



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

“Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación del semen bovino”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

P R E S E N T A

YAZMIN ELIZABETH FELIPE PEREZ

TUTOR:

DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

DR. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

México, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	Página
INDICE.....	I
Indice de figuras, cuadros y gráficas.....	II
Resumen.....	IV
Abstract	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III. JUSTIFICACIÓN.....	12
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS	14
VI. MATERIALES Y METODOS.....	15
VII. RESULTADOS.....	24
VIII. DISCUSIÓN.....	31
IX. CONCLUSIONES.....	40
X. LITERATURA CITADA.....	41
ANEXO:Cuadros y Gráficas.....	46

INDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRAFICAS

Página

Figura 1. Micrografías electrónicas de cabezas de espermatozoides de bovino con la teca perinuclear expuesta.....	6
Figura 2. Patrón electroforético de las proteínas extraídas de la teca perinuclear en semen fresco y descongelado.....	25
Figura 3. Inmunodetección de actina en el extracto proteico de la TP mediante Western blot.....	26
Figura 4. Inmunodetección de distrobrevina en el extracto proteico de la TP mediante Western blot.....	27
Figura 5. Microscopia electrónica mostrando cabezas espermáticas en diferentes etapas de extracción de las proteínas de la TP.....	28
Figura 6. Espermatozoides que muestran los patrones obtenidos con la tinción de eosina-nigrosina para valorar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en las muestras de semen bovino.....	29
Figura 7. Espermatozoides de bovino que muestran los patrones obtenidos con la triple tinción para valorar la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma.....	30
Cuadro 1. Principales proteínas identificadas en la teca perinuclear en el espermatozoide del bovino.....	9
Cuadro 2. Comparación de la viabilidad espermática de semen fresco contra descongelado mediante la tinción de eosina-nigrosina.....	48
Cuadro 3. Comparación de viabilidad espermática de semen fresco contra descongelado mediante la técnica de triple tinción.....	50
Cuadro 4. Comparación de viabilidad en semen fresco empleando las técnicas de eosina-nigrosina y triple tinción.....	52
Cuadro 5. Comparación de viabilidad en semen descongelado empleando eosina-nigrosina y triple tinción.....	53
Cuadro 6. Comparación de espermatozoides vivos con acrosoma en semen fresco y descongelado.....	56
Cuadro 7. Comparación de espermatozoides vivos sin acrosoma en semen fresco y descongelado.....	58
Gráfica 1. Comparación del número de bandas extraídas de la teca perinuclear del espermatozoide bovino en 8 muestras de semen fresco y descongelado.....	47
Gráfica 2. Comparación del porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado, empleando la técnica de eosina- nigrosina (E-N).....	49
Gráfica 3. Comparación del porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado, empleando la técnica de triple tinción (TT).....	51

Gráfica 4. Comparación de los resultados de viabilidad espermática en semen fresco entre las técnicas de eosina-nigrosina (E-N) y triple tinción (TT).....	53
Gráfica 5. Comparación de los resultados de viabilidad espermática en semen descongelado entre las técnicas de eosina-nigrosina (E-N) y triple tinción (TT).....	55
Gráfica 6. Comparación del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen fresco y descongelado empleando la técnica de triple tinción (TT).....	57
Gráfica 7. Comparación del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma en semen fresco y descongelado empleando la técnica de triple tinción (TT).....	59

Resumen

El uso de semen bovino congelado-descongelado en la inseminación artificial es una práctica que ha venido a ser cada vez más común en los hatos ganaderos; sin embargo varios estudios han reportado que el semen descongelado pierde alrededor del 50% de viabilidad, lo cual se atribuye a los daños que sufren los espermatozoides luego de ser sometidos al proceso de congelación-descongelación. Estudios realizados en semen de bovino comprobaron que los espermatozoides congelados-descongelados sufren daños morfológicos en la teca perinuclear (TP). La TP se divide en dos regiones, la subacrosomal y la postacrosomal; cuya densidad y composición proteica es variable. Forma parte de la región postacrosomal una subestructura (sTP) la cual ha sido empleada como marcador morfológico de la TP, en el espermatozoide bovino se observa como un cinturón en forma de grecas cuadradas que rodea la zona ecuatorial de la cabeza espermática. Los daños observables en la sTP postcongelación van desde la pérdida en la continuidad de su arquitectura hasta la ausencia total, existiendo una correlación entre el número de espermatozoides con TP alterada o ausente y el número de espermatozoides muertos. Varias proteínas conforman a la TP del espermatozoide bovino, no obstante hasta el momento no se ha reportado el daño que el proceso de congelación-descongelación ocasiona sobre éstas, por lo que el objetivo planteado en el presente estudio fue comprobar si existe una relación entre el daño morfológico observado en la TP de espermatozoides descongelados y la posible alteración de las proteínas que la conforman. Mediante la técnica de separación de proteínas en geles de electroforesis SDS-PAGE, se observó que existen diferencias en los patrones de bandeo del extracto proteico de la TP de espermatozoides frescos y descongelados. Empleando la técnica de detección de proteínas con anticuerpos Westernblot, se observó que entre las proteínas de la TP que están siendo mayormente alteradas por el proceso de congelación-descongelación se encuentran actina y distrobrevina. Las observaciones en microscopía electrónica de la TP en espermatozoides de bovino descongelados corroboraron los resultados de estudios previos respecto al daño morfológico que se observa en la sTP de espermatozoides descongelados. Se concluye que el proceso de congelación-descongelación produce alteraciones en algunas proteínas que conforman la TP del espermatozoide bovino, haciéndolas más susceptibles a la extracción, dicha alteración podría estar relacionada con el daño morfológico observado en la TP del espermatozoide descongelado.

Palabras clave: espermatozoide bovino, viabilidad espermática, teca perinuclear, proteínas.

Abstract

The use of frozen-thawed bull semen for artificial insemination has become to be a common practice among herd cattle, however, many studies have reported that there is about a 50% viability loss in frozen-thawed semen, which is attributed to the damage sperm suffer after been exposed to the freezing and thawing process. Studies done on bull semen proved that frozen-thawed sperm suffer morphologic damage at the perinuclear theca (PT). The PT is divided in two regions, the subacrosomal and the postacrosomal, and has a variable density and proteinic composition. A substructure (PTs) which has been used as a morphologic marker of the PT, constitutes a part of the postacrosomal region, in the bull sperm it can be observed as a belt of square frets surrounding the equatorial segment of the sperm head. Observable damages in the PTs after freezing and thawing range from the loss of continuity to the total absence of its architecture, and there is a relation between the number of sperm with altered or absent PT and the number of dead sperm. Many proteins constitute the bull sperm PT, nevertheless, up to the moment there are no reports on the damage that the freezing-thawing causes on them, so the objective set in the present study was to prove if there is a relation between the morphologic damage observed in the PT of frozen-thawed sperm and the possible alteration of its constituent proteins. Using the protein separation method of electrophoresis SDS-PAGE, differences were observed in the band patterns of the PT proteic extract of fresh and frozen-thawed sperm. Furthermore, by the Westernblot technique to identify proteins with antibodies, it was observed that actin and dystrobrevin are found among the PT proteins that are being majorly altered by the freezing-thawing process. Electron microscopy observations of the PT from frozen-thawed bull sperm corroborated the results from previous studies referring to the morphologic damage observed in the PTs of frozen-thawed sperm. In conclusion, the freezing and thawing process causes alteration of some proteins that constitute the PT of the bull sperm turning them more sensible to the extraction, this alteration could be related to the morphologic damage observed in the frozen-thawed sperm PT.

Key words: bull sperm, sperm viability, perinuclear theca, proteins.

I. Introducción

La tecnología desarrollada para aplicar la inseminación artificial en animales de granja ha tenido un enorme impacto a nivel mundial, dando pie al desarrollo de otras técnicas como la criopreservación, el sexado espermático, la transferencia embrionaria entre otras; sin embargo, la mayor aceptación y empleo de ésta se ha logrado en el ganado bovino (Foote, 2002).

Desde el siglo pasado se ha implementado la inseminación artificial en la especie bovina, lo cual ha permitido eliminar el peligro y costo del mantenimiento de los sementales en las instalaciones pequeñas, reducir la transmisión de enfermedades venéreas, y ha sido de gran utilidad para el mejoramiento genético (De Alba, 1993; Foote, 2002), al diseminar efectivamente las características genóticas deseables de toros probados (Rodríguez-Martínez, 2000).

Varios países europeos han logrado implementar el uso de la inseminación artificial hasta en un 100% en el ganado lechero; sin embargo y a pesar de la preparación de técnicos especializados, y de la inversión de recursos para lograr un proceso adecuado para la criopreservación del semen, no se han logrado obtener altos índices de fertilidad, así como el emplear un menor número posible de células espermáticas para producir un mayor número de dosis (De Alba, 1993; Valencia et al., 1986).

La congelación de semen tiene por objeto preservar la viabilidad y capacidad fecundante de las células espermáticas postcongelación, manteniéndolas en un estado de letargo metabólico a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, para que al momento de ser utilizado durante la inseminación artificial se pueda lograr una fertilización exitosa.

En la actualidad se inseminan más de 150 millones de hembras vacunas al año en todo el mundo (Rodríguez-Martínez, 2000), empleando aproximadamente 30 millones de células espermáticas por dosis de semen congelado en bovinos, considerando que solo se obtendrá el 50% de células viables para ser depositados en las hembras bovinas (De Alba, 1993).

Varios estudios en semen descongelado han demostrado que el mayor daño producido por el proceso de congelación-descongelación ocurre principalmente en la membrana plasmática (Flores, 2005; Watson, 1995; Nobles, et al., 1997; Neild, et al., 2003), no obstante, hasta el momento ningún autor ha podido correlacionar ésta alteración con la pérdida de viabilidad espermática (Martínez, 2003).

El citoesqueleto espermático debe mantener la presión osmótica regulando el volumen del líquido intracelular; sin embargo esta función se altera durante el proceso de congelación y descongelación (Petrunkina, et al., 2004).

Estudios de microscopía electrónica realizados en semen fresco y descongelado de bovino han demostrado que en el citoesqueleto de la cabeza espermática, específicamente en la teca perinuclear sufre daños morfológicos producidos por el proceso de congelación-descongelación, determinado que existe una correlación negativa entre espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides que presentan grave daño morfológico en la teca perinuclear, cuya subestructura está ausente (Martínez, 2003).

En la cabeza espermática el principal elemento citoesqueletico es la teca perinuclear (TP), la cual envuelve al núcleo, se conforma de varias proteínas cuya localización sugiere que participan en varias funciones, incluyendo la de brindar estabilidad a las membranas de la cabeza espermática durante la fertilización (Oko, 1995).

Trabajos experimentales realizados por Petrunkina y col. (1994), han propuesto que la pérdida en la viabilidad de las células espermáticas podría estar asociada a la pérdida de proteínas estructurales del citoesqueleto de la cabeza o de la TP, ocasionados principalmente durante el proceso de descongelación (Martínez, et al. 2006).

El presente estudio tiene por objeto evaluar bioquímicamente a las proteínas que conforman la TP del espermatozoide del bovino en semen fresco y descongelado, para probar si existe relación entre el daño observado en la TP de espermatozoides descongelados y la alteración de las proteínas estructurales que conforman la TP.

II. Antecedentes

Criopreservación del Semen

Siendo la congelación una técnica ampliamente usada para la preservación espermática a largo plazo, en la última década se han desarrollado varias pruebas, a nivel de campo se emplea la motilidad en masa y el movimiento progresivo, además de la tinción de eosina-nigrosina para determinar el porcentaje de viabilidad espermática; mientras que a nivel de laboratorio se han desarrollado técnicas más complejas que incluso requieren de sofisticados programas de computación para detectar la integridad estructural, morfológica y funcional de la membrana plasmática y membrana acrosomal, de tal manera que el porcentaje de células con reacción acrosomal después de la criopreservación ha sido empleada como un parámetro para evaluar la función espermática y la respuesta a la criopreservación en varias especies, incluyendo al bovino (Petrunkina, et al., 2004).

Uno de los principales cambios asociados con la baja viabilidad espermática postcongelación es la notable disminución de la motilidad (Rodríguez-Martínez, 2000). Los daños sufridos en las células espermáticas por el proceso de criopreservación van desde una disminución en la motilidad (Squires, et al., 2004), hasta alteraciones en la membrana plasmática (Flores, 2005) y daños estructurales en el citoesqueleto espermático o teca perinuclear (Martínez, 2003). La viabilidad espermática que se pierde mediante el proceso de congelación-descongelación representa un elevado porcentaje que oscila del 40 al 50%, pese al empleo de crioprotectores como el glicerol; que es ampliamente usado en el proceso de criopreservación de semen bovino (Squires, et al, 2004), cuya finalidad es brindar protección a la membrana plasmática y evitar la formación de cristales intracelulares (Flores, 2005).

