

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE RATONES (*Mus musculus*)

Prestadora de Servicio Social:

Padilla Roldán Andrea Aidee
Matrícula: 2152032705

Asesores:

Interno: Dr. José Ernesto Hernández Pichardo
Núm. Económico: 16587

Externo: Dra. Ariadna Aparicio Juárez
Cédula Profesional: 4934067

Lugar de realización:

Unidad de Edición Genética y Criopreservación del Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma de México, Cto. Exterior s/n, C.U., Coyoacán, 04510
CDMX.

Fecha de inicio y terminación:

Del 30 de mayo del 2022 al 30 de noviembre del 2022.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	2
4. MARCO TEÓRICO	3
4.1. Características anatomofisiológicas reproductivas del ratón (<i>Mus musculus</i>)	3
4.2. Características de los espermatozoides de ratón (<i>Mus musculus</i>)	4
4.3. Criopreservación	4
4.4. Crioprotectores	5
4.5. Métodos de criopreservación	6
5. OBJETIVOS	7
6. METAS	7
7. METODOLOGÍA	7
7.1. Preparación del medio crioprotector	7
7.2. Animales y obtención de las muestras	8
7.3. Evaluación de las muestras obtenidas	8
7.4. Protocolo de congelación	10
7.5. Protocolo de descongelación	10
7.6. Análisis estadístico	11
8. ACTIVIDADES REALIZADAS	11
9. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS	13
10. RESULTADOS	13
11. DISCUSIÓN	15
12. CONCLUSIONES	16
13. RECOMENDACIONES	16
14. BIBLIOGRAFÍA	17

1. RESUMEN

La criopreservación es una técnica de reproducción asistida la cual es una herramienta efectiva, segura y rentable para la conservación de gametos y embriones a largo plazo en animales y humanos, siendo uno de ellos en animales de laboratorio ya que proporciona el almacenamiento de cepas valiosas de roedores y es una alternativa ética para el uso y cuidado de estos animales. Actualmente, el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es un modelo animal ampliamente utilizado en la investigación biomédica, debido a su alto desempeño reproductivo, su facilidad de manipulación genética ya que actualmente se cuenta con cepas mutantes, consanguíneas, transgénicas o *knock outs* para el estudio y mejora de enfermedades. Por ello, el objetivo de este Servicio Social fue evaluar un protocolo de criopreservación de espermatozoides de ratón (*Mus musculus*) en la cepa C57BL/6, los espermatozoides fueron obtenidos de siete machos mayores a 12 semanas de edad y que tres días antes a la recolección de la muestra habían montado, se extrajeron los epidídimos así como los conductos deferentes y se les realizó cortes para la liberación de los espermatozoides en el medio crioprotector de rafinosa y leche descremada previamente elaborado. Las muestras fueron congeladas en criotubos de 1.5 mL donde se recuperaron alícuotas de 200 μ L de medio con espermatozoides con una concentración de 21×10^6 spz/mL, y se congelaron por exposición a vapores de nitrógeno líquido (LN₂) durante 10 minutos, posteriormente, se transfirieron a una canastilla para sumergirlos de forma rápida en el nitrógeno líquido, y fueron almacenados por una semana. Se evaluó la concentración espermática, viabilidad y motilidad antes y después de la congelación. Los resultados obtenidos de la prueba de viabilidad usando la tinción supravital mostraron ser significativamente diferentes ($p=0.024$) después de la congelación. La motilidad igualmente se vio reducida después de la congelación ($p<0.0001$) en comparación con la motilidad espermática antes de la congelación.

2. INTRODUCCIÓN

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) pertenece al orden Rodentia y a la familia Muridae, es una de las especies de mamíferos más utilizadas en la investigación debido a su genoma bien caracterizado, su facilidad de manipulación genética y experimental, así como su corto intervalo generacional y su alto desempeño reproductivo, haciendo de ellos modelos animales ideales (Yildiz *et al.*, 2007; Takeo y Nakagata, 2010b; Kaneko y Garrels, 2020). Su uso es importante para la comprensión y mejora de enfermedades oncológicas, inmunológicas, enfermedades infecciosas, descubrimiento de nuevos fármacos, entre otras (National Research Council, 1988).

