



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE
GLICEROL SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA TECA
PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARCO ANTONIO ARENAS NÚÑEZ

ASESORES:

**MVZ. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
MVZ. ROBERTO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
MVZ. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE**



MÉXICO, D. F.

2008



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis papás. Irene Núñez Carmona y Gustavo Arenas Tizayuca, que más que mis padres son mis amigos. Que puedo decirles, no tengo como pagarles todo su apoyo, su paciencia, gracias por su amor y confianza que me han brindaron siempre y durante la elaboración de este trabajo, se que al igual que yo se desesperaron y mucho. Además les agradezco sus palabras de aliento. Esto lo logre gracias a ustedes.

A mi abuelita Maconchita, donde quiera que este, se que me ha apoyado y brindado su confianza y amor.

A mis hermanos Pedro, Víctor y Gustavo, a mis primos que son como mis hermanos Jorge, Pablo, Ruth y Yazmín y a mi tía concepción. Gracias por sus palabras de aliento y su cariño.

A los MVZ. Rubén Alfaro y Margarita Baltazar. Por la enseñanza que me brindaron durante el tiempo que estuve con ustedes, por su confianza y cariño, gracias.

A mis Amigos de la Facultad. Cecilia, Enrique, Carlos, Cristian, Aura, Paloma, Emilio, Helio, Omar, Adrián, Roxana, Arturo, Carmen, Marlen, Oralia, Tania, Maru, Oscar y especialmente a Karla. Y a todos los que me conocen.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores María Elena Trujillo Ortega, Roberto Martínez Rodríguez y Santiago René Anzaldúa Arce por la confianza y apoyo que me brindaron durante el tiempo de realización de este trabajo.

A Oscar Gutiérrez Pérez que puedo decir, no basta con agradecerte el tiempo y paciencia que tuviste conmigo, a parte de aportar tus conocimientos para que yo entendiera lo que estaba haciendo, por tus consejos, gracias.

A todo el personal de la unidad de microscopia electrónica, que tan generosamente me brindaron su apoyo en la evaluación del material utilizado para la realización de este trabajo.

A mis sinodales María de Lourdes Juárez Mosqueda, María Elena Trujillo Ortega, Jorge Hernández Espinoza y Rosa María Viguera por sus comentarios puntuales y su aportación a esta tesis.

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de la DGAPA-UNAM. PAPPIT IN206506.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Antecedentes.....	4
1. 1. 1 Crioprotectores.....	5
1. 1. 2 Glicerol.....	6
1. 1. 3 Metabolismo del glicerol	7
1. 1. 4 Transformación del glicerol a metilglioxal.....	8
2. Daños producidos por la criopreservación.....	11
3. Morfología espermática	15
3. 3. 1 La cabeza	15
3. 3. 2 El cuello.....	17
3. 3. 3 El flagelo.....	17
4. Citoesqueleto	19
4. 4. 1 Microtúbulos y proteínas asociadas.....	20
4. 4. 2 Teca perinuclear (TP)	21
4. 4. 3 Funciones de la TP.....	22
4. 4. 4 Subestructura de la TP (sTP).....	23
5. Capacitación y Reacción Acrosomal	23
6. Justificación.....	25
7. Hipótesis	26
8. Objetivo General	27
9. Objetivos Específicos.....	27
10. Material y Métodos	28
10. 1 Recolección de semen	28
10. 2 Transporte.....	28
10. 3 Evaluación seminal.....	29
10. 4 Exposición de la TP y tratamiento con glicerol.....	30
10. 5 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)	30
11. Resultados	33
12. Discusión.....	37
13. Conclusión	40
14. Referencias.....	41

Resumen

ARENAS NUÑEZ MARCO ANTONIO. Efecto de distintas concentraciones de glicerol sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo (bajo la dirección de: MVZ. María Elena Trujillo Ortega, MVZ. Roberto Martínez Rodríguez y MVZ. Santiago R. Anzaldúa Arce).

Estudios sobre criopreservación de semen porcino demuestran alteraciones producidas por este proceso en la integridad de la subestructura de la teca perinuclear (sTP). Por otra parte el glicerol es el crioprotector permeable más utilizado en los protocolos de criopreservación, sin embargo se reporta que presenta un efecto detrimental sobre proteínas citoesqueléticas. De hecho, la alta sensibilidad del espermatozoide porcino a la toxicidad del glicerol es la limitante por la cual es adicionado en concentraciones menores al 4% en los criodiluyentes para esta especie. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos concentraciones de glicerol sobre la teca perinuclear (TP), en muestras espermáticas de 6 eyaculados obtenidos de tres cerdos diferentes, fueron incubados en el detergente Brij 36-T, para retirar la membrana plasmática y el acrosoma y dejar la TP expuesta. Los experimentos con TP fueron adicionados en glicerol al 2 y 4% en NaCl 159 mol, por separado y se incubaron por 10 y 30 minutos, en otros dos tratamientos se adiciono glicerol con inhibidores de proteasas (IP), incubándolos 30 minutos, dejando un tercer grupo sin glicerol como control, y se dejó actuar por 30 minutos, al término de los cuales las muestras fueron fijadas y procesadas por tinción negativa para su valoración al microscopio electrónico. Se encontró que antes del tratamiento la apariencia de la sTP se conservó íntegra con apariencia de cinturón por debajo de la región ecuatorial espermática, con la forma descrita por otros autores como “eslabones de cadena” o “grecas” sin pérdida de continuidad. Después de los tratamientos, los resultados mostraron que la integridad de la sTP se ve alterada de manera significativa ($P < 0.05$) con la adición de glicerol al 2 y al 4% a 30 minutos, perdiendo su continuidad en un 74.7 y 72 % respectivamente, estos porcentajes son similares a lo obtenidos en estos tratamientos pero a 10 minutos obteniéndose 72% y 70% respectivamente. En los tratamientos con IP se obtuvo un 71.33% y 74% de pérdida de la continuidad. Los resultados muestran por primera vez el efecto adverso del glicerol sobre la integridad morfológica de la TP, lo que posiblemente sea un reflejo de la baja de viabilidad del semen criopreservado ya que esta estructura participa en diferentes eventos de la fertilización.

Abstract

Recent studies in cryopreserved boar spermatozoa demonstrate that alterations on perinuclear theca substructure (sPT) taken place by frozen-thawing process. On the other hand glycerol is the permeable cryoprotector most used in cryopreservation protocols, however is reported that presents a detrimental effect on protein cytoskeleton. In fact, the high susceptibility of boar spermatozoa to the glycerol toxicity is a restrictive factor by which it is added at less than 4% on final concentrations in the cryodiluents for boar semen. The aim of this study was to evaluate the effect of two concentrations of glycerol on the perinuclear theca (PT). Samples of 6 ejaculated obtained from 3 different boars were incubated in the detergent Brij 36-T, to remove the plasma membrane and the acrosome and leave the exposed PT. Then the samples were divided in five treatments. Control treatment (control) was sperm with exposed PT in NaCl solution (154M). Second and third treatments were added with glycerol 2 or 4% in the same NaCl solution; other two semen samples in NaCl solution were added with glycerol and protease inhibitors (IP). All treatments were incubated for 10 and 30 minutes, after the samples were fixed and processed by negative staining for its valuation at the transmission electron microscope. It was found that before treatment the appearance of the sPT will retain integrity with belt appearance around the head of spermatozoa just below the equatorial region, with the form described by other authors as "chain links" or "meander" with no loss of continuity. After treatments, the results showed that the addition of glycerol (both 2 and 4%) altered sTP integrity ($P < 0.05$) at 30 minutes, with damages on its continuity in 74.7 and 72%. These percentages are similar at 10 minutes obtained 72% and 70% respectively. Results in IP treatments showed a 71.33% and 74% loss of continuity. The results show for the first time the adverse effect of glycerol on morphological integrity of the TP, which is possibly a reflection on the decline in sperm viability cryopreserved since this structure is involved in different events of fertilization.

Key Words: spermatozoa of Boar, glycerol, Inhibitors of proteases, sPT.

1. Introducción

La criopreservación es una biotécnica que permite conservar espermatozoides de diferentes especies de mamíferos por tiempo indefinido; lo que hace posible la optimización y aprovechamiento de los mejores reproductores mediante el almacenamiento de su material germinal, al que se podrá tener acceso cuando se requiera aún después de que el semental ya no este disponible ⁽¹⁾.

La primera vez que se realizó con éxito la congelación de material seminal fue en el año de 1949 por C. Polge, A. Smith, A. Parkes, a partir de entonces se han desarrollado diversas técnicas para congelar diferentes tipos de material biológico (espermatozoides, células sanguíneas, tejidos, óvulos, embriones). El primer tipo celular congelado con éxito fue el semen de gallo ^(2, 3, 4).