Petrunkina y col. (2004), afirman que durante el ciclo de congelación-descongelación se generan importantes gradientes osmóticos a través de la membrana plasmática y que la muerte celular ocurre principalmente durante el descongelado, por lo que sugiere que la respuesta espermática al reto osmótico (medido como volumen celular), puede ser indicativo de la sobrevivencia e integridad funcional de la membrana después de la criopreservación.

Drevious (1972), señala que las células espermáticas se comportan como osmómetros perfectos, que se hinchan en respuesta a condiciones hipotónicas, resultado de la activación de transporte de iones (Petrunkina, et al., 2004).

Así mismo, existe evidencia de que el citoesqueleto juega un papel importante en la detección inicial y en la transducción de la señal de cambio de volumen en varios tipos celulares, como en el caso de los espermatozoides de cerdo y perro (Petrunkina, et al.2004, 2005).

Teca perinuclear

La teca perinuclear es un verdadero citoesqueleto de la cabeza espermática, con una densidad variable y cuya organización arquitectónica se encuentra recubriendo al núcleo casi en su totalidad, excepto en la zona de inserción con el cuello (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999, Mújica, et al., 2003, Martínez, 2003). Esta se divide en dos regiones: la capa subacrosomal, situada por debajo de la membrana acrosomal interna, y la capa postacrosomal, localizada caudalmente y forma un cáliz que rodea la porción entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática, excepto en la inserción del flagelo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999; Mújica, et al., 2003) (Figura 1).

En los límites entre la región postacrosomal y el segmento ecuatorial de la teca perinuclear se localiza la subestructura de la TP (sTP) (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999); también denominada por otros autores como subsegmento

ecuatorial (Ellis, 2002), forma una especie de anillo y su arquitectura es especie específica; en el espermatozoide del cobayo se observa como una hilera de filamentos delgados que semejan las pestañas de un párpado (Mújica, et. al., 2003), en el espermatozoide del cerdo forma una cadena de eslabones (Gutiérrez-Pérez, 2006), mientras que en el espermatozoide del bovino y ovino la subestructura conforma una línea de grecas (Martínez, 2003).

La subestructura ha sido empleada como un marcador morfológico de la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide (Juarez-Mosqueda y Mújica, 1999).

Martínez (2003), mediante microscopia electrónica evaluó la TP de espermatozoides de bovino, tanto en semen fresco como descongelado, encontrando que se produce un daño a la sTP después del proceso de congelación-descongelación que se incrementa hasta en un 52.5%. Las alteraciones observadas en la TP van desde cambios en la morfología de la subestructura, hasta la pérdida total de la misma (Figura 1). De igual modo, encontró que existe una correlación negativa entre el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides con sTP ausente.

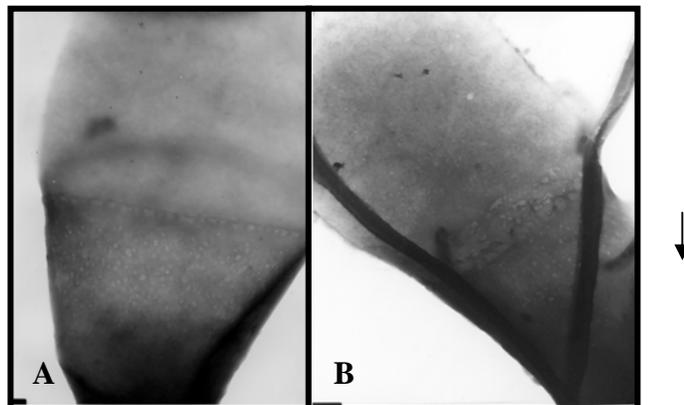


Figura 1. Micrografías electrónicas de cabezas de espermatozoides de bovino con la teca perinuclear expuesta.

A) Muestra la teca perinuclear de un espermatozoide de semen fresco, la flecha señala la subestructura intacta. B) Muestra la teca perinuclear de un espermatozoide de semen congelado-descongelado, la flecha señala la subestructura dañada. (Martínez, 2004; Martínez, et al., 2006)

Composición proteica de la teca perinuclear

La teca perinuclear (TP) del espermatozoide de los mamíferos está compuesta por varias proteínas que se caracterizan por su resistencia a la extracción con detergentes neutros y soluciones amortiguadoras altas en sal (ver cuadro 1), algunas de las cuales son comparables con el citoesqueleto de la células somáticas (Mújica, et.al. 2003).

Las proteínas del citoesqueleto encontradas en las células somáticas han sido ampliamente estudiadas. Entre los componentes principales se encuentran filamentos formados por monómeros de actina, microtúbulos formados por dímeros de α y β tubulina y filamentos intermedios cuya estructura es diferente a los anteriores, y dependiendo del tejido pueden estar formados por vimentina, desminas, queratinas, entre otras (Alberts, et al., 2002).

Mientras que en los espermatozoides de los mamíferos se reporta la existencia de las siguientes proteínas:

Actina de 43 kD, se localiza en la región postacrosomal de la TP del conejo y del bovino; en el espermatozoide del conejo en la mitad anterior, y en las dos terceras partes en del bovino (Flaherty, et al., 1986).

Calicina de 60 kD, se localiza exclusivamente en la región postacrosomal de la TP del bovino y tiene gran afinidad por actina (Longo, et al, 1987).

Calmodulina de 17 kD, ha sido identificada en la región postacrosomal de la TP de los espermatozoides del carnero, conejo, hamster, rata, ratón, mono, humanos y cobayos (Kanh, et al, 1991).

CP β 3 (por sus siglas en inglés, proteínas capeadoras) de 31 kD y CP α 3 de 33.74 kD, se ubican en la región postacrosomal o cáliz de la TP del espermatozoide del bovino y del humano (Von Bülow, et al., 1997).

Cilicina I y II de 74 y 53 kD respectivamente, fueron localizadas en la región postacrosomal del espermatozoide del bovino y del humano (Hess y col., 1993,1995).

MBP (por sus siglas en inglés, polipéptidos de bandas múltiples) de 56 a 74 kD, se han identificado distribuídas en toda la TP en espermatozoides de rata y toro (Longo, et al., 1987).

PERF 15 de 15.5 kD, se ubica en la región subacrosomal o perforatorium de la TP y es el componente más abundante de la TP de la rata y el ratón (Oko and Morales, 1994; Mújica, et al. 2003). Oko (1995), logró la clonación y secuenciación en su totalidad del polipéptido mayor de la TP, de 15 kD, el cual contiene 132 residuos de aminoácidos, y se le dio el término de PERF 15, debido a su localización en el perforatorium (región subacrosomal) del espermatozoide de ratón.

Arp T1 y Arp T2 (por sus siglas en inglés, proteínas relacionadas con actina) de 40 kD, se localizaron en el cáliz de espermátides del ser humano y del bovino (Heid, et al., 2002). Estudios realizados por Heid y colaboradores (2002), identificaron al componente proteico perteneciente a la familia de proteínas relacionadas con actina (Arp), Arp-T1 y Arp-T2, nombradas como T por la ubicación testicular en los espermátides del bovino, es decir, solo se localizaron en espermatozoides inmaduros. Además, mediante geles bidimensionales identificaron una proteína del cáliz o región postacrosomal cercana a los 40 kD, cerca del punto isoeléctrico (PI) de 5, el cual se ubica muy próximo a la proteína Arp-T2 del ser humano, cuyo PI es de 5.28, y la proteína Arp-T1 cuyo PI es de 6.32. Oko y Maravei

(1994,1995) identificaron alrededor de 20 polipéptidos en la TP del espermatozoide bovino, de los cuales 6 fueron los más prominentes con un peso molecular de 60, 36, 32, 28, 25,15.5 kD, se encuentran distribuidos en toda la TP; aunque no de manera uniforme, siendo el polipéptido de 15.5 kD exclusivo de la región subacrosomal (Mújica, et al. 2003).

Otros estudios realizados por Van Der Hoorn y col. (1990), Burfeind y Hoyer-Fender (1991), indican que las proteínas comprometidas con los elementos citoesqueléticos tienen muy poco parecido con las proteínas citoesqueléticas de las células somáticas, las cuales derivan de un juego de genes que son expresados únicamente durante el proceso de espermatogenesis, siendo la mayoría de proteínas sintetizadas durante la fase haploide.

Cuadro 1. Principales proteínas identificadas en la teca perinuclear en el espermatozoide del bovino. (Mújica, et al., 2003)

Proteína	Región de Localización	Peso Molecular kD	Referencias
Proteínas Solubles en alcalis	Subacrosomal y Postacrosomal	25-60	Oko y Maravei 1994
Polipéptidos Múltiples	Subacrosomal y Postacrosomal	56-74	Longo, et al 1987
Técinas	Subacrosomal y Postacrosomal	50 y 48	Bellvé, et al 1990
Proteína Soluble en álcalis (PERF 15)	Subacrosomal	15.5	Oko y Maravei 1994
Actina	Postacrosomal	43	Flaherty, et al 1986,1988
Calicina	Postacrosomal	60	Longo, et al 1987
CP α 3	Postacrosomal	31	Von Bülow, et al 1997
CP β 3	Postacrosomal	33.74	Von Bülow, et al 1997
Cilicina I y II	Postacrosomal	74 y 53	Hess, et al 1993,1995

Por otro lado, aunque no directamente en citoesqueleto, estudios recientes de Delgado-Buenrostro, et al., 2005, han identificado en espermatozoides de cobayo un grupo de proteínas de la familia WASp que funcionan como moléculas adaptadoras que reclutan al complejo Arp 2/3, mismo que produce la nucleación de filamentos de actina (Weaver, et al., 2003).

Mientras que en la región subacrosomal de la TP del cobayo Hernández-González detectó la proteína distrobrevina de 66 kD. Las distrobrevinas pertenecen a la familia de las distrofinas, las cuales se encuentran en varios órganos como proteínas citoesqueléticas asociadas a la membrana. Las distrofinas están comprometidas con el mantenimiento de dominios funcionales, al organizar un complejo que une el citoesqueleto con la matriz extracelular a través de un complejo proteico de distrofinas, la pérdida de distrofinas conlleva al desensamble de dicho complejo y culmina en degeneración muscular, enfermedad conocida como distrofia muscular de Duchenne (Hernández-González, 2001).

Algunas funciones atribuibles a la TP

Heid, y col. (2002) indican que durante la diferenciación espermática han localizado en la TP a las proteínas Arp-T1 y Arp-T2 las cuales están involucradas con el modelamiento morfogénico de la cabeza espermática; sin embargo, falta encontrar con qué moléculas del cáliz se asocian.

Okó (1995) propuso que las proteínas de la teca perinuclear juegan un papel importante en la unión, extensión y anclaje del acrosoma a la envoltura nuclear durante la espermiogénesis, basado en la capacidad de unión a lípidos caracterizada en el polipéptido de 15 kD,.

Petrunkina y col. (2004) indica que la red de microfilamentos (formada por actina F) parece ser importante en la regulación del volumen celular espermático, lo anterior fue demostrado al someter células espermáticas de verraco a condiciones iso e hipotónicas con citocalasina D.

La importancia que tiene la TP en el proceso de fertilización se evidencia en las investigaciones de Courtens (1976), Lalli y Clermont (1981), Oko y Clermont (1991), las cuales afirman que la TP es la principal barrera que impide la descondensación de la cromatina espermática, por lo que una función importante atribuible a la TP es también la protección del material genético.

Brener y col. (2003) han reportado que en el espermatozoide del bovino, la inhibición de formación de actina F con citocalasina D, impide o bloquea la capacitación espermática.

Sutovsky y col. (1997), comprobaron *in vivo* que al impedir la interacción de las proteínas de la TP con las microvellosidades del ovocito mediante la microinyección de espermatozoides intactos de toro dentro de ovocitos maduros, la TP no es desensamblada y consecuentemente no ocurre la descondensación nuclear.

Mientras que *in vitro* al bloquear la acción de las microvellosidades de la corteza del ovocito (empleando citocalasina B que rompe filamentos de actina), con la TP del espermatozoide, tampoco ocurre la descondensación del material genético (Sutovsky, et al., 1997).

Por lo anterior Sutovsky y colaboradores (1997) sugieren que la unión de la TP con las microvellosidades del ovocito y la remoción de la teca por éstas estructuras ovocíticas, constituye un paso temprano de la fertilización, previo a la conversión del núcleo espermático en el pronúcleo masculino.

III. Justificación

Aún cuando varios autores consideran a la membrana plasmática como el principal organelo que se daña por el proceso de congelación-descongelación, dicha alteración no ha sido correlacionada con la pérdida de viabilidad espermática; sin embargo en semen congelado-descongelado se ha determinado que existe una correlación negativa entre espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides que presentan grave daño morfológico en la TP cuya subestructura esta ausente. Lo cual hace necesario evaluar si existe relación entre el daño morfológico que sufre la TP por el proceso de congelación-descongelación y la posible alteración de las proteínas que la conforman.