El desarrollo de la ciencia de los animales de laboratorio ha permitido contar con cepas de roedores genéticamente definidas. Actualmente, se ha establecido un gran número de cepas mutantes, consanguíneas, transgénicas o *knock outs* (KO) en todo el mundo (Nakagata, 2011). Debido a esto, el uso del ratón (*Mus musculus*) ha aumentado la demanda de métodos mejorados, rentables y seguros para almacenar y archivar cepas valiosas (Hasegawa *et al.*, 2012). Como una alternativa para satisfacer los requerimientos éticos y salvaguardar estos modelos biológicos tan valiosos para la ciencia, se han desarrollado técnicas reproductivas que permiten la conservación de gametos. Una de ellas es la criopreservación de gametos y embriones la cual se ha convertido en la tecnología líder para la conservación a largo plazo de germoplasma (Knight y Abbott, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

La criopreservación ha sido durante mucho tiempo una estrategia importante para la preservación de la fertilidad en animales y humanos, implica mantener material biológico a bajas temperaturas (típicamente en nitrógeno líquido, a -196 °C) de tal manera que se pueda obtener material viable recuperado (Landel, 2005). En tal sentido, la criopreservación de gametos y embriones de roedores es un método básico importante para las tecnologías de reproducción artificial (ART), así como el mantenimiento de cepas de roedores de distintos orígenes, ya sean consanguíneas,

mutantes, transgénicas o *knock outs* contra la deriva génica, la depresión endogámica, enfermedades, desastres ambientales, o fallas en el equipo de la instalación del bioterio (Kaneko y Garrels, 2020). Sin embargo, el problema principal en la criopreservación de espermatozoides de ratón es su sensibilidad al frío. Aunado a esto, se ha observado que son extremadamente sensibles a las tensiones mecánicas generadas durante la manipulación (como el pipeteo), centrifugación, cambios de volumen impulsados osmóticamente y radicales libres derivados del oxígeno libre. Al mismo tiempo se ha observado que los espermatozoides de ratón son más susceptibles al daño criogénico que los espermatozoides de otros mamíferos debido a la forma única de la cabeza del espermatozoide, y la baja permeabilidad de la membrana plasmática al agua (Yildiz *et al.*, 2010). El efecto adverso más descrito de congelamiento y descongelamiento de espermatozoides de ratón es la disminución de la motilidad y pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Por lo tanto, factores como el tipo de agente o medio crioprotector (CPA) utilizados y los antecedentes genéticos de los ratones contribuyen al éxito en la criopreservación de espermatozoides (Yildiz *et al.*, 2007).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Características anatomofisiológicas reproductivas del ratón (Mus musculus)

Los componentes del sistema reproductor masculino tienen tres funciones: producción de espermatozoides funcionales, transporte de espermatozoides y secreción de componentes del fluido seminal. En el ratón, este sistema reproductor está compuesto por los testículos, conductos eferentes, el epidídimo, conductos deferentes y las glándulas sexuales accesorias que consisten en vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales, glándulas ampulares, glándulas prepuciales; uretra y pene (Knoblauch y True, 2012). Los espermatozoides emergen de los testículos y experimentan un proceso de maduración en el epidídimo durante el cual cambian morfológica, bioquímica y fisiológicamente para adquirir motilidad y la capacidad de fertilizar óvulos. Durante la eyaculación, los espermatozoides salen del epidídimo y

pasan a través de los conductos deferentes, la uretra y el pene, donde las secreciones de la próstata, las vesículas seminales, glándulas ampulares y las glándulas bulbouretrales se mezclan con los espermatozoides, lo que contribuye a la composición final del semen (Pritchett y Taft, 2006; Lin *et al.*, 2013; Treuting *et al.*, 2017). Se ha estimado que el volumen de eyaculado en ratones es de 1.5 microlitros el cual se conforma de 10.2 mg de peso del tapón seminal y una concentración de 2.5×10^6 espermatozoides/mL sin embargo, esta puede variar de una cepa a otra (Anderson *et al.*, 1983).

4.2. Características de los espermatozoides de ratón (*Mus musculus*)

Los espermatozoides de ratón tienen una cabeza de forma falciforme que se compone de cuatro partes principales: el núcleo, el sistema acrosómico, la teca perinuclear y la membrana plasmática. El núcleo ocupa la mayor parte del volumen de la cabeza y contiene el genoma haploide (Lin *et al.*, 2013). La motilidad espermática es una medida funcional de los espermatozoides, en ratones los valores de control de la motilidad espermática deben de estar en el rango de 85 a 96% (Creasy y Chapin, 2013). Por otro lado, se ha obtenido el porcentaje de espermatozoides anormales en ciertas cepas, por ejemplo, la cepa BALB/c es conocida por producir una proporción inusualmente alta de espermatozoides morfológicamente anormales (75%). Además, la cepa PL/J también tiene una alta frecuencia de espermatozoides con morfología anormal de la cabeza (30%), incluidas cabezas agrandadas, estrechas, alargadas y sin cabeza (Sun *et al.*, 2006).