La criopreservación de semen es un tema controvertido por lo que constantemente se modifican los protocolos de congelación con la finalidad de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia y fertilidad del semen al descongelado. Aún así, durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50 % de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, el citoesqueleto, el aparato motor y el núcleo del espermatozoide ^(2, 3, 4).

Aunque la adición del glicerol, como elemento crioprotector de las células durante los procesos de congelación, presenta beneficios sobre la capacidad fertilizante de semen de bovinos, éste también produce un efecto detrimental sobre el semen de otras especies como el de verraco, aves y caballos. Wilmut y Polge ⁽⁵⁾ fundamentaron que la capacidad fertilizante del espermatozoide de verraco se reduce cuando el semen es almacenado en 5 o 10% de glicerol a 20° C, pero no a 5° C ⁽⁶⁾.

1.1 Antecedentes

La criopreservación inicia en 1949, cuando los investigadores C. Polge, A. Smith, A. Parkes descubren el efecto crioprotector del glicerol al usarlo para congelar semen de gallo, posteriormente trabajan con semen de bovino comprobando su efecto crioprotector sobre la célula espermática ⁽⁴⁾. Este descubrimiento lo hicieron por “serendipia”; que en latín significa por casualidad. Los investigadores utilizaron un frasco con residuos de glicerol para almacenar espermatozoides de gallo y observaron que estos se movían después de estar en refrigeración.

Las ventajas de la criopreservación son: permitir almacenar semen por tiempo indefinido, intensificar el mejoramiento genético para el uso de los mejores reproductores, la utilización en producción de líneas selectas, la creación de bancos de germoplasma, la preservación de razas autóctonas, la prevención de enfermedades infecto-contagiosas, la conservación de material genético de reproductores valiosos y la exportación de dosis a países con esquemas de selección ^(7, 8).

En cuanto a la especie porcina, en 1970 y 1971 se obtienen los primeros lechones a partir de semen congelado mediante la deposición del mismo a nivel uterino o cervical por laparotomía ⁽⁹⁾ o inseminación con catéteres ⁽¹⁰⁾, respectivamente.

En 1975, simultáneamente en Estados Unidos Pursel y Johnson (1975) y en Alemania Westerndorf *et al.*, (1975), desarrollan dos protocolos de congelación utilizando como diluyentes a la yema de huevo y al glicerol como agentes crioprotectores, además del empleo de distintos azúcares.

En la década de los 90, se mejoran las condiciones del proceso de congelación con el estudio de nuevos envases y curvas de congelación ⁽⁹⁾.

En la especie porcina, la técnica está lejos de destacar debido a la susceptibilidad del espermatozoide de esta especie a los daños causados por el proceso de congelación y descongelación ⁽⁹⁾, pero sobre todo a la accesibilidad para emplear semen fresco-refrigerado (15 a 16° C), que permite conservar la calidad del semen por varios días, lo que lo convierte hoy en día en la mejor opción a nivel comercial ^(11, 12).

1.1.1 Crioprotectores

Son sustancias que se emplean para proteger a la célula espermática de las consecuencias de la formación de cristales de hielo, para atenuar los cambios en la composición del medio, así como de los efectos de los cambios de temperatura ⁽⁴⁾. Estos pueden actuar a nivel intracelular o extracelular.

Un crioprotector óptimo debe cumplir con tres criterios:

1. Ser altamente permeable en la membrana plasmática, para minimizar así los cambios de volumen.
2. Tener poca dependencia de la temperatura (baja energía de activación).
3. Causar la menor toxicidad a las células.

Actualmente los crioprotectores se dividen en dos tipos:

1. Los que atraviesan la membrana celular como: el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMOSO), el eritritol, el adonitol y la acetamida.
2. Los que no atraviesan la membrana celular como: azúcares (dextrosa, fructosa, sacarosa, trealosa, lactosa) y la polivinilpirrolidona ⁽¹³⁾.

Los que actúan a nivel intracelular ejercen una acción protectora al evitar la formación de cristales de hielo dentro de la célula, ya que disminuyen la temperatura a la que se alcanza el punto de congelación, evitando al mismo tiempo la concentración de electrolitos a los que está expuesta la célula durante el proceso de congelación-descongelación ⁽¹³⁾.

Los que actúan a nivel extracelular son solutos o coloides que no pueden servir como diluyentes, pero contribuyen a la propiedad osmótica de la solución y favoreciendo la salida de agua de la célula, produciendo con ello la deshidratación y encogimiento de las mismas ⁽¹⁴⁾.

1. 1. 2 Glicerol

El glicerol es empleado como agente crioprotector permeable para inhibir la formación de hielo intracelular ⁽¹⁵⁾.

A pesar de que el glicerol es un crioprotector universal, la concentración adecuada de este en los diluyentes para la congelación del semen no está bien establecida; concentraciones del 2 al 6 % pueden dar buenos resultados, ello según la especie o la célula. Este crioprotector atraviesa la membrana en pocos segundos y el equilibrio se alcanza a los 30 segundos, por lo que se ha propuesto que el efecto de este sobre la capacidad de

fecundación de los espermatozoides después de la descongelación puede ser dependiente de la temperatura y del tiempo de exposición al mismo ^(13, 16, 17, 18, 19).

Hammerstedt y Graham en 1992 ⁽¹⁸⁾, al revisar los efectos del glicerol sobre las células observaron que el estrés osmótico esta asociado con las concentraciones molares de glicerol empleadas, con modificaciones de la bicapa lipídica por su habilidad de insertarse entre los fosfolípidos, con su potencial para entrar como intermediario en vías metabólicas y también encontraron que este interacciona con los microtúbulos y otras proteínas del citoesqueleto. Por otra parte, la pérdida de fertilidad asociada con el empleo del glicerol en el espermatozoide de cerdo se atribuye al deterioro del acrosoma, ocasionado probablemente por estrés osmótico ^(18, 20). Recientemente, en el espermatozoide de bovino se reportó que alteraciones del citoesqueleto (teca perinuclear) de la cabeza del espermatozoide están relacionadas con la pérdida del acrosoma ⁽¹⁴⁾.

1.1.3 Metabolismo del Glicerol

El glicerol puede ser metabolizado por los espermatozoides de verraco, toro, carnero y macho cabrio, donde estimula el consumo de oxígeno, Aunque el espermatozoide de verraco tiene la capacidad de oxidarlo hasta CO₂ ⁽²⁰⁾, sólo concentraciones relativamente bajas del mismo pueden ser utilizadas para obtener una sobrevivencia adecuada después de la criopreservación del semen, es decir concentraciones adecuadas del mismo para la criopreservación de otras especies son perjudiciales para la sobrevivencia del espermatozoide en esta especie, ya que ocasionan daños en el acrosoma y alteraciones de la membrana plasmática ^(16, 18). Se ha señalado que el daño toxico del glicerol sobre los espermatozoides es independiente del daño osmótico. Una teoría es que el daño surge de la

conversión metabólica a un compuesto tóxico (**metilglioxal**), compuesto presente tanto en espermatozoides de aves y mamíferos ⁽²¹⁾.

1. 1. 4 Transformación del glicerol a metilglioxal

Riddle y Lorenz en 1973 ⁽²²⁾, reportaron al metilglioxal como intermediario del metabolismo del glicerol, vía un mecanismo glicólítico alterno. Durante su metabolismo el glicerol es convertido a dihidroxiacetona y esta triosa a metilglioxal por un mecanismo no enzimático, la reacción es catalizada principalmente por fosfato inorgánico.

El interés del metilglioxal como un posible intermediario del catabolismo de la glucosa inicia aproximadamente en 1913 con el descubrimiento del sistema enzimático glioxalasa que convierte este α - cetoaldehído a D- lactato. Durante los siguientes 50 años, finalmente se determina que el metilglioxal es un producto no enzimático de la glicólisis más que un intermediario auténtico. Sin embargo, varios investigadores han proporcionado evidencias convincentes de que este compuesto puede ser realmente un intermediario de un mecanismo activo alterno de la vía glicolítica en diversas bacterias ⁽²³⁾. Parte del énfasis para este renovado interés en el metilglioxal surge de la observación de un producto bactericida elaborado por ciertas cepas de *E. coli* mutantes. Adicionalmente, Riddle y Lorenz, (1973) ⁽²²⁾, encontraron que el metilglioxal se acumula en concentraciones letales cuando los espermatozoides de ave son incubados en soluciones de Ringer-fosfato adicionado de glicerol o dihidroxiacetona.

El metilglioxal es conocido por ser un potente inhibidor metabólico, no así la dihidroxiacetona. De hecho la conversión de la triosa a metilglioxal, catalizada por fosfato, ha sido demostrada. Concentraciones elevadas de ambos compuestos han sido relacionadas

con la inhibición de la respiración celular, sin embargo dicha inhibición en presencia de glicerol no es un evento muy conocido; aunque normalmente la dihidroxiacetona aparece como un metabolito, producto de la utilización del glicerol.