IV. Hipótesis

El daño ocasionado a la teca-perinuclear del espermatozoide bovino debido al proceso de congelación-descongelación esta asociado con la alteración de las proteínas estructurales de la TP.

V. Objetivos

General:

- Caracterizar bioquímicamente las alteraciones que se producen por el proceso de congelación-descongelación sobre las proteínas de la TP del espermatozoide bovino.

Específicos:

- Evaluar la viabilidad espermática empleando técnicas de tinción supravitales en semen fresco y descongelado.
- Observar la integridad de la TP en espermatozoides frescos y descongelados.
- Extraer las proteínas de la TP del espermatozoide bovino a partir de semen fresco y descongelado.
- Realizar la separación proteica del extracto de la TP tanto de semen fresco como descongelado.
- Identificar por lo menos una de las proteínas extraídas de la TP del espermatozoide bovino mediante inmunodetección.
- Verificar si existe una relación entre el daño estructural en la TP producido por la congelación-descongelación con las proteínas extraídas de la TP.

VI. Materiales y Métodos:

Diseño experimental

Se obtuvieron muestras de semen de 8 sementales bovinos de la raza Holstein, los cuales se encuentran sexualmente activos y cuyo semen se procesa rutinariamente dentro del Centro de Procesamiento de semen RECA, ubicado en el km 23.2 de la carretera a Chichimequillas, Santa María Begoña, El Marqués, Querétaro.

Cada muestra de los eyaculados obtenidos fue sometida a los mismos tratamientos bioquímicos tanto en fresco como en descongelado, es decir antes y después del proceso de congelación.

Los tratamientos a los que se sometieron las muestras de semen fueron los siguientes:

- Evaluación de la viabilidad espermática y estado acrosomal con las tinciones de eosina-nigrosina (E-N) y triple tinción (TT).
- Preparación de muestras para microscopía electrónica.
- Decapitado espermático y separación de cabezas
- Exposición de teca perinuclear
- Preparación de muestras para observarlas por microscopía electrónica
- Extracción de proteínas de la teca perinuclear con el Compartmental Protein Extraction Kit (Chemicon).
- Separación del extracto proteico de la teca perinuclear mediante geles de electroforesis SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio - geles de poliacrilamida).
- Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-rad).
- Identificación proteica mediante inmunodetección Western blot (anticuerpos policlonales anti-actina de conejo de Santa Cruz, borrego-

anti-conejo de los laboratorios Jackson, anti-distrobrevina de Transduction Lab y el Western blot kit de quemitoluminiscencia ECL del laboratorio Amersham, Biosciences).

Después de preparar las muestras con las diferentes tinciones se procedió a contar 100 células por duplicado en cada laminilla, realizando los conteos en diferentes campos visuales (Martínez, 2003). Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística T de Student para datos pareados, estableciendo una confianza del 95%, empleando el paquete estadístico Minitab.

Obtención y evaluación de semen

El semen se obtuvo mediante una vagina artificial cuya temperatura osciló entre los 40 a los 42°C, lo anterior fue realizado por personal capacitado del mismo centro de procesamiento de semen.

Una vez que se obtuvo la muestra de semen en el tubo colector se le realizó la evaluación macro y microscópica dentro del laboratorio, también por el personal del mismo centro. Primero la muestra se incubó en un baño María a 35°C, se tomó una alícuota de semen con una micropipeta para evaluar la motilidad en masa y movimiento progresivo, únicamente se procesaron muestras con valores por arriba de 2.5 y 70% de ambos parámetros respectivamente. La concentración espermática se realizó con un espectrofotómetro colorimétrico (Calibration of Bausch & Lomb Spectronic 20), tomando 100 µl de semen diluido en 7.5 ml de solución salina fisiológica, de lo anterior se obtuvo una lectura que luego se comparó con la tabla de conversión y mediante una base de datos en la computadora se realizó el cálculo de dosis para congelar cada eyaculado, conteniendo una concentración de 45 millones por pajilla.

Adicionalmente se tomó una alícuota de cada muestra de semen fresco, a la cual se le realizaron las tinciones vitales de eosina-nigrosina y triple tinción descrita por Martínez, 2003 (Talbot y Chacón, 1981; Vázquez y Carriosa, 1980) las cuales se realizaron dentro del mismo laboratorio de RECA. Las mismas técnicas de evaluación se realizaron al semen congelado una semana después, en el laboratorio del Departamento de Morfología de la FMVZ, UNAM.

Congelamiento y descongelamiento de semen

La congelación de semen se realizó empleando la técnica de dos pasos (De Alba, 1993, Valencia, et al., 1986). Para lo cual, como primer paso el semen fue diluido con el 50% de leche descremada y antibióticos (70mg de lincomicina, 125mg de gentamicina y 5ml de estreptomina/L de leche), se colocó dentro de la cámara fría en una camisa con agua a 35°C durante 4 horas como periodo de equilibrio, adicionando cada 20 minutos el segundo diluyente, éste último además de lo antes descrito contenía glicerol al 8%, posteriormente se realizó el envasado automático del semen diluido en pajillas de 0.5ml conteniendo 45 millones de espermatozoides. Finalmente las pajillas se introdujeron dentro de bastones con capacidad para 10 pajillas, posteriormente fueron colocadas y llevados dentro de un cubo metálico sin fondo hacia la congeladora automática que contiene una centrífuga que dirige los vapores de nitrógeno hacia los bastones, logrando reducir la temperatura de 4° hasta -196 °C en tan sólo 3 minutos. Una vez terminado el proceso de congelación, los bastones fueron guardados en tanques con nitrógeno líquido para su posterior empleo.

El semen se descongeló en el laboratorio de Morfología una semana después de haber sido procesadas, se utilizaron 3 pajillas para el tratamiento de extracción proteica. Las pajillas se descongelaron introduciéndolas en un baño María a 35°C durante 20 segundos.

Preparación de muestras para microscopia electrónica

Tanto las muestras de semen fresco como las de semen descongelado fueron fijadas para su procesamiento por microscopia electrónica antes y después del proceso de extracción de proteínas de la TP, para lo cual se separaron alícuotas con 35 millones de cabezas espermáticas resuspendidas en solución salina fisiológica (SSF), (NaCl 154 mM), mismas que fueron fijadas en solución Karnowsky en relación 1:1 (v:v). Para retirar el fijador de las muestras, éstas se lavaron 3 veces con SSF mediante centrifugación a 800g por 3 min, posteriormente fueron lavadas otras 3 veces con agua destilada filtrada y la pastilla final fue resuspendida en agua destilada filtrada en su volumen inicial. Se tomaron alícuotas de 100 µl de cada muestra y se colocaron sobre rejillas de cobre de 300 mesh cubiertas con membrana de colodión-carbón, después de 10 minutos en los que se dejó sedimentar a las cabezas espermáticas, se retiró el exceso de muestra con tiras de papel filtro. Sobre las rejillas que contenían la muestra adsorbida se colocó una gota de ácido fosfotúngstico al 0.01% durante 3 min para realizar la tinción negativa, posteriormente se retiró el exceso de ácido con tiras de papel filtro y se enjuagó cada rejilla pasándola por una gota de 100 µl de agua destilada filtrada, para luego secar las rejillas sobre papel filtro y almacenarlas en un portarejillas hasta su observación al microscopio electrónico. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss M9 perteneciente al Departamento de Patología de la FMVZ, de la UNAM.

Extracción de las proteínas de la teca perinuclear

Lavado de semen

Con la finalidad de retirar el plasma seminal y el diluyente, todas las muestras fueron diluidas en SSF a 35 °C, sometidas a centrifugación y resuspendidas nuevamente en SSF, las muestras de semen fresco fueron procesadas en el centro de procesamiento de semen empleando una centrifuga de ángulo fijo con

una fuerza de gravedad fija de 3500 rpm por 3 min. Mientras que las muestras de semen descongeladas en el laboratorio del Departamento de Morfología fueron centrifugadas a 1500 rpm por 3 min.

Decapitado espermático

Se dislocaron las cabezas de los flagelos empleando el método mecánico de jeringueo, para ello la muestra con 135 millones de espermatozoides diluidos en 3 ml de agua destilada adicionada con 40 μ l de un preparado comercial de inhibidores de proteasas fueron pasados a través de una aguja hipodérmica calibre 21gx35mm, hasta completar ciclos de 200 pases (un ciclo comprende la succión y la expulsión del total de la muestra resuspendida en SSF través de la jeringa), para lo cual se emplearon jeringas desechables de 3cc.

Exposición de la teca perinuclear

Una vez que los espermatozoides fueron decapitados se procedió a exponer la TP, para ello se utilizó el detergente Brij 36 T al 10% (concentración final 1.2%), incubando las muestras con 140 μ l/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con SSF para quitar los residuos de membrana y el detergente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 3 minutos y posteriormente se resuspendieron en la misma solución.

Obtención de cabezas espermáticas

Esta se realizó resuspendiendo la pastilla de las muestras decapitadas y con la TP expuesta en SSF y centrifugando la suspensión a 3500 rpm durante 3 minutos, logrando separar las cabezas de los flagelos mediante 6 lavados consecutivos, La técnica se basó en el diferente el coeficiente de flotación de los flagelos, de tal manera que se obtuvo aproximadamente el 70% de cabezas puras.

Extracción de las proteínas citoesqueleticas de la cabeza espermática

Una vez que se logró obtener el precipitado o pastilla conteniendo una concentración de 97 millones de cabezas espermáticas con la TP expuesta, se le agregó 1 ml de la solución del kit comercial de extracción de proteínas identificado como Buffer C (Chemicón), adicionado con 10µl del inhibidor de proteasas 1X del mismo kit. Se dejó actuar sobre la muestra durante 20 min, en agitación constante a 4°C. Inmediatamente después, la muestra fue sometida a centrifugación durante 1 hr a 4000 rpm dentro de una centrífuga marca Hermle Z300.

Para precipitar las proteínas el sobrenadante obtenido se colocó en un tubo de ensayo conteniendo acetona pura fría en relación 2:1, y se mantuvo a -20 °C. La pastilla obtenida fue resuspendida en 2 ml de la solución identificada como Buffer W, manteniéndola en agitación constante a 4° C durante 6 min y de inmediato la suspensión se sometió nuevamente a centrifugación durante otra hora a 4000 rpm. El sobrenadante obtenido se mezcló con el anterior y se dejó a -20 °C durante 18 h para que las proteínas de la TP se precipitaran. Posteriormente la muestra de proteínas se centrifugó a 2500 rpm en una centrífuga clínica durante 1 h para separar la acetona. Después se decantó la acetona y las proteínas se resuspendieron en 100 µl de agua destilada filtrada, guardando 30 µl del extracto proteico de TP en un tubo de plástico ependorf para su posterior cuantificación proteica mediante el método de Lowry.

El resto del extracto proteico se resuspendió en 130 µl de amortiguador de muestra para electroforesis y se hirvió durante 4 min a 95 °C.

Cuantificación de proteínas extraídas de la TP

El extracto de proteínas de la TP se diluyó en 100 µl de agua destilada, de esta suspensión se tomaron 30 µl para realizar la cuantificación de proteínas empleando el método de Lowry.

Separación del extracto proteico de la teca perinuclear

Las proteínas obtenidas de la extracción de la TP fueron separadas de acuerdo al peso molecular de las mismas mediante electroforesis, de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970), se colocaron 30 µl por carril de cada muestra resuspendida en el amortiguador de muestra, empleando geles de poliacrilamida al 12%, además se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad), cargando 5 µl de marcadores por gel. Primero se dejó que las proteínas migraran en el gel concentrador (4%) durante 20 min a 50 v, y una vez alineadas sobre el gel separador (12%) se incremento el voltaje a 100 v durante 2:30 – 2:45 hrs, todo esto en la cámara fría a 4 °C.

Finalmente los geles se revelaron mediante la tinción de plata y se determinó el peso molecular relativo de cada banda proteica del extracto de TP.