4.3. Criopreservación

El proceso de criopreservación consiste en descender la temperatura fisiológica hasta temperaturas negativas. El descenso de la temperatura altera los procesos biológicos normales y hace que el metabolismo sea más lento y que las membranas celulares se contraigan, poniendo en riesgo la integridad estructural de la célula. De esta forma, si la congelación no se produce en una forma controlada resultará en un deterioro irreversible, e incompatible con la vida de la célula. En particular, existe una zona de

letalidad con temperaturas intermedias (-15 a -60 °C) que la célula debe atravesar dos veces (congelación y descongelación) durante el proceso. La deshidratación parcial de la célula es vital para evitar que el agua forme cristales de hielo durante la congelación. Por esta razón, se añaden al medio de congelación soluciones crioprotectoras (Benavides y Guénet, 2003). Los espermatozoides criopreservados pueden conservarse permanentemente en un tanque de nitrógeno líquido y los animales se pueden reproducir mediante fertilización *in vitro* y técnicas de transferencia de embriones. Potencialmente se pueden producir más de 2000 crías a partir de los espermatozoides recolectados de un ratón macho y criopreservados (Takeo *et al.*, 2020). No obstante, se ha observado que los espermatozoides de ratón son sensibles al frío y al efecto osmótico (Yildiz *et al.*, 2007).

4.4. Crioprotectores

La función principal de los agentes crioprotectores es desalojar el agua de la célula, evitando así la cristalización por el frío. Asimismo, proporcionan una acción protectora como fuente de energía para los espermatozoides y mantiene la presión osmótica mediante la formación de enlaces de hidrógeno con la membrana fosfolipídica que reducen el daño de la membrana y minimizan la desestabilización de la membrana durante la congelación y la descongelación (Yildiz *et al.*, 2007). Sin embargo, la toxicidad de los agentes crioprotectores se ha descrito como el principal impedimento para la criopreservación principalmente por vitrificación (Best, 2015). En tal sentido la toxicidad de los crioprotectores limita la concentración que puede ser utilizada y por lo tanto limita la eficacia crioprotectora de estos agentes (Sudagar *et al.*, 2017). Los crioprotectores son de estructura química variada y se dividen en permeables y no permeables, dependiendo de su capacidad de atravesar la membrana celular por difusión pasiva (Benavides y Guénet, 2003). Los crioprotectores permeables (metanol, dimetilsulfóxido, glicerol, propilenglicol y etilenglicol) se caracterizan por ser sustancias de bajo peso molecular y pueden penetrar la membrana celular mientras que los crioprotectores no permeables (polivinil pirrolidona, hidroxietil almidón y varios azúcares) son agentes de alto peso molecular y por lo tanto no pueden entrar a la

célula (Sudagar *et al.*, 2017). En ratones se han desarrollado distintos protocolos en los cuales destaca el primer agente crioprotector utilizado en espermatozoides de ratón el cual consiste en una combinación de leche descremada al 3% y rafinosa al 18%. Otro agente crioprotector usado consiste en la mezcla de rafinosa, glicerol y yema de huevo. Por otra parte, en algunos estudios se ha utilizado mono, di y trisacáridos, glicerol, DMSO y macromoléculas como la polivinilpirrolidona ya sea solos o en combinación con crioprotectores convencionales para mejorar la eficiencia de la criopreservación de espermatozoides de ratón (Yildiz *et al.*, 2007). Sin embargo, durante mucho tiempo, los espermatozoides congelados y descongelados de cepas endogámicas como la C57BL/6, han sufrido tasas bajas de fertilización específicas de la cepa después de la congelación. Debido a esto, se ha complementado con monotioglicerol (MTG) o L-glutamina al agente crioprotector (CPA) compuesto por rafinosa y leche descremada. Se ha demostrado que estos compuestos han mejorado fuertemente el efecto crioprotector del CPA original contra el daño celular y mejoran la motilidad posterior a la descongelación (Takeo y Nakagata, 2010a; Wigger *et al.*, 2021). Por lo que para este Servicio Social se eligió evaluar el protocolo de Szein *et al.*, (2001) el cual consiste en una mezcla de rafinosa al 18% y leche descremada al 3% como agente crioprotector.