Normalmente, el glicerol que entra a la vía glicolítica es convertido a dihidroxiacetona-fosfato, por un mecanismo de fosforilación. La dihidroxiacetona es también rápidamente metabolizada vía fosforilización. Así, la acumulación de dihidroxiacetona en el medio, cuando el glicerol es el substrato, es indudablemente debida a la acción de fosfatasas sobre la triosa fosforilada. Cuando el glicerol fosforilado es oxidado a dihidroxiacetona-fosfato, los niveles de NAD dentro de la célula pueden verse reducidos con la resultante disminución de la vía de tres carbonos a L-lactato (Figura 1). Bajo tales condiciones, la dihidroxiacetona-fosfato y la dihidroxiacetona resultantes pueden acumularse a grandes concentraciones. Los efectos aditivos inhibitorios cuando la dihidroxiacetona y el glicerol están presentes, son debidos al mantenimiento de un nivel alto de dihidroxiacetona, que cuando cualquiera de los dos substratos es adicionado por separado ⁽²³⁾.

2. Daños producidos por el proceso de criopreservación

Se sabe que el semen criopreservado presenta una viabilidad disminuida después de dicho proceso. El daño durante la criopreservación puede ser atribuido a la toxicidad de los crioprotectores, al estrés osmótico, a los cambios de temperatura, a la formación de cristales de hielo o daño oxidativo ^(4, 5, 24).

Como efecto primario de los daños sobre las células producidos por el proceso de congelación, se señala la ruptura de la membrana plasmática. Este daño ha sido principalmente atribuido al estrés hiperosmótico experimentado por las células durante el proceso de enfriamiento y por la liberación de este estrés durante el proceso de descongelación. Cuando una suspensión celular es enfriada los solutos extracelulares – tanto iónicos/ no iónicos y agentes crioprotectores – se van concentrando cada vez más conforme el enfriamiento avanza y el agua se precipita en forma de hielo. Esto crea un ambiente hiperosmótico para la célula, el cual puede causar: ⁽³⁾

- 1) Cambios en el pH, conforme las sales del amortiguador alcanzan su solubilidad.
- 2) Incremento de la deshidratación celular, que da como resultado el entrecruzamiento de estructuras intracelulares.
- 3) Debilitamiento de los complejos proteína-lípidos de la membrana celular y pérdida de fosfolípidos.

Estos posibles efectos que pueden ocasionar daño celular, como resultado de la concentración de solutos, han sido colectivamente caracterizados por Manzur *et al.*, 1970 ⁽²⁾ como “efecto-solución”. Estos mismos autores sugirieron que el efecto solución ejercido sobre las células se incrementa en los procesos de enfriado lento, ello debido a que el tiempo de exposición de la célula a una solución concentrada se prolonga ⁽²⁴⁾.

Además del efecto solución, otros cambios en el ambiente osmótico de la célula que pueden causarle daño son los inducidos tanto por la adición del crioprotector, antes de la congelación como la consecuente remoción del mismo después de la descongelación ⁽²⁴⁾. Como cualquier tipo celular los espermatozoides cuando son sometidos al proceso de congelación responden a esta agresión con la pérdida de agua y disminuyendo su volumen ^(4, 25). Adicionalmente, ya que la desestabilización de la membrana plasmática puede ocurrir aún en ausencia de la formación de hielo intracelular, es probable que la deshidratación de la célula (estrés osmótico) juegue un papel importante en el daño a la membrana producto de la congelación y descongelación ⁽³⁾. Bajo esta condición más del 90% del agua osmótica activa es removida y la membrana plasmática experimenta una fase de transición de la bicapa lipídica al sufrir alteraciones en la distribución de sus fosfolípidos, que pueden cambiar de una bicapa lipídica en estado de gel a un reareglo hexagonal con características de permeabilidad no selectiva de la membrana ⁽³⁾. Por otra parte, la superficie rugosa presentada por algunas de las células podría ser el resultado de la resistencia ejercida por el citoesqueleto y otras estructuras intracelulares constitutivas que interaccionan con la membrana plasmática ⁽²⁴⁾.

De aquí la importancia de que los espermatozoides mantengan la capacidad para ajustar el volumen celular antes y después del proceso de criopreservación para prevenir la lisis y la muerte de los mismos; esto está determinado por factores como la composición de fosfolípidos de la membrana, el citoesqueleto, permeabilidad al agua, canales de agua y canales iónicos, entre otros ⁽²⁵⁾.

Al igual que otros crioprotectores, se ha reportado que el glicerol tiene un efecto detrimental sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide, principalmente por alterar la actividad de la membrana ⁽²⁶⁾.

Cuando el glicerol es incorporado a los diluyentes, el estrés osmótico transitorio que produce sobre la membrana plasmática está íntimamente relacionado con la capacidad penetrante del mismo ⁽¹⁸⁾. A pesar de lo anterior, la adición de concentraciones elevadas de glicerol (600- 1800mOsm), no resultan en la disminución de la motilidad y viabilidad espermática, tan grande como se ha observado cuando se aumenta la osmolaridad por la adición de solutos no permeables, esto se ha observado en espermatozoides de toro, ratón, cerdo y humano ⁽²⁷⁾, lo anterior refleja la habilidad del glicerol para alcanzar un equilibrio rápidamente a través de la membrana plasmática.

Se ha observado que el 50% de las células pierden la integridad de la membrana plasmática cuando la osmolaridad del medio es mayor o igual a 2000mOsm; incluso aunque la lisis celular se reduzca al disminuir la temperatura, la sobrevivencia se verá afectada por el tiempo de exposición de las células a los medios hiperosmóticos. El estrés osmótico causado por el glicerol se ha reportado para muchos tipos celulares ⁽²⁷⁾ y se ha relacionado a diferencias en la permeabilidad relativa a este compuesto a través de la membrana plasmática. Al respecto, se ha observado que cuando los espermatozoides son expuestos a soluciones hiperosmóticas de glicerol, pero isotónicas con respecto a los electrolitos, son pocas células las que pierden la integridad de la membrana plasmática ⁽¹⁸⁾, por lo que la lisis causada por la remoción del glicerol de las células puede depender de forma en que las mismas retornen a las condiciones isosmóticas ⁽²⁴⁾.

Por ello, se ha sugerido que para prevenir el daño osmótico sobre las células durante el proceso criopreservación es necesario conocer la tolerancia osmótica de las mismas en función de: a) tiempo, b) temperatura y c) tipo y concentración de solutos ⁽²⁴⁾.

Healy, 1969 ⁽²⁸⁾ estudió el efecto de la congelación con glicerol sobre la ultraestructura de las células espermáticas de varios animales y encontró diferencias que atribuyó a la

composición diferente de las membranas plasmáticas entre especies ^(29, 30). Los cambios en la motilidad del espermatozoide criopreservado en presencia de glicerol han sido asociados tanto con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, así como con la ruptura o pérdida del potencial de la membrana mitocondrial ⁽³¹⁾.

Las distorsiones producidas por el glicerol sobre la pieza media del flagelo consisten en el hinchamiento de las mitocondrias y pérdida de la integridad de la membrana celular; la pieza media es la región del flagelo donde la motilidad de la célula espermática es generada ^(25, 26, 27). En el caso del verraco la congelación de semen, en presencia del glicerol causa cambios estructurales principalmente a nivel de acrosoma ⁽⁵⁾.

Los cambios degenerativos que ocurren en la cabeza de los espermatozoides de verraco son similares a los que se han descrito en los espermatozoides de toro (vacuolización). Sin embargo, uno de los primeros cambios observados en los espermatozoides dañados no deja de ser la fractura de la membrana plasmática sobre el acrosoma, seguida del hinchamiento y finalmente la ruptura completa de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa.

Adicionalmente se menciona que la viscosidad del citoplasma y la de algún organelo del espermatozoide pueden verse alterados cuando el glicerol penetra al mismo. Además se sabe que la viscosidad intracelular del espermatozoide difiere entre especies, por lo que el glicerol podría tener efectos específicos sobre los eventos que ocurran en el citoplasma según la especie ^(13, 18, 32).

En conclusión la criopreservación junto con la concentración elevada de glicerol inducen daño espermático como resultado del estrés osmótico primero que el daño mecánico de la membrana plasmática y alteración en el metabolismo espermático y el daño oxidativo a los fosfolípidos de la membrana y la cromatina ⁽²⁵⁾.

A pesar de que el glicerol es el crioprotector que causa un mayor estrés osmótico y que provoca alteraciones en la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y potencial de la membrana mitocondrial ⁽³¹⁾. El estrés osmótico se atribuye a la diferencia existente en la permeabilidad relativa de los crioprotectores, del agua, y de la temperatura dependiente ⁽³¹⁾.

3. Morfología Espermática

El espermatozoide es una célula muy especializada que posee un solo juego del número de cromosomas de la especie ⁽³³⁾. Se ha dividido en tres regiones:

1. Cabeza, que consiste de un núcleo condensado, la teca perinuclear (TP) y el acrosoma.
2. El cuello une a la cabeza con el flagelo.
3. El flagelo, que contiene al axonema, las mitocondrias y otros elementos estructurales responsables del movimiento (Figura 2).

