



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

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

---

**VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA TECA  
PERINUCLEAR DE LOS ESPERMATOZOIDES  
CRIOPRESERVADOS DE CERDO**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**KATHERINE ARANCIBIA SALINAS**

TUTOR:

**Dra. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**

COMITÉ TUTORAL:

**Dra. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**

**Dr. ENRIQUE O. HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIAS**

### **A mis hijos: Karlo, Mariana y Victoria**

Quienes son el motor de mi vida y comprendieron la importancia de esta nueva etapa y todo lo que implicó, y a quienes agradezco infinitamente su apoyo.

### **A mis padres**

Que me enseñaron que la constancia y la perseverancia te llevan a la meta trazada.

### **A Ricardo y Alejandro**

Quienes estuvieron siempre dándome palabras de aliento.

### **A Cecilia**

En estas líneas quiero decirte que donde quiera que estés, siempre tendrás un lugar en mi corazón. Te quiero hermana.

### **A Víctor Hugo**

Una vez más consigo una de mis metas gracias a que siempre has estado impulsándome de una u otra forma, teniendo siempre las palabras precisas. Gracias por estar a mi lado y por tu infinita paciencia.

Te amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las Dras. María Elena Trujillo y Lourdes Juárez por su tiempo, apoyo y confianza que me brindaron desde el inicio de este proyecto.

A mi jurado Drs. Hugo Montaldo, Carlos Gutiérrez, Alejandro Córdova, y Alfredo Medrano, así como a mi asesor externo Dr. Enrique Hernández por la invaluable asesoría brindada en virtud de que todos sus comentarios y observaciones enriquecieron este trabajo.

A los Drs. Clemente Lemus, Antonia Cervantes y Santos Aguilar por las facilidades prestadas para la obtención de las muestras de semen.

Al Dr. Carlos Cedillo, responsable de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por las facilidades prestadas en el uso del microscopio electrónico de transmisión.

Al Dr. Jorge Hernández Jefe del Departamento de Morfología, por las facilidades brindadas en el laboratorio.

Al Dr. Ernesto Basurto por su excelente trabajo fotográfico.

Agradezco a las Biólogas Sirenia González y Lourdes Rojas de la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV-IPN por la asistencia técnica proporcionada.

A la maestra Norma Duarte con quien he compartido diferentes facetas académicas, deseo agradecerle su sincera amistad y sus palabras de aliento.

Al Dr. Héctor Villaseñor por brindarme su amistad y por los ratos agradables en que convivimos en el departamento de Morfología.

A mi entrañable amiga chilena Andrea Donoso, porque a pesar de la distancia y de tantos años sin vernos nuestra amistad ha permanecido inquebrantable y que desde el principio de este proyecto ha tenido las palabras precisas.

A todos y cada uno de mis compañeros de posgrado, en especial a Salvador y Dania, por sus palabras de entusiasmo y apoyo.

A mis **entrañables amigas**: Felisa Altube, Verónica Gómora, Blanca Maldonado y Mary Carmen Kado Bol, porque desde el principio de este proyecto, de alguna u otra forma ayudaron a que se concluyera y a quienes les agradezco infinitamente su apoyo y sincera amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por ser parte de sus becarios. Número de registro 116225.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM PAPIIT: IN 206702; IN 206506.

# INDICE

	Página
Índice	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
1. Citoesqueléto	4
2. Anatomía del espermatozoide	5
2.1 Cabeza	5
2.1.1 Membrana plasmática	5
2.1.2 Acrosoma	7
2.1.3 Núcleo	8
2.2 Flagelo	9
3. Teca perinuclear (TP)	11
3.1 Subestructura de la TP	12
3.2 Funciones y proteínas de la TP	13
3.2.1 Mantenimientos de dominio de la membrana Plasmática	14
3.2.2 Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del óvulo	15
3.2.3 Activación el ovocito	15
3.2.4 Descondensación del material genético	16
3.2.5 Protección del ADN espermático	17
4. Fisiología espermática	17
4.1 Capacitación	17
4.2 Reacción acrosomal	19
4.3 Fertilización	20
5. Utilización de la Inseminación Artificial	21
5.1 Uso de semen fresco y refrigerado	22
5.2 Diluyentes usados en el semen refrigerado	22
5.3 Uso de semen congelado-descongelado	23
5.4 Diluyentes utilizados para la congelación del semen	24

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
5.5 Daños por congelación	25
5.6 Criopreservación del semen porcino	27
6. Evaluación de la calidad del semen	28
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>31</b>
Objetivos específicos	31
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
1. Animales experimentales	32
1.1 Evaluación espermática	32
2. Congelamiento de semen	33
2.1 Descongelación	33
2.2 Decapitado de espermatozoides	34
3. Evaluación de la integridad de la TP	34
3.1 Exposición y extracción de proteínas de la TP	34
3.2 Electroforesis de proteínas extraídas	35
3.3 Microscopia Electrónica	35
3.3.1 Tinción negativa	35
3.3.2 Cortes finos	36
3.4 Evaluación del diámetro ecuatorial espermático	36
4. Evaluación del acrosoma	37
5. Análisis estadístico	38
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
- Integridad de la subestructura de la TP	40
- Integridad de la subestructura de la TP por raza	43
- Integridad de la subestructura de la TP por animal	46
- Subestructura de la TP	46
- Integridad del acrosoma	48
- Extracción de proteínas de TP	48

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
- Evaluación del diámetro ecuatorial espermático	51
- Motilidad espermática	54
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO: Artículo enviado y aceptado a “Veterinary Research”</b>	<b>76</b>



## **RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre la integridad morfológica y bioquímica de la subestructura de la teca perinuclear (TP) de los espermatozoides de cerdo así como la relación de la TP con la integridad del acrosoma. El semen de doce verracos fue dividido en dos fracciones; una fue congelada-descongelada y la otra fue usada en fresco como testigo. Para la exposición de la TP ambas muestras fueron tratadas con el detergente no iónico Brij 36-T y procesadas, por tinción negativa, para su observación al microscopio electrónico de transmisión. Evaluación del acrosoma se realizó por la técnica de Triple tinción. En cada una de las 12 muestras se observaron 50 células en semen fresco y 50 células en semen congelado-descongelado al microscopio de transmisión (MET); 200 células fueron observadas al microscopio de luz. Antes de la congelación los espermatozoides mostraron 16.7% de alteraciones en la subestructura de la TP, que se incrementó a 53% después de la descongelación del semen ( $p < 0.0001$ ). Similarmente, el daño al acrosoma se incrementó del 19.5% a 54.9% después de la descongelación de las células ( $p < 0.0001$ ). Se encontró una relación entre las alteraciones de la subestructura de la TP y la pérdida de acrosoma. Por otra parte, aunque en las muestras control no se observó diferencia en el daño de la subestructura de la TP entre razas, los espermatozoides de la raza Pelón Mexicano presentaron el mayor daño después del proceso de congelación-descongelación. El efecto del individuo sobre la integridad de la subestructura de la TP en semen fresco y en semen congelado-descongelado fue estadísticamente significativo ( $P = 0.0057$ ). Las bandas proteicas de las muestras congeladas-descongeladas, fueron diferentes a las de semen fresco. Las bandas con peso molecular de aproximadamente 31, 32 y 49 kDa, fueron más notables en semen fresco y las de 17, 30 y 40 kDa, en semen congelado-descongelado. Los resultados de esta investigación indican que el proceso de congelación produce alteraciones en la morfología de la subestructura de la TP, así como en la extracción de las proteínas de la TP. Asimismo, fueron diferentes las extracciones de la TP entre razas y posiblemente contribuyan a la sensibilidad del espermatozoide a la congelación. En conclusión, la pérdida del acrosoma en el espermatozoide de cerdo se incrementó en proporción con los espermatozoides con TP alterada.

**Palabras claves:** teca perinuclear, acrosoma, criopreservación, espermatozoides, cerdo.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the effect of cryopreservation of boar spermatozoa on the morphological and biochemistry integrity of the perinuclear theca (PT) substructure as well as its relation with the acrosome integrity. Semen from 12 boars was divided in two fractions; one was cryopreserved and thawed, the other was used fresh as a control sample. In order to expose the PT structure both samples were treated with the nonionic detergent Brij 36-T and processed for electron microscopy observation after negative staining. The acrosome evaluation was made by triple staining. In each one of the 12 samples it was observed 50 cell by electron microscopy and 200 by light microscopy. Before freezing, 16.7% of spermatozoa showed PT-substructure alterations, which increased to 53% after freezing and thawing ( $P < 0.001$ ). Similarly, acrosome damage increased from 19.5% to 54.9% after cryopreservation ( $P < 0.001$ ). A relationship was found between PT-substructure alterations and acrosome loss. In addition, while no difference in PT substructure damage was observed between breeds in control sample, the samples from Mexican hairless breed had significantly more spermatozoa with damage PT substructure after freezing-thawing. In another hand, the effect of the boar over the integrity of the PT substructure in both samples was statistically significant ( $P = 0.0057$ ). Furthermore, it was found that the proteins bands of the freezing-thawing samples were different to the fresh semen samples. The bands with approximate molecular weights of 31, 32 and 49 kDa, where the most prominent in fresh semen, while 17, 30 and 40 kDa in freezing-thawing semen. The results of this study indicated that the process of cryopreservation causes alterations in the morphological of the PT substructure, as well as in the PT proteins extraction. Also, there were a differential extraction of the PT between breeds and possibly these contribute to the sensibility of the spermatozoa to cryopreservation process. In conclusion, the acrosome loss of boar spermatozoa increased proportionally to PT-altered spermatozoa.

**Key words:** perinuclear theca, acrosome, cryopreservation, spermatozoa, boar.

## ***I. INTRODUCCIÓN***

A temperaturas cercanas a 0° C, el metabolismo de los espermatozoides se detiene, sin embargo, se ha observado que éste persiste, el cual se suspende a temperaturas por debajo de -196° C (Alba, 1985). Aún cuando la técnica de preservación a baja temperatura usada para el semen del cerdo ha sido mejorada actualmente (Meyers, 2005), en comparación con el semen refrigerado aún trae consigo los efectos desfavorables de una reducción de más de 40% en la viabilidad (Almlid *et al.*, 1996; Guthrie y Welch, 2005), así como bajas tasas de parición (10-25% menos) con camadas de 1 a 3 lechones menos (Johnson *et al.*, 1981; 2000). Debido a ello, el congelamiento del semen en cerdos ha probado ser comercialmente menos atractivo que en bovinos (Hooper, 1986; Rodríguez-Martínez y Eriksson, 1994; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 2006).

La evaluación del semen para su uso en inseminación artificial (IA) y congelación, ha sido basada principalmente en el examen microscópico de la motilidad y morfología del espermatozoide. Sin embargo, aunque estas evaluaciones son valiosas no siempre son exactas (Ostermier *et al.*, 2000). Diversos autores reportan que el daño producido por el proceso de congelación-descongelación ocurre principalmente en la membrana plasmática (MP) (Watson, 1995; Noiles *et al.*, 1997; Neild *et al.*, 2003). Sin embargo, Jager *et al.*, (1990) encuentran que dicho proceso causa alteraciones en el interior del espermatozoide (citoplasma?) que permiten que agentes externos actúen sobre el material genético de la célula. Martínez (2003), encontró que la teca perinuclear (TP) del espermatozoide de bovino experimenta un daño por el proceso de criopreservación y que entre mayor sea el porcentaje de espermatozoides con TP alterada, menor es el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto. Así también, los espermatozoides que sobreviven a la congelación-descongelación sufren alteraciones similares a las causadas por la capacitación (Watson, 1995).

La teca perinuclear (TP) es un elemento citoesquelético único que rodea al núcleo del espermatozoide de los mamíferos, excepto en su base donde el flagelo se inserta al cuello (Longo *et al.*, 1987; Longo y Cook, 1991). Por la ubicación de este elemento citoesquelético especializado, se ha sugerido que probablemente esté asegurando la estabilidad del acrosoma y el diseño estructural de la cabeza (Oko y Morales, 1994). Se ha demostrado que una TP intacta puede prevenir el acceso de los factores citoplasmáticos del ovocito al DNA espermático, bloqueando así la descondensación del núcleo espermático (Sutovsky *et al.*, 1997). Kimura *et al.* (1998) encontraron que las cabezas espermáticas tratadas con Tritón (detergente neutro) poseen la capacidad de activar al ovocito, mientras que las cabezas espermáticas tratadas con SDS (dodecilsulfato de sodio; detergente aniónico) no. Se sabe que el SDS provoca la pérdida de la TP.

La TP posee a su vez una subestructura en la porción apical de la hoja posacrosomal la cual presenta características morfológicas específicas de acuerdo a la especie. Por su localización, formación y pérdida (reacción acrosomal) se ha sugerido que esta subestructura puede actuar como un marcador morfológico de la integridad de la TP (Martínez, 2003).

Por otro lado, se ha sugerido que las proteínas de la TP, podrían estar participando durante el proceso de fertilización, por ejemplo, en el mantenimiento de dominios de la membrana plasmática de la cabeza espermática. Sin embargo, cabe aclarar que sólo un número limitado de proteínas de la TP ha sido identificado en el espermatozoide de algunas especies (Oko y Maravei, 1994; Lecuyer *et al.*, 2000).

Por lo anterior resulta importante, generar información sobre los cambios que ocurren en la TP del espermatozoide del verraco durante el proceso de congelación-descongelación, para de esta forma en un futuro proteger dicha

estructura, si resulta afectada por dicho proceso. Considerando que la valoración *in vitro* de la capacidad funcional del espermatozoide después del proceso de congelación y descongelación es de particular interés para la industria de la IA (De Leeuw *et al.*, 1990; Medrano y Holt., 1998).

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. Citoesqueleto**

El citoesqueleto se puede definir en las células eucariotas como una organización de filamentos proteicos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios (Alberts *et al.*, 2002).

Los microtúbulos son tubos rígidos y fuertes (Alberts *et al.*, 2002), son los principales organizadores del citoesqueleto y participan en diversas funciones celulares, como en el mantenimiento de la forma de la célula, mitosis, citocinesis, en el posicionamiento de organelos, transporte intracelular a regiones específicas, así como en la locomoción celular, su diámetro es de 25nm (Malhotra y Shnitka, 1991). Están constituidos en su mayoría por la proteína tubulina, aunque también están asociadas las proteínas dineína, cinecina y *MAPs* (proteínas asociadas a microtúbulos).

Los filamentos de actina a diferencia de los microtúbulos, son los más finos y fáciles de romper, así como los más difíciles de ensamblar, su diámetro es de 5 a 9 nm (Alberts *et al.*, 2002). La actina es la principal proteína citoesquelética de los mamíferos e interviene en la forma celular, migración e interacción con la matriz extracelular (Howes *et al.*, 2001), además de endurecer o cambiar la forma de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2002).

Los filamentos intermedios forman estructuras semejantes a cuerdas, fáciles de formar y difíciles de romper, son estructuras muy estables y resistentes a la extracción con amortiguadores desnaturalizantes (Stewart, 1993). La función primaria de los filamentos intermedios es la de proporcionar resistencia mecánica, su diámetro es de unos 10 nm (Nogales *et al.*, 1998).

Cabe mencionar que Petrunkina *et al.* (2004) encontraron daño posterior a la descongelación en el citoesqueleto y pérdida en la capacidad para el control

del mantenimiento osmótico espermático, en perros. Este resultado fue similar al encontrado utilizando espermatozoides porcinos (Petrunkina *et al.*, 2005).

En el espermatozoide, la principal estructura citoesquelética de la cabeza es la teca perinuclear.

## **2. Anatomía del espermatozoide**

El espermatozoide es el producto final del proceso de gametogénesis en el macho, el cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos del testículo. De manera general, el espermatozoide de los mamíferos tiene dos componentes principales, la cabeza y la cola ó flagelo (Knobil y Nelly, 1988) (Figura 1).

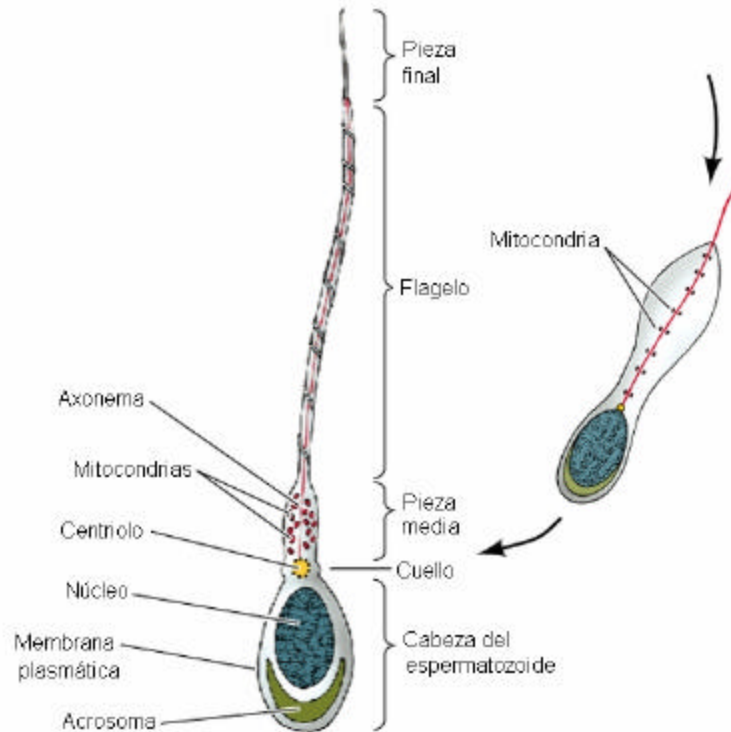
### **2.1 Cabeza**

De afuera hacia dentro se encuentran en la cabeza del espermatozoide: la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa, el acrosoma, la membrana acrosomal interna, la teca perinuclear, la envoltura nuclear y el núcleo (Figura 2).

**2.1.1 Membrana plasmática.** La membrana plasmática (MP), consiste en una bicapa lipídica en la cual se encuentran proteínas integrales y periféricas. La integridad de la MP es importante para la fecundación, ya que sólo los espermatozoides con membranas intactas pueden sufrir la capacitación (Buhr, 1991; Breitbart, 2002; Tienthai *et al.*, 2004) y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1981; Nicholas y Stanley, 1989; Abou-Haila y Tulsiani, 2000).

Muldrew y McGann, (1990) proponen la presencia de un gradiente crítico de presión osmótica a lo largo de la MP, como el que ocurre durante el proceso de congelación que puede dañar la MP. Además, Buhr *et al.* (1994), sugieren que existe modificación en la composición lipídica de la MP cuando sufre este proceso. Así, Curry (2000) menciona que la membrana plasmática del

espermatozoide congelado tiene menor capacidad de resistir el estrés osmótico en comparación con la membrana plasmática del espermatozoide refrigerado.



© 2000 Simoes Associates, Inc.

Figura 1. Estructura general del espermatozoide

Se conoce que el espermatozoide posee dominios específicos en la MP (Miles *et al.*, 1981; Yescas, 2006). Los dominios pueden definirse como grupos específicos de lípidos, proteínas y glicoconjugados que pueden actuar de manera independiente o coordinada en los procesos fisiológicos de la célula. Tres son los dominios que han sido identificados en la MP de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos los cuales son establecidos durante la espermiogénesis (Yanagimachi, 1994; Gadella *et al.*, 1995; Mújica *et al.*, 2003). Los dominios difieren en sus propiedades químicas y estructurales y son: 1) el dominio anterior o acrosomal, 2) el dominio ecuatorial y 3) el dominio posterior o postacrosomal (Miles *et al.*, 1981); todos ellos correlacionados o asociados



con la capacidad funcional de la célula para fertilizar al óvulo (Yanagimachi, 1981; Fraser *et al.*, 1995). Por lo tanto, estos dominios de membrana, están relacionados con la capacidad funcional del espermatozoide (Johnson, 1985) y los daños en la estructura de la membrana plasmática de la cabeza podrían interferir con la capacitación, la reacción acrosomal y/o la fusión del espermatozoide con el óvulo (Buhr, 1989).

Se sabe que la congelación y descongelación daña a las células, siendo numerosas las investigaciones que se han realizado para analizar la naturaleza del daño. Una conclusión general de estos estudios es que la membrana plasmática es el sitio primario del daño por la congelación (McGann *et al.*, 1988; Watson, 1995; Noiles *et al.*, 1997; Neild *et al.*, 2003). Sin embargo, Ostermeier *et al.*, (2000) encontraron que los parámetros como motilidad, integridad de la MP o del acrosoma no tienen una correlación significativa con la viabilidad espermática ó la fertilidad del semen criopresevado en diferentes especies de mamíferos, por lo que otras estructuras del espermatozoide pueden alterarse por este proceso.

**2.1.2 Acrosoma.** El acrosoma puede definirse como un gránulo secretor en forma de capuchón localizado sobre la porción anterior del núcleo, entre la membrana plasmática y la TP y se origina del aparato de Golgi (Alberts *et al.*, 2002).

La membrana acrosomal interna se continúa en el margen posterior del capuchón con la membrana acrosomal externa (Alberts *et al.*, 2002). Estas dos membranas corren paralelamente en la mayor parte de la cabeza del espermatozoide y rodean una cavidad estrecha que está rodeada por un material amorfo y homogéneo (Fawcett, 1970). Sutovsky *et al.* (2003), encontraron una estrecha relación entre la TP y las membranas acrosomales, lo que sugiere que la TP participa en el ensamblaje del acrosoma.

El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina, la hialuronidasa y esterases, necesarias para que el espermatozoide penetre la corona radiada y la zona pelúcida durante la fecundación (Gadella, 1996). Para que estas enzimas sean liberadas debe llevarse a cabo un proceso llamado reacción acrosomal (RA) (Cabello-Agüeros *et al.*, 2003).

Buhr (1989), menciona que en el bovino, se han utilizado varias técnicas para predecir la capacidad fertilizante del espermatozoide congelado, tomando en consideración la integridad del acrosoma. Sin embargo, no se ha podido correlacionar la integridad del acrosoma con la disminución de la viabilidad del espermatozoide (Watson y Plummer, 1985; Heras *et al.*, 1996; Ostermeier *et al.*, 2000).

**2.1.3 Núcleo.** El volumen del núcleo de los espermatozoides de los mamíferos es menor que el de las células somáticas y su cromatina está altamente condensada (Knobil y Nelly, 1988). Generalmente la cromatina tiene una densidad uniforme, debido al alto grado de compactación del DNA, sin embargo puede llegar a contener áreas claras, llamadas vacuolas nucleares (Bedford, 1990). El arreglo de la cromatina se debe a la presencia de una única clase de proteínas cromosómicas: las protaminas (Wykes y Krawetz, 2003).