4.5. *Métodos de criopreservación*

Históricamente se han utilizado dos enfoques para la criopreservación: i) la congelación lenta y ii) la vitrificación. En el sistema de congelación lenta, la temperatura desciende aproximadamente de 0.3 a 2 °C por minuto en un medio con concentraciones bajas de crioprotectores hasta -30 a -80 °C. De esta manera las células tienen tiempo suficiente para eliminar el exceso de líquido (Benavides y Guénet, 2003). Por otra parte, el método de vitrificación implica la formación de vidrio (en lugar de cristales de hielo) en el interior de las células. Durante este proceso el agua llega al estado sólido (vítreo) sin pasar por la formación de cristales. Esto se logra por medio de la congelación ultra rápida (>1000 °C/min) y el uso de altas concentraciones de crioprotectores. Las células son deshidratadas, antes de la congelación, colocándolas en altas concentraciones de un crioprotector (> 6 M). Este método presenta la ventaja de no tener que usar un

sistema de congelación controlado, y se pueden transferir las muestras directamente en nitrógeno líquido y sus vapores, y de no causar daños a la célula debido a que no se forman cristales de hielo. Sin embargo, muy pocos estudios han probado si los diluyentes refrigerantes son efectivos para la vitrificación (Horta *et al.*, 2017). En este proyecto se evaluó un protocolo de criopreservación de espermatozoides de ratón (*Mus musculus*) en la cepa C57BL/6 por medio de la técnica de congelación lenta.

5. OBJETIVOS

- Evaluar un protocolo de criopreservación de espermatozoides de ratón (*Mus musculus*) en la cepa C57BL/6.

6. METAS

Se obtendrán 40 muestras de espermatozoides por el método de recolección del epidídimo y conductos deferentes en la cepa C57BL/6, para su posterior congelación. De las 40 muestras obtenidas, se determinará antes y después de la congelación las siguientes características: concentración espermática, viabilidad y motilidad.

7. METODOLOGÍA

El presente proyecto se realizó en la Unidad de Edición Genética y Criopreservación del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Cto. Exterior s/n, C.U., Coyoacán, 04510 CDMX.

7.1. Preparación del medio crioprotector

Para la preparación del medio crioprotector se utilizaron 150 mL de agua de grado de cultivo celular previamente calentada en un microondas por 30 segundos. Posteriormente, se colocó en una placa de agitación y se añadieron 45 g de rafinosa pentahidratada al 18% (Sigma-Aldrich R7630) y la solución fue agitada hasta disolverse por completo. A esta solución se le agregó de manera lenta 7.5 g de leche descremada

deshidratada al 3% (BD Diagnostics 232100), y se mezcló hasta disolverse. En seguida, se colocó la solución preparada en un matraz aforado y se le añadió agua de grado de cultivo hasta incrementar el volumen a 250 mL, para luego ser centrifugada a 16,000 g por 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de aclarar el medio crioprotector. Inmediatamente después de la centrifugación la solución fue filtrada lentamente a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μm con cuidado de no remover el sedimento. Finalmente, se distribuyó en 10 alícuotas y fueron almacenadas a -80 °C (Sztein *et al.*, 2001).

7.2. *Animales y obtención de las muestras*

Se sacrificaron siete ratones macho de la cepa C57BL/6 provenientes del bioterio del IFC, UNAM, de más de 12 semanas de edad, los cuales habían montado tres días antes a la obtención de la muestra. Los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical, y de acuerdo con el protocolo de Sztein *et al.*, (2001), se removieron los dos epidídimos y los conductos deferentes de manera aséptica, y se colocaron sobre una caja Petri estéril de 35 mm que contenía 1 mL del medio crioprotector previamente equilibrado a 37 °C. Las muestras fueron observadas bajo microscopio con el fin de eliminar completamente remanentes de sangre y grasa del tejido. Posteriormente, con ayuda de unas tijeras de micro-disección se realizaron de 5 a 6 incisiones en los epidídimos y conductos deferentes directamente en el medio crioprotector, y se dejaron reposar por 10 minutos en una placa térmica a 37°C con el fin de dispersar los espermatozoides de los órganos al medio crioprotector. Se obtuvieron siete muestras de espermatozoides en su totalidad para su análisis.

7.3. *Evaluación de las muestras obtenidas*

- Evaluación del porcentaje de la concentración espermática, viabilidad y motilidad.

Se evaluó la concentración espermática, viabilidad y motilidad a partir de la suspensión de espermatozoides y medio crioprotector.

❖ Concentración espermática

La concentración espermática fue determinada mediante el uso de un hemocitómetro de Neubauer, con una dilución de 1:20 en la cual en 10 μL de solución salina (NaCl) se diluyeron 20 μL de muestra. Para la dilución se utilizó una pipeta de Thomas para glóbulos blancos, esta se llenó con la suspensión de espermatozoides hasta la marca de 0.5 y después con solución salina se llenó hasta la marca 1.0, se agitó y se liberaron tres gotas. Posteriormente, la suspensión se colocó en ambos lados de la cámara de Neubauer y se realizó el conteo en cinco cuadrantes con espermatozoides completos (cabeza y cola) bajo un microscopio óptico con un aumento de 40x este resultado se multiplicó por el factor $10^6/\text{mL}$ (un millón por mililitro) y, finalmente, para obtener la concentración total de espermatozoides se multiplicó la concentración de espermatozoides/mL por mL de eyaculado en este caso se hizo la conversión de μL a mL (Aitken *et al.*, 2001; Vásquez *et al.*, 2012).