Identificación de las proteínas de la teca perinuclear

Para lograr la identificación proteica se empleó la técnica de inmunodetección en papel de nitrocelulosa por Western bot, para lo cual se emplearon eyaculados completos, utilizando la mitad para el extracto proteico de TP de semen fresco y dejando el resto para el extracto de TP de semen congelado (aproximadamente 500 millones de espermatozoides para cada muestra). Primeramente se hizo la extracción proteica como se menciona anteriormente, mientras que para la separación de las proteínas por electroforesis, el extracto se resuspendió en 80 µl de amortiguador de muestra y se corrió bajo las condiciones antes mencionadas. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa. La transferencia se realizó empleando membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) a 75 mA durante 17 hrs a 4 °C en amortiguador de transferencia (glicina, tris base, metanol y agua destilada). Después se corroboró la

transferencia de las proteínas a la membrana por la tinción de las mismas con rojo de Ponceau. Para realizar la identificación proteica se destiñó la membrana mediante repetidos lavados con agua destilada, luego las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución de bloqueo [PBS-TRITONX100 (pH 7.4) al 1% con 5% de leche en polvo descremada (Svelty)]. Transcurrido el tiempo del bloqueo se realizaron 5 lavados con PBS-TRITON X100 al 1% de 5 min cada uno a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron anticuerpos policlonales de conejo contra actina (Santa Cruz) (1:100) diluidos en la solución de bloqueo y se dejó incubar en agitación constante a temperatura ambiente durante toda la noche (aprox 16 hrs). Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-TRITONX100 al 1% de 5 min cada uno y se colocaron los anticuerpos secundarios dirigidos contra el primero (cabra anti conejo, Jackson) unidos a peroxidasa, a razón de 1:10,000 también diluidos en la solución de bloqueo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con agitación constante. Las membranas de nitrocelulosa nuevamente fueron lavadas 5 veces en PBS-TRITONX100 al 1%. Posteriormente, la reacción fue revelada por el método de quimioluminiscencia, para ello se colocó el sustrato de la peroxidasa del kit quimioluminiscente ECL (Western blot system, Amersham Biosciences) sobre la membrana con PBS-TRITONX100 al 1%, dejándolo actuar durante 2 minutos bañando con éste la membrana constantemente.

A continuación la membrana fue colocada dentro de una bolsa de acetato en el interior de un chasis o casete para placas radiogáficas, sobre la membrana envuelta en el acetato se colocó el negativo radiográfico (X-omat, Kodak) y se cerró el chasis o casete. La quimioluminiscencia resultado de la interacción de la peroxidasa con el sustrato ECL luego de 15 a 30 min de exposición con el negativo, permitió observar las bandas de actina después de revelar los negativos radiográficos.

Adicionalmente se realizó la técnica de stripping o desnudamiento de membrana sobre la membrana de nitrocelulosa que fue empleada para la detección de actina, con lo que se retiraron los anticuerpos que ésta contenía para posteriormente detectar la presencia de la proteína distrobrevina en el extracto de TP de espermatozoides de semen fresco y descongelado, aplicando la misma técnica descrita para la detección de actina.

Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas T de student para datos pareados se aplicaron a los resultados de los conteos celulares de las pruebas vitales y del estado acrosomal de E-N y TT mediante el uso del paquete estadístico MINITAB™ Release versión 13.1, así como la prueba T de student para diferencia de medias que se empleó para comparar los resultados de ambas pruebas.

Los datos para los conteos espermáticos analizados tanto en semen fresco como en semen descongelado de los 8 eyaculados se realizaron en 4 observaciones a cada uno (n=32), contando 100 células por laminilla en diferentes campos.

Para los experimentos de inmunodetección de las proteínas se consideró como positiva la identificación proteica al observarse el mismo patrón continuamente en 3 repeticiones de diferentes muestras.

VII. RESULTADOS

Electroforesis del extracto proteico de la TP

El patrón electroforético reveló un número importante de bandas polipeptídicas, dentro del rango de 14 a 45 kD en el semen fresco se observó un promedio de 4 bandas y en el rango 11 a 45 kD en el semen descongelado se observó un promedio de 7 bandas. A pesar de que los patrones de bandeado no siempre fueron consistentes, el número de bandas observadas siempre fue mayor en los extractos provenientes del semen descongelado, presentando en promedio 3 bandas más que el los del semen fresco 43, 25 y 11 kD (Figura 2).

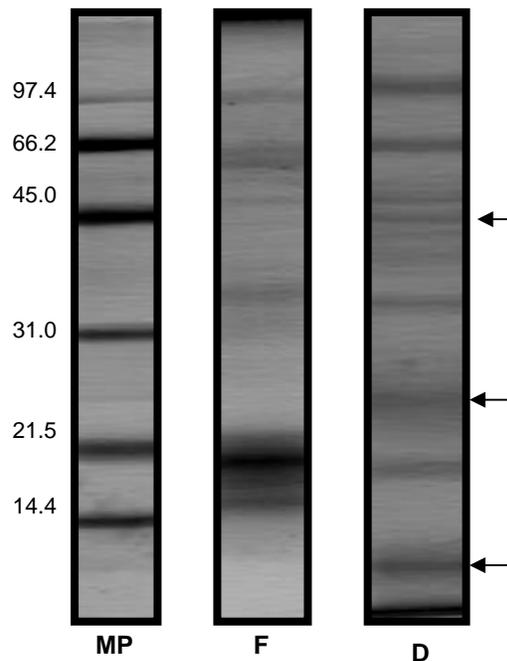


Figura 2. Patrón electroforético de las proteínas extraídas de la teca perinuclear en semen fresco y descongelado

La barra marcada con MP muestra los marcadores de peso. La barra marcada con la letra F muestra las bandas proteicas extraídas de la teca perinuclear del semen fresco. La barra marcada con la letra D muestra las bandas proteicas extraídas de la teca perinuclear del semen descongelado. Las flechas señalan las bandas proteicas que se observan solamente en el extracto de la teca perinuclear del semen descongelado, las cuales no aparecen en el extracto de la teca perinuclear del semen fresco.

Mientras que dentro del rango de 48 a 99 kD se observó un promedio de 4 bandas en ambos extractos de la TP. De igual modo algunas bandas proteicas extraídas de la TP de espermatozoides de semen descongelado se observaron con mayor intensidad que en el extracto de semen fresco siendo ubicadas en 99, 66 y 11 kD

Identificación de proteínas presentes en la teca perinuclear

Actina

La técnica de inmunodetección por Western blot realizada en el extracto proteico de la TP de espermatozoides frescos y descongelados empleando el anticuerpo contra actina identificó una banda proteica de 43.6kD en la muestra de semen descongelado (Figura 3), no así en la muestra de semen fresco. Sin embargo en ambos geles se reconocieron bandas cercanas a los 48, 53 y 60kD.

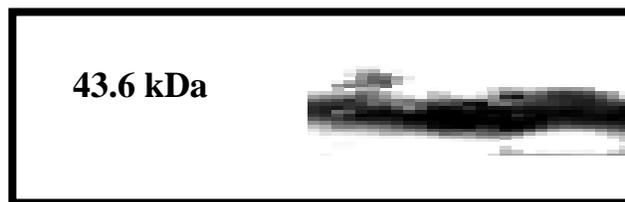


Figura 3. Inmunodetección de actina en el extracto proteico de la TP mediante Western blot
Banda de actina detectada en la línea de los 43.6 kDa en las muestras del extracto proteico de la TP de semen descongelado. En el extracto de la TP de semen fresco no se detecto actina.

Distrobrevina

La técnica de inmunodetección por Western blot realizada en el extracto proteico de la TP de espermatozoides frescos y descongelados empleando el anticuerpo contra distrobrevina emitió luminiscencia sobre la banda de 66kD tanto en la muestra de semen descongelado como en la muestra de semen fresco; sin embargo se observó mayor intensidad en la banda de la muestra de semen descongelado. El anticuerpo contra distrobrevina también se detecto en otras bandas por arriba de los 45 kDa en ambas muestras, (Figura 4).

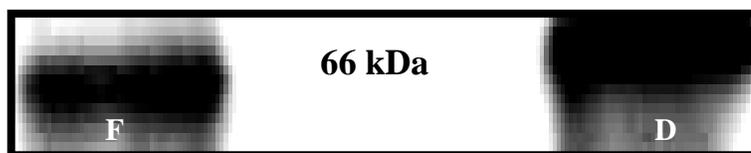


Figura 4. Inmunodetección de distrobrevina en el extracto proteico de la TP mediante Western blot

El extracto de TP de semen fresco se observa en la barra marcada como F, donde el anticuerpo anti distrobrevina detecto una banda proteica cercana a los 66 kDa. En la barra marcada como D se muestra el extracto de TP de semen descongelado, donde el anticuerpo anti distrobrevina detecto una banda proteica cercana a los 66 kDa la cual se observa con mayor intensidad que en el extracto de semen fresco.

Evaluación ultraestructural

Se realizó el monitoreo de la morfología de la teca perinuclear durante diferentes etapas de la extracción de sus proteínas (Figura 5), estableciéndose que en el semen descongelado, a los 20 min de exposición a la solución Buffer C, más 6 min de exposición a la solución Buffer W, se logró extraer completamente a las proteínas de la teca perinuclear, dejando desnudo al núcleo espermático; pero sin provocar su descondensación, con lo que se aseguró que el extracto proteico analizado no contuviera proteínas nucleares. Mientras que en semen fresco, aún incrementando el tiempo de exposición a la primer solución (Buffer C) hasta 25 min, además de los 6 min de exposición a la segunda solución (Buffer W), la extracción de las proteínas de la teca perinuclear no fue total. Derivado de estos resultados se decidió extraer ambas muestras con el mismo tiempo de extracción, que fue fijado con las soluciones de extracción a 20 y 6 min respectivamente.

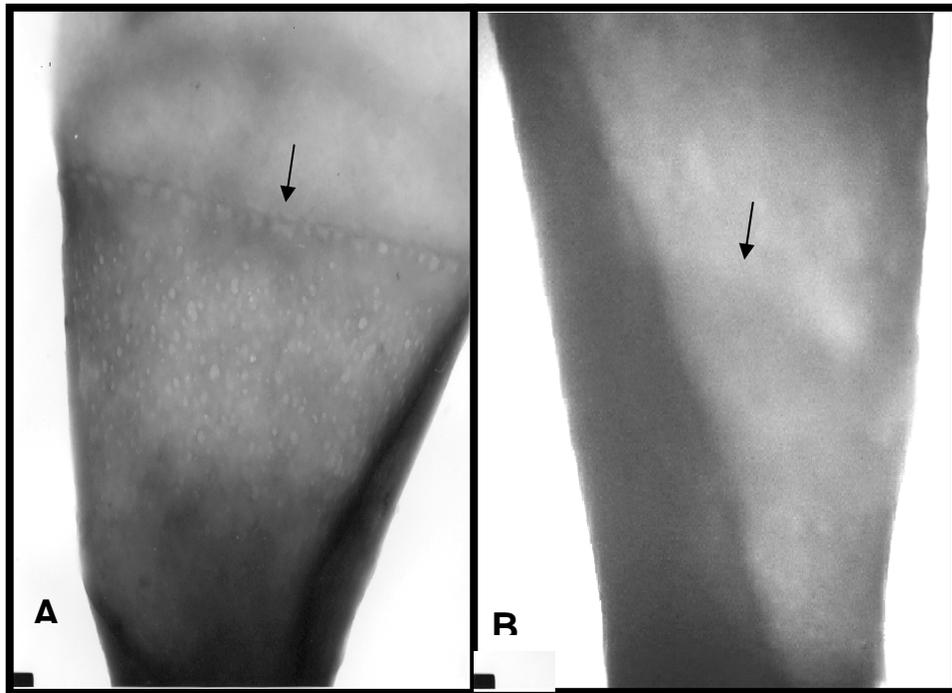


Figura 5. Microscopia electrónica mostrando cabezas espermáticas en diferentes etapas de extracción de las proteínas de la TP

A) Muestra una cabeza espermática con la teca perinuclear expuesta, antes de ser sometida al proceso de extracción proteica, la flecha señala la ubicación de la subestructura. B) Muestra una cabeza espermática con el núcleo desnudo, después de haber sido expuesta al proceso de extracción de la teca perinuclear, la flecha señala el sitio donde estuvo la subestructura. Barra 500 nm.

Cuantificación del extracto proteico de la TP

Por el método de cuantificación de proteínas de Lowry aplicado a las muestras de semen fresco y descongelado, al utilizar una concentración espermática de 135×10^6 , se obtuvieron concentraciones de cabezas espermáticas de aproximadamente 97×10^6 , de las cuales se obtuvo un promedio de $81.6 \mu\text{g}$ de proteínas extraídas de la TP en semen fresco y $144.1 \mu\text{g}$ en semen descongelado.

Viabilidad celular

Empleando la tinción de eosina-nigrosina (E-N), en semen fresco se obtuvo el 74% de viabilidad espermática y el 41% en semen descongelado ($P= 0.000$), (Figura 6, Cuadro 2, Gráfica 2).