La envoltura nuclear de los espermatozoides se relaciona de manera estrecha con la cromatina, posee varios rasgos estructurales poco comunes, como la presencia de dos membranas separadas de 7 a 10 nm carentes de poros nucleares, las cuales cerca del polo caudal de la cabeza espermática se fusionan con la MP para formar el anillo posterior. Más abajo del anillo posterior, la envoltura nuclear asume una apariencia más típica, las membranas se separan por 40 a 60 nm y se extienden en la región del cuello lejos de la cromatina. Esta última área recibe el nombre de “envoltura redundante” y contiene los poros nucleares (Bellvé y O'Brien, 1983).

Si el núcleo se daña, no se llevará a cabo la fecundación debido a que no tendrá la rigidez estructural para penetrar las envolturas del óvulo. Una de las funciones de la TP es la de envolver al núcleo para protegerlo y mantenerlo íntegro durante la maduración espermática y el tránsito por el tracto femenino, así también aporta la rigidez estructural para favorecer la penetración de las envolturas del óvulo (Juárez y Mújica, 1999). Por otra parte, la TP mantiene una continuidad estructural con la matriz nuclear, proporcionándole forma al núcleo (Sutovsky *et al.*, 2003).

## **2.2 Flagelo**

El flagelo es la porción móvil de la célula, que provee la fuerza motriz necesaria para alcanzar la superficie del óvulo y lograr la fertilización. Consiste en cuatro diferentes segmentos: pieza conectora (cuello), pieza media, pieza principal y pieza terminal (Knobil y Nelly, 1988).

La pieza conectora ó cuello, se extiende entre la cabeza y la pieza media, y une a la cabeza con el flagelo. En su extremo anterior esta región (articular) recibe el nombre de capitolio y se une a la placa basal del núcleo por una serie de filamentos finos. En el interior de la pieza de conexión, inmediatamente por debajo de la superficie articular del capitolio, hay un centriolo proximal orientado transversalmente. En los espermatozoides maduros falta generalmente el centriolo distal.

Otras estructuras dentro de la región del cuello incluyen la porción redundante de la envoltura nuclear, una ó dos mitocondrias que se extienden de la pieza media del flagelo, los segmentos iniciales de las fibras densas externas y la extensión anterior del par de microtúbulos centrales del axonema (Bellvé y O'Brien, 1983).

La pieza media se extiende desde el cuello hasta el anillo posterior de las mitocondrias y constituye la porción más ancha del flagelo, sus principales

características estructurales son el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas externas.

El axonema está compuesto por “9+2” dobletes de microtúbulos (9 pares periféricos y dos pares centrales). El axonema central aparece rodeado por las fibras densas externas, las que presentan grandes variaciones de tamaño y suelen desaparecer hacia el final de la pieza. Por fuera de estas fibras se encuentran las mitocondrias a manera de collar denominada vaina mitocondrial que contiene como su nombre lo indica, una gran cantidad de mitocondrias (Knobil y Nelly, 1988; Medeiros *et al.*, 2002). La vaina es rica en fosfolípidos y varía entre especies en el número de mitocondrias y la composición química (Gadella, 1996).

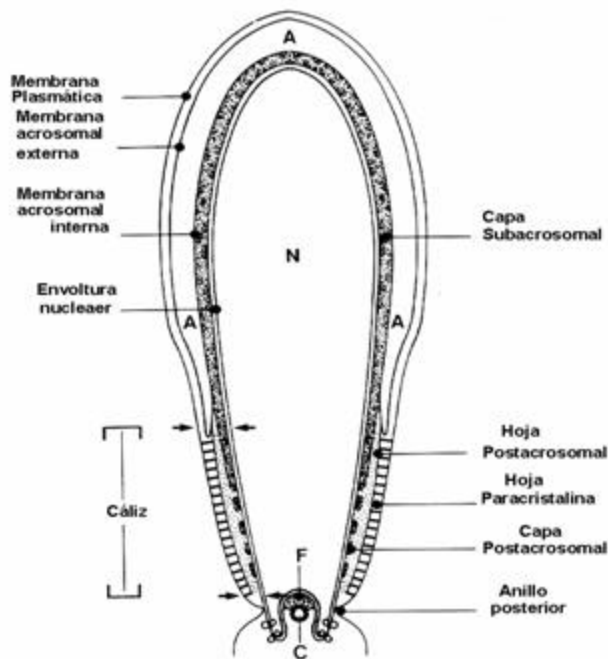
Las mitocondrias proporcionan energía mediante la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) que se utiliza para generar el movimiento del flagelo y mantener la motilidad (Medeiros *et al.*, 2002). Si las mitocondrias sufren daño, esto causaría una disminución en la producción de ATP, lo que reduciría la motilidad de la célula espermática ocasionando una disminución en la capacidad fertilizante (Thomas *et al.*, 1998).

La pieza principal es el segmento más largo del flagelo. Contiene a la vaina fibrosa que presenta dos engrosamientos que corren a lo largo de la pieza y de las que se desprenden las “fibras circunferenciales” que abrazan a las fibras densas externas, estas se ramifican y se anastomosan entre sí (Knobil y Nelly, 1988).

La pieza terminal es la porción más corta del flagelo. Persiste en ella el axonema embebido en una matriz amorfa y directamente rodeado por la MP (Bellvé y O'Brien, 1983).

### **3. Teca perinuclear**

La TP es el principal elemento citoesquelético de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos (Hess *et al.*, 1993) y constituye un elemento estructuralmente continuo que envuelve al núcleo, excepto en su base, donde se implanta el cuello del espermatozoide (Lalli y Clermont, 1981; Longo *et al.*, 1987; Juárez-Mosqueda y Mújica 1999; Rousseaux-Prévost *et al.*, 2003). Morfológicamente, este elemento ha sido dividido en dos regiones: la capa subacrosomal, que llena el espacio entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y la capa postacrosomal o cáliz que es la extensión caudal de la anterior y llena el espacio entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática (Oko y Clermont, 1991; Fouquet y Kann, 1994; Oko y Morales, 1994). A su vez, la capa posacrosomal, se puede dividir en tres hojas: a) la hoja postacrosomal la cual es una capa electrodensa que se encuentra entre la capa posacrosomal y la hoja paracristalina (Manandhar y Toshimori, 2003), b) la hoja paracristalina que es material denso compuesto por un arreglo de fibras rígidas paralelas, que está asociado con la MP y c) la capa posacrosomal (Mújica *et al.*, 2003) (Figura 2).



Longo *et al.*, 1987

Figura 2. Esquema de los componentes que forman la cabeza del espermatozoide de los mamíferos y morfología de la teca perinuclear. A: acrosoma; N: núcleo; F: fosa de implantación; C: centríolo

### 3.1 Subestructura de la TP

Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), encontraron que la TP de espermatozoides de varias especies (conejo, borrego, bovino, cerdo y cobayo) presenta una subestructura en la porción apical de la hoja postacrosomal, cuya forma es específica por especie y que se encuentra rodeando la cabeza espermática a nivel del segmento ecuatorial (Ellis, 2002; Gutiérrez-Pérez, 2006; Martínez *et al.*, 2006). En el cobayo su formación ocurre durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo y se pierde durante la reacción acrosomal. Se ha considerado que esta subestructura podría ser utilizada como un marcador morfológico para evaluar la integridad de la TP.

Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), describieron la subestructura de la TP en el cerdo, como pequeñas proyecciones a manera de “pestañas”, las cuales fueron observadas en el MET por tinción negativa (Figura 3), esta subestructura fue morfológicamente similar a la subestructura del cobayo.

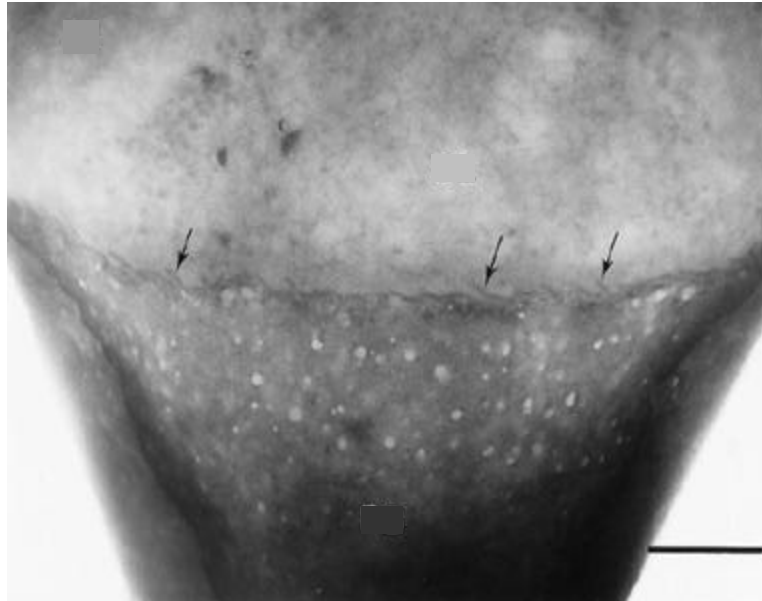


Figura 3.- Subestructura de la TP del cerdo a manera de pestañas (flechas), reportada por Juárez-Mosqueda y Mújica (1999). Barra, 500 nm.

### **3.2 Funciones y proteínas de la teca perinuclear**

En relación a las proteínas presentes en la TP, cabe mencionar que se han identificado proteínas de pH básico tanto en la capa subacrosomal como en la capa posacrosomal (Longo *et al.*, 1987; Oko y Maravei, 1994; Lecuyer *et al.*, 2000;). La mayoría de las proteínas son específicas de la TP aunque algunas se encuentran presentes también en células somáticas. Sin embargo, en el espermatozoide varias proteínas aún continúan siendo desconocidas (Longo *et al.*, 1987; Mújica *et al.*, 2003).

A continuación las funciones de la TP son descritas junto con las proteínas que han sido involucradas en las mismas:

**3.2.1 Mantenimiento de dominios de la membrana plasmática.** La MP del espermatozoide tiene propiedades únicas en la superficie y está organizada en cinco dominios mayores (Virtanen *et al.*, 1984; Yagi y Paranko, 1995; Yescas, 2006), tres de los cuales se encuentran en la cabeza: el anterior, del segmento ecuatorial del acrosoma y de la región posacrosomal (Miles *et al.*, 1981). Diversas moléculas de señalización de superficie y receptores implicados en la fertilización y desarrollo están ancladas en los dominios de la MP. Durante la capacitación y la reacción acrosomal ocurren reacomodos específicos de partículas intramembranas quedando localizadas en dominios diferentes (Yanagimachi, 1994). El dominio de membrana de la región ecuatorial del acrosoma, formado durante la RA, es reconocida por la MP del huevo para unirse y fusionarse. La posición y la motilidad de proteínas transmembranales están controladas por vínculos entre el citoesqueleto y la MP (Mújica *et al.*, 2003). En esta función podrían estar involucradas las proteínas actina, cilicina I y II así como espectrina, las cuales se describen a continuación.

**Actina (43kD).** Es la principal proteína citoesquelética de todas las células de mamíferos y se encuentra en espermatozoides maduros (Fouquet *et al.*, 1990; 1991; Panarcho *et al.*, 1994; Howes *et al.*, 2001). Ha sido encontrada en la región posacrosomal de la TP en los espermatozoides de toro, conejo y cerdo, no así en humano y hamster (Flanerty *et al.*, 1988). Una función común de las estructuras citoesqueléticas de actina consiste en endurecer o cambiar la forma de la MP (Alberts *et al.*, 2002). La actina-F ha sido implicada en la estabilización de la subestructura de la TP, ya que la pérdida de actina-F que ocurre durante la reacción acrosomal en el espermatozoide del cobayo ocasiona la pérdida de la subestructura, al igual que el tratamiento de las células con citocalasina D (un agente desestabilizador de actina-F) (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).



**Cilicina I y II (74 y 53 kD).** Son proteínas específicas de la TP, fueron localizadas por inmunofluorescencia en la región postacrosomal (cáliz) en espermatozoides epididimarios y maduros del ser humano y el bovino (Hess *et al.*, 1995). Por otro lado sólo un papel estructural en el cáliz ha sido sugerido para ambas cilicinas (Hess *et al.*, 1995).

**Espectrina.** Se ha encontrado que la espectrina une proteínas a lo largo de la cara nuclear de la membrana acrosomal interna. Ha sido detectada en la cara citoplasmática más externa de la región posacrosomal (Yagi y Paranko, 1995; Kann *et al.*, 1993).

**3.2.2 Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del óvulo.** La capa subacrosomal le confiere un carácter rígido a la porción anterior de la cabeza espermática, que puede ser significativo en la penetración de las vestimentas del óvulo (Yagi y Paranko, 1995). Las proteínas que se encuentran en esta región son las Cilicinas I y II (descritas previamente) así como PERF 15, la cual se describe a continuación.

**PERF (15 y 15.5 kD)** Se localiza en la región subacrosomal o perforatorium de la TP (Oko y Morales, 1994) y es el componente más abundante de la TP del ratón y de la rata (Morales *et al.*, 1999; Mújica *et al.*, 2003). Está relacionada con la superfamilia de proteínas de anclaje de lípidos (Sutovsky *et al.*, 2003).

**3.2.3 Activación del ovocito.** Posteriormente a la penetración del espermatozoide al huevo, la TP es removida y las proteínas de ésta son liberadas hacia el citoplasma del huevo. Kimura *et al.* (1998), encontraron que las cabezas espermáticas tratadas con Tritón (detergente neutro) poseen la capacidad de activar al ovocito, mientras que las cabezas espermáticas tratadas con SDS (detergente anionico) no. La diferencia entre estos dos tipos de cabezas espermáticas es la presencia o ausencia de la TP. También, encontraron en la cabeza de espermatozoide de ratón, un factor de activación

del ovocito, SOAF, el cual se forma durante la transformación de las espermátidas redondas a espermatozoide (Sutovsky *et al.*, 1999). Por otro lado, Sutovsky y Schatten (2000), indicaron que estos factores pueden ser liberados de las cabezas de los espermatozoides de mamíferos por un proceso de congelación-descongelación ó por extracción química.

Asimismo, la TP es considerada como un reservorio de moléculas de señalización que pueden desencadenar la activación del ovocito, así como la antipoliespermia y el desarrollo embrionario temprano (Mújica *et al.*, 2003; Sutovsky *et al.*, 2003).

**3.2.4 Descondensación del material genético.** Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), indicaron que la formación de la subestructura de la TP, está aparentemente relacionada con la estabilidad de la TP requerida para la protección de la cromatina espermática (Sutovsky *et al.*, 1997). Se puede decir que el citoplasma del ovocito (Sutovsky, 2003), tiene la capacidad de descondensar a la TP, y los productos de ésta, tienen la propiedad de activarlo (Kimura *et al.*, 1998). Sutovsky *et al.* (1997), enfatizaron la importancia de la eliminación de la TP, para la conversión del núcleo espermático dentro del pronúcleo masculino. Asimismo Oko y Maravei (1994), detectaron proteínas parecidas a las histonas en la hoja subacrosomal de la TP, tomando esta referencia, Sutovsky *et al.* (2003), sugieren que estas proteínas, podrían convertirse en una fuente de aporte rápido de histonas en los estadios tempranos del desarrollo del pronúcleo masculino.

El factor de transcripción Stat 4, se encuentra en niveles altos en la TP del espermatozoide maduro (Herrada y Wolgemuth, 1997). La presencia de un potencial factor de transcripción como Stat 4 en la TP puede sugerir que esta estructura tiene otra función además de la estructural, ya que se ha observado en estudios *in vitro*, que al reducir la TP se logra extraer la proteína Stat 4 sin ningún rompimiento proteolítico (Herrada y Wolgemuth, 1997).

**3.2.5 Protección del ADN espermático.** En esta función ha sido involucrada la **Calicina (60 kDa)** (Von Bölow *et al.*, 1997; Lecuyer *et al.*, 2000), que ha sido identificada como una proteína de unión a actina perteneciente a la familia kelch y se localiza en la región postacrosomal ó caliz de la TP del espermatozoide maduro en ratón, toro y humano (Longo *et al.*, 1987).

Otras proteínas encontradas en la TP son: **Calmodulina (17kD)** se ha encontrado en diversas especies como carnero, conejo, cobayo, hamster, humano, rata y ratón (Kann *et al.*, 1991). Esta proteína ha sido reportado en la región postacrosomal, en la región subacrosomal e inclusive en toda la TP (Leclerc y Goulpil, 2000). **Arp T1 y Arp T2 (40kD)**, las cuales han sido relacionadas con actina. Se localizan en el cáliz de espermatozoides del hombre y del bovino (Heid *et al.*, 2002). Asimismo las proteínas llamadas **Tecinas (70, 50 y 48 kD)** han sido localizadas en toda la TP. La TP también contiene un grupo de proteínas denominadas banda multipeptídica (**PMB**) (Dadoune, 2003). Por último, dentro de la familia de las **Distrofinas** se han identificado las isoformas Dp71f y  $\beta$ -distrobrevina. La primera ha sido identificada en la hoja postacrosomal y la segunda en la región subacrosomal.

#### **4. Fisiología espermática**

Para que el espermatozoide pueda fertilizar al óvulo, éste debe de realizar dos procesos fisiológicos en el tracto reproductor de la hembra: la capacitación y la reacción acrosomal.

##### **4.1 Capacitación**

Para que el espermatozoide eyaculado pueda fertilizar al óvulo, requiere de un período en el tracto reproductor de la hembra que dura alrededor de 5 a 6 horas en el cerdo (el tiempo depende de la especie) (Moore, 1985; Holt, 1996; Hunter *et al.*, 1998) que prepara a la célula para la reacción acrosomal (RA).

Durante la capacitación, la MP experimenta cambios físicos y bioquímicos, entre los que se incluyen incremento en la fluidez de la membrana, cambios en la composición de los lípidos así como la disminución de colesterol y un aumento en lípidos fusogénicos. Estas modificaciones están relacionadas con cambios específicos en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , y con los patrones de motilidad, como la hiperactivación (Breitbart, 2002; Tienthai *et al.*, 2004).

Es decir, las alteraciones en las propiedades físicas de la membrana pueden influir en la movilidad, conformación y activación de las enzimas así como en el transporte molecular, ya que podrían afectar la capacidad del espermatozoide para controlar la concentración del calcio y/o pH internos, ya que durante este proceso ocurre un aumento en la concentración de calcio libre intracelular y un aumento en el pH interno (Yanagimachi, 1994).

Todos estos cambios podrían ser el resultado de la remoción de glicoproteína y/o proteínas adsorbidas en la superficie del espermatozoide. El requerimiento de calcio presumiblemente es un reflejo de la dependencia de calcio de la adenilato ciclasa espermática. Esto debido a que se ha observado que durante la capacitación existe una elevación en los niveles de AMPc y en la fosforilación de proteínas espermáticas. Una de las proteínas fosforiladas durante la capacitación es la fosfolipasa C, que cataliza la conversión del fosfatidilinositol trifosfato en diacilglicerol e inositol trifosfato, los cuales han sido involucrados en el incremento de la fluidez de la MP (Aitken, 1997).

Cabe mencionar que la capacitación espermática ocurre cuando el espermatozoide se encuentra dentro de la tuba uterina, aún cuando no es claro cómo se modula este evento (Tienthai *et al.*, 2004) y sólo los espermatozoides no capacitados se unen al epitelio de la tuba uterina, ya que los espermatozoides capacitados presentan una reducción en la capacidad de unión (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001).

#### **4.2 Reacción acrosomal**

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis regulada que conducen a la liberación de las enzimas proteolíticas del acrosoma, las cuales son esenciales para que el espermatozoide atraviese las envolturas del óvulo. La exocitosis ocurre como consecuencia de una señal externa, la cual es transmitida hacia el interior de las células vía segundos mensajeros y/o cambios en la permeabilidad a los iones de la membrana (Morales *et al.*, 1999). Como inductores de la RA se encuentra la zona pelúcida y la progesterona (Hernández-González *et al.*, 2000). *In vivo*, la RA es inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida (ZP3) que es capaz de elevar la concentración de calcio interno a niveles micromolares en 30-50 milisegundos. Este flujo de calcio es el mecanismo que dispara la RA (Abou-Haila y Tulsiani, 2000). La RA puede ser inducida *in vitro* en espermatozoides capacitados con extractos de zona pelúcida solubilizada o con ligandos como la progesterona, el factor de crecimiento epidermal o el ionóforo de calcio A23187 (Breitbart y Naor, 1999).

La transducción de señal es a través de una vía muy compleja que involucra a múltiples elementos y efectos, entre los cuáles se pueden incluir el calcio, pH, proteínas-G, metabolismo del inositol, lipopolisacáridos y el AMPc. El calcio intracelular actúa vía modulación de la actividad de una gran variedad de sistemas enzimáticos promoviendo la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994).

Inmediatamente después de la unión del espermatozoide (receptor) a la zona pelúcida (ligando), la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la MP que recubre al acrosoma, lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal, enzimas como la acrosina y la hialuronodasa. Sin embargo esto no ocurre en la región ecuatorial de la MP (Flesch y Gadella, 2000). La RA es un requisito absoluto para la fusión espermatozoide-óvulo, esto sugiere que la MP que recubre al segmento ecuatorial sufre un cambio fisiológico mayor que vuelve al espermatozoide competente para fusionarse.

Así, esta membrana posee una proteína con propiedades fusogénicas. Una molécula de adhesión candidata para este proceso es la proteína espermática cirestestina, que pertenece a la familia de proteínas de adhesión a matriz extracelular (ADAMS), que se asocia con la membrana acrosomal interna, y que durante el proceso de capacitación y/o RA migra al segmento ecuatorial. En conclusión, como resultado de la RA se presenta un nuevo dominio en la MP a nivel del segmento ecuatorial y posacrosomal, que presenta las proteínas necesarias para la fusión con la membrana del óvulo.

### **4.3 Fertilización**

La fertilización se define como un fenómeno múltiple que comienza con la interacción y subsecuente fusión de los gametos y culmina con la asociación de los cromosomas correspondientes derivados de los dos pronúcleos, el materno y el paterno, etapa conocida como singamia (Flesch y Gadella, 2000).

En el espermatozoide, los eventos que se llevan a cabo después de la fusión de las membranas y la incorporación del gameto al citoplasma del ovocito son: la ruptura de la envoltura nuclear, la desestructuración de la TP, la descondensación de la cromatina espermática y la formación del pronúcleo masculino (Bedford, 1990; Sutovsky *et al.*, 2003).