❖ Viabilidad

La viabilidad fue examinada mediante el método de tinción supravital y adicionalmente se realizó la prueba de hinchazón hiposmótica (HOS).

La tinción supravital se llevó a cabo colocando 10 μL de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos limpio y atemperado a 37 °C, y se mezcló con una gota de solución de eosina-nigrosina (Hycel de México, S.A. de C.V.). Después de haberlos mezclado se realizó un frotis y se dejó secar al aire. Se realizó el conteo de 100 espermatozoides bajo un microscopio óptico con un aumento de 40x, diferenciando aquellos que estaban vivos (blancos) de los muertos (rosas). El porcentaje de espermatozoides vivos se calculó dividiendo la cantidad de espermatozoides vivos contados entre 100 (Iranpour y Valojerdi, 2013; Aitken *et al.*, 2001).

Para la prueba HOS, se preparó una solución de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y fructosa en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, en un tubo de plástico graduado de 14 mL se temperó 100 μL de la solución hipoosmótica por 5 minutos, se agregaron 10 μL de la muestra y se mezcló con una pipeta. Esta solución se incubó a 37° C por

30 minutos, y luego se colocó una gota de la solución en un portaobjetos cubriéndolo con un cubreobjetos. Con el uso de un microscopio óptico se realizó el conteo de 100 espermatozoides, y la hinchazón se identificó por cambios en la conformación de la cola. El porcentaje de células hinchadas se determinó como la cantidad de espermatozoides con la cola hinchada entre 100 (Aitken *et al.*, 2001).

❖ Motilidad

La motilidad fue evaluada mediante la colocación de una gota de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos previamente atemperado a 37 °C y se le colocó un cubreobjeto, y fue llevado al microscopio óptico dónde se observó la motilidad de los espermatozoides y se clasificó en motilidad progresiva a aquellos espermatozoides que se movían en línea recta y no progresiva a aquellos que se movían en un mismo sitio (Aitken *et al.*, 2001).

7.4. *Protocolo de congelación*

En criotubos de 1.5 mL se recuperaron alícuotas de 200 µL de medio con espermatozoides previamente recolectados a una temperatura de 37 °C, y se congelaron por exposición a vapores de nitrógeno líquido (LN₂) durante 10 minutos. Luego de esto, se transfirieron a una canastilla para sumergirlos de forma rápida en el nitrógeno líquido, y finalmente fueron almacenados en el tanque de nitrógeno líquido por una semana.

7.5. *Protocolo de descongelación*

Para la descongelación de los criotubos, estos fueron retirados del nitrógeno líquido y se sostuvieron en el aire durante 10 segundos, e inmediatamente se sumergieron en un baño de agua mantenido a 37.5 °C durante 10 minutos. Asimismo, se temperó en el baño de agua a 37.5 °C 1 mL de medio M2 para cultivo de células embrionarias. Posteriormente, en un tubo plástico graduado de 15 mL se agregó la muestra descongelada y el medio M2 previamente temperado, y la solución fue centrifugada por

10 minutos a 700 rpm. Una vez centrifugado el sobrenadante compuesto por el medio crioprotector y el medio M2 fue eliminado de manera que solo quedara el pellet compuesto por los espermatozoides, el cual fue utilizado para evaluar la viabilidad, concentración espermática y motilidad.

7.6. *Análisis estadístico*

La concentración espermática, viabilidad y motilidad fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el software JMP.

8. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante la realización del Servicio Social en la Unidad de Edición Genética y Criopreservación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM participé en el programa de Producción, cuidado y manejo de animales de bioterio de investigación biomédica con clave 2022-12/89- 2439 realizando las siguientes actividades:

- Cálculos de producción programada e implementación del Método Cinco para reproducción exogámica de ratas y el método para reproducción endogámica de ratas y ratones en el bioterio del IFC, UNAM, así como la selección de progenitores, apareamiento, separación de machos reproductores, diagnóstico de gestación, sexado , ajuste de camadas y selección de críos al destete.
- Manejo de registros de las colonias de rata y ratón del bioterio del IFC, UNAM.
- Aplicación de métodos de identificación permanente (perforaciones, muescas, tatuajes y aretes) en roedores y lagomorfos.
- Manipulación directa de ratas adultas, crías y neonatos Wistar, Long Evans, SHR (espontáneamente hipertensa) y WKY (Wistar-Kyoto), ratón (CD1, C57BL/6, BALB/c) y lagomorfos (Nueva Zelanda).
- Cambio de sustrato y suministro de agua y alimento.
- Aplicación de enriquecimiento ambiental.
- Toma de muestras sanguíneas (vena caudal, vena submaxilar, seno venoso retroorbital, vena safena y cardiocentesis) y vías de administración (oral,

subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa) en roedores y lagomorfos.