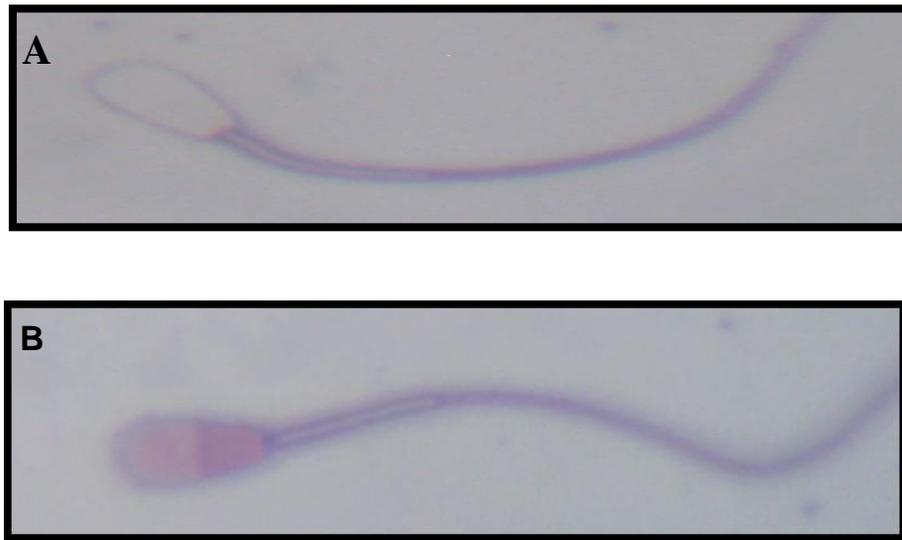


Figura 6. Espermatozoides que muestran los patrones obtenidos con la tinción de eosina-nigrosina para valorar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en las muestras de semen bovino

A) Espermatozoide vivo, se observa de color claro debido a que su membrana está intacta y no absorbió el colorante sobre el fondo oscuro. B) Espermatozoide muerto, se observa de color violeta debido a que su membrana está alterada y absorbió el colorante.

Empleando la triple tinción, se observó una diferencia significativa en el porcentaje total de espermatozoides vivos, siendo del 83.16% en semen fresco y 37.25% en semen descongelado ($P=0.000$) (Figura 7, Cuadro 3, Gráfica 3).

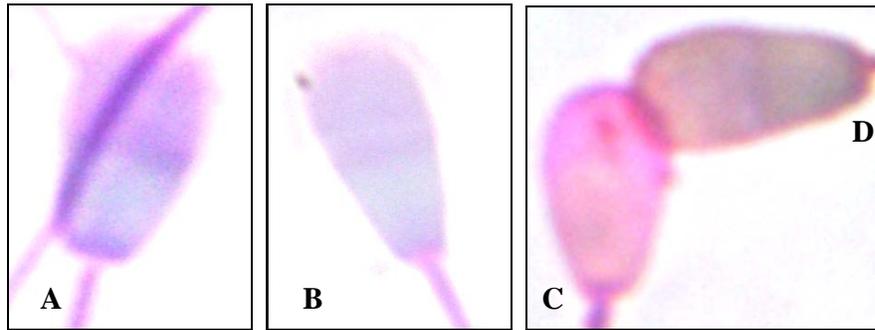


Figura 7. Espermatozoides de bovino que muestran los patrones obtenidos con la en la triple tinción para valorar la viabilidad espermática y la integridad del acrosoma

A) Se observa un espermatozoide muertos con acrosoma, donde la región postacrosomal se tiñó de color azul y el acrosoma de color rosa. B) Se observa un espermatozoide muertos sin acrosoma, donde la región postacrosomal se tiñó de color azul y el acrosoma se observa claro. C) Se observa un espermatozoide vivo con acrosoma; donde la base de la región postacrosomal se tiñó ligeramente de café y el acrosoma de color rosa. D) Se observa un espermatozoide vivo sin acrosoma; donde la base de la región postacrosomal se tiñó ligeramente de color café y el acrosoma se observa claro.

Al comparar los resultados de ambas técnicas de tinción, se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen fresco, siendo el resultado de la técnica de E-N de 74.88%, y el de la triple tinción de 83.16%, (Cuadro 4, Gráfica 3). Mientras que al comparar el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen descongelado se obtuvo el 41.69% con la tinción de E-N y 37.25% con la triple tinción ($P=0.041$), (Cuadro 5, Gráfica 5).

Existe diferencia significativa en la comparación del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma empleando la técnica de triple tinción, la cual fue del 74.88% en el semen fresco y del 33.41% en el semen descongelado ($P=0.000$), (Cuadro 6, Gráfica 6).

Mientras que la diferencia en los datos obtenidos del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma empleando la técnica de triple tinción fue del 8.75% en el semen fresco y 3.84% para los espermatozoides del semen descongelado ($P=0.040$) (Cuadro 7, Gráfica 7).

VIII. DISCUSIÓN

El núcleo espermático se encuentra rodeado por una basta y compleja estructura proteica, la teca perinuclear, cuyas proteínas se caracterizan por su resistencia a la extracción con detergentes neutros y amortiguadores altos en sales (Longo, et al., 1987); no obstante, el proceso de criopreservación es capaz de alterar al citoesqueleto espermático, especialmente a la TP (Watson, 1995; Nobles, 1997; Martínez, 20003, 2006, Gutiérrez, 2006; Petrunkina, 2004, 2005)

Electroforesis del extracto proteico de la TP

El resultado de la extracción de proteínas de la teca perinuclear de espermatozoides de bovino en semen fresco y descongelado concuerda con lo reportado por diversos autores respecto a la termosensibilidad de las proteínas del citoesqueleto (Petrunkina, 2004, 2005, Watson, 1995, Hall, 1993), por lo que sus proteínas constituyentes podrían estar siendo alteradas por el proceso de congelación-descongelación y por ello que se observó un mayor número de bandas proteicas en el semen descongelado.

En este estudio se encontraron bandas proteicas con pesos moleculares menores a los reportados para las proteínas mayoritarias que componen a la teca perinuclear en el espermatozoide del bovino. Oko y Maravei (1994), reportan que entre las proteínas más prominentes encontradas en la TP del espermatozoide bovino la de más bajo peso molecular es una de 15.5kD. En el presente trabajo se reportan proteínas con pesos cercanos a los 11kD; no obstante, los mismos autores reportan que mediante el método de extracción que ellos emplearon, al analizar las proteínas por SDS-PAGE obtuvieron bandas polipeptídicas de al menos 20 aa, y no descartan la posibilidad de que la teca perinuclear del bovino pueda estar constituida por otras proteínas de mayor o menor peso molecular (Oko y Maravei, 1994). Sin embargo, es importante notar que el método de

extracción empleado por los autores mencionados fue diferente, ya que ellos emplearon soluciones alcalinas (NaOH y NaCl), mientras que en el presente trabajo se empleo un kit comercial de extracción (Compartmental Protein Extraction kit, Chemicon), el cual contiene: HEPES, MgCl₂, KCl, EDTA, sacarosa, glycerol, y ortovanadato sódico.

Las bandas proteicas encontradas en el rango de 14 a 45 kD coinciden con los reportes de proteínas que se encuentran formando parte de la TP del bovino como la Perf 15 de 15.5 kD (Oko y Maravei, 1994), proteínas solubles en álcalis de 25 a 60 kD(Oko y Maravei, 1994), CP α 3 de 31 kD, CP β 3 de 34.74 kD (Von B[ulow, et al., 1997) y actina de 43 kD (Flaherthy, et al., 1986, 1988).

Mientras que dentro de las proteínas encontradas en el rango de 48 a 99 KD se reporta la existencia de MBP de 56 a 74 kD (Long, et al., 1987), Cilicina I de 74 kD y Cilicina II de 53 kD (Hess, 1993,1995).

Por otra parte, de manera importante, se encontró que existe una extracción diferencial de los componentes de la TP entre el semen fresco y descongelado. Estos resultados confirman que el proceso de congelación-descongelación al que se somete el semen bovino, produce alteraciones en las proteínas que conforman a la TP. Posiblemente al fragmentarse las proteínas de la TP durante el proceso de congelación-descongelación una de las proteínas cuya conformación está siendo alterada sean los microfilamentos (actina F) y como consecuencia de esto se pierda la continuidad de la subestructura de la TP como lo refiere Martínez (2003), y a que se pierde la fuerza de soporte en la arquitectura de ésta estructura con la consecuente fragilidad de la misma. Lo anterior confirma lo reportado por Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), quienes encontraron que la subestructura del espermatozoide del cobayo se encuentra estabilizada por actina F.

Los daños producidos sobre la TP por el proceso de congelación-descongelación podrían repercutir directamente sobre la funcionalidad espermática, tal como lo afirman los trabajos de Noiles, et al., (1997) y Storey, et al., (1998), cuyos experimentos en espermatozoides de ratón, demostraron que la permeabilidad de la membrana plasmática depende en gran medida del citoesqueleto espermático.

Los resultados observados tanto en los patrones de bandeo como la diferencia en la intensidad resultado de las proteínas extraídas de la TP de espermatozoides frescos y descongelados, podrían explicarse debido a que las proteínas que conforman a la TP están sufriendo un fraccionamiento aleatorio producido por el proceso de congelación-descongelación; por lo tanto no siempre pudieron ser observados patrones de bandeo con la misma intensidad.

La diferencia en el patrón proteico observado en las electroforesis de los extractos de la TP del semen fresco y del descongelado, podrían traducirse en alteraciones funcionales de las células espermáticas descongeladas, lo anterior lo respaldan las investigaciones de autores como Sutovsky (2003), Mújica (2003) y Gutiérrez (2006) entre otros que señalan que la TP podría ser el reservorio potencial de varias proteínas involucradas en diversos procesos de vital importancia durante la fertilización, como lo es la señalización, la activación del huevo y la descondensación nuclear.

Identificación de proteínas presentes en la teca perinuclear

Actina

Una de las proteínas que forman parte de la teca perinuclear es actina, la cual se ha propuesto juega un papel importante en la estabilidad y mantenimiento de dominios funcionales en la membrana plasmática (Luna y Hit, 1992); además de mantener la estabilidad de la subestructura de la TP (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999), forman parte importante del citoesqueleto espermático (Mitchison y Cramer, 1996).

En el presente trabajo, mediante la técnica de Westernblot, una banda de 43.6 kD fue identificada por anticuerpos monoclonales anti-actina en el extracto de semen descongelado, aunque también se identificó en 3 diferentes bandas proteicas del extracto de la TP; lo cual sugiere que se observó reacción cruzada con otras proteínas.

En el extracto proteico de la TP del semen fresco no se observó la banda de actina en la marca de los 43.6 kD; no obstante fue detectada en las bandas de 48, 53 y 60 kD las cuales se observaron con mayor intensidad en el extracto de semen fresco que en el descongelado. Lo anterior podría sugerir que la disociación de actina de la TP es producida por el proceso de congelación-descongelación y se traduce en una alteración estructural de ésta proteína, como lo sugieren investigaciones realizadas por Petrunkina y col. (2004, 2005).

Distrobrevina

Investigaciones realizadas por González-Hernández y col. (2001), mediante inmunodetección lograron identificar a la proteína distrobrevina tanto en el citoesqueleto del flagelo como en la región subacrosomal de la TP del espermatozoide del cobayo. La distrobrevina forma parte de la familia de las distrofinas, las cuales se caracterizan por participar con proteínas que forman complejos proteicos unidos a proteínas citoesqueleticas que se encargan del

mantenimiento de los dominios funcionales de la membrana plasmática (González-Hernández, et al., 2001).

La proteína distrobrevina fue localizada en la banda de los 66 kDa del extracto proteico de la TP tanto de espermatozoides frescos como descongelados, sin embargo se observó con mayor intensidad en el descongelado, lo cual podría indicar que el proceso de congelación-descongelación hace a esta proteína más sensible a la extracción. El hallazgo de distrobrevina en la banda de 66 kD coincide con lo reportado por Hernández –González (2001) en el espermatozoide del cobayo.

Sin embargo, el anticuerpo empleado contra distrobrevina tuvo reacción cruzada en contra de bandas peptídicas ubicadas por arriba de los 45 kDa.

Hasta el momento no existían reportes de la localización de esta proteína en el espermatozoide del bovino, por lo que su detección en el presente estudio podría dar lugar al desarrollo de futuras investigaciones respecto a la función que la distrobrevina tiene dentro de la TP, así como a los procesos de señalización que se requieren para que esta proteína sea funcional.

Al analizar en forma conjunta los resultados obtenidos podríamos sugerir que existe una estrecha relación entre el daño estructural ocasionado por el proceso de congelación-descongelación del semen bovino que sufre la TP y la alteración de las proteínas que la conforman.

Dentro de las proteínas que están siendo alteradas por el proceso de congelación-descongelación en la teca perinuclear del espermatozoide bovino se encontró actina y distrobrevina, por lo que se sugiere realizar estudios más profundos sobre su dinámica y esclarecer la manera en que los daños que estas sufren interfieren con otros procesos relacionados con la fertilización, como la capacitación y

reacción acrosomal, debido a que actina y distrobrevina se relacionan con otras proteínas de membrana (González-Hernández, et al., 2001; Delgado-Buenrostro, et al.,2005).