Inmediatamente después de la incorporación del espermatozoide al citoplasma del huevo, la envoltura nuclear se rompe y la cromatina espermática queda rodeada sólo por la TP. Esta última representa una barrera para la descondensación del material genético del macho (Kimura *et al.*, 1998). La destrucción de la TP comienza a partir de la porción apical de la región posacrosomal (Yanagimachi, 1994) y se ha encontrado que la descondensación del núcleo espermático también comienza en la porción apical de la región postacrosomal. La destrucción de la TP debe acontecer como un requisito para el proceso de descondensación y la formación del pronúcleo (Sutovsky y Schatten, 2000).

Jager *et al.* (1990), al estudiar la descondensación del núcleo espermático inducida por heparina, observaron que aún cuando la membrana celular se encuentra dañada, la heparina es incapaz de inducir la descondensación del núcleo espermático. Sin embargo, esto sí ocurre en los espermatozoides congelados-descongelados ya que los autores mencionan que debe existir un daño interno en la célula (citoplasma?). Juárez (1995), encontró que cuando la TP se encuentra dañada el núcleo del espermatozoide del cobayo es capaz de descondensarse en presencia de heparina.

Por otra parte, se ha mencionado que si ocurre un daño en la cromatina puede ocurrir infertilidad ó muerte embrionaria precoz, estb último relacionado con una alteración en el proceso de condensación-descondensación de la cromatina espermática (Córdova *et al.*, 2001; 2006).

### **5. Utilización de la Inseminación Artificial**

En las últimas décadas, el uso de la IA en cerdos usando semen refrigerado, ha tenido un fuerte incremento en nuestro país. Dentro de las ventajas de su uso se encuentra un fácil manejo del semen, el menor riesgo de introducción de enfermedades en el hato, la disminución de la cantidad de verracos necesarios en el hato y mayores opciones para el mejoramiento genético.

A nivel mundial, se estima que anualmente se realizan 19 millones de inseminaciones en la especie porcina, de las cuales el 99% son realizadas con semen refrigerado que ha sido diluido y almacenado entre los 15 a 20 °C (Johnson *et al.*, 2000); y de ellas el 85% son utilizadas el mismo día de su recolección, ó al día siguiente (Gadea, 2003). Uno de los mayores problemas encontrados con el uso de semen fresco diluido, es la pérdida de la viabilidad asociada con el almacenamiento. El mantenimiento del semen de verraco a 15–16°C por más de 2 a 3 días (Córdova, 2000), resulta en una disminución gradual en la motilidad y capacidad fecundante (Renard *et al.*, 1996), esto, aún con el empleo de diluentes de larga acción (7-8 días) (Mc Donald, 1991).

La IA utilizando semen congelado-descongelado del verraco, no ha alcanzado el mismo nivel de difusión que en los bovinos (Foote, 2002), principalmente debido a: 1) la variación en el éxito de la congelación del semen entre verracos, 2) a la elevada concentración de espermatozoides requeridos por dosis y 3) a la disminución en la fertilidad y el tamaño de camada, al compararlo con el semen refrigerado (Reed, 1985; Hooper, 1986; McDonald, 1991; Rodríguez y Eriksson, 1994; Ostemeier *et al.*, 2000). Por ello, desde hace varios años la meta en la tecnología del semen congelado del cerdo es el de alcanzar (de manera consistente y bajo condiciones de campo), tasas de partos en un rango de 65 a 70%, y la utilización de no más de  $1 \times 10^9$  de espermatozoides por dosis, permitiendo así el uso racional de los eyaculados para la producción de reemplazos de raza pura dentro de programas de mejoramiento genético (Foote, 2002).

### **5.1 Uso de semen fresco y refrigerado**

El semen fresco se obtiene y se utiliza el mismo día conservándose a temperatura ambiente, en un lapso de no más de tres horas (Guzmán, 2003). El semen refrigerado es aquel que se conserva por periodos de 2 a 3 días (diluyentes de corta acción) ó por periodos más largos que van de los 5, 7 y hasta 10 días (diluyentes de larga acción). En ambos casos el semen debe mantenerse a una temperatura de 15° C para su conservación (Córdova, 2000). Se ha propuesto también una temperatura de conservación de 5° C, sin embargo no es la más utilizada (Johnson *et al.*, 2000).

### **5.2 Diluyentes usados en el semen refrigerado**

Los diluyentes son soluciones acuosas que se emplean con la finalidad de preservar las características funcionales de las células espermáticas y aumentar el volumen del eyaculado para conseguir un mayor número de dosis para inseminación. Para conservar la viabilidad de los espermatozoides durante períodos prolongados, es necesario que se reduzca la actividad metabólica de éstos, empleando para ello un medio adecuado de dilución y



reduciendo la temperatura (Gadea, 2003). Para cumplir con dicho propósito, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa, dextrosa y/o trehalosa), protegerla del choque térmico por frío como la albúmina sérica bovina (BSA), regular el pH del medio (Bicarbonato, TRIS y/o HEPES), controlar la presión osmótica (sales de NaCl, KCl) e inhibir del desarrollo bacteriano (antibióticos) (Johnson *et al.*, 2000; Watson, 2000).

Los diluyentes que se utilizan para tal fin, han sido clasificados en dos grupos: conservación a corto plazo (1 a 3 días) como Kiev, Modena y BTS (Conejo *et al.*, 1996) y los de conservación a largo plazo (más de 4 días), como MR-A, Androhep y Reading. La ventaja de los diluyentes de larga acción es la posibilidad de transportar el semen a largas distancias (Gadea, 2003), así como una mejora de la genética en forma acelerada (Conejo *et al.*, 1996).

El semen conservado a 5° C requiere la adición de sustancias crioprotectoras, como la yema de huevo y/o leche. Los medios más utilizados son el Serdiuk y el Kato los cuales están compuestos de glucosa, bicarbonato de sodio, ácido cítrico y yema de huevo. El descenso de la temperatura debe realizarse en forma gradual para evitar el choque térmico (Johnson *et al.*, 2000).

### **5.3 Uso de semen congelado-descongelado**

La congelación de semen es un proceso que permite conservar a los espermatozoides por largo tiempo (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000). Adicionalmente, esta técnica permite almacenar el semen de animales valiosos, eliminar las limitaciones de manejo y/o sanitarias que impedirían la utilización de algunos individuos y facilita la transferencia del material genético (Eberhard, 1995; Holt, 1996).

El proceso de congelación consta de diferentes etapas como enfriado, deshidratación celular, congelación, descongelación y rehidratación celular entre otras (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000). Aún cuando en este

proceso ocurren cambios que modifican y/o alteran a la célula espermática, se menciona que la mayor desestabilización ocurre durante el proceso de congelación-descongelación, debido a que en la MP se lleva a cabo una transición de fases (Graham y Mocé, 2005). La transición de fases es el cambio físico que sufren los lípidos de la MP, la cual se encuentra en un estado líquido cristalino, pero al congelarse la MP se vuelve más rígida y poco elástica al adoptar un estado de gel (Holt, 2000; Chen *et al.*, 2002). Este evento puede dañar la MP de manera irreversible (Patist y Zoerb, 2005).

#### **5.4 Diluyentes utilizados para la congelación del semen.**

Los diluyentes empleados para la congelación del semen tienen las mismas características que los diluyentes para semen fresco refrigerado, sin embargo, para evitar que se formen los cristales de hielo se les agregan crioprotectores los cuales pueden ser de dos tipos: los que penetran a la célula (de bajo peso molecular) (Mizukami *et al.*, 1999; Holt, 2000) y los que actúan desde el exterior (de alto peso molecular). En el primer grupo se encuentran el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el eritritol, el adonitol el propilenglicol y la acetamida. Si bien estos cinco últimos crioprotectores han permitido mejorar la motilidad postdescongelación, no han aumentado la viabilidad de los espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000).

El glicerol es el que más se ha incluido en los diluyentes para el congelamiento del semen, tanto del cerdo como de otras especies (aún cuando la concentración óptima no ha sido estandarizada). El glicerol tiene la propiedad de que puede insertarse en el interior de la bicapa de la membrana plasmática (MP) y al hacerlo probablemente induzca alteraciones en sus propiedades debido a una reacomodación de los lípidos, y por lo tanto esté afectando la estabilidad y la permeabilidad de la MP (Watson, 1995). Se menciona que concentraciones de glicerol entre 2 y 6 % pueden dar buenos resultados (Bwanga, 1990; Bamba y Adams, 1990; Anchooguy *et al.*, 1991; Hofmo y Almlid, 1991; Fiser, 1991) y suele adicionarse cuando el semen se encuentra a una temperatura de 5°C (Watson, 1995).

Dentro de los crioprotectores que actúan fuera de la célula, se ubican los azúcares como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la lactosa, la trehalosa y la polivinilpirrolidona; en este grupo se encuentra también la yema de huevo. Si bien sólo los crioprotectores del primer grupo siguen siendo los más ampliamente utilizados como crioprotectores en una gran variedad de células y tejidos, la yema de huevo sigue siendo adicionada de manera rutinaria desde hace varias décadas, porque su adición disminuye el efecto provocado por un choque por frío (Anchordoguy *et al.*, 1987;1991; Bamba y Adams, 1990; Bwanga, 1990). Esto es debido a que uno de sus principales componentes es una lipoproteína de baja densidad que tiene un efecto protector sobre la MP y a que evita el doblamiento o enrollamiento del flagelo, que trae como consecuencia una disminución en la motilidad progresiva de la célula espermática (Holt, 2000). Adicionalmente, de manera regular a los diluentes a base de yema de huevo se les agrega una sustancia surfactante como el Orvus-Es-Paste, el cual modifica las partículas de la yema de huevo facilitando así la interacción de éstas con la MP del espermatozoide (Holt, 2000; Watson, 2000).

### **5.5 Daños por congelación**

Se ha mencionado que el daño primario en las células por el proceso de congelación-descongelación es en la MP (McGann *et al.*, 1988; Neild *et al.*, 2003). Sin embargo, Ostermeier *et al.* (2000), consideran que las evaluaciones de integridad de la MP o del acrosoma no tienen una correlación significativa con la viabilidad espermática ó la fertilidad del semen bovino criopreservado, por lo que otras estructuras del espermatozoide pueden alterarse en este proceso.

Por otra parte, el enfriado y la congelación de semen inducen cambios en los espermatozoides parecidos a los producidos en el proceso de capacitación, esto ocasiona que la MP se desestabilice, se vuelva más fluida y sea más susceptible a que ocurra la RA de forma prematura (Johnson *et al.*, 2000). De esta manera la vida de los espermatozoides se acorta considerablemente, lo

que significa que están “envejecidos”, por lo que la oportunidad de poder fertilizar al ovocito es significativamente menor (Watson, 2000; Bailey *et al.*, 2000). Por esta razón, Watson (1995), recomienda tasas lentas de enfriado, que permitan al agua salir de la célula y congelarse fuera de ella.

Además, daños en el acrosoma o en la cromatina, puede originar infertilidad ó muerte embrionaria, esto último debido a una alteración durante el proceso de condensación-descondensación de la cromatina espermática (Córdova *et al.*, 2001).

Diversas investigaciones señalan que durante la criopreservación las células pueden dañarse debido a la formación intracelular de cristales de hielo y por los cambios que acompañan a dicho proceso como los cambios osmóticos, dando como resultado la deshidratación de las células, lo que afecta la supervivencia de éstas (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los cambios osmóticos producen una serie de eventos que influyen en la capacidad de las células para mantener los procesos de señalización. El incremento de calcio intracelular y la salida del colesterol de la MP ocurre en los espermatozoides criopreservados (Holt y North, 1994; Meyers, 2005). Medrano y Holt (1998), consideran que la formación intracelular de hielo debe evitarse para reducir el daño celular durante este proceso y aumentar la supervivencia espermática.

Después de la formación del hielo, la concentración de solutos excede su solubilidad y se precipitan, fenómeno que se conoce como punto eutéctico (temperatura a la cual la concentración de solutos exceden su solubilidad y dejan de ser solubles precipitándose), provocando cambios en la osmolaridad y un acortamiento de la MP (Watson, 1995). Petrunkina *et al.* (2004, 2005), sugiere que el citoesqueleto juega un papel importante en el envío y traducción de las señales que controlan los cambios de volumen, por lo que un citoesqueleto íntegro es de vital importancia en la funcionalidad y supervivencia celular posterior al proceso de congelación.

Silva *et al.* (2006), mencionan que para una concepción exitosa, el espermatozoide debe mantener la membrana, organelos y genoma, funcionando adecuadamente, si esto no ocurre, el espermatozoide se considera deteriorado y sin la capacidad de fertilizar al ovocito.

### **5.6 Criopreservación del semen porcino**

El semen porcino se caracteriza por obtenerse en grandes volúmenes y por ser muy sensible al choque por frío. La fertilidad del espermatozoide en esta especie declina drásticamente después del proceso de congelación-descongelación (Johnson *et al.*, 1981; Thomas *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2000; Guthrie y Welch, 2005). Diversos autores reportaron cambios en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide porcino durante el enfriado, congelado, descongelado y consideraron que algunos de ellos son irreversibles (Buhr *et al.*, 1994; Neild *et al.*, 2003). El cambio en la fluidez hace que la MP se desestabilice y sea susceptible a que ocurra una reacción acrosomal prematura, lo que trae como consecuencia que la vida de los espermatozoides se vea acortada. Si bien las técnicas morfológicas han proporcionado detalles de los daños ocasionados a la MP, los resultados no siempre han estado correlacionados con el porcentaje de fertilidad (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996).

Para lograr el congelamiento exitoso del semen porcino, se han venido ensayando diferentes concentraciones espermáticas en combinación con el empleo de diversas técnicas de congelación-descongelación (Bwanga, 1991; Bwganda *et al.*, 1991<sup>a</sup>; 1991<sup>b</sup>; 1991<sup>c</sup>; 1991<sup>d</sup>); lográndose con ello el uso comercial de pellets (Pursel y Johnson, 1975), maxi pajillas, midi y mini pajillas (Westendorf *et al.*, 1975; Weitze *et al.*, 1988; Bwanga *et al.*, 1990).

Actualmente, el método más usado es el de las maxi pajillas de 5 ml, las cuales son más fáciles de manejar, identificar, almacenar y descongelar. Sin embargo, su diámetro es una desventaja para el congelamiento uniforme de los espermatozoides, comparado con las mini o midi pajillas, ya que al tener un

radio mayor, se interfiere con la eficiente disipación de calor (Medrano y Holt, 1998). Sin embargo, independientemente del método utilizado al evaluar la calidad y capacidad fecundante del semen descongelado los resultados obtenidos han sido muy similares.

## **6. Evaluación de la calidad del semen**

Una de las variables más ampliamente usadas para evaluar la calidad del semen después de la congelación-descongelación ha sido la motilidad progresiva, que se evalúa en el microscopio óptico. El uso del citómetro de flujo para el análisis espermático ha conducido a métodos más cuantitativos para evaluar la viabilidad del espermatozoide (Johnson *et al.*, 2000), sin embargo aunque este procedimiento es valioso, no siempre es exacto. Samper (1991), reportó que espermatozoides con motilidad progresiva baja (< 20%) se considera de calidad pobre, pero muestras de semen con una motilidad alta (>50%) podrían, por otra parte, contener daños que no afecten la motilidad del espermatozoide.

Estudios realizados en Europa y en los Estados Unidos muestran que la motilidad espermática en cerdos puede variar entre un 20 y un 50% después de la descongelación, encontrándose tasas de pariciones que pueden ir del 40 al 70%, mientras que el tamaño de camada va de 6 a 10 lechones (Almlid y Hofmo, 1996). En estos reportes se encontró que los espermatozoides de la raza Landrace mantuvieron el mayor porcentaje de motilidad (34%), sobre los de las razas Yorkshire (29.9%) y Duroc (21.8%). Asimismo, en comparación con el uso de semen fresco diluido o la monta natural, la tasa de partos y el número de lechones nacidos vivos resultó menor usando semen congelado-descongelado, sobre todo en la raza Duroc. Por ello, el congelamiento del semen del cerdo ha probado ser comercialmente menos atractivo que la del semen de bovino (Hooper, 1986; Rodríguez-Martínez y Eriksson, 1994).

Por lo anterior, el congelamiento exitoso del semen de cerdo depende de la comprensión de los factores que influyen la capacidad del espermatozoide para resistir el congelamiento y el descongelamiento. Estos factores pueden ser clasificados en dos categorías: 1) factores internos o fijos, como las características inherentes del cerdo, en el eyaculado y en el espermatozoide, y 2) factores externos, como la composición del diluyente, el tipo y la concentración de los agentes crioprotectores, la rapidez del enfriamiento y el congelamiento, el tiempo en el que el semen desciende su temperatura, el método de congelación y descongelación del semen (Watson, 1995; Curry, 2000; Holt, 2000).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad el uso del semen congelado para inseminación artificial en la especie porcina, es muy limitado (Wongtawan *et al.*, 2006), esto debido a la baja viabilidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación (Watson, 2000; Meyers, 2005).

El semen porcino difiere del de otras especies de animales domésticos, ya que es producido en gran volumen y es extremadamente sensible al choque por frío inmediatamente después de su colección y sólo tolera niveles relativamente bajos de glicerol para el congelamiento. Estas características son de gran importancia a considerar en el procedimiento para su criopreservación (Bwanga *et al.*, 1990<sup>a</sup>; 1990<sup>b</sup>; Fiser, 1991; Fiser y Fairfull, 1996; Johnson *et al.*, 2000; Cerolini *et al.*, 2001; Patist y Zoerb, 2005; Guthrie y Welch, 2005), ya que se sabe que la criopreservación induce daños en el espermatozoide (Watson, 2000; Holt *et al.*, 2005; Meyers, 2005).

La valoración de la motilidad y de la morfología son aún los estándares comunes para determinar la viabilidad del espermatozoide *in vitro*, a pesar de que se conoce que el espermatozoide que sobrevive el congelamiento puede ser motil pero no necesariamente fértil (Polge, 1956). Se ha sugerido que otras estructuras internas pueden verse afectadas por dicho proceso, por lo tanto, la valoración de la integridad de la TP, una estructura espermática interna que ha sido involucrada en eventos importantes antes y después de la fertilización, puede ser de utilidad en el futuro para poder optimizar los métodos de congelación de semen porcino.



#### ***IV. HIPÓTESIS***

El proceso de congelación y descongelación del semen de cerdo daña la teca perinuclear de los espermatozoides.

#### ***V. OBJETIVO GENERAL***

Valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre la integridad morfológica y bioquímica de la TP de los espermatozoides de cerdo.

#### ***Objetivos específicos***

1. Estimar el promedio de la longitud, ancho y separación de las pestañas de la subestructura de la TP del espermatozoide del cerdo.
2. Evaluar la integridad de la subestructura del espermatozoide porcino, antes y después del proceso de congelación-descongelación y la influencia de individuo.
3. Relacionar la integridad de la TP con la integridad del acrosoma.
4. Identificar el patrón de proteínas extraídas de la TP antes y después del proceso de congelación-descongelación.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Animales**

Las muestras de semen fueron obtenidas de 12 verracos fértiles de cuatro diferentes razas Duroc (n=3), Landrace (n=3), Yorkshire (n=3) y Pelón mexicano (n=3). Los eyaculados (dos de cada animal), fueron obtenidos por el método de la mano enguantada. Los cerdos provenían de granjas ubicadas en Tepic, Nayarit; Tepeji del Rio, Hidalgo y del D.F. Para el transporte del semen hasta el laboratorio y equilibrio del mismo, las muestras fueron diluidas en una proporción 1:1 con el diluyente de larga acción MR-A (Kubus) o IMV XT-R y mantenidas a 18-20°C durante este tiempo (con excepción de las provenientes de la granja ubicada en el estado de Nayarit, las que se procesaron en el mismo sitio). El descenso de temperatura se realizó de manera gradual, introduciendo para ello bolsas de refrigerante, por periodos cortos, en la hielera de transporte.

#### **1.1 Evaluación espermática**

Los eyaculados fueron evaluados macroscópica y microscópicamente. Solamente las muestras que presentaban una motilidad progresiva mínima de 80%, un porcentaje de anormalidades menor al 15% y una concentración espermática mínima de  $150 \times 10^6$  cels/ml fueron incluidas en este estudio. La motilidad fue evaluada en una gota de semen colocada en un portaobjetos a una temperatura de 37° C y observada subjetivamente al microscopio de luz por un técnico especializado; la escala de motilidad fue incrementos del 5% (Kommisrud *et al.*, 2002; Vyt *et al.*, 2004).

Para evaluar el porcentaje de anormalidades, una gota de semen se tiñó con una gota de eosina-nigrosina, se realizó un frotis y se dejó secar al aire; se contaron 200 células en un microscopio de luz marca Carl Zeiss. La concentración espermática se realizó empleando una cámara de Neubauer depositando en la misma una gota de semen (diluido en formaldehído 1:200).

Después de la evaluación, el eyaculado fue dividido en dos fracciones: una fracción fue procesada para su congelación, utilizando para ello el método de Thilmant (1997), y la otra fue usada en fresco (control).

## **2. Congelamiento de semen**

Una vez en el laboratorio, mientras se terminaba el tiempo de equilibrio del semen (2-3 horas dependiendo del volumen), se procedió a preparar dos diluyentes (A y B), con dextrosa (2.5 g), yema de huevo (10 ml) y agua desionizada cbp 50 ml. En el caso del diluyente B se añadió glicerol (5 ml) (Córdova *et al.*, 2001). Ambos diluyentes fueron centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado. El diluyente A fue llevado a la temperatura a la que se transportó el semen. El semen fue centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue desechado y la pastilla espermática fue reconstituida en el diluyente A, a una concentración de  $6 \times 10^9$  cels/ml y la temperatura se disminuyó paulatinamente a 15° C (aproximadamente en 30 min), misma que se mantuvo por tres horas. Posteriormente, la temperatura del semen se disminuyó lentamente hasta alcanzar 5° C (1.5 horas aproximadamente) y se le adicionó, a la misma temperatura, el diluyente B en fracciones de 0.5ml, 1ml, 1.5ml y 2ml, con intervalos de 10 minutos entre cada una. La concentración fue ajustada a  $6 \times 10^8$  cels/ml y las muestras fueron envasadas en pajillas francesas de 0.5 ml y selladas con plastilina no tóxica. Inmediatamente después, las muestras fueron colocadas en vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos y finalmente sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento (por lo menos dos semanas antes de usarse).

### **2.1 Descongelación**

Las pajillas fueron extraídas del nitrógeno líquido e introducidas en un baño maría a 56 °C durante 12 segundos y mantenidas a temperatura ambiente hasta su evaluación. Las técnicas que se describen a continuación fueron

aplicadas a las muestras de ambos tratamientos (espermatozoides frescos y congelados -descongelados).