- Técnicas de anestesia y manejo del dolor en roedores.
- Realización de cirugías experimentales en roedores como ovariectomía, castración, vasectomía, adrenalectomía, tiroidectomía, esplenectomía, hepatectomía parcial y cuidado postoperatorio.
- Control de enfermedades y realización de necropsias en roedores y lagomorfos.
- Aplicación de métodos de eutanasia autorizados para las diferentes especies de animales de laboratorio.
- Realización de citologías vaginales en rata para determinar la etapa del ciclo estral.
- Preparación de medios para congelar y descongelar espermatozoides de ratón y fertilización *in vitro*, así como elaboración de capilares para la manipulación de ovocitos y embriones.
- Obtención de epidídimos, recolección de espermatozoides de ratón y evaluación (concentración espermática, viabilidad con eosina-nigrosina e hiposmótica y motilidad).
- Congelación y descongelación de espermatozoides de ratón en pajillas y criotubos.
- Aplicación de hormonas para superovulación de hembras, y auxiliar en la realización de vasectomías en ratones.
- Asistencia virtual al curso de Manejo de Animales de Laboratorio en Investigación Biomédica, realizado por la MVZ. Claudia V. Rivera Cerecedo.
- Participación en el curso de Diagnóstico Parasitológico en animales de laboratorio: rata, ratón y conejo, impartido por la Dra. Jimena Otero Negrete en el IFC, UNAM.
- Participación en el Taller de Manejo de Roedores, realizado por la MVZ. Claudia V. Rivera Cerecedo en el cual se orientó a alumnos de la Licenciatura en Neurociencias y Maestría en Ciencias Biomédicas, la manipulación de roedores, técnicas de anestesia, manejo del dolor, vías de administración, métodos de identificación y de eutanasia.

- Asistencia al Curso Latinoamericano de Métodos Alternativos al Uso de Animales de Experimentación en Educación, Investigación e Industria, 2022 realizado en la Facultad de Medicina, UNAM.
- Asistencia virtual a Expo Bioterios Hybrid, 2022 realizado en Medellín, Colombia.

9. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Se cumplió con el objetivo de evaluar un protocolo de criopreservación de espermatozoides de ratón de la cepa C57BL/6 sin embargo, solo se obtuvieron siete muestras ya que el número de animales fue limitado por cuestiones éticas. En estas muestras se pudo evaluar la concentración espermática, viabilidad y motilidad antes y después de la congelación.

10. RESULTADOS

Se obtuvieron siete muestras de espermatozoides de la cepa C57BL/6 de las cuales se evaluó viabilidad usando la tinción supravital eosina-nigrosina y la prueba hipoosmótica antes y después de la congelación. La estadística descriptiva de las pruebas se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Viabilidad determinada mediante tinción y prueba hipoosmótica de espermatozoides de ratón antes y después de la congelación.

Viabilidad espermática (%)	N	Media±D.E	Max.	Min.	C.V.
<i>Tinción supravital</i>					
Antes de congelar	7	76±0.15	90	45	20.4
Después de congelar	4	49±0.16	60	26	33.117
<i>Prueba HOS</i>					
Antes de congelar	7	78±0.12	90	75	14.97 6
Después de congelar	4	58±0.20	60	30	34.57 4

N= Número de muestras; D.E= Desviación Estándar; Max= Máximo; Min= Mínimo; CV= Coeficiente de Variación.

Se determinó que el congelamiento redujo la viabilidad espermática de manera significativa con la tinción supravital ($p=0.024$), sin embargo, no se encontró un efecto significativo de congelamiento sobre la viabilidad espermática utilizando la prueba hipoosmótica.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de la concentración espermática de ratón.

Concentración espermática ($\times 10^6$ spz/mL)	N	Media \pm D.E	Max.	Min.	C.V.
	7	21.14 \pm 4.14	26	14	19.582

N= Número de muestras; D.E= Desviación Estándar; Max= Máximo; Min= Mínimo; CV= Coeficiente de Variación.

Cuadro 3. Motilidad de espermatozoides de ratón antes y después de la congelación.

Motilidad espermática (%)	N	Media \pm D.E	Max.	Min.	C.V.
Antes de congelar	7	81 \pm 0.04	90	80	4.6417
Después de congelar	4	19 \pm 0.03	20	15	13.333

N= Número de muestras; D.E= Desviación Estándar; Max= Máximo; Min= Mínimo; CV= Coeficiente de Variación.