3.3.1 La cabeza

La forma de esta es característica de cada especie, esta tiene la forma de hoz en espermatozoide de rata y ratón y es aplanada y redonda en la mayoría de los animales domésticos.

Esta constituida de adentro hacia fuera por el núcleo, la envoltura nuclear, la teca perinuclear y el acrosoma, esta recubierta por la membrana citoplasmática, se debe de agregar que la cromatina nuclear muestra ciertas características que sugieren que su organización es importante para cumplir con sus funciones, por eso durante la

espermatozoides el DNA espermático debe ocupar un volumen menor, esto se resuelve condensando el material genético, por eso presenta una apariencia más alargada.

A su vez el núcleo está cubierto por dos estructuras, la envoltura nuclear y la teca perinuclear, la primera está relacionada estrechamente con la cromatina, consiste en dos membranas separadas entre 7 a 10 nm. Cerca del polo caudal de la cabeza y forman el anillo posterior, que se considera una especie de sello que separa la cabeza y al flagelo en compartimientos. La envoltura no posee poros nucleares, se localizan en una estructura residual de la espermiogénesis conocida como “envoltura redundante”, se aloja en el cuello y lejos de la cromatina ⁽³⁴⁾.

La TP es una estructura citoesquelética que rodea al núcleo, excepto donde el flagelo se inserta a la cabeza ⁽³⁵⁾.

El acrosoma es un organelo en forma de capuchón, envuelto en una membrana que se adapta estrechamente a los contornos de la parte anterior del núcleo. La membrana acrosomal interna, la que está adherida a la envoltura nuclear, se continúa en el margen posterior del capuchón con la membrana acrosomal externa. Las dos membranas corren paralelamente una a la otra en la mayor parte de su curso y rodean una cavidad muy estrecha que está ocupada por un material amorfo y homogéneo. El contenido acrosómico es rico en enzimas como glucosidasas ácidas, proteasas, esterasas, fosfatasa ácida y arilsulfatasa ⁽³⁶⁾, su forma y tamaño varía entre especies.

3. 3. 2 El cuello

Esta estructura tiene forma cónica con la base más ancha en su unión con la cabeza y la forma más estrecha en su unión con la pieza media. Se extiende entre la cabeza y la pieza media del flagelo. La porción más cercana a la cabeza es la llamada pieza de conexión y une a la cabeza con el flagelo. En su extremo anterior esta región recibe el nombre de capitolio y se une a la placa basal del núcleo por una serie de filamentos finos. En el extremo caudal del cuello, la pieza de conexión esta compuesta de nueve columnas estriadas o segmentadas. Estas están orientadas longitudinalmente y están compuestas de bandas claras y densas en forma alterada y gradualmente se fusiona con el capitolio. En el interior de la pieza de conexión, inmediatamente por debajo de la superficie articular del capitolio, hay un centriolo proximal orientado transversalmente. Otras estructuras del cuello incluyen la porción redundante de la envoltura nuclear, una o 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 axónema.

3. 3. 3 El Flagelo

Es la porción móvil del espermatozoide que se subdivide en tres segmentos: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La característica común de estos tres es la presencia del axonema central con un arreglo típico de 9 dobletes de microtúbulos periféricos y dos microtúbulos centrales. La pieza media se extiende desde el cuello hasta el anillo posterior y constituye la porción más ancha del flagelo. El axonema central aparece rodeado por nueve fibras simples, más gruesas y de contorno irregular, denominadas “fibras densas

externas”. Por fuera de éstas se encuentran las mitocondrias a manera de collar, es la vaina mitocondrial.

La pieza principal es el segmento más largo del flagelo. El axonema se mantiene rodeado por las nueve fibras densas externa, las que presenta grandes variaciones de tamaño y suelen desaparecer hacia el final de la pieza. En la pieza terminal (porción más corta), solo persiste en el axonema embebido de una matriz amorfa y directamente rodeado por la membrana plasmática⁽³⁷⁾.



Figura 2. .espermatozoide completó teñido con azul de coomazie, en el que se aprecian la cabeza, el cuello, el flagelo y sus respectivas medidas. Fuente. Gutiérrez- Pérez, 2006.

4. Citoesqueleto

La arquitectura tipo- específica es determinada y mantenida por la expresión génica de proteínas responsables del ensamblaje del citoesqueleto. Entre las características del citoesqueleto esta su resistencia a la lisis y a la extracción con detergentes desnaturizantes, así como a soluciones amortiguadoras a diferentes concentraciones salinas y pH ^(38, 39).

El citoplasma de las células eucariotas esta organizado por una red de filamentos conocida como citoesqueleto, esta red esta constituida por tres tipos de filamentos. Los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los tres tipo se forman como ensamblajes helicoidales de subunidades que se autoasocian generando combinaciones proteicas extremo-extremo a laterales.

Los filamentos intermedios forman estructuras semejantes a cuerdas, fáciles de formar pero difíciles de romper. Los microtúbulos son rígidos y fuertes, mientras que los filamentos de actina muy finos, complicados de ensamblar y mucho más sencillos de romper ⁽⁴⁰⁾. La tubulina y la actina son las subunidades de los microtúbulos y microfilamentos respectivamente, ambas proteínas han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución de las células eucariotas. Las subunidades de los filamentos intermedios son más diversas, siendo específicas de tejido como las queratinas de células epiteliales, a los neurofilamentos de células nerviosas.

En todas las células la función primaria de los filamentos intermedios es proporcionar resistencia mecánica ⁽⁴¹⁾. La actina es la principal proteína citoesquelética de todas las células de mamíferos y tiene un papel importante en la regulación de la forma celular, migración e interacción con la matriz extracelular ⁽⁴²⁾. Además una función común de las

estructuras citoesqueleticas de actina consiste en endurecer o cambiar la forma de la membrana plasmática, los microtúbulos participan en un gran número de funciones celulares incluyendo el mantenimiento de la forma y polaridad, mitosis, citocinesis, el posicionamiento de organelos, transporte intracelular a regiones específicas y la locomoción celular ⁽⁴³⁾.

4. 4. 1 Microtúbulos y Proteínas Asociadas

Los microtúbulos y sus proteínas asociadas (MAPs) son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función celular. Estudios detallados *in vitro* han establecido que la tasa de polimerización y despolimerización de tubulina se ve alterada por el glicerol. En la mayoría de las células el citoesqueleto de microtúbulos participa en los procesos de transducción de señal, por lo que cualquier alteración de los mismos puede afectar la respuesta celular a los estímulos externos. Para su funcionamiento los microtúbulos requieren de ATP. Se ha propuesto que el glicerol ejerce un efecto directo sobre la proteína de los microtúbulos (tubulina) al formar uniones covalente o físicas muy fuertes con los mismos ⁽⁴⁴⁾. Adicionalmente, los crioprotectores pueden directamente afectar el equilibrio bioenergético al incrementar la permeabilidad iónica de la membrana ^(22, 23, 24).

Entre las proteínas que se asocian a los microtúbulos están: la dineina, cinecina, las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos), estas se unen y promueven el ensamblaje de los microtúbulos; estas incluyen MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 y tau. Las proteínas dineina y cinecina son motoras y basan su movimiento en la hidrólisis del ATP ⁽⁴⁵⁾.

4. 4. 2 Teca Perinuclear (TP)

Al hablar de citoesqueleto espermático se debe mencionar que la principal estructura citoesquelética de la cabeza de los espermatozoides es la teca perinuclear.

La TP o también llamada sustancia perinuclear, es una estructura citoesquelética de origen proteico única de la cabeza espermática, que envuelve al núcleo excepto en su base, donde se inserta el cuello del espermatozoide y donde se forma el anillo posterior ^(38, 46), la teca perinuclear al ser observada al microscopio electrónico de transmisión, presenta una apariencia fibrillogranular ^(46, 47).

Morfológicamente se divide en dos regiones que son: la hoja o lámina subacrosomal, que se intercala entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, llenando el espacio entre el acrosoma y el núcleo ^(31, 44); la hoja o lámina postacrosomal, que se extiende de manera distal desde la región ecuatorial de la cabeza espermática y se acomoda entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear ^(38, 47).

La teca perinuclear se ensambla durante la espermiogénesis, coincidiendo con la transformación nuclear. El material perinuclear aparece primero en la espermatide temprana entre el granulo acrosomal en formación y la envoltura nuclear. Durante la espermiogénesis la estructura se extiende periféricamente sobre el polo anterior, justo al frente del acrosoma en formación ⁽⁴⁸⁾. Estas dos regiones no tienen su morfogénesis en la misma etapa de la espermiogénesis y difieren en composición proteica ⁽⁴⁸⁾.