Evaluación ultraestructural

Los resultados de las observaciones realizadas mediante microscopia electrónica en semen fresco y descongelado de la TP, son consistentes con los reportados por Martínez (2003), al manifestarse la pérdida en la continuidad de las grecas que forman la sTP perinuclear del espermatozoide bovino de semen descongelado, que incluso desaparecen por completo en un gran número de espermatozoides. Así mismo existe evidencia de que en otras especies el daño post congelación de la TP se refleja en un aumento de STP alteradas como lo reporta Martínez (2003,2006) en el espermatozoide del bovino y Gutiérrez (2006) en el espermatozoide del cerdo.

Se observó que el método de extracción de proteína empleado en el presente estudio, resultó más eficaz en el semen descongelado que en el fresco aún exponiendo éste último a periodos de extracción por más tiempo, lo cual indica que efectivamente el proceso de congelación y descongelación sensibiliza o altera a las proteínas que conforman la teca perinuclear.

Cuantificación del extracto proteico de la TP

La cantidad de proteína extraída de la TP del semen fresco (81.6 µg) fue menor que en el semen descongelado (144.1 µg), lo cual concuerda con las observaciones realizadas mediante microscopia electrónica, en las cuales se observó que las cabezas espermáticas de semen descongelado la TP se extrajo por completo, no así en el descongelado, donde se observó un pequeño remanente de la estructura proteica de la TP.

Viabilidad celular

El proceso de criopreservación espermática resulta en una reducción de la tasa de fertilidad en comparación con el uso de semen fresco para la inseminación artificial de diversas especies, lo anterior es consecuencia de la pérdida de viabilidad y funcionalidad de la población que sobrevive a la congelación-descongelación (Watson, 2000), por lo que es importante realizar un buen protocolo de criopreservación, para optimizar el número de células viables pero también evaluar la capacidad fertilizante de la población espermática sobreviviente.

Existen varios métodos de evaluación de la viabilidad del semen, y entre los que mayormente se emplean se encuentra el uso de la tinción eosina-nigrosina; sin embargo, al comparar los resultados obtenidos de ésta técnica contra los obtenidos mediante la técnica de triple tinción, no sólo se encontró que existe diferencia estadística significativa ($P = 0.004$) en los resultados de espermatozoides vivos de ambas, sino que además el uso de la triple tinción ofrece la posibilidad de obtener resultados mas confiables y de mayor utilidad, como lo es el conocer el porcentaje de espermatozoides que además de la viabilidad también conservan el acrosoma intacto, lo cual es un requisito absoluto para que se de la fertilización (Delgado-Buenrostro, et al., 2005, Bedford et al., 1990). Garde y col (1992) emplearon y adaptaron la técnica de triple tinción para evaluar el semen ovino, y compararon los resultados con los obtenidos mediante la aplicación de otras técnicas, de lo cual concluyeron que la técnica de triple tinción presenta ventajas sobre otros métodos de valoración del acrosoma y puede emplearse para evaluar la viabilidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides sometidos a distintos procesos de conservación.

Los resultados apoyan a los reportados por Garde y col (1992), en cuanto a las ventajas que ofrece la técnica de triple tinción, cuya importancia reside en que en

años recientes, evaluar el nivel de células con reacción acrosomal después de la criopreservación ha sido utilizado como un parámetro para evaluar la función espermática en respuesta a la criopreservación en espermatozoides de humanos, caninos, equinos y bovinos (Peña, et al., 1999, 2001, 2003; Januskauskas, et al., 2000; Rathi, et al., 2001) .

En las muestras de los eyaculados que se evaluaron en el presente trabajo se encontró que existe una diferencia estadística altamente significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto ($P= 0.000$), ya que en el semen fresco se obtuvo una media de 74.88%, contra 33.41% en el semen descongelado, lo cual representa el 41.47% menos de espermatozoides con capacidad fertilizante. Los resultados obtenidos difieren de los obtenidos por Martínez (2003), quien encontró una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto cercano al 20% ($P<0.05$). Además, contrario a lo reportado por Martínez (2003), se comprobó que la técnica de eosina-nigrosina puede ser una herramienta útil en la detección de células vivas de semen bovino, al diluir la muestra de semen con la tinción a 35° C, evitando que el manejo de la muestra a temperaturas menores provoquen la muerte espermática por shock térmico y que esto interfiera con los resultados observados.

Aún cuando la técnica de triple tinción ofrece mayores ventajas comparada con otras técnicas, y permite determinar el porcentaje de espermatozoides que a conservan tanto la viabilidad como el acrosoma intacto, tiene el inconveniente de no determinar el estado de capacitación de los espermatozoides, lo cual sería importante evaluar, puesto que los espermatozoides capacitados tienen un promedio de vida menor y muy posiblemente no alcancen a llegar al sitio de fertilización cuando sean introducidos dentro del tracto genital de la hembra durante la inseminación artificial.

Lo anterior significa que el número de espermatozoides descongelados capaces de fertilizar al ovocito es aún menor al 33.41% que pudo determinarse mediante el uso de la técnica de triple tinción en el presente trabajo.

Cabe mencionar que durante la evaluación microscópica, en varias de las muestras ya sea teñidas mediante la triple tinción observadas en semen descongelado se encontraron cabezas espermáticas sueltas, lo cual podría indicarnos que el proceso de congelación-descongelación también incrementa la susceptibilidad de los espermatozoides a ser decapitados con procesos simples como la centrifugación, y aún cuando en condiciones naturales los espermatozoides no se someten a éste tipo de tratamientos, el hallazgo podría indicarnos que existen otras estructuras citoesqueleticas del espermatozoide, además de la TP que están siendo dañadas por el proceso de congelación-descongelación.

La importancia de haber realizado las tinciones para cuantificar la viabilidad espermática radica en que se aseguró que todas las muestras empleadas estuvieran dentro de los parámetros mínimos de calidad requeridos para el uso de semen bovino descongelado en la inseminación artificial y una vez garantizada la calidad del semen se procedió a realizar el tratamiento de extracción de la teca perinuclear.

IX. CONCLUSIONES

- El daño observado en la teca perinuclear del espermatozoide bovino por el proceso de congelación-descongelación de semen está relacionado con alteraciones que sufren las proteínas que la conforman.
- En espermatozoides de bovino sometidos a congelación-descongelación, las proteínas de la TP son más susceptibles al proceso de extracción, lo cual sugiere que dicho proceso altera a las proteínas de la TP.
- El mayor número de bandas proteicas observadas en el extracto de la teca perinuclear de los espermatozoides del bovino descongelados indican que existe una clara alteración con el posible fraccionamiento de las proteínas al ser sometidas al proceso de congelación-descongelación.
- Entre las proteínas de la teca perinuclear del espermatozoide del bovino que están siendo alteradas por el proceso de congelación descongelación se encuentran actina y distrobrevina.
- Además de las proteínas de la teca perinuclear, es posible que otras estructuras proteicas como el complejo que forma la pieza de conexión entre la cabeza y el flagelo espermático del bovino, estén siendo dañadas por el proceso de congelación-descongelación.
- Las alteraciones sufridas por los gametos masculinos de los bovinos por el proceso de congelación-descongelación resultan en una gran reducción tanto del porcentaje de viabilidad como de la conservación de la capacidad fecundante de aquellas células que logran sobrevivir a dicho proceso, como lo muestran nuestros resultados de triple tinción.

X. LITERATURA CITADA

Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. The molecular biology of the cell. 4th edition, Garland Science, 2002

Bedford JM, Germ cells and fertilization. Reproduction in mammals, austin and Short Ed. Cambridge University Press, 1990;1:128-163.

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J & Brivio MF. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. Biol Reprod. 2003; 68: 837-845.

Burfeind R and Hoyer-Fender S. Sequence and developmental expression of a mRNA encoding a putative protein of rat sperm outer dense fibers. Dev Biol. 1991; 148: 195-204.

Courtens J L, Courot M, flechon J. The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. J Ultrastruct Res. 1976; 57:54-64.

De Alba J. Reproducción animal. La prensa medica mexicana. México, D.F 1993.

Delgado-Buenrostro NL, Hernández-González EO, Segura-Nieto M, Mújica a. actin polymerization in the ecuatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. Mol Reprod and Develop 2005.; 70: 198-210.

Drevious L O. Bull spermatozoa as osmometers. Journal of Reproduction and Fertility. 1972; 28: 29-39.

Ellis D. J. Post-testicular dt of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. J. Struct. Biol. 2002; 138, 187-198.

Flaherty S P, Winfrey V P, Olson G E. Localization of actin in human, bull, rabbit and hamster sperm by immunoelectron microscopy. Anat Rec. 1986; 221: 599-610.

Flores HF. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Maestría. FMVZ, Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx, 2005.

Foot RH. The history of artificial insemination; Selected notes and notables. American Society of Animal Science 2002; 1-10.

Fouquet J and Kann M. The cytoskeleton of mammalian spermatozoon. *J Biol Chem.* 1994; 278:32, 29471-29477.

Garde J, García AC, Gutiérrez A, Vázquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med Vet* 1992; 9:1-6.

Gutiérrez O. correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis de Maestría. FMVZ. UNAM, México, D.F. 2006.

Hall S M, Evans J, Hawthorth S G. Influenced of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 1993; 32359-368.

Heid H, Finge U, Winter S, Kuhn C, Zimbelman R, and Franke W. (2002). Novel Actin Related Proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the Mammalian Sperm Heads. *Experimental Cell Research.* 279, 177-187.

Hernández-González E O, Martínez-Rojas D, Mornet D, Rendon A, Mújica A. Comparative distribution of short dystrophin superfamily products in various guinea pig spermatozoa domains. *Eur J Cell Biol.* 2001; 80: 792-798.

Hess H, Heid H, Frank WW. Molecular characterization of mammalian cilycin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1993; 122: 1044-1052.

Hess H, Heid H, Zimbelman R, Franke WW. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads, the identification and characterization of cilycin II. *Exp Cell Res.* 1995; 218: 174-182.

Juárez-Mosqueda ML y Mujica A. A perinuclear substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J. Struct Biol* 1999; 128, 225-236.

Kann M L, Feinberg J, Rainteau D, Dadoune J P, Weinman S, Fouquet J P. Localization of calmodulin in perinuclear structures of spermatids and spermatozoa: a comparison of six mammalian species. *Anat Rec.* 1991;230: 481-488.

Lalli M and Clermont Y. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am J Anat.*1981;160: 319-343.

Longo F. Basic Proteins of the Perinuclear Theca of mammalian spermatozoa. *Biol. Cel.* 1987; 81, 89-93.

Luna E J, Hitt A L. Cytoskeleton-plasma membrana interaction. *Science*. 1992; 258: 955-964.

Martínez C. Efecto del Congelamiento y Descongelamiento sobre la Teca Perinuclear del espermatozoide de bovino. Tesis de Licenciatura. FMVZ. UNAM, México, D,F 2004.

Martínez CO, Juárez-Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Criopreservation of bull sperm results in alteration of the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006 (artículo en prensa).

Mitchison TJ, and Cramer LP. Actin-Based cell Motility and Cell locomotion. *Cell* 1996;604:371-379.

Mújica A. et al. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Research and Technique*. 2003; 61, 76-87.

Neild D M, Gadella B M, Cháves M G , Miragaya M H, Colenbrander B, Agüero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2003; 59: 1693-1705.

Noiles EE, Tompson KA, Storey BT. Water permeability of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 1997; 35: 79-92.

Oko R. Developmental Expression and Posible Role of Perinuclear Theca Proteins in Mammalian Spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7, 777-97.

Oko R. Occurrence and formation of citoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrología*. 1998; 30, 193-206.

Oko R and Clermont Y. Origin and distribution of perforatorial proteins during spermatogenesis of the rat: an inmunocytochemical study. *Anat Rec*. 1991; 230:489-501.

Oko R., and Maravei R. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1994; 50, 1000-1004.

Oko R and Morales C R. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev Biol*. 1994; 166: 235-245.

Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*. 1999; 52: 965-980.

Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil*. 2001; 57: 371-376.

Peña AI, Luguilde LL, Barrio M, Herradon PG, Quintela LA. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration in dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2003; 59: 1725-1739.

Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction*. 2004; 127: 105-115.

Petrunkina AM, Gröper B, Töpfer-Petersen, Günzel-Apel AR. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a Freezing extender. *Theriogenology*. 2005; 63: 1390-1406.

Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*. 2001; 65: 462-470.

Rodríguez-Martínez H. Evaluación de semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *IVIS 2000*; 1-5.

Senger P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 1st revised ed. Washington, USA. 1999.