## **2.2 Decapitado de espermatozoides**

Se realizó por el método de Si y Okuno (1999) y modificado por Martel (2006). El procedimiento se realizó a 4° C, en presencia de un cóctel comercial de inhibidores de proteasas (40µl/ml) (Roche). Muestras frescas y descongeladas fueron lavadas en NaCl 154 mM (SSF) y resuspendidas a una concentración de  $10 \times 10^6$ . Para el decapitado se emplearon perlas de vidrio  $\leq 106\mu\text{m}$  (Sigma, México) en una relación 3:1. Las muestras fueron homogenizadas en un vortex durante 2 minutos (Si y Okuno, 1999). El sobrenadante fue recuperado y se filtró a través de una membrana de Nylon con un tamaño de poro de  $11\mu\text{m}$  (Millipore), como soporte se utilizó un filtro para colectar embriones. Este proceso permitió recuperar las cabezas espermáticas las cuales fueron centrifugadas a 2400 rpm durante 10 min, en una centrífuga clínica. La pastilla fue resuspendida en SSF y el sobrenadante fue desechado. Para la evaluación el porcentaje de cabezas recuperadas una alícuota de las cabezas resuspendidas se colocó en un portaobjetos y se evaluaron al microscopio de luz con el objetivo 32X. La concentración de las cabezas espermáticas fue determinada empleando una cámara e Neubauer, la concentración se ajustó a  $35 \times 10^6$ . Las muestras fueron centrifugadas a 2400 rpm durante 10 minutos y resuspendidas en PBS. Con este método se aseguró el 95% de purificación de cabezas espermáticas.

## **3. Evaluación de la integridad de la TP**

### **3.1 Exposición y extracción de proteínas de la TP**

Para extraer la MP y el acrosoma, y exponer la TP, los espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración de  $35 \times 10^6$  cels/ml y tratados con el detergente neutro Brij 36-T (concentración final 1.2%) por 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las muestras fueron lavadas tres veces en

NaCl 154 mM (SSF) por centrifugación/resuspensión a 2500 rpm y el sobrenadante fue fijado en fijador de Karnovsky (1965) y procesadas para su evaluación al microscopio electrónico de transmisión (MET) por tinción negativa.

Para la extracción de las proteínas de la TP, las muestras fueron resuspendidas en SSF y adicionadas con SDS al 1.2% (concentración final) y se incubaron a temperatura ambiente durante 13 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Para la precipitación de las proteínas extraídas el sobrenadante fue recuperado y depositado v:v en acetona fría por un período de 12 a 24 hrs a -20°C. La pastilla obtenida fue fijada para su evaluación al MET por tinción negativa.

### **3.2 Electroforesis de proteínas extraídas**

Las proteínas precipitadas con acetona fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 400 µl de amortiguador de muestra y hervidas por 5 minutos. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% por el método descrito por Laemmli (1970), como marcadores se utilizaron proteínas de bajo peso molecular. Las muestras fueron corridas a 100 voltios constantes. Los geles fueron teñidos con plata, por el método de Oakley *et al.* (1980). Es importante señalar que las proteínas fueron extraídas tanto de espermatozoides completos (cabeza y flagelo), como de cabezas espermáticas. Asimismo, se realizó la electroforesis de los tres lavados por centrifugación/resuspensión para eliminar el detergente Brij 36-T, con la finalidad de comprobar que no habían remanentes de proteínas de membranas plasmática y membrana acrosomal externa durante el proceso de extracción.

### **3.3 Microscopia Electrónica**

**3.3.1 Tinción negativa.** Las muestras tratadas con Brij 36-T fueron fijadas en el fijador Karnovsky por 2 horas a 4°C (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Posteriormente, las muestras fueron lavadas por

centrifugación/resuspensión 2 veces en PBS y 2 veces en agua destilada y resuspendidas en esta última en su volumen inicial. Una gota de cada muestra fue colocada sobre una rejilla de 200 mesh cubierta con membrana de colodión-carbón, el exceso de muestra fue retirado con papel filtro y los espermatozoides fueron teñidos con ácido fosfotúngstico al 0.2% en solución acuosa por 3 minutos. Para la evaluación de la TP las muestras fueron observadas utilizando un MET Carl Zeiss 900. En cada una de las 12 muestras tratadas con los detergentes Brij y SDS se observaron 50 células en semen fresco y 50 células en semen congelado-descongelado seleccionadas aleatoriamente, analizando un total de 2400 cabezas espermáticas. Durante la evaluación al MET, la integridad de la subestructura fue clasificada en: normal, dañada y sin subestructura (Ver resultados).

Adicionalmente, muestras de espermatozoides sin el tratamiento con el detergente Brij 36-T fueron procesadas con la misma técnica.

**3.3.2 Cortes finos.** Se realizaron cortes finos de las cabezas espermáticas tratadas con Brij 36-T, para ello los espermatozoides fueron fijados (v/v) en fijador de Karnovsky por 20 min. Para retirar el fijador, las células fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 3 min (lavado), el sobrenadante fue descartado, la pastilla fue resuspendida en PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9.6mM, pH de 7.4) y las células se lavaron dos veces en este último y resuspendidas en  $\text{OsO}_4$  al 1% en PBS para su postfijación por 1 hr a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas a través de una serie de gradientes ascendentes de etanol e incluidas en resina de Spurr. Cortes finos plateados ó dorados fueron obtenidos y teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, y examinados al MET.

### **3.4 Evaluación del diámetro ecuatorial espermático**

Las muestras tratadas con Brij 36-T y SDS fueron agitadas en un vortex y de cada una de ellas se tomó una gota de 15  $\mu\text{l}$  que fue colocada sobre un portaobjetos y se dejó secar al aire. Para la tinción de las células, los

portaobjetos fueron sumergidos en alcohol al 96% por 10 minutos. Enseguida fueron sumergidos durante 30 segundos en alcohol absoluto (dos veces) y posteriormente fueron teñidas con hematoxilina durante 7 minutos. Las muestras fueron deshidratadas y montadas con bálsamo de Canadá. Fotografías de las células espermáticas fueron tomadas empleando un microscopio marca Leica modelo DMLS equipado con una cámara JVC modelo KY-F70B (Víctor Co., Yokohama, Japón) y las imágenes fueron analizadas con el Software para análisis de imagen Automontage (Synchrosopy, Frederick, MD, USA). El Software se empleo para medir la longitud ecuatorial en 50 cabezas espermáticas de cada muestra.

#### ***4. Evaluación del acrosoma***

Se realizó por la técnica de Triple tinción (Talbot y Chacon, 1981). Se tomaron 100  $\mu$ l de cada muestra ( $35 \times 10^6$  cels/ml) y fueron adicionados con 100  $\mu$ l de azul tripán al 2% en PBS, e incubados a 37°C durante 15 minutos. Las muestras fueron lavadas varias veces por centrifugación/resuspensión a 1200 rpm por 3 minutos, hasta que el sobrenadante se observó transparente, enseguida fueron resuspendidas en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato (0.1M pH de 7.4) e incubadas 30 minutos a 4° C. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos, el sobrenadante fue eliminado y las pastillas fueron resuspendidas y lavadas en PBS. Una gota de cada muestra fue tomada para realizar un frotis que se dejó secar al aire. Los frotis fueron incubados con café Brismack al 0.8% en solución acuosa (pH de 1.8) a 37° C durante 15 minutos y posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada. Las muestras fueron teñidas con rosa de bengala al 0.8% en amortiguador Tris (0.1M, pH 5.3) a temperatura ambiente durante un minuto. Por último, los frotis fueron enjuagados con agua destilada y dejados secar al aire para su observación al microscopio de luz. En cada una de las 12 muestras se observaron 50 células en semen fresco y 50 células en semen congelado-descongelado, analizando un total de 1200 cabezas espermáticas.

Los espermatozoides fueron clasificados como: vivo con acrosoma intacto (VAI; rosa sobre la región acrosomal/café sobre la región posacrosomal); vivo con reacción acrosomal (VRA; sin tinción en la región acrosomal/café sobre la región posacrosomal); muerto (rosa sobre la región acrosomal/azúl sobre la región posacrosomal, así como sin tinción en la región acrosomal/azúl sobre la región posacrosomal).

### **5. Análisis estadístico**

El efecto de la congelación-descongelación sobre la integridad de la subestructura de la TP, fue evaluado con un modelo logístico para variables ordinales. La unidad experimental fue el eyaculado, la variable dependiente fue la integridad de la subestructura de la TP, definiéndose tres niveles crecientes de daño; normal, dañada y ausente. Las variables independientes fueron el efecto del tratamiento de congelación-descongelación, raza e individuo. Se realizaron análisis con tres modelos 1) usando como variable independiente el tratamiento, 2) usando como variables independientes el efecto de tratamiento, raza e interacción tratamiento por raza y 3) usando como variables independientes el efecto de tratamiento, individuo e interacción tratamiento por individuo. Además, se estimó el coeficiente de correlación por rangos de Spearman entre el porcentaje de espermatozoides vivos con reacción acrosomal y el porcentaje de espermatozoides con TP dañada (Agresti, 2002).

Para estimar el promedio de la longitud, ancho y separación de las pestañas de la subestructura de la TP del espermatozoide del cerdo, se realizaron estadísticas descriptivas (media, mínima, máxima, desviación estandar y el error) en 21 células, las cuales presentaron la subestructura a manera de pestañas.

Con el fin de evaluar los efectos de tratamiento de congelación-descongelación, de raza, así como la interacción raza por tratamiento sobre la motilidad progresiva se realizó un análisis de varianza.



Para comparar la magnitud de los espermatozoides con SDS y Brij, se realizaron pruebas de t por raza, utilizando la medición del diámetro de la región ecuatorial de la cabeza de 50 espermatozoides tratados con hematoxilina.

## **VII. RESULTADOS**

### ***Integridad de la subestructura de la TP***

En la Figura 4 se muestran las características que fueron tomadas en consideración para la evaluación de la subestructura de la TP del espermatozoide del cerdo antes y después del proceso de criopreservación. La subestructura de la TP fue considerada como *normal* cuando presentó una morfología a manera de grecas rodeando en forma continua la porción apical de la hoja posacrosomal (Fig. 4a); *dañada*, cuando la subestructura presentó las grecas en forma discontinua, (Fig. 4b) ó la presencia de estructuras a manera de pestañas (Fig. 4c) y *ausente* cuando no presentó la subestructura (Fig. 4d). Los resultados obtenidos al evaluar la subestructura de la TP antes y después del proceso de congelación-descongelación mostraron que el porcentaje de espermatozoides con subestructura normal fue menor después de la congelación-descongelación (83 vs. 47%). En el semen fresco el 11.9% de los espermatozoides presentaron la subestructura dañada, mientras que después del proceso de congelación-descongelación, fue de 30.8%. Por otra parte, la ausencia de subestructura en semen fresco fue de 4.8%, contra 22.2% después del proceso de congelación-descongelación. En conjunto, estas diferencias fueron significativas ( $P < 0.001$ ) (Tabla 1). Adicionalmente, la subestructura a manera de pestañas sólo fue posible observarla en los espermatozoides descongelados.

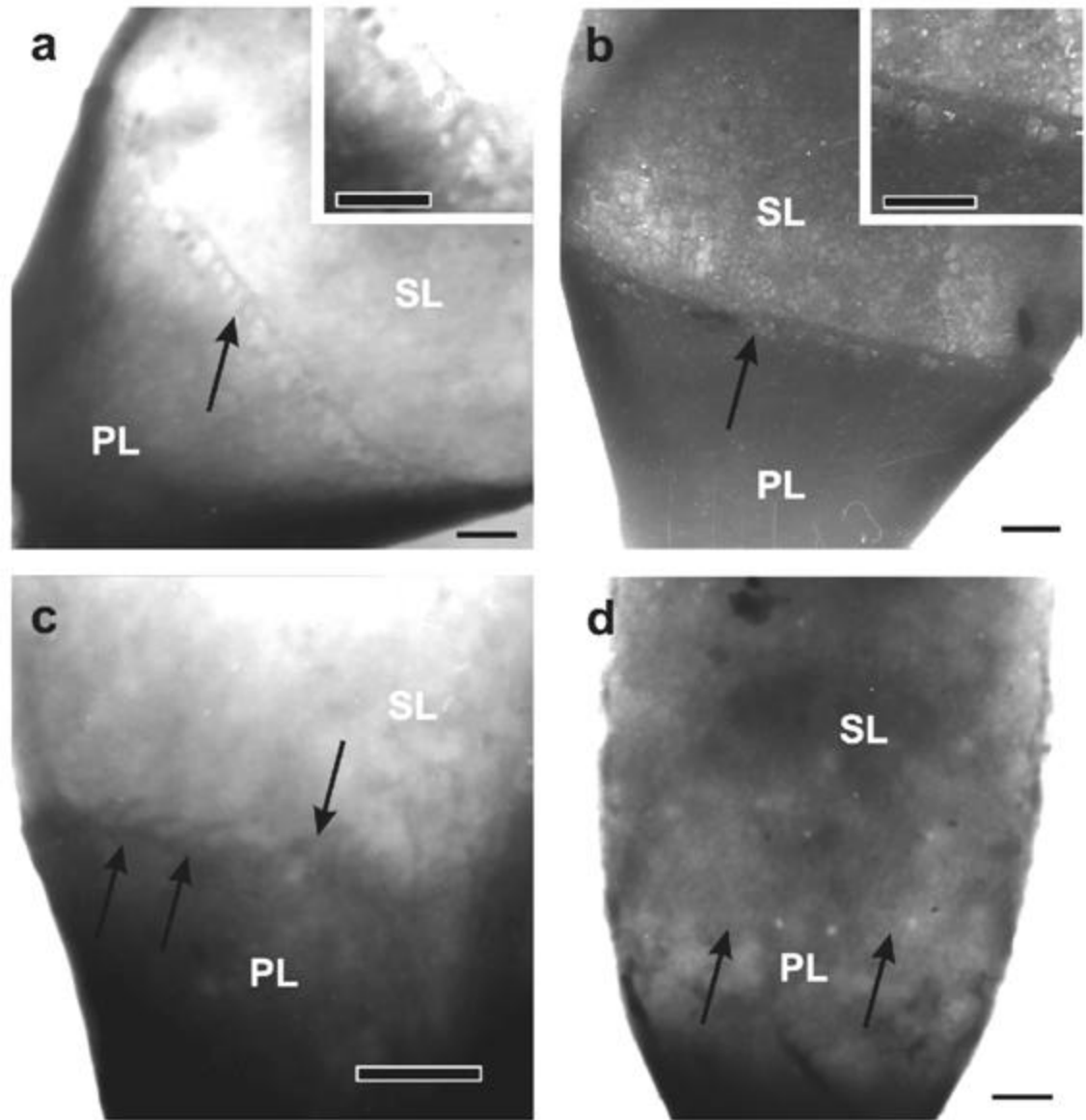


Figura 4.- Fotografías al MET de cabezas de espermatozoides de cerdo procesadas por tinción negativa. Los espermatozoides fueron tratados con Brij 36-T. (a) Subestructura normal de semen fresco. Se aprecia la subestructura a manera de "grecas" que se encuentra entre la capa subacrosomal (SL) y la hoja posacrosomal (PL) (flecha). Barra,  $0.4\mu\text{m}$ . En la esquina se puede apreciar una amplificación de la subestructura. (b) Subestructura dañada ó alterada en semen fresco. Se aprecia una discontinuidad en las "grecas" en la porción apical de la hoja posacrosomal (flecha). Barra,  $0.4\mu\text{m}$ . En la esquina se puede apreciar una amplificación de la subestructura. (c) Subestructura dañada ó alterada, procedente de una muestra congelada-descongelada. Se aprecian la subestructura a manera de "pestañas" (flechas). Barra,  $0.4\mu\text{m}$ . (d) Subestructura ausente. Cabeza espermática sin presencia de subestructura (flechas). La superficie de la porción apical de la hoja posacrosomal aparece "rasurada". Barra  $0.6\mu\text{m}$ .

Tabla 1

Porcentaje de la subestructura de la TP; normal, dañada y ausente, y el porcentaje de la integridad del acrosoma en semen fresco y congelado/descongelado en espermatozoides de cerdo.

Tratamiento	Integridad de la teca perinuclear			Integridad del acrosoma		
	Subestructura normal	Subestructura dañada	Subestructura ausente	Vivo con acrosoma intacto*	Vivo con reacción acrosomal*	Muerto*
Fresco	83.3	11.9	4.8	78.7	19.5	2.1
Descogelado	47.0	30.8	22.2	27.6	54.9	17.5

(\*) determinado con azul tripan, café Bismark y rosa de Bengala;  
P<(0.001) n=2400

Adicionalmente, para mostrar que cuando la MP y el acrosoma permanecen cubriendo la cabeza espermática no es posible observar la TP, espermatozoides intactos, es decir sin ningún tratamiento, fueron procesados por tinción negativa y observados al MET (Figura 5a). La Figura 5b es un mayor aumento de la porción apical de la región postacrosomal de este mismo tipo de espermatozoides mostrando nuevamente que no es posible apreciar la subestructura de la TP en una célula íntegra. Finalmente, la Figura 5c muestra que la TP es la única estructura que envuelve al núcleo después de que las células son tratadas con el detergente Brij 36-T.

### ***Integridad de la subestructura de la TP por raza***

Tomando solo en consideración la raza, esta resultó significativa ( $P=0.0034$ ) sobre la integridad de la subestructura de la TP antes y después del proceso de congelación-descongelación. Los espermatozoides de la raza Duroc mostraron un menor porcentaje (28.8%) ( $P= 0.0018$ ) de alteraciones sobre la TP seguido por las razas Yorkshire (33.7%) y Landrace con un porcentaje de 36.8 mientras que la raza Pelón mexicano fue la que mostró el más alto porcentaje de alteraciones (42.0%) ( $P=0.0193$ ). Sin embargo, no se observó efecto de interacción de raza por tratamiento ( $P=0.0736$ ) (Tabla 2).

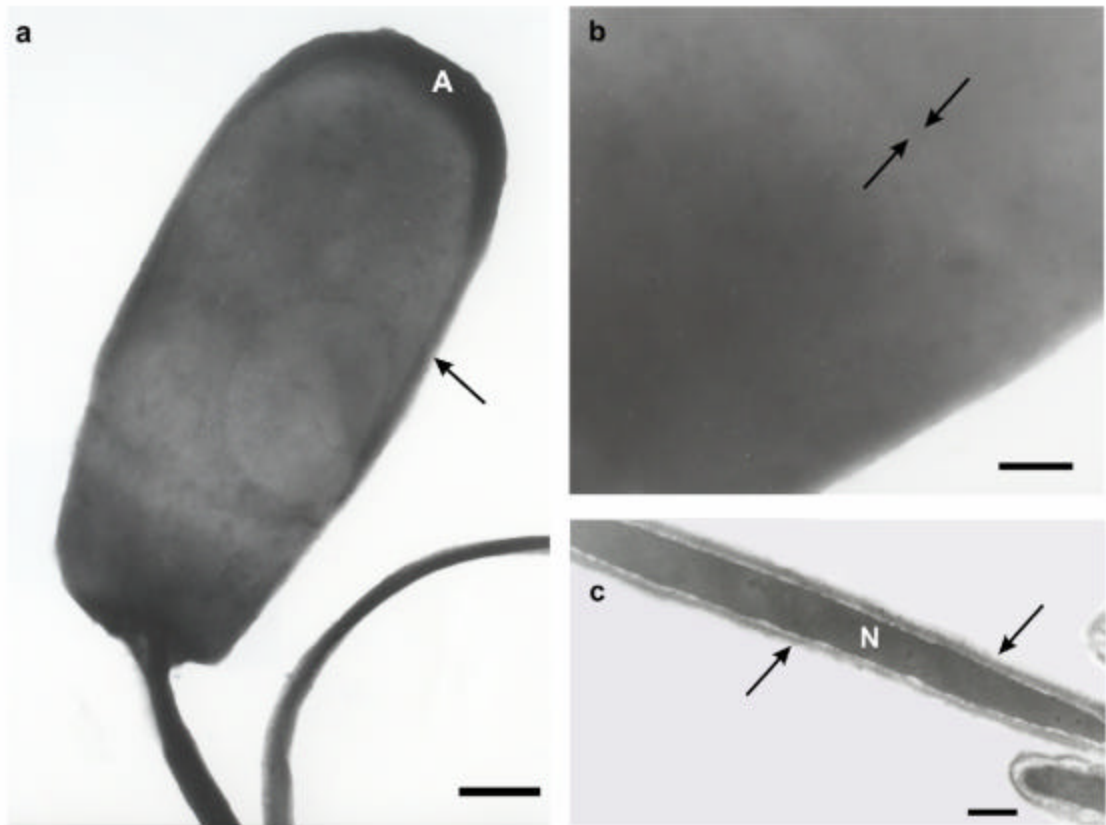


Figura 5.- Fotografías al MET de las cabezas de espermatozoides de cerdo. (a) Tinción negativa de espermatozoides sin el tratamiento de Brij 36-T, se puede apreciar la membrana plasmática (flecha), así como el acrosoma (A). Barra 1.1 $\mu$ m. (b) Aumento de la cabeza espermática, no se observa la subestructura a nivel ecuatorial. Barra, 0.4 $\mu$ m. (c) Corte fino de espermatozoides tratados con Brij 36-T, las flechas indican la teca perinuclear, también se aprecia el núcleo (N). Barra 0.25 $\mu$ m.

Tabla 2

Porcentajes de integridad de la subestructura de la teca perinuclear y el efecto marginal en semen fresco y congelado-descongelado en cuatro razas de cerdos. El efecto marginal es el promedio del semen fresco y el criopreservado.

Raza	Tratamiento								
	Semen Fresco (%)			Semen congelado-descongelado (%)			Efecto Marginal (%)		
	Subestructura			Subestructura			Subestructura		
	Normal	Dañada	Ausente	Normal	Dañada	Ausente	Normal	Dañada	Ausente
Duroc	87.5	9.5	3.0	55.0	27.5	17.5	71.3	18.5	10.3
Pelón mexicano	82.7	16.0	1.3	33.3	34.0	32.7	58.0	25.0	17.0
Landrace	78.0	14.0	8.0	48.7	26.7	24.7	63.4	20.4	16.4
Yorkshire	83.3	10.7	6.0	49.3	34.0	16.7	66.3	22.4	11.4

Efecto del Tratamiento P=0.0001; Efecto de Raza P=0.0034; Interacción raza/tratamiento P=0.0736.  
n= 2400

### ***Integridad de la subestructura de la TP por animal***

El efecto del individuo sobre la integridad de la subestructura de la TP en semen fresco y en semen congelado-descongelado fue estadísticamente significativo ( $P=0.0057$ ). Es decir, tomando en consideración la comparación entre individuos, sólo el Pelón mexicano número 3 y el Landrace número 1 se comportaron de manera diferente al resto del grupo, ya que estos presentaron los porcentajes marginales de TP normal más bajos (Tabla 3). Así mismo, la interacción individuo por tratamiento resultó estadísticamente significativa ( $P=0.0008$ ); esta interacción se explica porque los cerdos Landrace número 1 ( $P=0.0001$ ) y Pelón mexicano número 4 ( $P=0.0119$ ) se comportaron de manera diferente al promedio del grupo en cuanto a su respuesta a la congelación. En otras palabras, el cerdo Pelón mexicano número 4 tuvo mayor deterioro de la TP por la congelación y el Landrace número 1 tuvo menor deterioro que el promedio (Tabla 3).

