amplio espectro de microorganismos, pero debido a sus importantes efectos secundarios (daño a la médula ósea, incluyendo anemia aplásica), en humanos, su uso se limita a infecciones muy graves, como la fiebre tifoidea. Pese a sus efectos secundarios, los la OMS aboga por su uso en muchos países del tercer mundo en ausencia de tratamientos más baratos. Se usa en el tratamiento del cólera, al destruir los vibrios y disminuir la diarrea asociada. Es efectivo contra los

vibrios resistentes a la tetraciclina. Se usa también en colirios y emulsiones para tratar la conjuntivitis bacteriana.

- Congelación: Es una forma de conservación que se basa en la solidificación del agua contenida en estos. Por ello uno de los factores a tener en cuenta en el proceso de congelación es el contenido de agua del producto. En función de la cantidad de agua se tiene el calor latente de congelación. El calor latente del agua es la cantidad de calor necesario para transformar 1 kg de líquido en hielo, sin cambio de temperatura, en este caso es de 80 kcal/kg. Otros factores son la temperatura inicial y final del producto pues son determinantes en la cantidad de calor que se debe extraer del producto.
- Criogenia: Es el conjunto de técnicas utilizadas para enfriar un material a la temperatura de ebullición del nitrógeno o a temperaturas aún más bajas. La temperatura de ebullición del nitrógeno, es decir 77,36 K (o lo que es lo mismo -195,79 °C), se alcanza sumergiendo a una muestra en nitrógeno líquido. El uso de helio líquido en lugar de nitrógeno permite alcanzar la temperatura de ebullición de éste, que es de 4,22 K (-268,93 °C).
- Célula: Unidad fundamental de los organismos vivos, generalmente de tamaño microscópico, capaz de reproducción independiente y formada por un citoplasma y un núcleo rodeados por una membrana.
- Contrastación: Comprobar la exactitud o autenticidad de algo.