Squires E., Keith S., Graham J. Evaluation for protective cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2004; 62: 1056-1065.

Storey BT, Noiles E, Tompson KA. Comparación of glycerol, other polyols, threose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 1998; 37: 46-58.

Stovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G. The Removal of the Sperm Perinuclear Theca and Its Association with the Bovine Oocyte Surface during Fertilization. *Developmental Biology*. 1997; 188: 75-84.

Talbot P and Chacón R. A triple staining technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool*. 1981; 215: 201-208.

Valencia J, Galina C, Stiel A. Inseminación artificial en reproducción de animales domésticos. Ed. Noriega Editores, Limusa, México. 1986.

Van Der Hoorn F S, Tarnasky H A, Nordeen S K. A new rat gene RT7 is specifically expressed during spermatogenesis. *Dev Biol.* 1990; 142: 147-154.

Vázquez J, Carriosa J. Identificación del estado del acrosoma y viabilidad de los espermatozoides por una técnica de triple tinción. 4as Jornadas Internacionales de Reproducción animal e Inseminación Artificial. Leon Comunicaciones. 1981; 35-38.

Vincent C, Proliere G, Pajot-Augy E, Cmpion E, Garnier V, Renard J. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one cell rabbit embryos. *Cryobiology* 1990; 27: 9-23.

Von Bülow M, Rackwitz H R, Zimbelmann R. Franke WW. Cp β 3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res.* 1997; 233: 216-224.

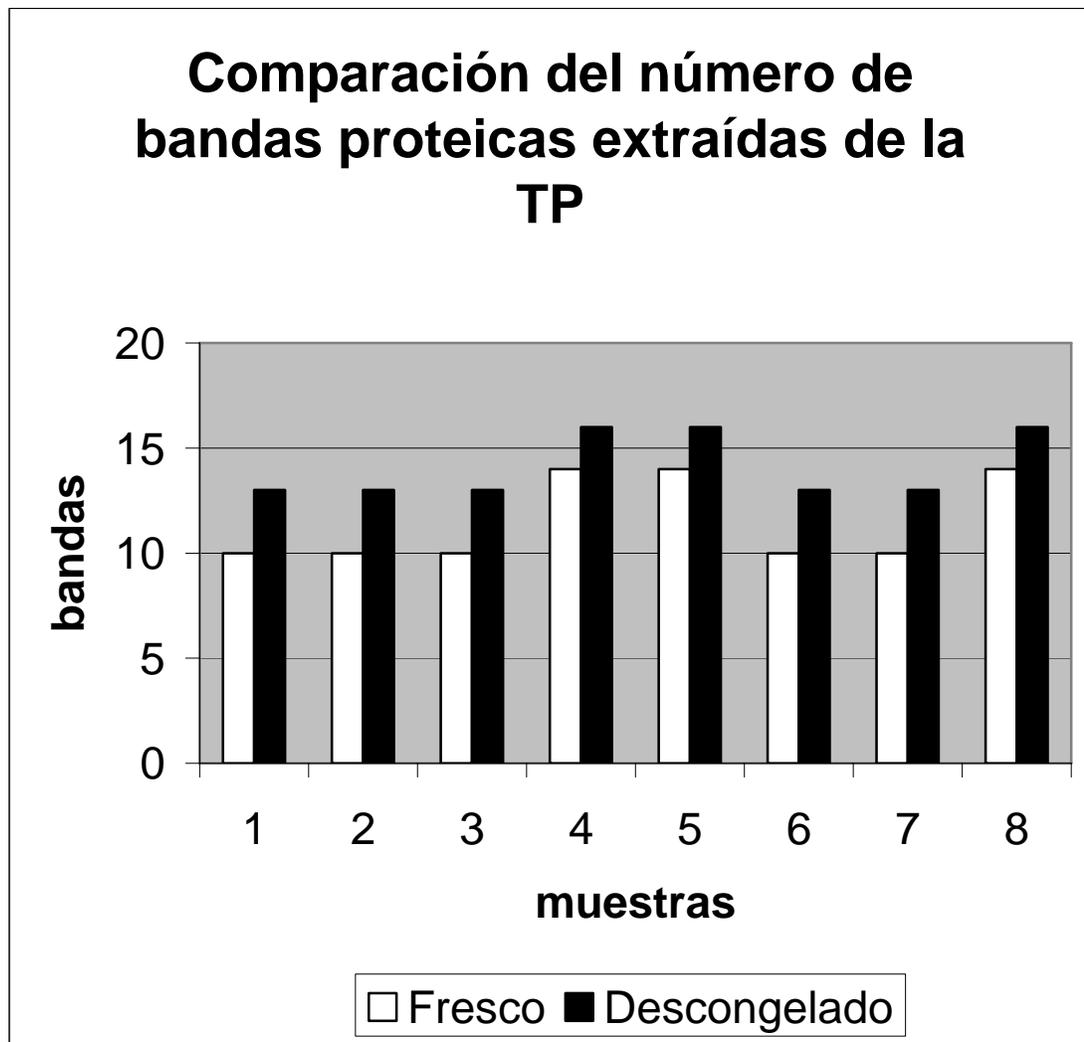
Watson PF. Recent developments and concepts in the cytopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7: 787-891.

Weaver A M, Young M E, Lee W L, Cooper J a. Integration of signals to the Arp 2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15:23-30.

A N E X O

Cuadros y gráficas

Gráfica 1. Comparación del número de bandas extraídas de la teca perinuclear del espermatozoide bovino en 8 muestras de semen fresco y descongelado.



Cuadro 2. Comparación de la viabilidad espermática de semen fresco contra descongelado mediante la tinción de eosina-nigrosina

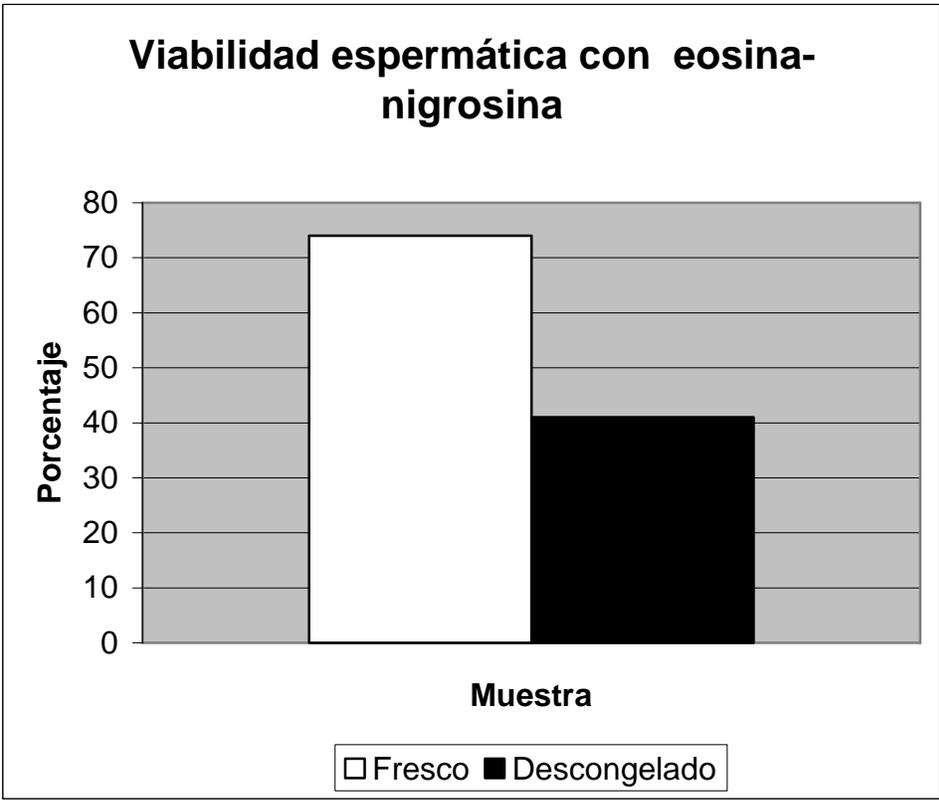
	N	Media Viabilidad (%)	Des Est	Err Est Media
Fresco	32	74.88	10.28	1.82
Descongelado	32	41.69	8.89	1.57
Diferencia	32	33.19	8.80	1.56

95% IC para la diferencia de las medias: (30.01, 36.36)
Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T = 21.32
Valor-P = 0.000

**Prueba T para datos Pareados e Intervalo de Confianza del 95%
Fresco vs Descongelado E-N**

Se encontró diferencia estadística altamente significativa en el porcentaje de viabilidad de espermatozoides frescos y descongelados (P=0.000).

Gráfica 2. Comparación del porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado, empleando la técnica de eosina- nigrosina (E-N).



Cuadro 3. Comparación de viabilidad espermática de semen fresco contra descongelado mediante la técnica de triple tinción

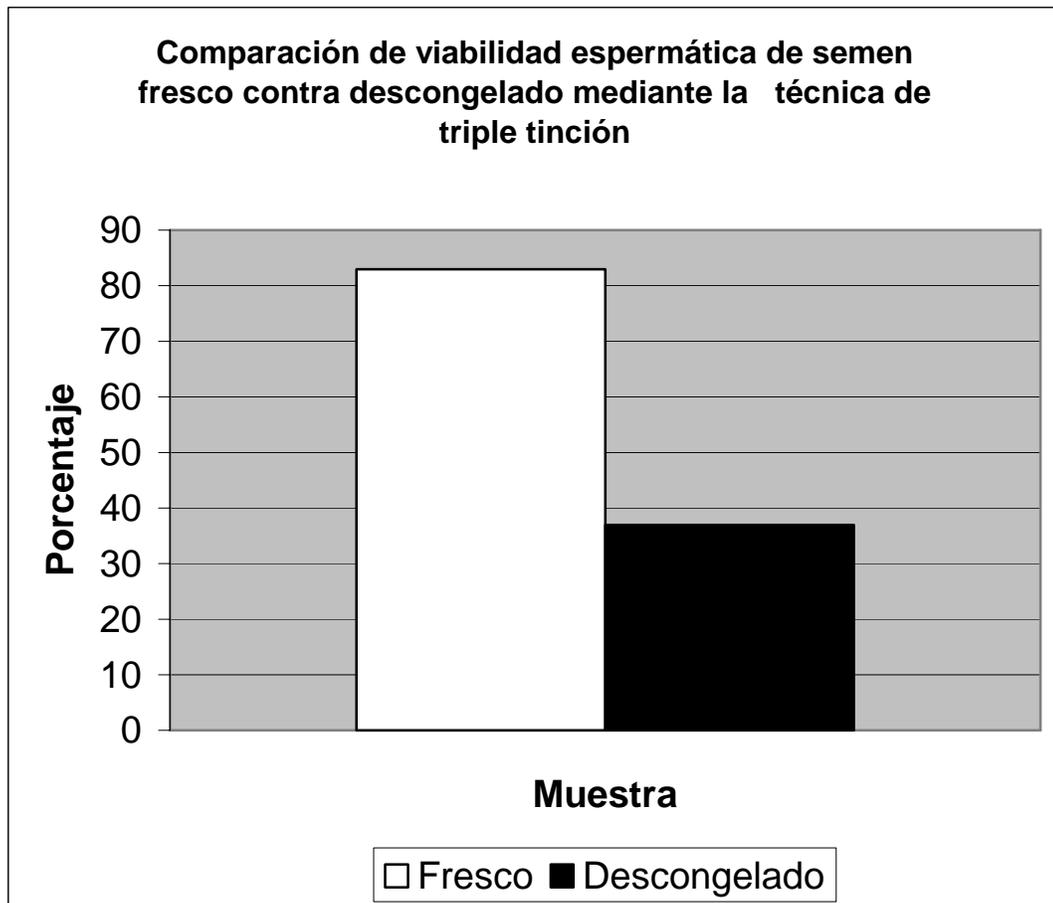
	N	Media Viabilidad (%)	Des Est	Err Est Media
Fresco	32	83.16	8.89	1.57
Descongelado	32	37.25	9.01	1.59
Diferencia	32	45.91	12.98	2.29

95% IC para la diferencia de la media: (41.23, 50.59)
 Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T = 20.01
 Valor-P = 0.000

**Prueba T para datos Pareados e Intervalo de Confianza del 95%
 Fresco vs Descongelado TT**

Se encontró diferencia estadística altamente significativa entre el porcentaje de viabilidad de espermatozoides frescos y descongelados (P=0.000).

Gráfica 3. Comparación del porcentaje de viabilidad espermática en semen fresco y descongelado, empleando la técnica de triple tinción (TT).