Se determinó que el congelamiento redujo la motilidad espermática de manera significativa ($p<0.0001$) en comparación con la motilidad espermática antes de la congelación.

11. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de viabilidad se mostró una diferencia significativa ($p=0.024$) usando la tinción supravital de eosina-nigrosina después de la congelación, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa con la prueba hipoosmótica.

En cuanto a la concentración espermática, esta fue evaluada en los siete ratones C57BL/6 antes y después de la congelación, donde se obtuvo una media de 21.1×10^6 espermatozoides/mL. De acuerdo con Sztein *et al.*, (1997) encontraron una concentración después de la recolección a 37 °C de 22.3×10^6 espermatozoides/mL, sin embargo, utilizaron machos de la cepa híbrida B6D2F1, la cual es una combinación de la cepa C57BL/6 con la cepa DBA/2J. Sztein *et al.*, (2000) analizaron la concentración de ocho muestras de espermatozoides de ratón de diferentes cepas entre ellas la cepa C57BL/6 recién recolectados donde mostraron concentraciones que oscilaban entre 13×10^6 espermatozoides/mL hasta 45×10^6 espermatozoides/mL. No se han descrito resultados consistentes en concentración espermática ya que suele variar de una cepa a otra. Además, han descrito que después de la congelación y descongelación sólo sobrevive aproximadamente el 60% de la concentración espermática inicial.

Por otra parte, en la prueba de motilidad se mostró una diferencia significativa ($p<0.0001$) ya que disminuyó después de la congelación. En un estudio realizado por Sztein *et al.*, (1997) investigaron el efecto sobre la motilidad en relación con la temperatura de recolección de espermatozoides de ratón y la tasa de congelación y descongelación, encontrando que la motilidad fue máxima después de la recolección a 37 °C con un 80% de motilidad, sin embargo, los espermatozoides descongelados presentaron motilidad del 84% en la fracción móvil.

El uso de leche descremada deshidratada al 3% y rafinosa pentahidratada al 18% ha sido ampliamente usado como agente crioprotector en protocolos de criopreservación de cepas de ratón y ha demostrado ser confiable. Por otro lado, de acuerdo con Yildiz *et al.*, (2007) se ha demostrado que los crioprotectores son factores importantes que afectan la motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática de

espermatozoides de ratón híbrido B6129S1 durante la congelación y descongelación y que la suplementación de glicerol o fructosa a la rafinosa aumenta la motilidad progresiva después de la congelación en comparación con rafinosa sola o combinada con crioprotectores permeables como glucosa o etilenglicol en ratones B6129SF1. Actualmente, en estudios realizados por Takeo y Nakagata (2018), han demostrado que la adición de 100 mM de L-glutamina a la solución crioprotectora de rafinosa pentahidratada al 18% y leche descremada al 3% combinado con una previa incubación de espermatozoides congelados recuperados en un medio que contenía metil- β -ciclodextrina (MBCD) resultaba en una alta tasa de fertilización con espermatozoides descongelados de ratón de la cepa C57BL/6.

12. CONCLUSIONES

El protocolo evaluado en el presente trabajo no dio resultados comparables con los resultados obtenidos de otros estudios, ya que el número de la muestra fue limitado y además de que actualmente se han desarrollado protocolos de congelación de espermatozoides de ratón donde adicionan monotioglicerol o L-glutamina al agente crioprotector y que han demostrado dar mejores resultados para la supervivencia, motilidad y capacidad fertilizante de espermatozoides de ratón después de la congelación.

13. RECOMENDACIONES

Se recomienda adicionar monotioglicerol o L-glutamina al agente crioprotector (CPA), evaluar la supervivencia y motilidad después de la congelación y posteriormente realizar fertilización *in vitro* con espermatozoides descongelados.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken, R., Baker, H., Behre, H., Comhaire, F., Cooper, T., De Jonge, C., Eliasson, R., Farley, T., Griffin, P., Huhtaniemi, I., Kruger, T., Mbizvo, M., Overstreet, J., Sellaro, L., Suominen, J., Waites, G., & Wang, C. (2001). *Recolección y examen del semen humano*. In C. Barratt (Ed.), *Manual de Laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical* (pp. 5–40). Médica Panamericana.
2. Anderson, R.A, Oswald, C., Willis, B.R., & Zaneveld, L.J.D. (1983). *Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice*. *Reproduction*, 68(1), 1–7. DOI:10.1530/jrf.0.0680001
3. Benavides, F.J., & Guénet, J.L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. *Capítulo II. Biología y manejo reproductivo del ratón*. Universidad Alcalá de Henares (Vol. 5). SECAL.
4. Best, B.P. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation research*, 18(5), 422-436.
5. Creasy, D.M., & Chapin, R.E. (Eds.). (2013). *Male Reproductive System*. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 2493–2598. Academic Press. DOI:10.1016/b978-0-12-415759-0.00059-5
6. Hasegawa, A., Yonezawa, K., Ohta, A., Mochida, K., & Ogura, A. (2012). *Optimization of a Protocol for Cryopreservation of Mouse Spermatozoa Using Cryotubes*. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 156–161.
7. Horta, F., Alzobi, H., Jitanantawittaya, S., Catt, S., Chen, P., Pangestu, M., & Temple-Smith, P. (2017). Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 107.
8. Iranpour, F.G., & Valojerdi, M.R. (2013). The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6°C. *Iranian journal of reproductive medicine*, 11(3), 195.
9. Kaneko, T., & Garrels, W. (2020). Reproductive technologies in laboratory animals. *Reproductive Technologies in Animals*, 145-159.