### **Subestructura de la TP**

Los parámetros morfométricos para la subestructura en forma de pestaña de la TP del espermatozoide del cerdo fueron: largo  $132 \pm 7.2$  nm; ancho:  $9.44 \pm 0.89$  nm y para el espacio entre pestañas:  $78.9 \pm 6.3$  nm. Dicha subestructura sólo fue observada en muestras de espermatozoides descongelados.



Tabla 3  
 Porcentaje de la integridad de la subestructura de la teca perinuclear e individuo, en semen fresco y criopreservado de cerdo.

Animal	Fresco			Congelado-Descongelado			Efecto marginal		
	Subestructura			Subestructura			Subestructura		
	Normal	Dañada	Ausente	Normal	Dañada	Ausente	Normal	Dañada	Ausente
Duroc 2	87	9	4	49	41	10	68	25	7
Duroc 3	88	12	0	64	4	32	76	8	16
Duroc 5	88	8	4	58	24	18	73	16	11
Landrace 1	60	16	24	58	20	22	59	18	23
Landrace 2	82	18	0	40	36	24	61	27	12
Landrace 3	92	8	0	48	24	28	70	16	14
Yorkshire 1	80	2	18	52	24	24	66	13	21
Yorkshire 3	88	12	0	50	30	20	69	21	10
Yorkshire 5	82	18	0	46	48	6	64	33	3
Pelón mexicano 1	84	12	4	34	56	10	59	34	7
Pelón mexicano 3	76	24	0	32	26	42	54	25	21
Pelón mexicano 4	88	12	0	34	20	46	61	16	23

Efecto de tratamiento P=0.0057, interacción tratamiento por individuo P=0.0008

### ***Integridad del acrosoma***

Los resultados obtenidos de la evaluación de la integridad del acrosoma en semen fresco y en semen congelado-descongelado son presentados en la Tabla 1. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro antes de la congelación fue del 78.7 contra 27.6 después del proceso ( $P < 0.001$ ). Por el contrario, el porcentaje más alto para espermatozoides vivos con reacción acrosomal se obtuvo después del proceso de congelación, este fue de 54.9 mientras que en el descongelado fue de 19.5 ( $P < 0.001$ ). Asimismo, se incrementó el porcentaje de espermatozoides muertos en el semen criopreservado (2.1 vs. 17.5) ( $P < 0.001$ ). Por otra parte, el coeficiente de correlación de rangos estimados entre el porcentaje de espermatozoides con TP dañada y el porcentaje de espermatozoides VRA, tomando en consideración el conjunto de muestras de ambos tratamientos, fue de 0.68 ( $P = 0.0026$ ), es decir, existe una relación entre ambos.

### **Extracción de proteínas de la TP**

El tratamiento con SDS de los espermatozoides desmembrados de ambos tipos de muestras (fresco y congelado-descongelado) para la extracción de las proteínas de la TP, permitió sólo la extracción parcial de la misma ya que restos de ella fueron observadas después del tratamiento por 13 minutos con el detergente; siendo más resistente a la extracción la región subacrosomal (Figuras 6a y 6b). Sin embargo, en las muestras congeladas-descongeladas aparentemente hubo una mayor extracción; el simple tratamiento con el detergente Brij 36-T pareció extraer algunas proteínas, ya que las cabezas se observaron más electrolúcidas de la región subacrosomal (Figura 6c) y con el tratamiento con SDS se presentaron diversas áreas electrolúcidas bien definidas, sobretodo en la región posacrosomal (Figura 6d).

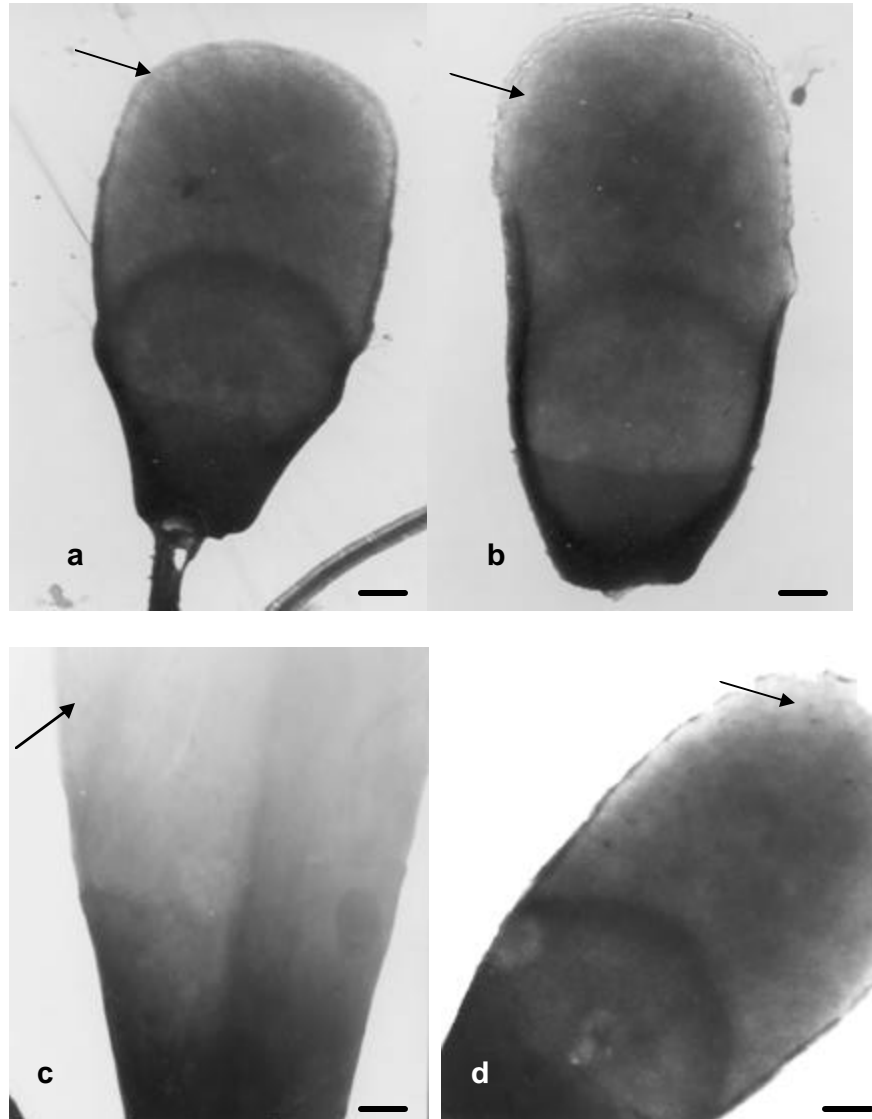


Figura 6.- Fotografías al MET de cabezas de espermatozoides de cerdo procesadas por tinción negativa en semen fresco y congelado-descongelado. Los espermatozoides fueron tratados con Brij 36-T para exponer la TP y con SDS para extraer a la misma. (a) Cabeza espermática con la TP expuesta en semen fresco. Se aprecia la región subacrosomal más electrolúcida (flecha). Barra, 0.4 $\mu$ m. (b) Cabeza espermática con la TP extraída en semen fresco. Se aprecia la región subacrosomal más electrolúcida (flecha). Barra, 1.1 $\mu$ m. (c) Cabeza espermática con la TP expuesta en semen congelado-descongelado. Se aprecian la región subacrosomal más electrolúcida que en semen fresco (flecha). Barra, 0.4 $\mu$ m. (d) Cabeza espermática con la TP extraída en semen congelado-descongelado. Se aprecia la región subacrosomal más electrolúcida que en semen fresco (flecha). Barra 1.1 $\mu$ m.

En la figura 7 se muestra los patrones electroforéticos obtenidos de los extractos de la TP obtenidos de los espermatozoides y cabezas espermáticas desmembrados. En general, en la TP proveniente del semen fresco se observaron 16 bandas polipeptídicas cuyos peso moleculares relativos (Mrs) fueron de 13 hasta 87 kDa (carril 3); siendo cualitativamente las más abundantes las de Mrs de 31, 32 y 49 kDa. Por otra parte, en la TP proveniente de este mismo tipo de células pero sin flagelo (es decir sólo cabezas espermáticas) se presentaron las mismas bandas polipeptídicas que en el caso anterior excepto un pequeño número de proteínas agrupados en una banda polipeptídica con Mr de 16-22 kDa (carril 1). Aunque, en el semen congelado-descongelado sólo se encontraron 13 bandas polipeptídicas cuyos Mrs iban de 13 a 74 kDa, estas cualitativamente se tiñeron con mayor intensidad, siendo las mayoritarias las de 17, 30 y 40 kDa (carril 4). En el extracto proveniente de la TP de las cabezas los patrones proteicos obtenidos de las muestras congeladas-descongeladas (carril 2) aparecieron dos bandas proteicas de 17 y 97 kDa que no se presentaron en semen fresco. Por otra parte, solo el primero de los 3 sobrenadantes obtenidos de los lavados de las células para retirar el Brij 36-T (carriles 5, 6 y 7), previo al tratamiento con SDS para la extracción de las proteínas de la TP, presentó varias bandas polipeptídicas que probablemente correspondan a proteínas de MP.

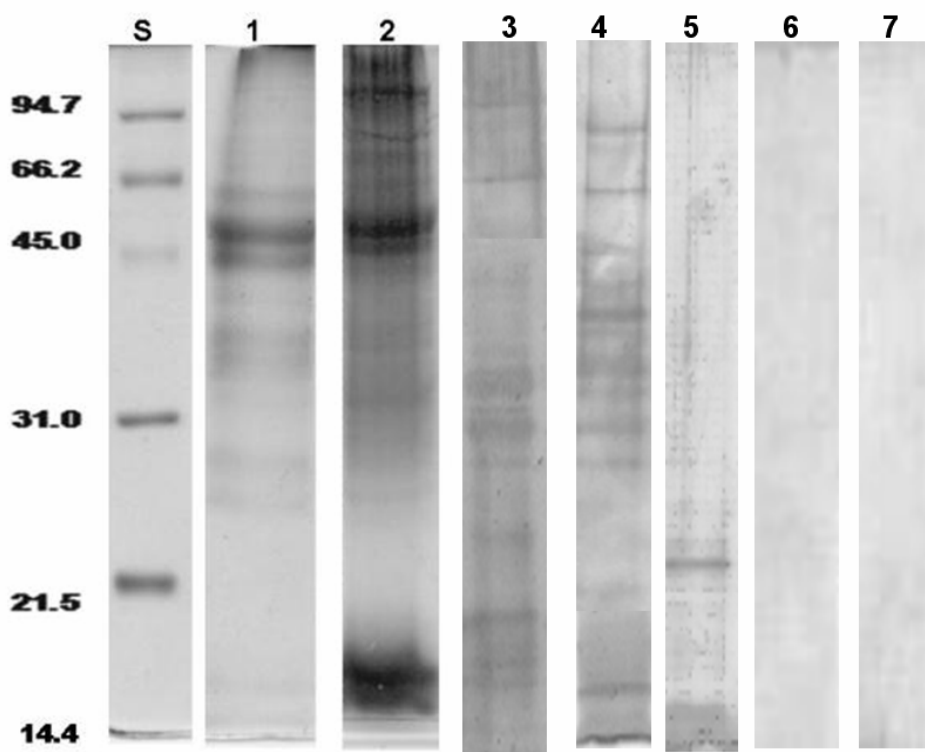


Figura 7.- SDS-PAGE 10%. Marcadores de peso molecular estandar (S); extracto proteico de espermatozoides decapitados frescos (1); extracto proteico de espermatozoides decapitados congelados-descongelados (2); extracto proteico de espermatozoides completos frescos (3); extracto proteico de espermatozoides completos congelados-descongelados (4); primer lavado para extraer el detergente Brij 36-T (5); segundo lavado para extraer el detergente Brij 36-T (6); tercer lavado para extraer el detergente Brij 36-T (7).

### **Evaluación del diámetro ecuatorial espermático**

Adicionalmente, con la finalidad de evaluar si la extracción de las proteínas de la TP modificaba el diámetro de las cabezas, se realizó una medición del diámetro de la región ecuatorial antes y después del tratamiento con SDS (Figuras 8-11). Esta medición, mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ), al comparar los tratamientos con Brij 36-T y con SDS en las muestras provenientes de cerdos de las razas Duroc y Pelón mexicano ( $3.87 \mu\text{m}$  vs.  $3.47 \mu\text{m}$  y  $2.82 \mu\text{m}$  vs.  $2.69 \mu\text{m}$ , respectivamente), mientras que en las muestras provenientes de los cerdos de las razas Landrace y Yorkshire esto no fue así ( $3.57 \mu\text{m}$  vs.  $3.56 \mu\text{m}$  y  $3.02$  vs.  $3.01$ , respectivamente).

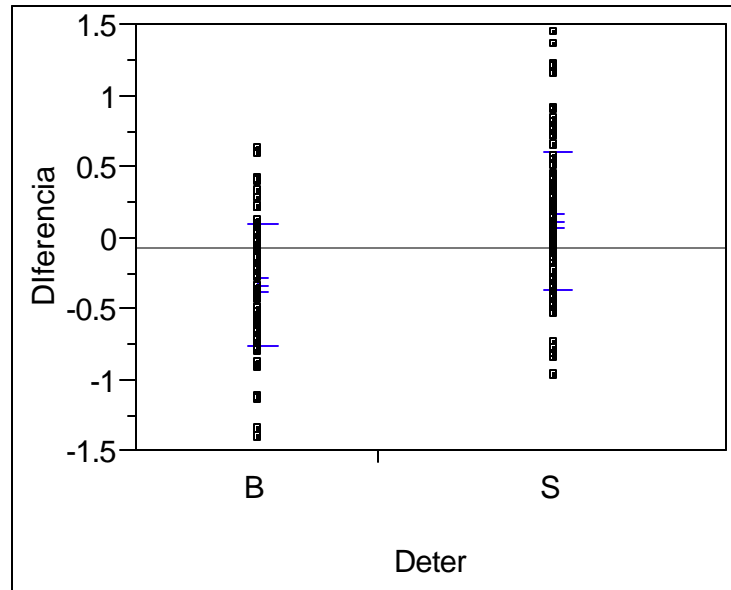


Figura 8. Medición longitudinal en  $\mu\text{m}$  de las cabezas antes y después del tratamiento con SDS en la raza Duroc. Deter= detergente; B= Brij 36-T; S= SDS.  $P < 0.0001$   $n=100$

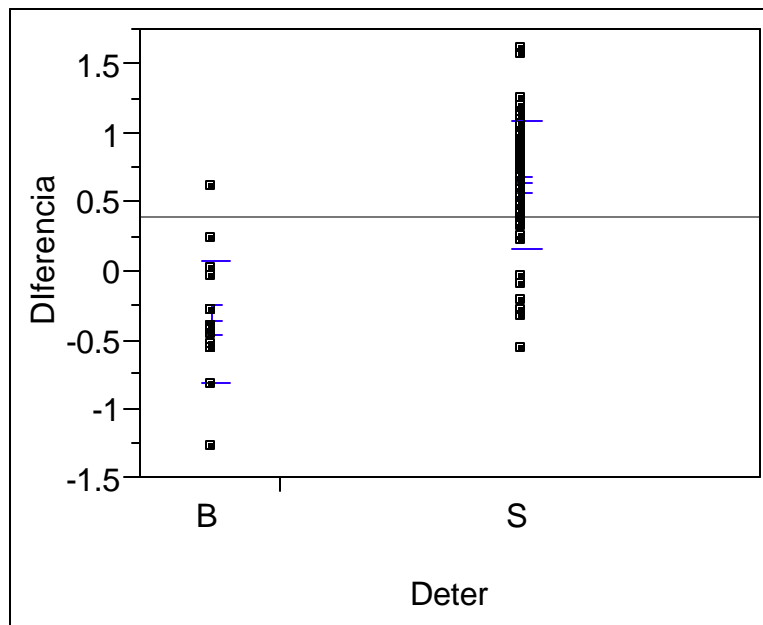


Figura 9. Medición longitudinal en  $\mu\text{m}$  de las cabezas antes y después del tratamiento con SDS en la raza Pelón mexicano. Deter= detergente; B= Brij 36-T; S= SDS.  $P < 0.0001$   $n=100$

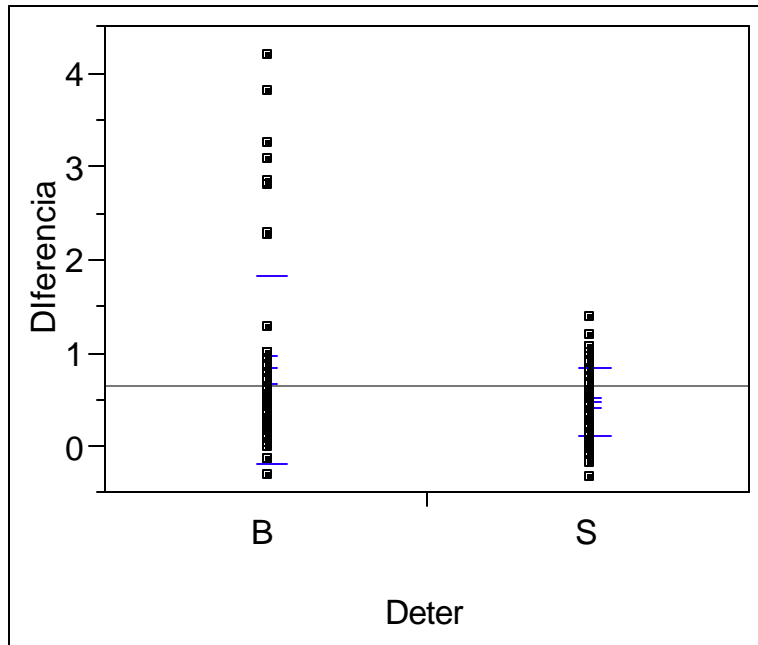


Figura 10. Medición longitudinal en  $\mu\text{m}$  de las cabezas antes y después del tratamiento con SDS en la raza Yorkshire. Deter= detergente; B= Brij 36-T; S= SDS.  $P < 0.9872$   $n = 100$

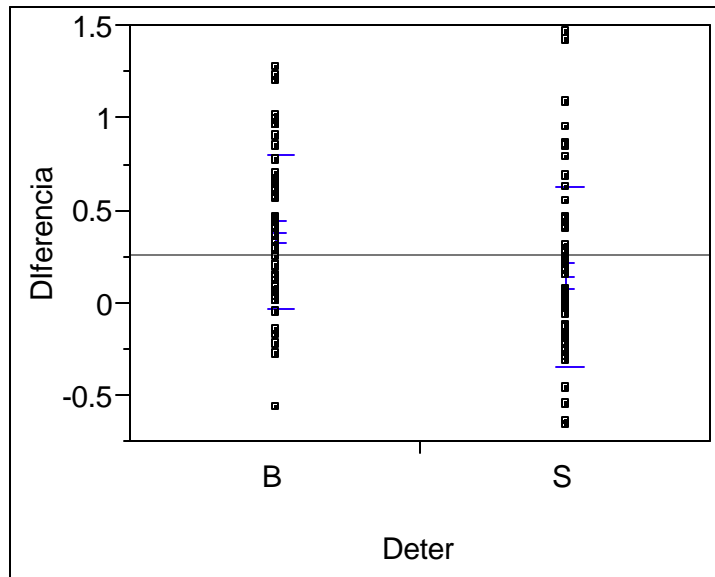
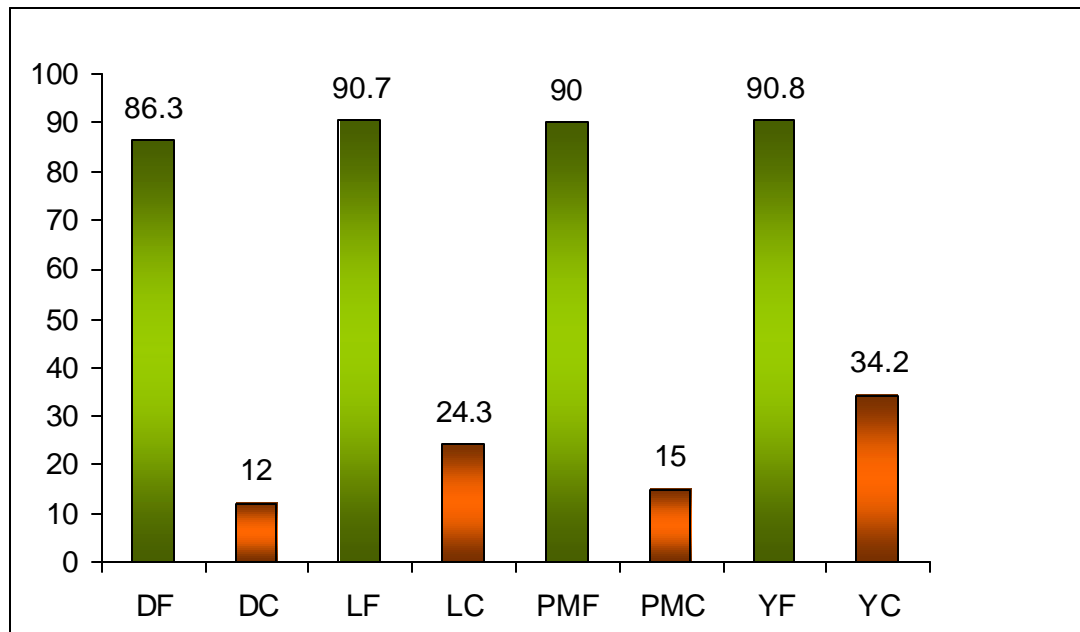


Figura 11. Medición longitudinal en  $\mu\text{m}$  de las cabezas antes y después del tratamiento con SDS en la raza Landrace. Deter= detergente; B= Brij 36-T; S= SDS.  $P < 0.9951$   $n = 100$

### Motilidad espermática

En promedio la motilidad en semen fresco fue de 89% y en semen congelado-descongelado fue del 21%. La motilidad más alta en semen fresco fue del 90% ( $\pm$  3.2 DE) y la más baja fue de 86% ( $\pm$  2.2 DE). Después del proceso de congelación-descongelación, la motilidad más alta fue de 34 % ( $\pm$  3.5 DE) y la motilidad más baja fue de 12% ( $\pm$  2.2 DE), siendo las razas Duroc y Pelón mexicano, las más afectadas con una motilidad de 12% ( $\pm$  2.2 DE) y 15% ( $\pm$  3.2 DE) respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Porcentaje de motilidad en semen fresco y semen congelado-descongelados en cuatro razas de cerdos.