Cuadro 4. Comparación de viabilidad en semen fresco empleando las técnicas de eosina-nigrosina y triple tinción

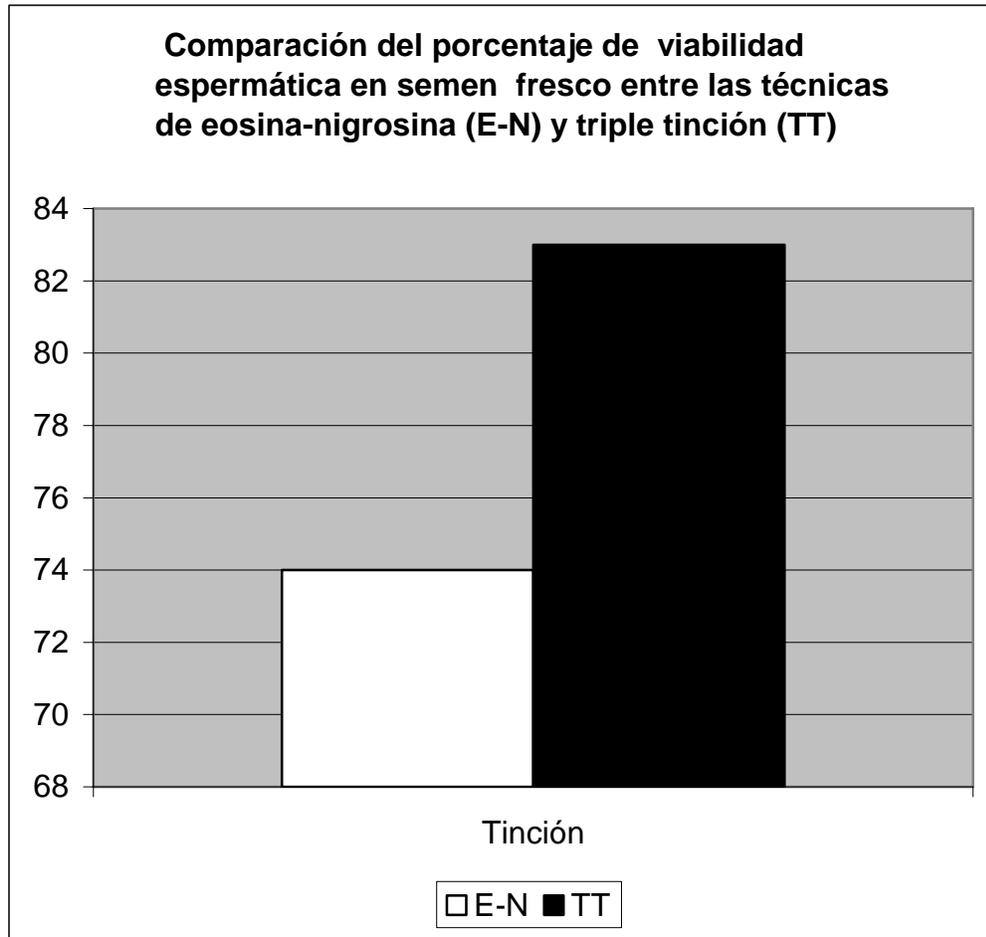
	N	Media Viabilidad (%)	Desv Est	Err Est Media
Fresco E-N	32	74.88	10.28	1.82
Fresco TT	32	83.16	8.89	1.57
Diferencia	32	-8.28	15.03	2.66

95% IC para la diferencia de la media: (-13.70, -2.86)
Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T = -3.12
Valor-P = 0.004

Prueba T para datos Pareados e Intervalo de Confianza del 95%
Fresco E-N vs Fresco TT

Se encontró diferencia estadística significativa en el porcentaje de viabilidad de espermatozoides de semen fresco en los resultados de las tinciones de eosina-nigrosina y la triple tinción (P=0.004).

Gráfica 4. Comparación de los resultados de viabilidad espermática en semen fresco entre las técnicas de eosina-nigrosina (E-N) y triple tinción (TT).



Cuadro 5. Comparación de viabilidad en semen descongelado empleando eosina-nigrosina y triple tinción

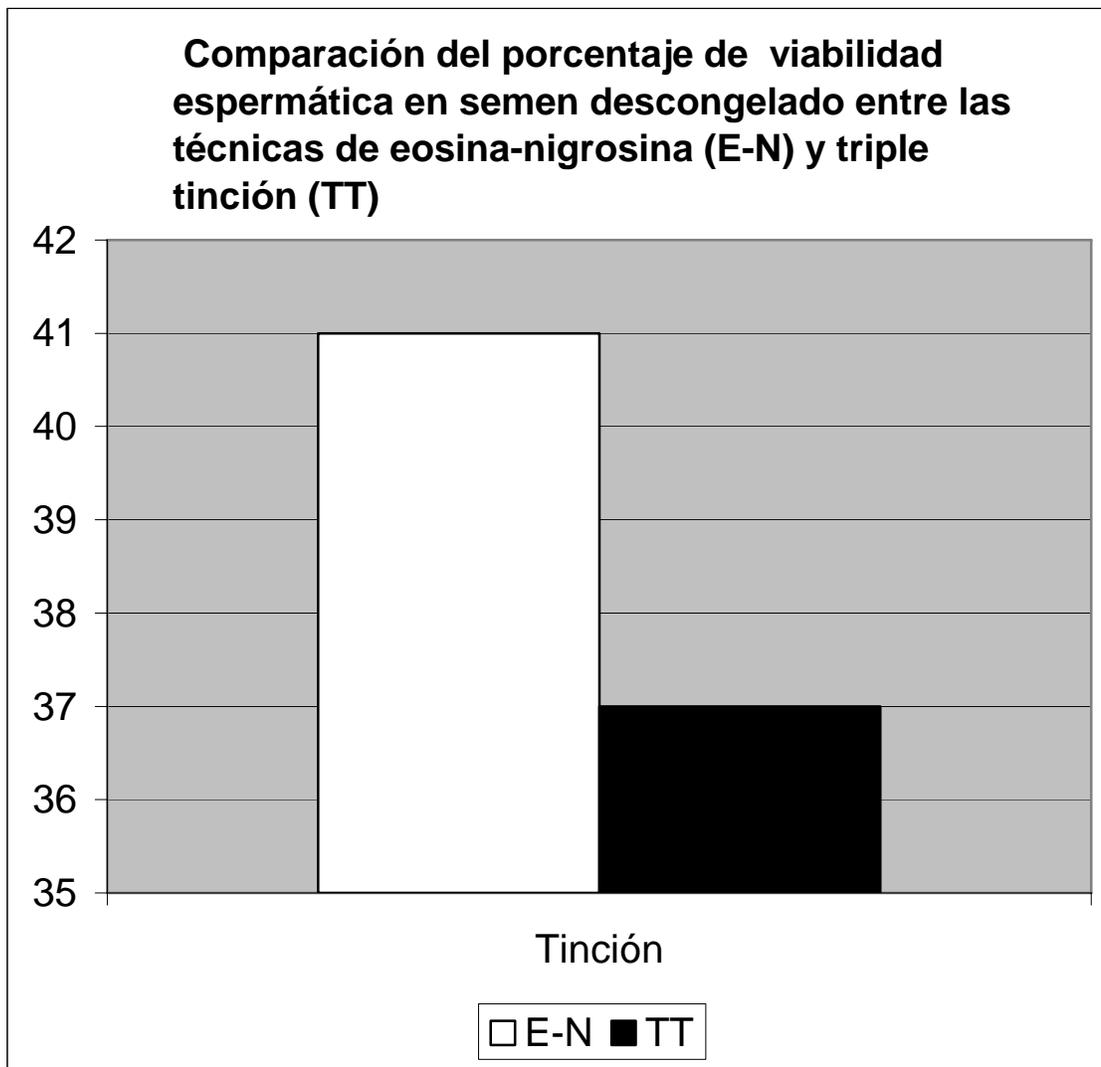
	N	Media Viabilidad (%)	Desv Est	Err Est Media
Descongelado E-N	32	41.69	8.89	1.57
Descongelado TT	32	37.25	9.01	1.59
Diferencia	32	4.44	11.78	2.08

95% IC para la diferencia de la media: (0.19, 8.68)
 Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T = 2.13
 Valor-P = 0.041

**Prueba T para datos Pareados e Intervalo de Confianza del 95%
 Descongelado E-N vs Descongelado TT**

Existe diferencia estadística significativa en el porcentaje de viabilidad de espermatozoides de semen descongelado en los resultados de las tinciones de eosina-nigrosina y la triple tinción (P=0.041).

Gráfica 5. Comparación de los resultados de viabilidad espermática en semen descongelado entre las técnicas de eosina-nigrosina (E-N) y triple tinción (TT).



Cuadro 6. Comparación de espermatozoides vivos con acrosoma en semen fresco y descongelado

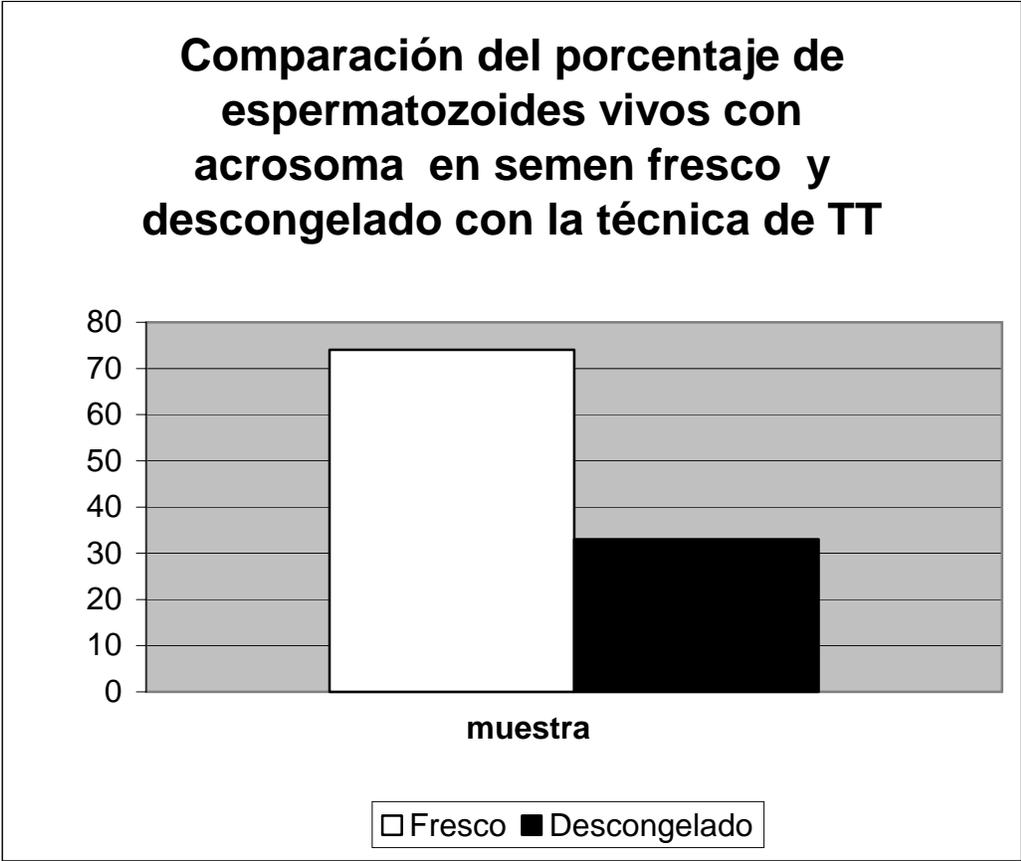
	N	Media (%)	Des Est	Err Est Media
Vc/aF	32	74.88	11.18	1.98
Vc/aD	32	33.41	7.37	1.30
Diferencia	32	41.47	12.19	2.15

95% IC para la diferencia de la media: (37.07, 45.86)
 Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T= 19.25
 Valor-P= 0.000

Prueba T pareada e IC: Vc/aF, Vc/aD

Los resultados de la triple tinción indican que existe diferencia estadística altamente significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma entre las muestras de semen fresco y descongelado (P=0.041).

Gráfica 6. Comparación del porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen fresco y descongelado empleando la técnica de triple tinción (TT).



Cuadro 7. Comparación de espermatozoides vivos sin acrosoma en semen fresco y descongelado

	N	Media (%)	Des Est	Err Est Media
Vs/aF	32	8.75	11.18	1.98
Vs/aD	32	3.84	3.55	0.63
Diferencia	32	4.91	12.92	2.28

95% IC para la diferencia de la media: (0.25, 9.56)
 Prueba T para la diferencia de las medias=0 (vs no=0): Valor-T= 2.15
 Valor-P= 0.040

Prueba T pareada e IC: Vs/aF, Vs/aD

Los resultados de la triple tinción indican que existe diferencia estadística significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma entre las muestras de semen fresco y descongelado (P=0.040).

Gráfica 7. Comparación del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma en semen fresco y descongelado empleando la técnica de triple tinción (TT).