4. 4. 3 Funciones de la teca perinuclear (TP)

Se le ha involucrado en:

- a) En el ensamblaje del acrosoma, manteniendo una continuidad estructural con la matriz nuclear, por lo que se convierte en una estructura citoesquelética que da forma al núcleo, además análisis ultraestructurales de espermatides y espermatozoides epididimales demuestran una estrecha relación entre la teca y las membranas acrosomales espermáticas, participando en la formación de la cabeza ⁽⁴⁸⁾.
- b) En el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática de la cabeza espermática, durante la capacitación y la reacción acrosomal se presenta un reacomodo específico de las partículas intramembranas, las cuales quedan situadas en dominios diferentes.
- c) En la protección del núcleo, la protección mecánica al envolver al núcleo y así lo mantiene integro durante la maduración espermática y el tránsito por el tracto femenino hasta el sitio de fecundación.
- d) Participa en la rigidez estructural que aporta y favorece la penetración de las envolturas del óvulo, esta rigidez se debe al aumento en la estabilidad de la teca perinuclear conferida por el incremento progresivo de puentes disulfuro intra e intermolecularmente entre sus constituyentes proteicos durante la maduración epididimal al mismo tiempo que se establecen los enlaces entre las protaminas nucleares ⁽⁴⁸⁾.
- e) Participa en los procesos de fusión y descondensación espermática y es considerada como reservorio de moléculas de señalización algunas de las cuales podrían estar participando en la activación del ovocito, la defensa antipoliespérmica y el desarrollo embrionario temprano ^(47, 48, 49).

4. 4. 4 Subestructura de la TP (sTP)

En estudios sobre cambios en la composición proteica de la TP durante la reacción acrosomal Juárez y Mújica, (1999) ⁽⁴⁹⁾, reportaron la formación de una subestructura en la región apical de la hoja postacrososomal de la TP de espermatozoide de cobayo, esta sTP consiste en proyecciones en forma de pestañas, que rodea la cabeza espermática. Esta subestructura también ha sido reportada en espermatozoides de carnero ⁽⁴⁾, cerdo y bovino ⁽⁴⁹⁾.

5. Capacitación y Reacción Acrosomal (RA)

La capacitación es un proceso en el cual los espermatozoides que ya han sido eyaculados requieren de un periodo de incubación en el tracto reproductor de la hembra y que lo prepara para la reacción acrosomal.

Específicamente la capacitación es considerada como la suma de procesos bioquímicos y fisiológicos que se llevan a cabo en el periodo de incubación de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra. En este evento el espermatozoide sufre cambios tales como: incremento en la fluidez de la membrana, pérdida de colesterol, aumentó en la concentración de calcio, incremento en la concentración de AMPc, fosforilación de proteínas y cambios de motilidad del gameto ⁽⁵⁰⁾.

La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis regulada que ocasiona cambios estructurales y funcionales en el espermatozoide. Durante ésta el acrosoma libera enzimas proteolíticas para que el espermatozoide pueda atravesar las envolturas del ovocito. Se ha propuesto que la estrecha relación estructural que existe entre la membrana plasmática y el

citoesqueleto soporta el concepto de que los elementos de este último mantiene la integridad de esta región de la cabeza espermática durante la reacción acrosomal, además las proteínas constituyentes de la TP durante la reacción acrosomal podrían servir para estabilizar la región ecuatorial previniendo de la vesiculación que se lleva a cabo durante la reacción acrosomal, por lo que para la estabilización de las membranas de esta región, las proteínas de la TP pueden jugar un papel importante en la fertilización.

Como ya se mencionó la TP está involucrada en el mantenimiento de los dominios de membrana. Durante la capacitación y la reacción acrosomal se presenta un reacomodo específico de las partículas intramembranas. Además se ha publicado que la actina que es una proteína constituyente de la TP participa en estos eventos y que tiene la capacidad de unirse con otras proteínas de la misma TP ⁽⁵¹⁾, confiriéndole la capacidad de formar polímeros. Juárez y Mújica (1999) ⁽⁴⁹⁾, mencionan que la sTP del espermatozoide de cobayo es estabilizada por la actina y posiblemente la desestabilización de la misma provoca que la sTP se altere.

Por lo tanto la polimerización de la actina en la región ecuatorial y postacrosomal ha sido reportada que ocurre en el espermatozoide de cerdo durante la capacitación ⁽⁵²⁾ y en el cobayo durante la reacción acrosomal ⁽⁵³⁾. Por otro lado la polimerización se ha involucrado en la habilidad de la capacidad de fertilización del espermatozoide con reacción acrosomal. Se ha reportado que la TP del espermatozoide de cerdo al igual que el espermatozoide de bovino, sufre alteraciones después del proceso de criopreservación ^(54, 55). Otras investigaciones han señalado que las proteínas del citoesqueleto pueden sufrir cambios inducidos por los componentes de TP debido a que son termosensibles y por lo tanto estos cambios estructurales tienen consecuencias funcionales. Sin embargo no se excluye la idea de que estos cambios sean inducidos primeramente por el efecto tóxico del glicerol ^(54, 55).

6. Justificación

Durante los procesos de congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que causan reducción de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco ⁽⁵⁶⁾. Esto se debe a que durante los protocolos de criopreservación se presentan daños estresantes, entre los que se encuentra el **estrés tóxico** debido a la exposición de la célula al agente crioprotector ⁽⁴⁾. En el caso del espermatozoide de cerdo se ha reportado la relación directa entre la concentración de glicerol presente en el medio de congelación con el daño acrosomal presentado después del proceso, es decir entre mayor es la concentración de glicerol mayor es el daño acrosomal ⁽¹⁷⁾. Recientemente se ha reportado que existe una relación entre la integridad de la TP y la del acrosoma en el espermatozoide criopreservado del bovino ^(24, 57).

La reducción de la fertilidad asociado al semen congelado ha sido atribuida en gran parte a la alteración en la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación ⁽⁴⁹⁾. Sin embargo esta reducción podría estar relacionada con un efecto tóxico del glicerol sobre la TP.

Por lo que este trabajo se realizara para establecer si existe un efecto tóxico del glicerol sobre la sTP del espermatozoide de cerdo.

7. Hipótesis

Si la TP del espermatozoide de cerdo es expuesta al glicerol está sufrirá alteraciones morfológicas.

8. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glicerol sobre la integridad de la TP del espermatozoide de cerdo.

9. Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de la adición de 2% y 4% de glicerol sobre la TP del espermatozoide de cerdo con y sin inhibidores de proteasas.

Evaluar la TP en los espermatozoides de cerdo de los diferentes tratamientos (2%, 4%, 4%/IP₁, 4%/IP₂ y control).

10. Material y Métodos

Diseño experimental (figura 3).

Los eyaculados fueron obtenidos de tres machos reproductores (2 años aproximadamente de edad) pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEEIPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual está ubicado en el Km. 2 de la carretera Jilotepec-Corrales colonia la Dalia en Jilotepec, Edo. México.

10.1 Recolección del semen

Para colectar el semen se empleó la técnica de la mano enguantada. Sólo se colectó la fracción rica en espermatozoides la cual fue filtrada a través de una gasa estéril. Una vez que se obtuvo el eyaculado se midió el volumen con base en el peso (1Kg. = 1l) y se procedió a su dilución a una proporción 1:1 con un producto comercial (IMV USA870 XT – R).

10.2 Transporte

Para el transporte de los eyaculados al laboratorio del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se utilizó una caja térmica de poliuretano, la temperatura se monitoreo constantemente para mantenerla a 23° C.

10.3 Evaluación seminal

A su llegada al laboratorio se llevó a cabo la evaluación del semen. La motilidad espermática que se evaluó tomando alícuotas de semen y se colocaron sobre un portaobjetos a 37° C y se observaron al microscopio de luz, con el objetivo de 40 x.

Las muestras que no cumplieron con los parámetros establecidos de motilidad del 80 % y menos del 15 % de anormalidades morfológicas fueron desechadas. La evaluación del porcentaje de anormalidades morfológicas (alteraciones en cabeza, alteraciones en cola y gota citoplasmática), se evaluó durante el conteo celular.

Para la valoración del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se realizaron frotis y se tiñeron con eosina-nigrosina, (tinción de sobrevivencia), para calcular la concentración espermática, se tomaron alícuotas de 25 µl de semen, las cuales fueron colocadas en 500 µl de solución de tritón X-100 al 0.1 % y para conocer la concentración espermática se uso la cámara de Neubauer de la siguiente forma: El conteo celular se efectuó de cinco de los recuadros de la cámara de Neubauer (los 4 de las esquinas y el del centro) y se aplicó la siguiente formula: $N^{\circ} \text{ células} \times \text{FD} \times 10,000 \times 5$. Donde N° es el número de células contadas de los 5 cuadros, FD es el factor de dilución, 10,000 que esta dado por la dimensión de la cámara y 5 el número de cuadros contados, los resultados se expresaron en millones de células por ml.