DF: semen fresco de la raza Duroc; LF: semen fresco de la raza Landrace; PMF: semen fresco de la raza Pelón mexicano; YF: semen fresco de la raza Yorkshire; DC: semen congelado-descongelado de la raza Duroc; LC: semen congelado-descongelado de la raza Landrace; PMC: semen congelado-descongelado de la raza Pelón mexicano; YC: semen congelado-descongelado de la raza Yorkshire.



## **VIII. DISCUSIÓN**

Los resultados de esta investigación indican que el proceso de congelación-descongelación produce alteraciones en la morfología de la subestructura de la TP (Tabla 1).

El daño en la subestructura de la TP, causado por la congelación, coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (2006), en el semen de bovino criopreservado. Ambos hallazgos soportan la propuesta de Jager *et al.* (1990), quien señala que el proceso de congelación-descongelación causa alteraciones en el interior del espermatozoide que permiten que agentes externos, como la heparina, actúen sobre el material genético de la célula. A este último respecto, Sutovsky *et al.* (1997) y Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), indicaron la necesidad de la remoción de la TP para que DNA espermático pueda ser descondensado. Por lo tanto, se podría sugerir que las alteraciones sobre la integridad de la TP en el semen criopreservado disminuyen la estabilidad nuclear espermática, haciéndolo sensible a agentes o materiales extraños, tales como factores descondensantes.

La integridad del acrosoma es esencial considerando que éste contiene enzimas que tienen un papel de vital importancia en la penetración de la zona pelúcida (Kjoestad *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la TP puede tener un papel estructural en la estabilización del acrosoma (Yagi y Paranko, 1995). La TP aparece en la etapa temprana de la espermiogénesis estrechamente relacionada con el acrosoma y la membrana nuclear (Oko y Maravei 1994) y en el ser humano se ha encontrado que fallas en la formación de la misma se asocian con espermatozoides de cabeza redonda (sin acrosoma) (Escalier, 1990). Por otro lado, Longo *et al.* (1991), indican que las proteínas de la TP pueden contribuir a la asociación núcleo-acrosoma proporcionando un tipo de soporte intermembranoso. Se ha sugerido que el proceso de congelación-descongelación puede producir un deterioro significativo en la integridad del acrosoma del espermatozoide de cerdo (Watson *et al.*, 1995). Los resultados en este estudio también mostraron que

después del proceso de congelación-descongelación aumenta el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma y de manera notoria este coincidió con el de la TP dañada. Sin embargo, mientras Martínez *et al.* (2006), en el bovino encontraron una correlación entre el número de espermatozoides con la subestructura de la TP ausente y el número de espermatozoides con reacción acrosomal, en este trabajo se encontró que ligeras alteraciones de la subestructura se correlacionaron con la pérdida del acrosoma. Esto sugiere que en el semen de bovino la subestructura de la TP es menos sensible al proceso de criopreservación. Esto podría ser debido a diferencias en la composición de la subestructura de la TP, ya que la morfología de la subestructura es específica de especie (Koehler, 1970; Olson *et al.*, 1983; Watson *et al.*, 1995; Juárez-Mosqueda y Mújica 1999; Felipe, 2006).

Por otra parte, ya que la TP ha sido relacionada con eventos como el mantenimiento de la integridad de la cabeza espermática (Sutovsky *et al.*, 1997), el mantenimiento de los dominios de membrana plasmática (Gadella *et al.*, 1995), en la penetración del espermatozoide al huevo (Sutovsky *et al.*, 2003), en la protección del DNA espermático (Von Bölow *et al.*, 1997), en la activación del ovocito (Kimura *et al.*, 1998) y en la descondensación del material genético (Sutovsky *et al.*, 2003), el daño observado en la subestructura de la TP podría estar relacionado con daños más extensivos en la TP, afectándose así el proceso de fertilización.

Por otra parte, si bien en este estudio la subestructura a manera de pestañas fue similar a la reportada por Juárez-Mosqueda y Mújica (1999) en el espermatozoide de cerdo, ésta sólo fue encontrada en los espermatozoides criopreservados. Por ello, posiblemente en dicho trabajo la muestra de semen haya provenido de una muestra congelada-descongelada, y que en este estudio fue considerada como una alteración de la TP.

Se descarta que la presencia de la subestructura se trate de un artefacto ya que la misma ha sido reportada en otras especies como el conejo (Koehler,

1970), el bovino (Olson *et al.*, 1983; Felipe 2006), borrego (Watson *et al.*, 1995) y cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999). Por lo que es apoyada la propuesta de Martínez *et al.* (2006), que la subestructura puede ser utilizada como un marcador morfológico para evaluar la integridad de la TP.

En relación a la variabilidad que se encontró en el porcentaje de alteraciones sobre la TP entre verracos, podría deberse a las características propias de cada individuo. Medrano y Holt (1998), Gadea *et al.* (2003) y Holt *et al.* (2005), mencionan que existen machos clasificados como “buenos congeladores” y “malos congeladores”. En apoyo de ello, Thurston *et al.* (2002), describen un marcador genético para capacidad de congelación espermática. Esto es de interés ya que las pruebas de interacción del efecto de individuo por tratamiento pueden detectar diferencias en la capacidad de individuos a la congelación.

La diferencia en la extracción de las proteínas de la TP entre el semen fresco y descongelado posiblemente se deba a la termosensibilidad que presentan algunas proteínas citoesqueléticas (Watson, 1995; 2000; Petrunkina, 2004; 2005). Las diferencias encontradas en las mediciones del diámetro de las cabezas antes y después del proceso de congelación, principalmente de los cerdos de la raza Duroc y Pelón mexicano, apoyan las diferencias en la extracción no sólo entre ambos tipos de muestras sino posiblemente entre raza. Esto último posiblemente contribuya a que estos cerdos posean una menor resistencia a la congelación-descongelación.

Por otra parte, la menor extracción de las proteínas de la región subacrosomal de la TP se deba a que las proteínas de esta región están estabilizadas por una mayor cantidad de puentes disulfuro, como fue reportado en el espermatozoide del cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

Las bandas proteicas encontradas en este estudio, son similares a las reportadas por Rousseaux-Prévost *et al.* (2003) en la TP del espermatozoide

de la misma especie, los autores reportaron un patrón de bandeo de 6.5 a 116 kDa, mientras que en este estudio el rango fue de 13.8 a 87 kDa con un promedio de 16 bandas proteicas, estas diferencias entre los rangos de peso molecular posiblemente se deban a diferencias en el proceso de extracción de la TP entre ambos trabajos. En este estudio las bandas observadas con mayor frecuencia fueron las de 17 kDa y entre 40 - 49 kDa. Estas últimas se encontraron solamente en la TP de las células decapitadas, por lo que se trata de proteínas exclusivas de la TP y no proviene del flagelo. Adicionalmente, Oko y Maravei (1994), observaron en el toro 20 bandas proteicas lo que podría sugerir una diferencia entre el contenido proteico entre especies.

Adicionalmente, no se descarta la posibilidad de que otras proteínas, además de las que integran a la subestructura están sufriendo un proceso de desestabilización durante el proceso de criopreservación.

Respecto a la disminución en la motilidad espermática en la raza Duroc después del proceso de congelación-descongelación, los datos coinciden con lo reportado por Almlid y Hofmo (1996) quienes mencionan que esta raza muestra menor motilidad después del proceso de congelación-descongelación, y coinciden también con lo encontrado en las razas Landrace y Yorkshire que son las que mantienen una mejor motilidad. Sin embargo, los resultados son contrarios a lo señalado por Lemus y Alonso (2005) para la raza Pelón mexicano, quienes encontraron mejor porcentaje de motilidad sobre las razas Landrace y Duroc. En este estudio se encontró que la motilidad del semen proveniente de la raza Pelón mexicano fue similar a la motilidad del semen proveniente de la raza Duroc.

Finalmente, diversas investigaciones están siendo realizadas para evaluar las posibles alteraciones fisiológicas en el proceso de fertilización ocasionadas por el daño sobre la TP en los espermatozoides criopreservados y también con la finalidad de desarrollar diluyentes específicos que ayuden a reducir el daño

sobre esta estructura (Felipe 2006; García 2006; Gutiérrez-Pérez, 2006; Márquez 2006; Martel 2006; Martínez *et al.*, 2006; Yescas 2006).

## ***IX CONCLUSIONES***

Los resultados indican que el proceso de congelación-descongelación dañó la integridad de la subestructura de la TP.

Los datos de esta investigación refuerzan la hipótesis que la TP estabiliza al acrosoma ya que los cambios estructurales causados por el proceso de congelación-descongelación en la subestructura de la TP del cerdo se relacionaron con la pérdida del acrosoma, lo cual puede explicar parcialmente la baja viabilidad observada en el semen congelado-descongelado.

La subestructura a manera de pestañas es una alteración de la célula provocada por el proceso de congelación-descongelación.

Existe una desestabilización bioquímica de la TP después del proceso de congelación-descongelación en virtud de que los patrones proteicos son diferentes antes a los de la TP de los espermatozoides de semen fresco.

## **X. LITERATURA CITADA**

1. Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R.P., 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 379 (2), 173-182.
2. Agresti, A., 2002. *Categorical data analysis*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
3. Aitken, R. 1997. *The cell biology of fertilization. The fate of the male germ cell*. Edited by Ivell and Holstein Plenum Press, New York, pp. 291-299.
4. Alba, J. 1985. *Reproducción animal*. Ediciones científicas.
5. Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Water, P., 2002. *The Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> Edition, Garland Science.
6. Almlid, T., Hofmo, P.O., 1996. A brief review of frozen semen application under Norwegian I.A. service conditions. *Reprod. In Domestic Animal* 31, 169-173.
7. Anchoroguy, T.J.; Cecchine, L.A.; Crowe, J.H., Crowe L.M., 1991. Insights into the Cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology* 28, 467-473.
8. Anchoroguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24, 324-331.
9. Bamba, K., Adams, L.C.E., 1990. Freezing rabbit semen by the use of BFS diluent. *Laboratory Animals* 24, 172-175.
10. Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cornier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1-7.
11. Berford, J.M., 1990. Germ cells and fertilization. In: *Reproduction in mammals*, Austin and Short. Vol 1. pp. 128-163.
12. Bellvé, A., O'Brien, D. 1983. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. In: *Mechanisms and control of animal fertilization*. Hartman J.F. (Ed.), Academic Press. pp. 55-133.
13. Breitbart, H., 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol. Cell Endoc.* 187, 139-144.

14. Breitbart, H., Naor, Z., 1999. Protein kinase in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Reviews of Reproduction*. 4, 151-159.
15. Buhr, M.M., Curtus, E.F., Kakuda, N.S., 1994. Composition and behaviour of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
16. Buhr, M.M., 1991. Preservation of boar semen alters membrane molecular dynamics. *Proc 2<sup>nd</sup> Int Conf. On boar semen Preservation, Beltsville MD* pp. 95-104.
17. Buhr, M.M., 1989. Effects of sperm preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research*. 23, 441-449.
18. Bwanga, C.O., 1991. Cryopreservation of Boar semen: I. A literature review. *Acta Vet. Scand.* 32, 431-453.
19. Bwanga, C.O., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1991<sup>a</sup>. Freezing of boar semen in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.* 26, 117-125.
20. Bwanga, C.O., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1991<sup>b</sup>. Cryopreservation of Boar semen: II Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini, maxi straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.* 32, 455-461.
21. Bwanga, C.O., Ekwall, H., Rodríguez-Martínez, H., 1991<sup>c</sup>. Cryopreservation of Boar semen: III Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing/thawing. *Acta Vet. Scand.* 32, 463-471.
22. Bwanga, C.O., Hofmo, P.O., Grevle, I.S., Einarsson, S., Rodríguez-Martínez, H., 1991<sup>d</sup>. In vivo fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi straws. *J. Vet. Med. A.* 38, 281-286.
23. Bwanga, C.O., 1990. Cryopreservation of boar semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Thesis. Swedish University of Agriculture Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Uppsala, Sweden pp. 13-113.
24. Cabello-Agüeros, J.F., Hernández-González, E.O., Mújica, A., 2003. The role of F-actin cytoskeleton associates gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 56, 94-108.



25. Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T.M., 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reprod.* 121, 395-401.
26. Chen, T., Bhowmick, S., Sputtek, A., Fowler, A., Toner, M., 2002. The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 44, 301-306.
27. Conejo, N.J., Becerril, A.J., Ortega, G.R., 1996. Diluyentes de corto período de almacenamiento utilizados en la conservación del semen porcino. En: II Jornada en Producción Porcina, FMVZ, UNAM. México D.F. pp. 99-107.
28. Córdova, I.A., Hernández, P.E., Fernández R.F., Pérez G.J.F., García A.C., Saltijeral, O.J., Martín, R.S., Lleo, C.B., 2000. Congelación de semen de verraco. UAM-X. División CBS. México.
29. Córdova I.A., Pérez J.F., Lleo B., García A., Martín Rillo S., 2001. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.* 36, 199-202.
30. Córdova-Izquierdo A., Oliva, J.H., Lléo, B., García-Arteaga, C., Concuera, B.D., Pérez-Gutiérrez, J.F., 2006. Effect of different thawing temperatures on the viability, in Vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Animal Reproduction Science* 92, 145-154.
31. Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5, 46-52.
32. Dadoune, Jean-Pierre., 2003. Expression of mammalian spermatozoa nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* 61, 56-75.
33. De Leeuw, F., Chen, H., Colenberd, L., 1990. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171-183.
34. Eberhard, T., 1995. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. *Trends in ecology and evolution* 10, 438-443.
35. Ellis, D.J., 2002. Post-tesicular development 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.* 138, 187-198.

36. Eriksson, B., Rodríguez-Martínez, H., 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatpacks and maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63, 205-220.
37. Escalier, D., 1990. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 287-297.
38. Fawcett, D., 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Rep. Suppl.* 2, 90-127.
39. Felipe, P.Y., 2006. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación del semen porcino. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM México, D.F.
40. Fiser, P.S., 1991. Interaction of cooling velocity warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar semen. *Proc. 2<sup>nd</sup>. Int. Conf. Of boar semen preservation.* Beltsville, MD, USA, pp. 123-137.
41. Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1996. Glycerol equilibration time revisited. *Boar semen preservation III. Reprod. Domest. Anim.* 31, 141-146.
42. Flesch, F., Gadella, B., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. et Bio. Acta* 1469, 197-235.
43. Foote, R.H., 2002. The history of artificial insemination; Selected notes and notables. *American society of animal Science*, pp. 1-10.
44. Fouquet, J.P., Kann, M.L., 1994. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol. Cell.* 81, 89-93.
45. Fouquet, J.P., Kann, M.L., Dadoune, J.P., 1990. Immunoelectron microscopic distribution of actin in hamster spermatids and epididymal, capacitated and acrosome reacted spermatozoa. *Tissue Cell* 22, 291-300.
46. Fraser, L., Abeydeera, L.R., Niwa, K., 1995.  $Ca^{2+}$  Regulation Mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reprod and Development* 40, 233-241.

47. Gadea, J., 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión. Spanish Journal of Agricultural Research 1 (2), 17-27.
48. Gadella, B.M., 1996. Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. Repro. Dom. Anim. 31, 63-73.
49. Gazella, B.M., López-Cardoso, M., Van Golde, L.M.G., Colenbrander, B., Gadella, J.R., 1995. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. J. of Cell Sci. 108, 935-945.
50. García, D.C., 2006. Evaluación del efecto del fluido de la tuba uterina de la cerda sincronizada, sobre la capacitación espermática de los espermatozoides criopreservados. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM México, D.F.
51. Graham, J.K., Mocé, E. 2005. Fertility evaluation on frozen/thawed semen. Theriogenology. 64:492-504.
52. Guthrie, H.D., Welch, G.R. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. Theriogenology 63, 396-410.
53. Gutiérrez-Pérez, O., 2006. 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.
54. Guzmán, A.L.E., 2003. Evaluación de una técnica para la cryoconservación del semen porcino. Tesis de Licenciatura, Compostela, Nayarit. México.
55. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl. 11, 73-88.
56. Heid, H., Finge, U., Winter, S., Kuhn, C., Zimbelman, R., 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.
57. Heras, M., Varcárcel, A., Furnus, C., Pérez, L., Moses, D., Baldassarre, H., 1996. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to

- ram sperm acrosomes by freezing-thawing, not detected by light microscopy. *Anim. Repro. Sci.* 45, 81-89.
58. Hernández-González, E., Lecona-Valera, A.N., Escobar-Herrera, J., Mújica, A., 2000. Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 46, 43-58.
59. Herrada, G., Wolgemuth, D., 1997. The mouse transcription factor Stat 4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *Journal of Cell Sci.* 110, 1543-1553.
60. Hess, H., Heid, H., Zimbelmann, R., Frank, W.W., 1995. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: The identification and characterization of cylicin II. *Exp. Cell Res.* 218, 174-182.
61. Hess, H., Heid, H., Franke, W.W., 1993. Molecular characterization of mammalian calicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 122, 1042-1052.
62. Hofmo, P.O., Almlid, T., 1991. Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Conf. On Boar Semen Preservation.* Belsville, M.D. U.S.A., pp 111-122.
63. Holt, W.V., Medrano, A., Thurston, L.M., Watson, P.F., 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63, 370-82.
64. Holt, W., 2000. Fundamental aspects as sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53(1), 47-58.
65. Holt, W., 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Som. Anim.* 31, 17-24.
66. Holt, W., North, R.D., 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, 414-424.
67. Hooper, P., 1986. A contemporary comparison of comercial United Kingdom AI programme replicated in Northern Spain. *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Pig Vet. Soc. Congr.* Barcelona, Spain, pp. 68.

68. Howes, E.A., Hurst, S.M., Jones, R., 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Journal of Andrology* 22, 62-72.
69. Hunter, R.H.F., Huang, W.T., Holtz, W., 1998. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *J. Reprod. Fert.* 114, 17-23.
70. Jager, S., Wijchman, J., Kremer, J., 1990. Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *The Journal of Experimental Zoology* 256, 315-322.
71. Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of boar semen. *Animal Reprod. Sci.* 62, 143-172.
72. Johnson, L.A., 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970-1985. In: *Deep freezing of boar semen* (eds. L.A. Johnson and K. Larsson). Swedish Univ. Agric. Sci and United States Dept. Agric. pp. 199-222.
73. Johnson, L.L., Katz, D.F., Overstreet, J.W., 1981. The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation. *Gamete Res.* 4, 275-282.
74. Juárez-Mosqueda, L., 1995. Identificación de la calmodulina de la superficie de la Teca Perinuclear en el espermatozoide del cobayo no capacitado y en el capacitado con reacción acrosomal. Tesis de maestría. CINVESTAV.
75. Juárez-Mosqueda, L., Mújica A., 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal Guinea Pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of structural Biology* 128, 225-236.
76. Kann, M.L., Pradel, L.A., Fouquet, J.P., 1993. Spectrin and ankyrin like proteins in spermatids and spermatozoa of the hamster and some other mammalian. *Reprod. Nutr. Dev* 33, 51-61.
77. Kann, M.L., Feinberg, J., Rainteau, D., Dadoune, J.P., Weinman, S., Fouquet, J.P., 1991. Localization of calmodulin in perinuclear structures of spermatids and spermatozoa : a comparison of six mammalian species. *Anat. Rec.* 230, 481-488.

78. Karnowsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137A.
79. Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A.C.F. Yanagimachi, H., 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.* 58, 1407-1417.
80. Kjoestad, H., Ropstad, E., Andersen, B.K., 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.* 34, 299-303.
81. Knobil, E., Neill, J.D., 1988. *The physiology of reproduction* Raven Press. N.Y. U.S.A., pp. 27-67; 135-185.
82. Koehler, J.K., 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J. Ultrastruct. Res.* 33, 598-614.
83. Kommisrud, D., Paulenz, H., Sehested, E., Grevle, I.S., 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet. Scand.* 43 (1), 49-55.
84. Kumar, S., Millar, J.D., Watson, P.F., 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 46, 246-53.
85. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
86. Lalli, M., Clermont, Y., 1981. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am. J. Anat.* 160, 419-434.
87. Leclerc, P., Goupil, S., 2000. Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Biol. Reprod.* 62, 1875-1881.
88. Lecuyer, C., Dacheux, J.L., Hernand, E., Mazeman, E., Rousseaux, J., Rousseaux, R., 2000. Actin binding properties and co-localization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calcin. *Biol. Reprod.* 63, 1801-1810.
89. Lemus, C., Alonso, S.L., 2005. *El cerdo pelón mexicano y otros cerdos criollos*. Edición Lemus y Alonso. México, pp. 72-76.

90. Longo, F., Cook, S., 1991. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Mol. Repro. Dev.* 28, 380-393.
91. Longo, F.J., Krohne, G., Franke, W.W., 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biol.* 105, 1105-1120.
92. Malhotra, S.K., Shnitka, 1991. The cytoskeleton-microtubules and microfilaments. Chapter 2, *Structural Biology. Fundamentals of Medical Cell Biology*. University of Wisconsin, Madison, JAI. pp. 77-115.
93. Manandhar, G., Toshimori, K., 2003. Fate of postacrosomal perinuclear theca recognized by monoclonal antibody MN13 after sperm head microinjection and its role in oocyte activation in mice. *Biology or Reproduction* 68, 655-663.
94. Marquez, R.J., 2006. Producción de anticuerpos contra la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM México, D.F.
95. Martel, B.S., 2006. Identificación de la(s) proteína(s) de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo después del proceso de congelación. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM México, D.F.
96. Martínez, O., 2003. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. Tesis de Licenciatura. FMVZ. UNAM.
97. Martínez, O. Juárez-Mosqueda, M.L., Hernández-Espinosa, J., Valencia, J., 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66, 1969-1975.
98. McDonald, C., 1991. *Endocrinología veterinaria y Reproducción*. 4ta edic. Interamericana. McGraw Hill, México.
99. McGann, L., Yang, H., Walterson, M., 1988. Manifestation of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 25, 178-185.
100. Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T., Rodríguez, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.