10. Knight, J., & Abbott, A. (2002). *Full house*. *Nature*, 417(6891), 785–786. DOI:10.1038/417785a
11. Knoblaugh, S., & True, L. (2018). Male Reproductive System. In *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas* (pp. 285–286). Academic Press.
12. Landel, P. (2005). Archiving mouse strains by cryopreservation. *Laboratory Animal*, 34, 50–57. DOI: 10.1038/lab0405-50.
13. Lin, Y.W., Hsu, T.H., & Yen, P.H. (2013). Mouse sperm acquire a new structure on the apical hook during epididymal maturation. *Asian journal of andrology*, 15(4), 523-528.
14. National Research Council (US) and Institute of Medicine (US) Committee on the Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. (1988). *Use of laboratory animals in biomedical and Behavioral Research*. National Academy Press.
15. Nakagata, N. (2011). Cryopreservation of Mouse Spermatozoa and In Vitro Fertilization. *Methods in Molecular Biology*, 57–73.
16. Pritchett, K.R., & Taft, R. (2006). Chapter 3. Reproductive Biology of the Laboratory Mouse. *The mouse in biomedical research: normative biology, husbandry and models* (Vol 3). 91-121. Elsevier.
17. Sztein, J.M., Farley, J.S., & Mobraaten, L.E. (2000). *In Vitro Fertilization with Cryopreserved Inbred Mouse Sperm1*. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1774–1780. DOI:10.1095/biolreprod63.6.1774
18. Sztein, J.M., Farley, J.S., Young, A.F., & Mobraaten, L.E. (1997). *Motility of Cryopreserved Mouse Spermatozoa Affected by Temperature of Collection and Rate of Thawing*. *Cryobiology*, 35(1), 46–52. DOI:10.1006/cryo.1997.2024
19. Sztein, J.M., Noble, K., Farley, J.S., & Mobraaten, L.E. (2001). *Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation*. *Cryobiology*, 42(1), 28–39. DOI:10.1006/cryo.2001.2300
20. Sudagar, M., Keivanloo, S., & Hajibeglou, A. (2017). *Effect of different permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of rainbow trout*

- (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Aquaculture International*, 26(1), 75–84.
DOI:10.1007/s10499-017-0192-4
21. Sun, F., Ko, E., & Martin, R.H. (2006). Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 1-5.
22. Takeo, T., & Nakagata, N. (2010a). Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory Animals*, 44(2), 132–137. DOI:10.1258/la.2009.009074
23. Takeo, T., & Nakagata, N. (2010b). Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm. *Journal of Mammalian Ova Research*, 27(3), 70-78.
24. Takeo, T., & Nakagata, N. (2018). Mouse sperm cryopreservation using cryoprotectant containing L-glutamine. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), pdb-prot094516.
25. Takeo, T., Nakao, S., Nakagawa, Y., Sztein, J.M., & Nakagata, N. (2020). Cryopreservation of mouse resources. *Laboratory Animal Research*, 36(1), 1-6. DOI:10.1186/s42826-020-00066-w
26. Treuting, P.M., Dintzis, S., & Montine, K.S. (2017). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press
27. Vásquez, J.H., Gonzáles, J.M., & Pino, J.L. (2012). Decrease in spermatid parameters of mice treated with hydroalcoholic extract *Tropaeolum tuberosum* “mashua”. *Rev. peru. biol*, 19(1), 089-093.
28. Wigger, M., Tröder, S.E., & Zevnik, B. (2021). A simple and economic protocol for efficient in vitro fertilization using cryopreserved mouse sperm. *PloS one*, 16(10), 1-15.
29. Yildiz, C., Law, N., Ottaviani, P., Jarvi, K., & McKerlie, C. (2010). Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress. *Theriogenology*, 74(8), 1420–1430. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010

30. Yildiz, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R., Liu, L., & McKelvie, C. (2007). Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, 133(3), 585-595.