10.4 Exposición de la TP y tratamiento con glicerol

Para exponer la TP las muestras fueron adicionadas con el detergente neutro Brij 36-T (1.2% concentración final) y se dejaron incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida las muestras se centrifugaron y lavaron tres veces con agua destilada filtrada por centrifugación-resuspensión. Las muestras fueron resuspendidas en NaCl 154mM a su concentración inicial, una muestra de alícuota fue fijada con el fijador karnovsky para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). El resto de los espermatozoides con TP expuesta fueron divididos en 5 muestras: una fue usada como control (NaCl), dos más fueron adicionadas con glicerol (2% y 4% respectivamente) y dos además del glicerol fueron adicionadas con inhibidores de proteasas (20 μ l leupeptinas y 80 μ l de un cóctel de inhibidores).

Las muestras fueron incubadas a 37° C y a los 10 y 30 minutos de incubación muestras de alícuotas fueron fijadas en karnovsky para su evaluación al MET.

10.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

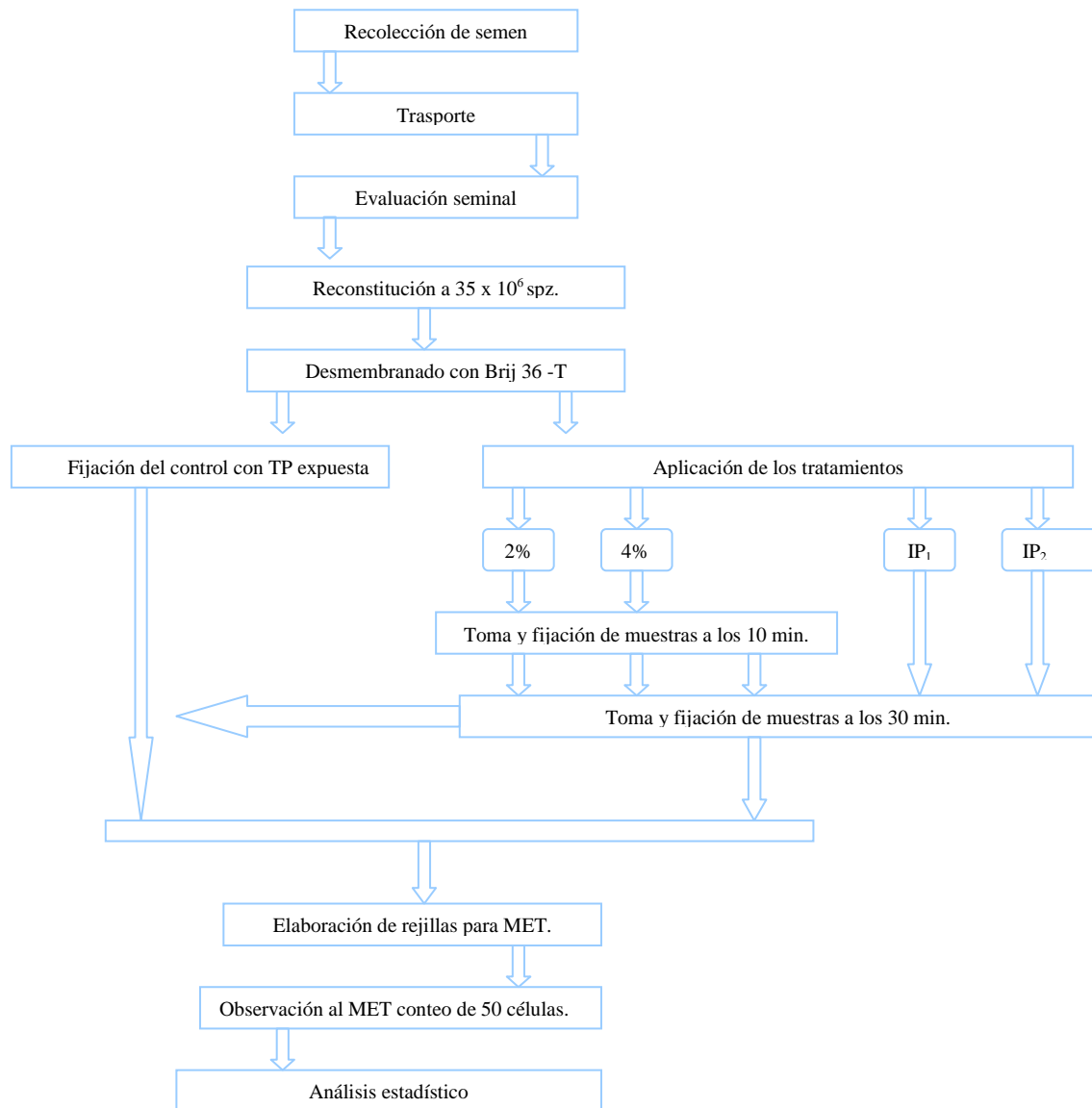
Para su observación al MET las muestras fueron procesadas por la tinción negativa (tinción de contraste). Alícuotas de las muestras fueron colocadas en rejillas de cobre de 300 mesh cubiertas con membrana de colodión-carbón, dejándose incubar por diez minutos para su adsorción, pasado este tiempo se retiro el exceso de las muestras con la punta de un papel filtro, las células se tiñeron con acido fosfotúngstico al 0.01% de 1.5 a 3 minutos o bien con acetato de uranilo por 12 segundos, pasando este tiempo las muestras se lavaron con agua destilada filtrada y se dejaron secar.

Para su valoración ultraestructural de las muestras se utilizó el microscopio electrónico de transmisión Zeiss M9, de la Unidad de Microscopia Electrónica del Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM. De cada tratamiento se evaluaron 50 espermatozoides los cuales se observaron y evaluaron al azar.

Para la valoración de la TP se utilizó como marcador morfológico la integridad de la subestructura de la hoja postacrosomal de la TP. La cual fue clasificada en sTP intacta, sTP alterada o sTP ausente ⁽⁵⁸⁾.

Análisis Estadístico. El número de espermatozoides se analizó por medio de la prueba de análisis de varianza y la prueba de Tukey. Se realizaron comparaciones de las muestras de los eyaculados controles con los eyaculados que contengan los distintos tratamientos (2% y 4% de glicerol, inhibidores de proteasas leupeptina y un cóctel de inhibidores).

Figura 3. Diseño experimental.



11. Resultados

La observación de los espermatozoides después del tratamiento con el detergente Brij 36-T (1.2%) mostró la TP integra, la cual presentó una subestructura bien definida por debajo de la región ecuatorial de la cabeza espermática en forma de eslabones de cadena, rodeando a la misma a manera de cinturón y sin pérdida de continuidad ⁽⁵⁸⁾.

Por otra parte, al evaluar la TP de las muestras control el 78% de los espermatozoides presentaron la subestructura integra (figura 4.A); a los 10 y 30 minutos los espermatozoides tratados con Brij, para exponer la TP, e incubados con glicerol al 2% presentaron el 6% y 3.33% de subestructura integra, respectivamente; mientras que los espermatozoides con glicerol al 4% a los mismos tiempos presentaron el 8% y 6%, respectivamente de subestructuras intactas. En las muestras adicionadas con leupeptina o el cóctel de inhibidores de proteasas en presencia de glicerol (4%), a los 30 minutos de incubación presentaron 6.67% y 4% de subestructuras intactas, respectivamente (gráfica 1).

En cuanto al porcentaje de alteraciones en la sTP (Figura 4.B), los espermatozoides control presentaron 21.33% de alteración mientras que solo en 0.67% estuvo ausente (Figura 4.C). Los espermatozoides tratados con glicerol al 2 y 4% a 10 y 30 minutos presentaron 36%, 46.67%, así como 46.67% y 50% de alteración en la sTP, respectivamente (gráfica 2). Por otra parte el 47.33% y 60.67% de espermatozoides tratados por 10 y 30 minutos con glicerol al 2% mostraron ausencia de la sTP, respectivamente; mientras que los espermatozoides tratados con glicerol al 4% a los mismos tiempos mostraron el 42% y 47.33% de sTP ausente, respectivamente. Las muestras tratadas con glicerol y adicionadas con leupeptina o con el cóctel de inhibidores de proteasas presentaron el 62% y 72% de alteración, también respectivamente y 31.33% y 24% de sTP ausente, respectivamente