101. Medrano, A., Holt, W.V., 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado descongelado. *Arch. Zootec.* 47, 319-327.
102. Meyers, S.A., 2005. Spermatozoa response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 57-64.
103. Miles, D., Primakoff, P., Bellvé, A.R., 1981. Surface domains on guinea pig sperm defined with monoclonal antibodies. *Cell* 23, 433-439.
104. Mizucami, A., Carrell, D.T., Peterson, C.M., 1999. Cryopreservation of embryos. In: *Encyclopedia of reproduction*. Vol 1. Utah: Academic Press, pp 765-772.
105. Morales, P., Vantiman, D., Madariaga, M., 1999. Sperm penetration through human zona pellucida as a predictor of in vitro fertilization. *Andrología* 31, 131-135.
106. Moore, K.L., 1985. *Embriología clínica*. 3a edición. Editorial Nueva Interamericana.
107. Mújica, A., Navarro-García, F., Hernández-Gonzalez, O., Juárez-Mosqueda, M., 2003. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique* 61, 76-87.
108. Muldrew, K., McGann, L.E., 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.* 57, 525-532.
109. Neild, D.M., Gadella, B.M., Chávez, M.G., Mitagaya, M., Colenbrander, B., Agüero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.
110. Nicholas, L.C., Stanley, M., 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41, 635-641.
111. Nogales, E., Wolf, S.G., Downing, K.H., 1998. Structure of the  $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
112. Noiles, E.E., Tomson, K.A., Storey, B.T., 1997. 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* 35, 79-92.



113. Oakley, B.R. Kirsch, D.R., Morris, N.R., 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363.
114. Oko, R., Maravei., 1994. Protein composition of the perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. *Biology of Reproduction* 50, 1000-1014.
115. Oko, R., Morales, C.R., 1994. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev. Biol.* 166, 235-245.
116. Oko, R., Clermont, Y., 1991. Origin and distribution of perforatorial proteins during spermatogenesis of the rat: and immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 230, 489-501.
117. Olson, G.E., Noland, T.N., Winfrey, V.P., Gargers, D.C., 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J. Ultrastruc. Res.* 85, 204-218.
118. Ostermeier, G., Saitor, R., Susko, J.L., Parrish, J.J., 2000. Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag BiotheNet*, Vol. 2 September ABN055
119. Paranko, J., Yagi, A., Kusisto, M., 1994. Immunocytochemical detection of actin and 53kDa polypeptide in the epididymal spermatozoa of rat and mouse. *Anat. Rec.* 240, 516-527.
120. Patist, A., Zoerb, H., 2005. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and surfaces B. Biointerfaces* 40, 107-113.
121. Petrunkina, A.M., Gröpper, B., Töpfer-Petersen, E., Günzel-Apel, A.R., 2005. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 63, 1390-1406.
122. Petrunkina, A.M., Hebel, M., Waberski, D., Weitze, K.F., Töpfer-Petersen, E., 2004. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction* 127, 105-115.
123. Polge, C. 1956. The development of artificial insemination service for pigs. *Anim. Breed. Abstrac.* 24, 209-217.

124. Pursel, V.G., Johnson, L.A. 1975. Frozen boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.
125. Renard, P., Dumont, E., Griveau, J.F., Callegari, J.P., Le Lannou, D., 1996. An overall lipoperoxidation is not involved in the loss of boar sperm motility during storage under anaerobic conditions. *Reprod. In Domestic Animal* 31, 251-252.
126. Roca, J., Rodriguez-Martinez, H., Vazquez, J.M., Bolarin, A., Hernandez, M., Saravia, F. 2006. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. In: Ashworth CJ, Kraeling RR, editors. *Control of pig reproduction VII*. Nottingham: Nottingham University Press, pp 261-275.
127. Rodríguez-Martínez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., Johannisson, A., 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod. Suppl.* 58, 129-145.
128. Rodríguez-Martínez, H., Eriksson, B., Lundeheim, N. 1996. Freezing boar semen in flat plastic bags membrane integrity and fertility. *Reproduction in Domestic Animal* 31, 161-168.
129. Rodríguez-Martínez, H., Eriksson B., 1994. Physiology and preservation of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 29, 376-378.
130. Rousseaux-Prévost, R., Lécuyer, C., Drobecq, H., Sergheraert, C., Dacheux J.L., Rousseaux, J., 2003. Characterization of boar sperm cytoskeletal cylicin II as an actin-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research* 303, 182-189.
131. Samper, J., 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. (suppl.)* 44, 107-114.
132. Si, Okuno, M., 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of Reproduction* 61, 240-246.
133. Silva, P.E.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 985-978.
134. Stewart, M., 1993. Intermediate filament structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 3-11.

135. Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., Oko, R., 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique* 61, 362-378.
136. Sutovsky, P., Schatten, G., 2000. Paternal contribution to the mammalian zygote: Fertilization after sperm-egg fusion. *International Review of Cytology* 195, 1-65.
137. Sutovsky, P., Ramalho-Santos, J., Moreno, D. R., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G., 1999. On-state selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe Mito Tracker<sup>TM</sup> and high resolution differential interference contrast microscopy. *Human Reproduction* Vol:14; 9, 2301-2312.
138. Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G., 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.* 188, 75-84.
139. Talbot, P., Chacón, R., 1981. A triple staining technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201-208.
140. Thilmant, P., 1997. Congélation du sperme de verrant en paillette de 0.5 ml resultants sur le terrain. *Ann Méd Vét.* 141, 457-462.
141. Thomas, C.A., Garner, D.L., De Jarnette, J.M., Marshall, C.E., 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58, 786-793.
142. Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W., 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.* 66, 545-554.
143. Tienthai, P., Johannisson, A., Rodriguez-Martínez, H., 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduc. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 131-146.
144. Virtanen, I., Badley, R.A., Pasivuo, R., Lehto, V.P., 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell. Biol.* 99, 1083-1091.

145. Von Bölow, M., Rackwitz, H., Zimbelmann, R., Franke, W., 1997. A novel isoform of an Actin-Binding Protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Experimental Cell Research* 233, 216-224.
146. Vyt, P., Maes, D., Rijsselaere, T., Dejonckheere, E., Cartryck, F., Van Soom, A., 2004. Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reproduction in Domestic Animal* 39(6), 447-453.
147. Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Ani. Rep. Sci.* 60-61, 481-492.
148. Watson, P.F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Repro. Fertil. Dev.* 7, 871-891.
149. Watson, P.F., Plummer, J., 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In "First International conference on deep freezing of boar semen. (L.A. Johnson and K. Larson Eds), Uppsala, pp. 199-122.
150. Weitze, K.F., Rath, D., Leps, H., 1988. Influence of volume/surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod & AI Dublin, EIRE* 3, 312.
151. Westendorf, P., Richter, L., Treu, H., 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Laborund Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletenverfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr* 82, 261-267.
152. Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, J., Rodríguez-Martínez, H., 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrate low-volume boar semen doses. *Theriogenology* 65, 775-787.
153. Wykes, S.M., Krawetz, S.A., 2003. The structural organization of sperm chromatin. *The Journal of Biological Chemistry* 29471-29477.
154. Yagi, A., Paranko, J., 1995. Actin,  $\alpha$ -actinin, and spectrin with specific association with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat. Rec.* 241, 77-87.
155. Yanagimachi, R., 1994. Mammalian Fertilization. In the "Physiology of Reproduction". 2<sup>nd</sup> edition. Raven Press. New York, pp. 189-317.

156. Yanagimachi, R., 1981. Mechanisms of fertilization in mammals, in fertilization and embrionic development in vitro. Plenum Press, New York, pp. 81-182.
157. Yescas, Z.D., 2006. Distribución de los dominios de membrana por daño en la teca perinuclear en el semen criopreservado de cerdo. Tesis de Maestría. FMVZ UNAM México, D.F.

**ANEXO**

**MORPHOLOGICAL PERINUCLEAR THECA ALTERATIONS ARE RELATED TO  
ACROSOME LOSS IN CRYOPRESERVED BOAR SPERMATOZOA**

Arancibia-Salinas K<sup>1</sup>, Juárez-Mosqueda ML<sup>1\*</sup>, Montaldo HH<sup>2</sup>, Hernández-González EO<sup>3</sup>, Muñoz GR<sup>4</sup>, Gutiérrez CG<sup>5</sup>, Trujillo OME<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 México, D.F.

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 México, D.F.

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, CP 07000 México, D.F.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia, Venezuela.

<sup>5</sup>Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 México, D.F.

<sup>6</sup>Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 México, D.F.

**\* Corresponding autor. Tel.:(+55) 55 56 22 58 93; (+52) 55 56 22 59 02.**

**E-mail address: luerfco@servidor.unam.mx (M.L. Juárez-Mosqueda)**

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the effect of cryopreservation of boar spermatozoa on the integrity of the perinuclear theca (PT) substructure and the integrity of the acrosome. Semen from 12 boars were divided in two fractions; one was cryopreserved and thawed the other was used fresh as a control sample. In order to expose the PT structure both samples were treated with the nonionic detergent Brij 36-T and processed for electron microscopy observation after negative staining. Before freezing, 16.7% of spermatozoa showed PT-substructure alterations, that increased to 53% after freezing and thawing ( $P < 0.001$ ). Similarly, acrosome damage increased from 19.5% to 54.9% after cryopreservation. Furthermore, significant correlations were found between PT-substructure alterations and acrosome defeat. In addition, whilst no difference in PT substructure damage was observed between breeds in control sample, the Mexican hairless breed had significantly more spermatozoa with damage PT substructure after freezing-thawing. In conclusion, the acrosome loss of boar spermatozoa increased with an increased proportion of PT-altered spermatozoa.

**Key words: perinuclear theca, acrosome, cryopreservation, spermatozoa, boar.**



## INTRODUCTION

The use of cryopreserved semen in pigs has been hindered by the low sperm viability and fertility observed after the freezing-thawing process (Roca *et al.*, 2006). Freezing and thawing causes damages to the cells and the spermatozoa is particularly sensitive to low temperature (Purdy, 2006; Hernández *et al.*, 2007). It has been long recognized that fertility of frozen boar semen is lower than the refrigerated semen (Bwanga *et al.*, 1991). This is possibly due to physiological and/or morphological injuries suffered by the spermatozoa during the freezing and thawing process (Cerolini *et al.*, 2001). A key aspect for increasing the fertility of frozen-thawing semen would be to maintain the integrity of the plasma membrane (PM) during cryopreservation since only spermatozoa with intact membranes can undergo capacitation (Tienthai *et al.*, 2004; Córdova *et al.*, 2001) and acrosome reaction (AR) (Yanagimachi, 1981; Abou-Haila and Tulsiani, 2000). It is well known that freezing and thawing cause alterations to the PM (Muldrew and McGann, 1990; Curry, 2000; Nield *et al.*, 2003). Several studies explored the relationship between sperm survival and the chemical/physical features of the PM. However none has been able to establish a significant relationship between the low viability observed in cryopreserved semen and the degree of damage on the PM (Ostermeier *et al.*, 2001). Recent studies have revealed that cryopreservation process induces substantial damage to the PT of bull spermatozoa (Martínez *et al.*, 2006). Moreover, it was shown that in boar spermatozoa the cytoskeleton appears to be important for volume regulation (Petrunkina *et al.*, 2004; 2005).

The perinuclear theca (PT) is the main cytoskeleton structure of mammalian spermatozoa head. The PT surrounds the nucleus completely except for the basal region where the tail attaches to the head (Longo *et al.*, 1987; Oko and Clermont, 1988; Longo and Cook, 1991; Bellvé *et al.*, 1992) and this cytoskeletal element has been subdivided in two morphologically distinct areas, the subacrosomal and the postacrosomal layer (Mújica *et al.*, 2003). From a purely structural point of view, the PT seems to connect the membranes of the spermatozoa head. The subacrosomal layer is located between the inner acrosomal membrane and the nuclear envelope, while the postacrosomal layer is located between the PM and the nuclear envelope. The PT continues with another layer called inner periacrosomal layer, located between the PM and the outer acrosomal membrane. Because of the location of this specialized cytoskeleton it has been suggested that the PT ensure stability of the acrosome and the structural design of the sperm head (Oko and Morales, 1994). In addition, the PT is involved in other important sperm functions, such as the formation of functional PM domains (Gadella *et al.*, 1995) egg activation (Kimura *et al.*, 1998) and mammalian fertilization where it is required for the formation of the male pronucleus. Surrounding the apical region of the postacrosomal layer the PT has a substructure (Koehler, 1970; Olson *et al.*, 1983; Oko and Maravei, 1994; Watson *et al.*, 1995; Juárez-Mosqueda and Mújica, 1999; Lecuyer *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006) that disappears early during fertilization (Juárez-Mosqueda and Mújica, 1999) and that could be used as an early marker of theca disruption. Therefore, the evaluation of the PT integrity in others species as the boar could provide important information of the functional

capacity of the spermatozoa. Further, it will facilitate the evaluation of the effects of sperm processing on spermatozoa cytoskeleton damage.

The objective of this study was used the PT substructure as a morphological marker of PT integrity and to evaluate the changes caused by cryopreservation on the PT substructure and their relationship with acrosomal status in boar spermatozoa.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Semen collection and evaluation*

Ejaculates were obtained from 12 fertile boars belonging to four different breeds: Duroc (n=3), Landrace (n=3), Yorkshire (n=3) and Mexican hairless (n=3). The ejaculates were obtained by the gloved hand method. Then, the semen was extended (1:1 [v/v]) with MR-A<sup>R</sup> (Kubus<sup>TM</sup>, Madrid, Spain) extender and taken to the laboratory at 18-20° C, where it was evaluated macroscopically and microscopically. Only samples with at least 80% of progressive motility, less than 15% of abnormalities and a minimum sperm concentration of  $150 \times 10^6$  cells/mL were included in the study. Motility was assessed in a drop of semen placed on a glass slide at a 37° C temperature and observed under a light microscope by a single observer. The percentage of abnormalities was determined with eosin-nigrosin staining assessing 200 cells. Sperm concentration was determined using a Neubauer chamber.

After collection, the semen was divided in two fractions. One fraction was frozen using the Thilman method (1997), and the other was used in fresh (control semen).

### Semen freezing and thawing

Extended semen samples containing  $6 \times 10^9$  spermatozoa were centrifuged at 800 x g for 10 min and pellets were resuspended with the cooling extender (11% dextrose and 20% egg yolk in distilled water) set at 15 °C for 3 h. Then, the semen was diluted (1:1) with the second extender (11% dextrose, 20% egg yolk and 4% glycerol). Final sperm concentration was adjusted at  $6 \times 10^8$  cells/mL and samples were packaged in 0.5mL plastic straws and sealed. The straws were immediately placed in contact with nitrogen vapor about 3 cm above the nitrogen liquid level (-130 to -150°C) for 20 min and finally plunged into the liquid nitrogen (-196°C) and stored for at least two weeks until used.

For thawing the semen straws were taken out of the liquid nitrogen and quickly placed in a water bath at 56 °C for 12 seconds.

The following techniques described, were applied to both sample of treatments (fresh and frozen-thawed spermatozoa).

### Assessment of the perinuclear theca substructure integrity

To expose the PT surface, the PM and acrosome were solubilized by treating the samples with the nonionic detergent Brij 36-T (1.2% final concentration) for 5 min at room temperature. Then the samples were washed in 154 mM NaCl by centrifugation/resuspension at 300 x g for 3 min, placed in Karnovsky fixative (Karnovsky, 1965) and processed for examination of the PT morphology by electron microscopy after negative staining.

### *Acrosome evaluation*

Acrosome reaction was assessed by triple stain technique (Talbot and Chacon, 1981). Briefly, a 100  $\mu$ L aliquot from each ejaculate ( $35 \times 10^6$  cells/ml) was added to 100  $\mu$ L of 2% Trypan blue in phosphate-buffer saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 9.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4), and incubated at 37°C for 15 min. Then, the aliquot washed several times by centrifugation/resuspension at 300 x g for 3 min, until the supernatant fraction appeared clear. Next the sperm cells were resuspended in 1 mL 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) and fixed for 30 min at 4°C. Afterwards, cells were centrifuged at 300 x g for 8 min, the supernatant fraction was eliminated and the cells pellet was resuspended and washed in PBS. One drop was used to make a smear that was left to dry. The smears were incubated with 0.8% Birmack brown solution in distilled water (pH 1.8) at 37°C for 15 min and rinsed with distilled water. Thereafter smears were stained with 0.8% rose Bengal solution in 0.1 M Tris-HCl buffer at room temperature for one min, rinsed once with distilled water, left to dry and examined under a light microscope. Spermatozoa were classified as: live with intact acrosome (LAI; pink stain over the acrosome region and brown over the postacrosomal region); live with acrosome reaction (LAR; no stain over the acrosomal region and brown stain over the postacrosomal region); dead with or without acrosoma reaction (pink stain over the acrosomal region and blue stain on

the postacrosomal region, as well as dead with acrosome reaction no stain over the acrosomal region and blue stain on the postacrosomal region).

### *Electron microscopy*

Negative staining of whole spermatozoa.- The samples treated with Brij 36-T were placed in Karnovsky (1965), fixative for 2 hours at 4° C, washed by centrifugation/resuspension twice in PBS and twice in distilled water and resuspended in their initial volume with distilled water. One drop of each sample was placed on collodion-carbon coated grids. The excess sample was removed with filter paper, and the spermatozoa were stained with aqueous 0.2% phosphotungstic acid for 3 minutes and rinsed in distilled water. The samples were examined in a Zeiss EM-900 transmission electron microscope (TEM) at 50 kV. Fifty cells on each sample were observed. During the TEM evaluation, the PT substructure was classified as: normal damaged and absent.

In addition, sperm samples not treated with Brij detergent were in a similar way processed. This was to show that the PT-substructure is not visible because the plasma membrane and the acrosome remain covering it (Figs. 1A y 1B).

Thin sections. Spermatozoa treated with Brij 36-T, were fixed with Karnowvsky solution for 20 min. After post fixation with 1% (w/v) OsO<sub>4</sub> in PBS buffer (ph 7.4) for 1 hour at room temperature, the samples were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in Spurr's resin, thin- sectioned and stained with uranyl acetate and lead citrate, prior to TEM examination (Fig. 1C).

### *Statistical analysis*

The effect of freezing-thawing on the PT-integrity was evaluated by a logistic regression analysis for ordinal variables. The experimental unit was the ejaculate. The dependent variable was the integrity of the PT substructure with three levels; normal damaged and absent. The independent variables were the freezing-thawing treatment, breed and the treatment by breed interaction. Spearman's correlation coefficient was used to estimate the relationship between the percentages of sperm with damaged PT substructure with the percentage of live acrosome reaction spermatozoa, within each ejaculate of both treatments.

## **RESULTS**

### *Morphology of the PT-substructure*

The ultrastructural morphology of the PT-substructure of boar spermatozoa was considered as normal when this appeared scalloped because of numerous papillae directed toward the equatorial segment of the PT layer (Fig. 2A). Damage substructure was considered when it had a discontinuous scalloped (Fig. 2B) or when eyelashes-like substructures were observed (Fig. 2C only observed after cryopreserved). Substructure was considered absent when it was not observed (Fig. 2d).

### *Integrity of the PT and the acrosome*

The results obtained for the PT and acrosome integrity evaluation on fresh and frozen-thawed semen are presented on Table 1. The freezing-thawing process damaged the PT substructure integrity. The percentage of spermatozoa with normal substructure decreased after freezing-thawing (83 vs. 47%) ( $P < 0.001$ ). The percentage of live spermatozoa with intact acrosome before freezing was 78.7% and decreased to 27.6% after the process ( $P < 0.001$ ). The percentage of live spermatozoa with acrosome reaction increased from 19.5 to 54.9 after freezing-thawing process ( $P < 0.001$ ). The percentage of dead spermatozoa increased after the cryopreservation (2.1 vs. 17.5) ( $P < 0.001$ ).

The Spearman's coefficient of correlation between the percentage of sperm with damaged PT substructure and the percentage of live acrosome reaction spermatozoa, for all data was 0.68 ( $P = 0.0026$ ).

### *Perinuclear theca integrity by breed*

The effect of breed was significant ( $P = 0.0034$ ) over the integrity of the PT substructure. All breeds evaluated in this study had an increase on PT substructure alteration (damaged substructure + absent substructure) and therefore a reduction in the spermatozoa with normal PT substructure percentage resulting from the freezing-thawing process ( $P = 0.0001$ ). No breed by treatment interaction effect was observed ( $P = 0.0736$ ) (Table 2). There was high variability between boars in their



response to cryopreservation. This variability is shown by a significant ( $P=0.0057$ ) boar by treatment interaction.

## **DISCUSSION**

The use of cryopreserved sperm for artificial insemination of sows is limited (Gilian *et al.*, 2004; Wongtawan *et al.*, 2006) due to the low viability of the sperm after cryopreservation (Watson, 2000; Meyers, 2005). It is well known that cryopreservation causes damage to the spermatozoa (Watson, 2000; Meyers, 2005; Holt *et al.*, 2005). The results of this investigation indicate that the freezing-thawing process causes alterations to the PT substructure. The damage of PT substructure and acrosome caused by freezing coincides with the reported by Martinez *et al.* (2006) who found that the cryopreservation of bull semen causes significant damage to the PT substructure. Both findings support the proposal by Jager *et al.* (1990) who points out that the freezing-thawing process causes alteration at the interior of human spermatozoa which allow external agents, such as heparin to act on the genetic material of the cell. Sutovsky *et al.* (1997) found that in the bovine spermatozoa the cytoskeleton may prevent access of cytoplasmic factors to the sperm DNA and thus prevents decondensation of the sperm nucleus. Therefore, one may assume that are the alterations on the PT integrity in the frozen-thawed spermatozoa that decreased the sperm nuclear stability, becoming sensible to foreign material or agents, such as decondensing factors.

It had been reported that the process of freezing and thawing may result in a significant deterioration of boar spermatozoa acrosomal integrity (Yagi and Paranko, 1995). Acrosome integrity is important considering that it contains enzymes with a crucial role in the penetration of the zona pellucida (Kjoestad *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 2003). On the other hand, it has been proposed that the PT could play a roll on stabilizing to the acrosome (Fiser *at el.*, 1991) since PT appears early in the spermiogenesis closely with the acrosomal and nuclear membranes (Longo and Cook, 1991; Oko and Maravei, 1994). Furthermore, failure in PT differentiation has been associated with acrosome deficient rounded head spermatozoa (Escalier, 1990). Longo *et al.* (1987) have suggested that PT proteins may contribute to the nucleus-acrosome association by providing some sort of intermembranous cement. The results in this study show that after the freezing-thawing process the percentage of absent acrosome is similar to the percentages PT damage. However, while Martínez *et al.* (2006) found a correlation between the number of sperm with absent PT substructure and the number of spermatozoa with an acrosome reaction in the bull, the present study found that acrosome reaction correlated to slighter alteration to the PT substructure. Thus suggesting that for bull semen the PT substructure is less sensitive to cryopreservation process. This could be possibly due to differences in the composition of the PT substructure, since the substructure morphology is species-specific (Koehler, 1970; Olson *et al.*, 1983; Watson *et al.*, 1995; Juárez-Mosqueda and Mújica, 1999; Martínez *et al.*, 2006).

In addition, since the PT is involved in events such as maintenance of spermatid head integrity (Sutovsky *et al.*, 1997), maintenance of the functional plasma membrane domains (Gadella *et al.*, 1995), spermatozoa penetration of the egg (Yagi and Paranko, 1995), protection of spermatid DNA (Von Bölow *et al.*, 1997; Lecuyer *et al.*, 2000), activation of the oocyte (Kimura *et al.*, 1998) and decondensation of sperm genetic material (Sutovsky *et al.*, 2003), the damage observed to the PT substructure could relate to more extensive damage to the PT, thus affecting the fertilization process.

In the present study only in the cryopreserved boar spermatozoa was observed the eyelash-like morphology of the PT substructure, which was reported in the boar spermatozoa (Juárez-Mosqueda and Mújica, 1999). However, Juárez-Mosqueda and Mújica (1999), did not mention whether the samples they used had been cryopreserved, thus it is possible that the eyelash-like morphology associates with alterations suffered by the PT in the cryopreservation process. Nevertheless, it appears that the morphology of the PT substructure is species specific, as its morphology differs for the rabbit (Koehler, 1970), bovine (Olson *et al.*, 1983; Ostermeier *et al.*, 2001), ram (Watson *et al.*, 1995) and guinea pig (Juárez-Mosqueda and Mújica, 1999).

In conclusion, freezing-thawing caused ultrastructural changes to the PT-substructure which was associated with acrosome loss. Our data reinforce the hypothesis that PT stabilizes the acrosome, which may partially explain the

decrease fertility observed in cryopreserved boar semen. At the moment, investigations are being made to define if the PT alterations affect the ability of the spermatozoa to acquire fertility capacity.

Table I

The percentage of PT substructure; normal, damage and absent and the percentage of acrosome integrity in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa.

Treatment	PT integrity			Acrosome integrity		
	PTsN	% PTsD	PTsAb	LIA*	% LAR*	Dead*
Fresh	83.3	11.9	4.8	78.7	19.5	2.1
Frozen-thawed	47.0	30.8	22.2	27.6	54.9	17.5

PT: perinuclear theca; (\*)determine with tripan blue, Bismark brown and rose Bengal; PTsN: PT substructure normal; PTsD: PT substructure damage; PTsA: PT substructure absent; LIA: Live intac acrosome; LAR: Live acrosome reaction.  
P<(0.001)

Table II

The percentage of PT integrity and marginal effect in fresh and frozen-thawed spermatozoa from four boar breed. The marginal effect it is the difference between fresh and frozen-thawing.

Breed	Treatment								
	Fresh semen (%)			Frozen-thawed semen (%)			Marginal effect (%)		
	PTsN	PTsD	PTsAb	PTsN	PTsD	PTsAb	PTsN	PTsD	PTsAb
Duroc	87.5	9.5	3.0	55.0	27.5	17.5	71.3	18.5	10.3
Mexican hairless	82.7	16.0	1.3	33.3	34.0	32.7	58.0	25.0	17.0
Landrace	78.0	14.0	8.0	48.7	26.7	24.7	63.4	20.4	16.4
Yorkshire	83.3	10.7	6.0	49.3	34.0	16.7	66.3	22.4	11.4

PTs: perinuclear theca-substructure; PTsN: PT substructure normal; PTsD: PT substructure damage; PTsA: PT substructure absent; LIA: Live intact acrosome; LAR: Live acrosome reaction. Effect of the treatment P=0.0001, race P=0.0034, race interaction treatment P=0.0736

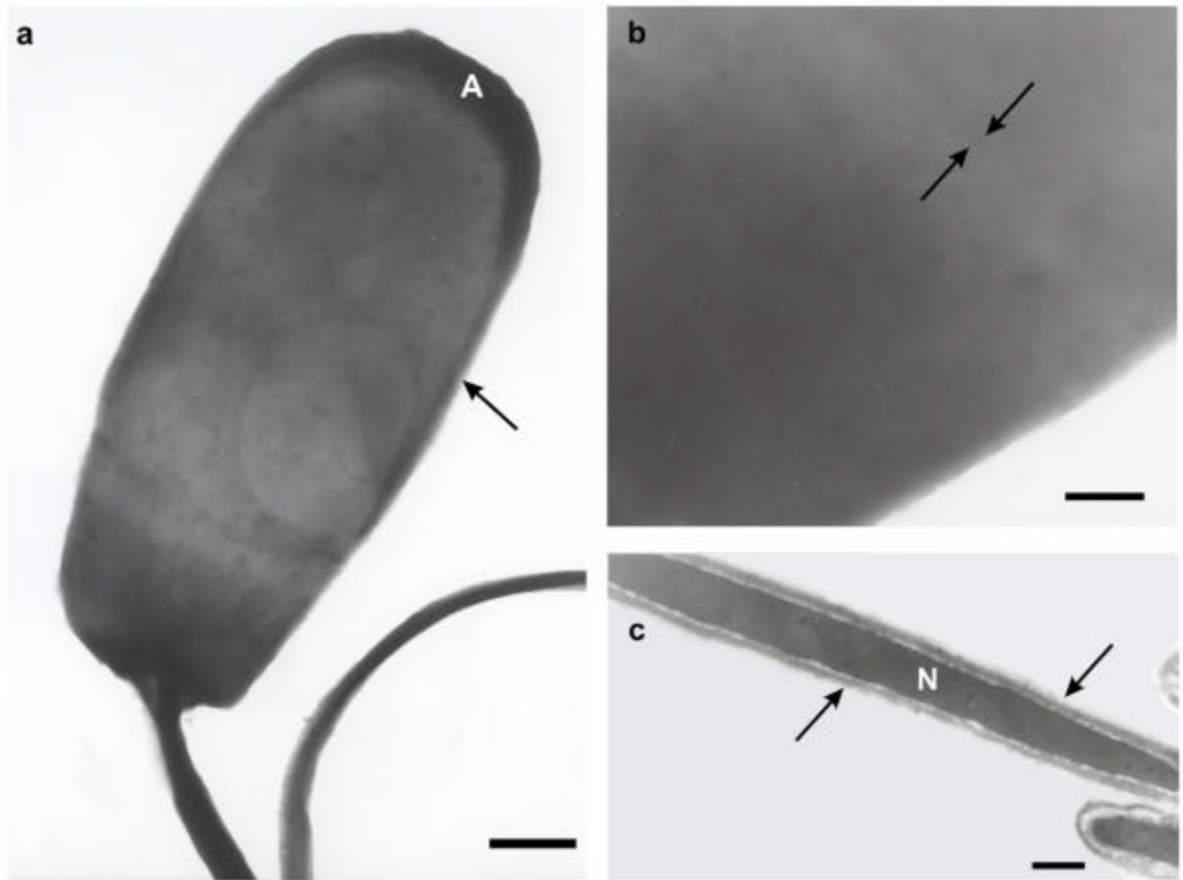


Fig. 1. Microphotographs of fresh and post-thaw pig spermatozoa heads. (a) A non-Brij-treated spermatozoa head negatively stained. The plasma membrane (arrow) as well as the acrosome (A) can be seen. Bar 1.1  $\mu\text{m}$ . (b) A high-magnification view of the sperm head in (a) to show that when the plasma membrane remains the PT-substructure is not seen (arrows). Bar 0.4  $\mu\text{m}$ . (c) A thin section of a Brij-treated spermatozoa showing that the plasma membrane, acrosome, and the nuclear membrane have been solubilized, leaving a hull, the PT (arrows) covering the sperm nucleus (n). Bar 0.25  $\mu\text{m}$ .

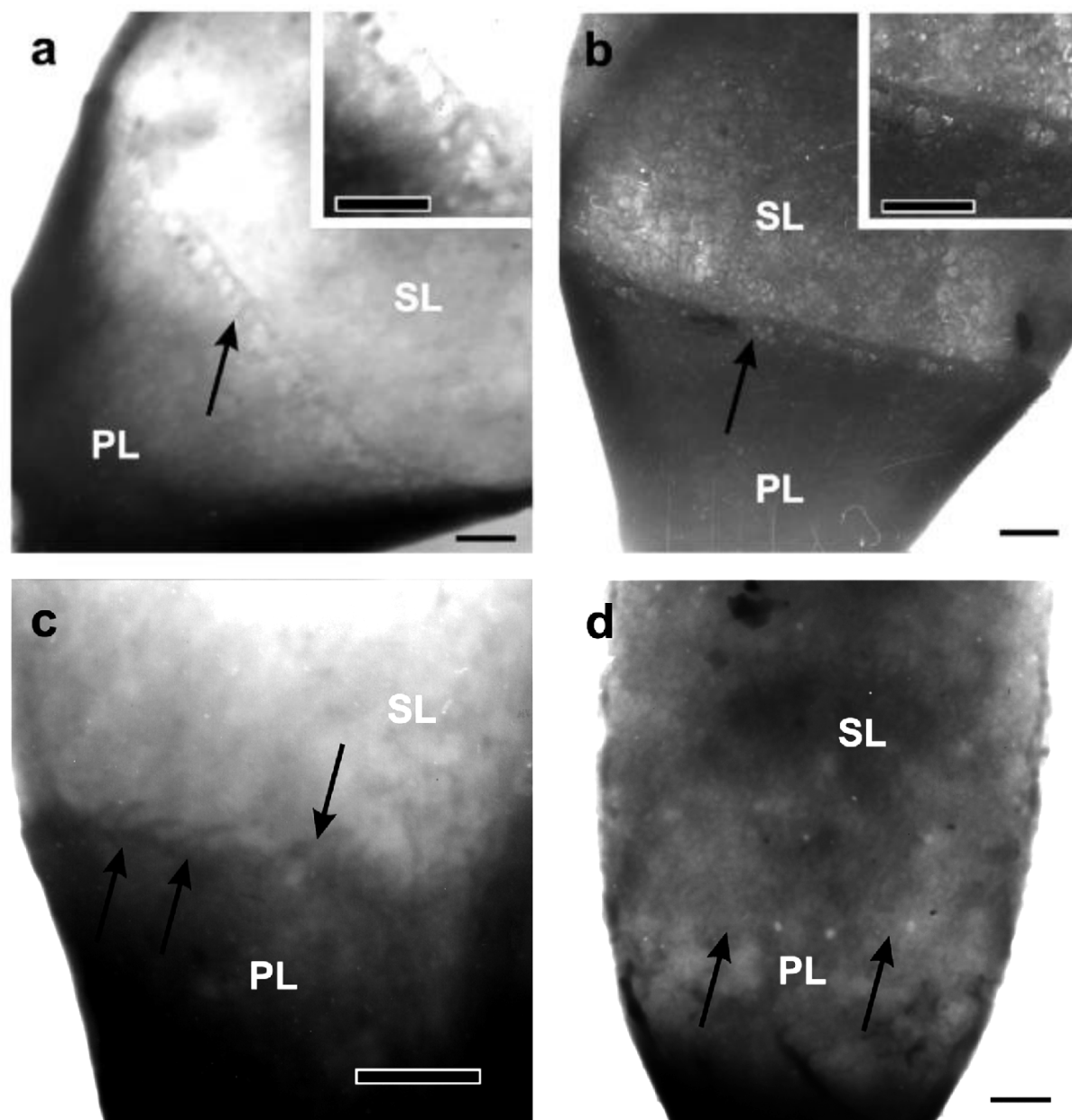


Fig. 2. Electron microphotographs of negatively stain preparations showing the PT substructure fresh and post-thaw pig spermatozoa. To expose the PT the spermatozoa were treated with Brij. (a) Whole-mount sperm heads with PT exposed. Over the PT the substructure is apparent (arrow) between the subacrosomal layer (SL) and the postacrosomal layer (PL) of the PT; it consists of a row of appears scalloped pattern circling the sperm head. The inset shows a high-magnification view of the substructure. Note that the substructure, which characterize the apical margin of the postacrosomal layer, remains intact. Bar 0.4  $\mu\text{m}$ . (b) Whole-mount post-thaw sperm head showing a damage substructure. Note a discontinuity on the scalloped pattern (arrow). Inset shows a high magnification of the substructure where some frets are lacking. Bar 0.4  $\mu\text{m}$ . (c) Whole-mount post-thaw sperm head showing a substructure where some frets are lacking. Bar 0.4  $\mu\text{m}$ . (d) Whole-mount post-thaw sperm head showing a substructure with a "eyelashes" appearance (arrows). Bar, 0.4  $\mu\text{m}$ .



Whole-mount post-thaw sperm head without substructure (arrows). Note that the apical portion of the posacrosomal layer does not show PT substructure appearance. Bar 0.6  $\mu\text{m}$ .

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This investigation was supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT IN206702). We thank MVZ Carlos Cedillo of the Unidad de Microscopía Electrónica of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia at UNAM for providing transmission electron microscope facilities. We thank Biol. Sirenia González and Lourdes Rojas of Unidad de Microscopía Electrónica del CIVESTAV-IPN for providing technical assistance. We acknowledge the generous gift of boar semen samples from Dr. Clemente Lemus and MVZ Antonia Cervantes. Also, we acknowledge Dr. Ernesto Basurto for his excellent photographic work.

## **References**

- Abou-Haila, A., D.R.P. Tulsiani, 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379 No.2: 173-182.
- Bellvé, A.R., R. Chandrika, Y.S. Martinova, A.H. Barth, 1992. The Perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol. Reprod.*, 47: 451-465.
- Bwanga, C.O., S. Einarsson, H. Rodríguez-Martínez, 1991. Cryopreservation of Boar semen: II Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini, maxi straws and plastic bags. *Acta Vet. Scand.*, 32: 455-461.
- Cerolini, S. A. Maldjian, F. Pizzi, T.M. Gliozzi, 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reprod.*, 121: 395-401.

Córdova, I.A., J.F. Pérez, B. Lleo, A. García, S. Martín-Rillo. 2001. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.*, 36: 199-202.

Curry, M.R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.*, 5: 46-52.

Escalier, D., 1990. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, 34: 287-297.

Fiser, P.S., C. Hansen, K.L. Uderhill, J.N.B. Shrestha, 1991. The effect of induced ice nucleation (seeding) on the post-thaw motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa *Anim. Reprod. Sci.*, 24: 293-304.

Gadella, B.M., M. López-Cardoso, L.M.G. Van Golde, B. Colenbrander, J.R. Gazella, 1995. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J. of Cell Sci.*, 108: 935-945.

Gilian, L., W.M. Cris Maxwell, G. Evans, 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16: 447-454.

Hernández, M., J. Roca, M.A. Gil, J.M. Vázquez, E.A. Martinez, 2007. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, 67: 1436-1445.

Holt, W.V., A. Medrano, L.M. Thurston, P.F. Watson, 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63: 370-382.

Jager, S., J. Wijchman, J. Kremer, 1990. Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *The Journal of Experimental Zoology*, 256: 315-322.

Juárez-Mosqueda, M.L., A. Mújica. 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal Guinea Pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology*, 128: 225-236.

Karnowsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A.

Kimura, Y., R. Yanagimachi, S. Kuretake, H. Bortkiewicz, A.C.F. Perry, H. Yanagimachi, 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, 58: 1407-1415.

Kjoestad, H., E. Ropstad, B.K. Andersen, 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 34: 299-303.

Koehler, J.K., 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J. Ultrastruc. Res.*, 33: 598-614.

Kumar, S., J.D. Millar, P.F. Watson, 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46: 246-253.

Lecuyer, C., J.L. Dacheux, E. Hermand, E. Mazeman, J. Rousseaux, R. Rousseaux-Prevost, 2000. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol. Reprod.*, 63: 1801-1810.

Longo, F.J., G. Krohne, W.W. Franke, 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biol.*, 105: 1105-1120.

Longo, F.J., S. Cook, 1991. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Mol. Reprod. Dev.*, 28: 380-393.

Martínez, O., M.L. Juárez-Mosqueda, J. Hernández-Espinosa, J. Valencia, 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*, 66: 1969-1975.

Meyers, S.A., 2005. Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 89: 57-64.

Mújica, A., F. Navarro-García, O. Hernández-Gonzalez, M. Juárez-Mosqueda, 2003. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique*, 61: 76-87.

Muldrew, K., L.E. McGann, 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.*, 57: 525-532.

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

Oko, R., Y. Clermont, 1988. Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 39: 673-687.

Oko, R., Maravei, 1994. Protein composition of the perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. *Biol. Reprod.*, 50: 1000-1014.

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

Olson, G.E., T.N. Noland, V.P. Winfrey, D.C. Gargers, 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J. Ultrastruc. Res.*, 85: 204-218.

Ostermeier, G.C., Sargeant, G.A., B.S. Yandell, D.P. Evenson, J.J. Parrish, 2001. Relationships of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. of Andrology*, 22(4): 595-603.

Petrunkina, A.M., B. Gröpper, E. Töpfer-Petersen, A.R. Günzel-Apel, 2005. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*, 63: 1390-1406.

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

Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.*, 63: 215-225.

Roca, J., H. Rodriguez-Martinez, J.M. Vazquez, A. Bolarin, M. Hernandez, F. Saravia, 2006. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. In: Ashworth CJ, Kraeling RR, editors. *Control of pig reproduction VII*. Nottingham: Nottingham University Press, pp 261-275.

Sutovsky, P., R. Oko, L. Hewitson, G. Schatten, 1997. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.*, 188: 75-84.

Sutovsky, P., G. Manandhar, A. Wu, R. Oko, 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc. Res. Tech.*, 61: 362-378.

Talbot, P., R. Chacon, 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215: 201-208.

Thilmant, P., 1997. Congélation du sperme de verrant en paillette de 0.5 ml resultants sur le terrain. *Ann. Méd. Vét.*, 141: 457-462.

Tienthai, P., A. Johannisson, H. Rodriguez-Martínez, 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduc. *Anim. Reprod. Sci.*, 80: 131-146.

Von Bölow, M., H.R. Rackwitz, R. Zimbelmann, W.W. Franke, 1997. CP  $\beta$ 3 a Novel isoform of an Actin-Binding Protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp. Cell. Res.*, 233: 216-224.

Watson, P.F., J.M. Plummer, P.S. Jones, J.C.S. Bredl, 1995. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 513-520.

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Sci.*, 60-61: 481-492.

Wongtawan, T., F. Saravia, M. Wallgren, J. Caballero, H. Rodríguez-Martínez, 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, 65: 775-787.

Yagi, A., J. Paranko, 1995. Actin,  $\alpha$ -actinin, and spectrin with specific association with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat. Rec.* 241: 77-87.

Yanagimachi, R., 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, J.D. Biggers J.D., editors. *Fertilization and embryonic development in vitro*. Plenum P pp. 81-182.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1].-González Flores Guilmer Ferdinand, "Generación de mallas en regiones planas irregulares", Tesis, Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Matemáticas, Mérida Yucatán, 1- 43 pp., Mayo de 1994.
- [2].-Grupo de Generación Numérica de Mallas y Métodos Numéricos de la Facultad de Ciencias y el Postgrado de la Facultad de Ingeniería, "Generación Numérica de Mallas 3D casi ortogonales para la reconstrucción de yacimientos de hidrocarburos", Reporte Técnico, Facultad de Ingeniería, UNAM, Diciembre 2005.
- [3].-Dr. Víctor Hugo Arana Ortiz, "Simulación Matemática de Yacimientos", Apuntes, Facultad de Ingeniería, UNAM, 2006.
- [4].-Un Siglo de la Perforación en México, Unidad de Perforación y Mantenimiento de Pozos, PEMEX, Tomo 1, 2000, 9-25 pp.
- [5].-Preusser A., "Computing contours by successive solutions of quintic polynomial equations", *ACM Trans. Math. Softw.* 10, 4 (Dec. 1984), 463-472 pp.
- [6].-Trujillo Sánchez Tito Antonio, "Fundamentos de Geología del Petróleo para la Explotación de Hidrocarburos", Tesis, Facultad de Ingeniería, UNAM, México, 39-69 y 80-118 pp., Agosto 2006.
- [7].-Knupp, P.M., and Steinberg, S., "The Fundamentals of Grid Generation", 1993.
- [8].-Steinberg, S., and Roache, P.J., "Variational Grid Generation", *Num. Meth. For P.D.E.'s*, 2, 71-96 pp., 1986.
- [9].-Thompson, J.F., "Numerical Grid Generation", North-Holland, New York, ed. 1982, (También publicado como 10 y 11 de *Applied Mathematics and Computation*, 1981).
- [10].-Activo Exploratorio Abkatun, "Campo Caan", PEP, Región Marina Suroeste, Presentación Power Point, 2005.
- [11].-Dr. Arévalo Villagran Jorge Alberto, "Fisicoquímica", Apuntes, Facultad de Ingeniería, UNAM, México, 2004.
- [12].-Akima, H. Algorithm, "A method of bivariate interpolation, and smooth surface fitting based on local procedures", *Comm. ACM* 17, 18-20 pp.1 Jan. 1974.
- [13].-Akima, H. "A method of bivariate interpolation and smooth surface fitting for values given at irregularly distributed points", *OT Rep.* 75-70, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C. Aug. 1975.

[14].-Módulo SNYM-Grid, que forma parte del SNYM 1.0.0, F.I.-U.N.A.M., México, Derechos Reservados © 2006.

[15].-SNYM 1.0.0, F.I.-U.N.A.M., México, Derechos Reservados © 2005.

[16].-Dr. Pablo Barrera Sánchez, "Generación Numérica de Mallas 3D para Yacimientos de Hidrocarburos", Grupo de Generación Numérica de Mallas y Análisis Numérico, Presentación Power Point, Facultad de Ciencias, UNAM, 2006.

[17].-Ing. Velázquez Franco Martín Carlos, "Administración de Yacimientos", Apuntes, Facultad de Ingeniería, UNAM, 2006.

[18].-Ing. Villamar Vigueras Manuel Juan, "Caracterización de Yacimientos", Apuntes, Facultad de Ingeniería, UNAM, 2006.

[19].-Khalid Aziz, Stanford U, "Reservoir Simulation Grids: opportunities and Problems", SPE 25233, 12th SPE Symposium on Reservoir Simulation held in New Orleans, I.A, U.S.A., February 28 March 3, 1-7 pp., 1993.