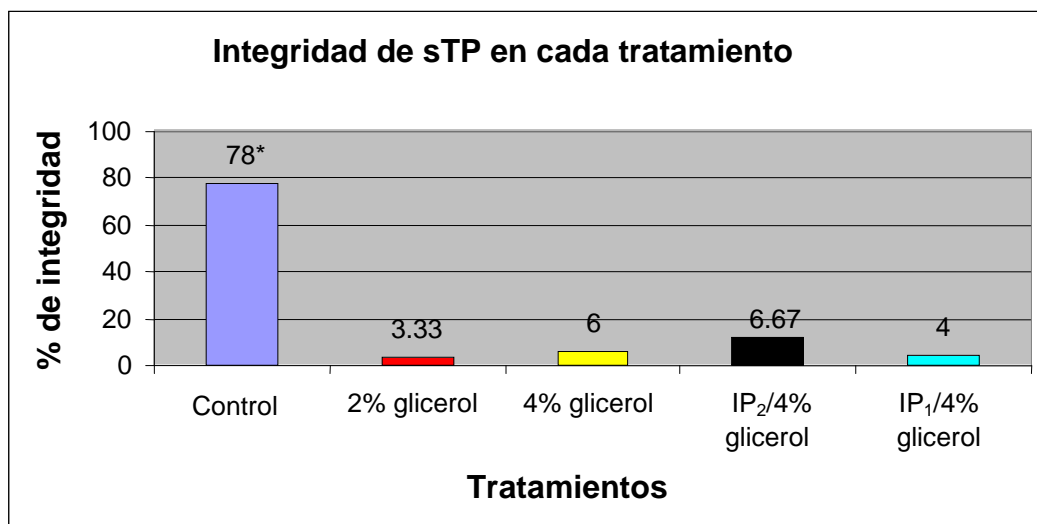
(gráfica 3). Los resultados obtenidos de los grupos con glicerol a 10 minutos no presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), con respecto a todos los grupo a 30 minutos, por lo que estos resultados no se ven en la tabla, ni en las graficas (cuadro 1).

Cuadro 1. Valoración de la integridad de la sTP en cada tratamiento

tratamiento	Control	2% G30	4% G30	IP ₁ /4%G	IP ₂ /4%G
Integra	78.0 ± 4.2 ^a	3.33 ± 1.6 ^b	6.0 ± 4.2 ^b	6.67 ± 6.0 ^b	4.00 ± 3.5 ^b
Alterada	21.33 ± 4.8 ^a	36.0 ± 12.9 ^{ab}	46.67 ± 21.7 ^{bc}	62.0 ± 15.7 ^{cd}	72.0 ± 11.0 ^d
Ausente	0.67 ± 1.6 ^a	60.67 ± 13.9 ^b	47.33 ± 24.4 ^{bc}	31.33 ± 20.4 ^d	24.0 ± 11.8 ^{cd}

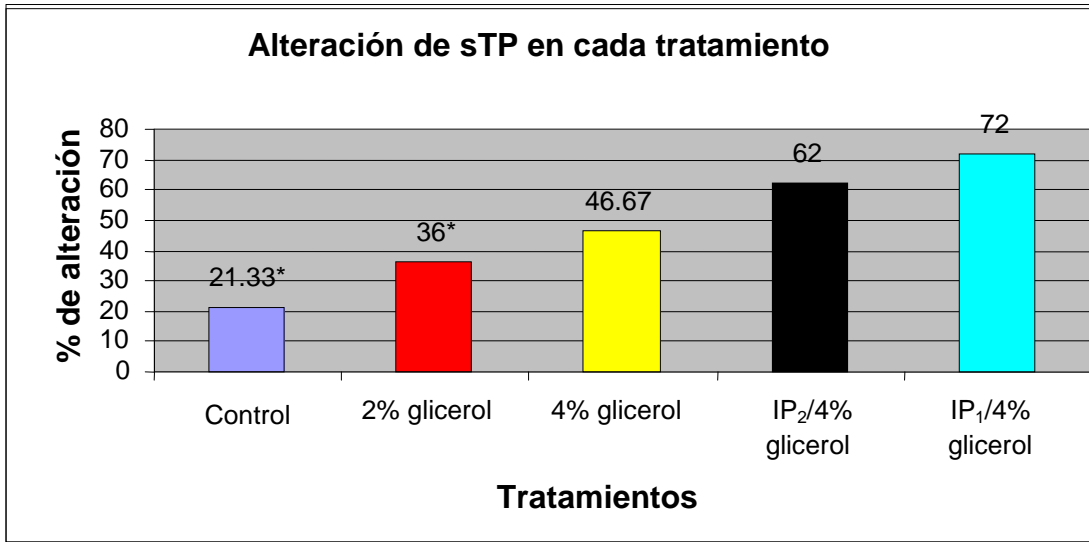
Se presentan las medias ± la desviación estándar de cada grupo, los valores por línea no conectados por la misma letra indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Estadísticamente existió una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en todas las muestras con respecto al control, no así entre ellas.

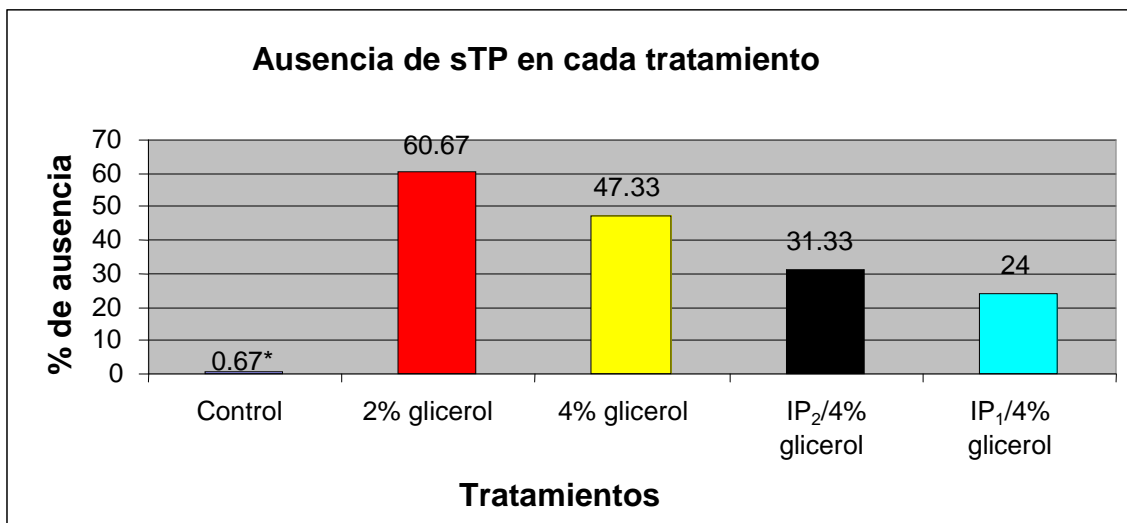


Grafica 1. Muestra los porcentajes de integridad de la subestructura de la TP en los espermatozoides tratados con glicerol (2% y 4%), con glicerol mas inhibidores de proteasas (IP₁ e IP₂/4% G) y el control.

* Presenta diferencia significativa con los demás grupos ($P < 0.05$).



Grafica 2. Muestra los porcentajes de alteración de la subestructura de la TP en los espermatozoides tratados con glicerol (2% y 4%), con glicerol más inhibidores de proteasas (IP₁ e IP₂/4% G) y el control.
*No presentan diferencia significativa entre ellos (P <0.05).



Grafica 3 Muestra los porcentajes de ausencia de la subestructura de la TP en los espermatozoides tratados con glicerol (2% y 4%), con glicerol más inhibidores de proteasas (IP₁ e IP₂/4% G) y el control.
* Presenta diferencia significativa con los demás grupos (P <0.05).

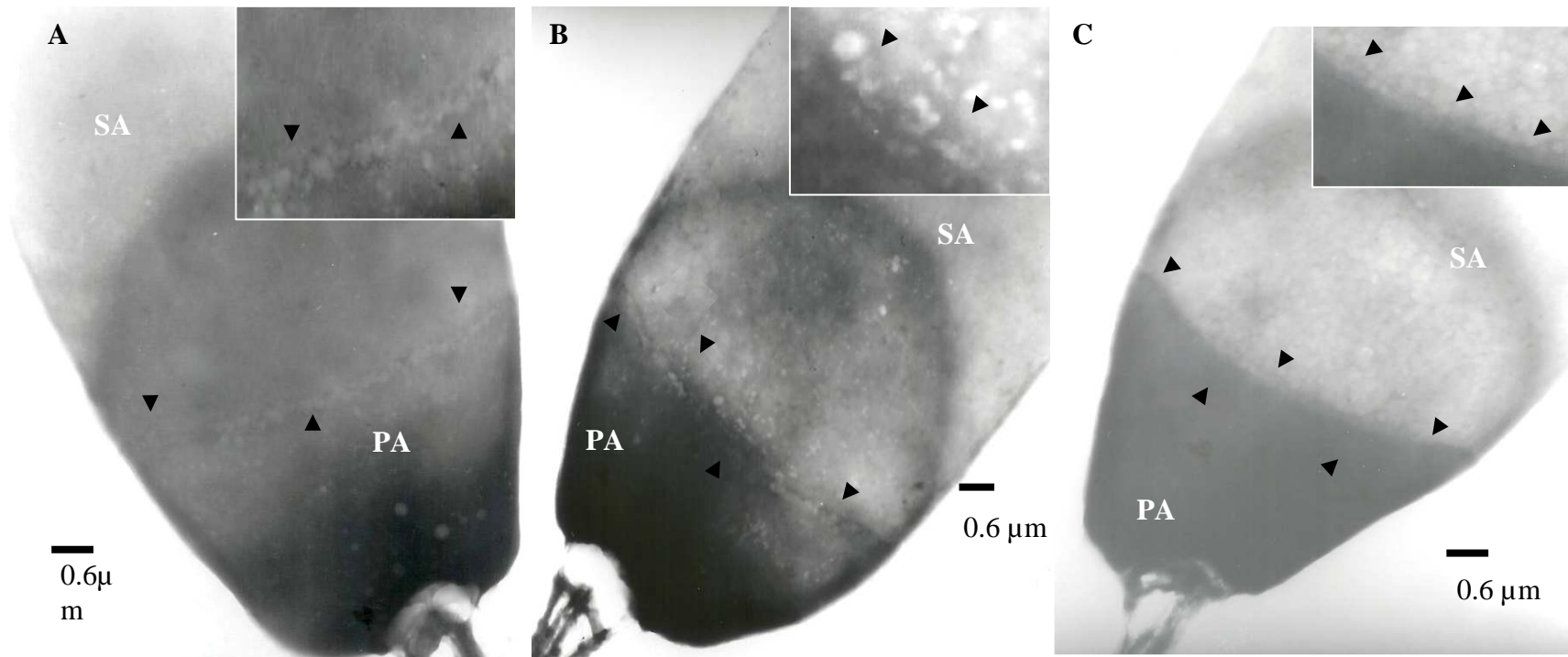


Figura 4. Micrografía electrónica de espermatozoides de cerdo con TP expuesta. 4. A) cabeza espermática con la sTP íntegra donde se puede apreciar la continuidad en la morfología de la misma que se presenta como una serie de pequeñas zonas menos electrodenso y que da una apariencia de eslabones de cadena, las flechas indican dichos eslabones. En el ángulo superior derecho un acercamiento de dicha sTP. 4. B) cabeza espermática con la sTP alterada nótese que las flechas negras indican los diferentes grados de alteración en la morfología de la misma, estas alteraciones son más aparentes en las zonas central y en el vértice del lado derecho de la sTP, las flechas en el recuadro superior derecho indican las zonas menos electrodenso en apariencia de eslabones de cadena. 4. C) cabeza espermática con la sTP ausente, nótese que en esta micrografía las flechas negras indican con claridad el surco que corre de vértice a vértice en la región ecuatorial de la cabeza espermática donde debió presentarse la sTP, en el recuadro de la parte superior derecha las flechas indican con mayor claridad las zonas donde debió presentarse la sTP, nótese también que el surco se observa mejor definido. PA vaina postacrosomal. SA, hoja subacrosomal. En las tres micrografías se observa el cuello de los espermatozoides

12. Discusión

En el presente trabajo encontramos que la integridad de la sTP en el espermatozoide de cerdo se vio afectada por las distintas concentraciones de glicerol empleadas (2 y 4%). Los resultados sugieren que a mayor concentración de glicerol, existirá un mayor porcentaje de alteración en la sTP de la cabeza espermática. La adición de inhibidores de proteasas a las muestras de los grupos experimentales, independientemente de la concentración de glicerol empleada, no fue suficiente para evitar los daños en la sTP, esto sugiere que glicerol afecta directamente a la sTP. La TP es el principal elemento citoesqueletico de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos, como en el espermatozoide de cobayo donde se identificó una subestructura de la TP, la cual está constituida por actina F.

Existen trabajos previos que indican que la actividad proteolítica puede provocar la degradación de los elementos del citoesqueleto ⁽⁵⁹⁾. Estudios realizados en el espermatozoide de cobayo empleando el mismo cóctel de inhibidores de proteasas utilizado en este trabajo mostraron la disminución del daño sobre la sTP en las células incubadas bajo condiciones destestabilizantes de la misma; en el mismo trabajo se reporta que la adición de TLCK o benzamidina fue suficiente para mantener la morfología de la sTP sin ninguna alteración, ambos inhiben de proteasas tipo tripsina ⁽³⁹⁾. El cóctel de inhibidores empleados en ambos estudios además de inhibir a serinproteasas (tripsina y quimiotripsina), actúan inhibiendo metaloproteasas (pronasa y termolisina) y cisteínproteasas (papaina), mientras que leupeptina inhibe serinproteasas (tripsina, quimiotripsina, trombina y plasmina) y cisteinproteasas (papaina y catepsina B). Lo anterior puede sugerir que el daño presentado en la sTP de la cabeza espermática fue provocado directamente por el glicerol, no se descarta la posibilidad de que las alteraciones

observadas pudieron deberse a otro tipo de proteasa que los inhibidores utilizados en este trabajo no fueron capaces de inhibir o a la activación de otro tipo de proteínas ⁽⁶⁰⁾.

Estudios previos, han señalado que el glicerol afecta a los espermatozoides independiente del daño osmótico. Una teoría es que el daño surge de la conversión del glicerol a un compuesto toxico llamado metilglioxal, vía un mecanismo no enzimático y alterno de la glucólisis ⁽²²⁾. Sin embargo, en el espermatozoide de cerdo no ha sido detectada la actividad de la glicerol cinasa, enzima necesaria para que el espermatozoide pueda metabolizar el glicerol por la vía glucolítica ⁽⁶¹⁾. Por lo que podemos sugerir, que el daño presentado en la sTP del espermatozoide de cerdo se deba a los efectos tóxicos del glicerol, en este trabajo el modelo utilizado fue el de espermatozoides sin membranas y aparentemente sin actividad metabólica. Por lo que, si bien el glicerol es un crioprotector permeable que ejerce una acción protectora al evitar la formación de cristales de hielo dentro de la célula espermática y disminuyendo el punto de congelación ⁽¹³⁾, su toxicidad para el espermatozoide de cerdo y otras especies ha sido ampliamente reportada ^(17, 19, 25, 28, 57, 62). Keates, 1980 ⁽⁴⁴⁾, realizó estudios *in vitro* y evaluó la acción del glicerol sobre la tubulina y proteínas asociadas a las misma, encontrando que altera la polimerización y despolimerización de los microtúbulos, lo que se reflejó en alteraciones del citoesqueleto. A su vez Márquez *et al.*, (1977) ⁽²⁸⁾ y Hammerstedt y Graham, (1992) ⁽¹⁸⁾ demostraron que el glicerol provoca efectos dañinos sobre el acrosoma, pieza media y membrana citoplasmática; sin embargo, aunque existen evidencias de la alteración del citoesqueleto, no existen reportes en relación a los posibles efectos directos del glicerol sobre la sTP del espermatozoide del cerdo.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo pueden estar relacionados con los hallazgos previos de Fiser *et al.*, (1993) ⁽¹⁹⁾ quienes reportaron que diluyentes para congelación de espermatozoides de cerdo, conteniendo concentraciones de glicerol al 2, 4 y

6 %, tuvieron una influencia negativa sobre la integridad acrosomal, siendo más significativa a una concentración del 6%. Anteriormente Almlid y Johnson, 1988 ⁽⁶³⁾ evaluando la integridad del acrosoma, de la membrana y el porcentaje de motilidad en concentraciones de glicerol del 2 al 6%, ellos informaron un mayor daño del acrosoma y menor motilidad con concentraciones del 5 al 6%, aunque con cierto grado de mantenimiento en la integridad de la membrana plasmática. Si como lo sugieren nuestros resultados, la toxicidad del glicerol tiene un efecto sobre la teca perinuclear, los cambios ultraestructurales en la sTP pueden influir negativamente en las funciones de la misma, como son entre otras, el mantenimiento del acrosoma, por lo que al alterarse o perderse esta estructura se provoque la alteración del mismo. Adicionalmente, ya que el citoesqueleto participa en procesos de señalización, modificaciones en el mismo pueden alterar la respuesta celular a los estímulos externos, cambiar el balance bioenergético, incrementar la permeabilidad de la membrana para los iones ^(3, 18) y afecta la distribución en los dominios de la membrana plasmática.

Finalmente la descripción de la sTP integra, concuerda con lo referido por Gutiérrez-Pérez, 2006 ⁽⁵⁸⁾ y Arancibia-Salinas, 2005 ⁽⁶⁴⁾.

Este es el primer estudio donde se reporta que el glicerol afecta el citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide del cerdo, específicamente la sTP. Diferentes experimentos deberán ser diseñados para tratar de esclarecer la forma en que lo hace y con ello tratar de minimizar sus efectos en el espermatozoide criopreservado.

13. Conclusión

Se observaron efectos tóxicos del glicerol al 2 y 4% sobre la sTP de la cabeza espermática en relación al marcador morfológico (integridad, alteración y ausencia de la sTP).

Los efectos tóxicos del glicerol fueron directamente proporcionales a la concentración utilizada.

Los efectos tóxicos del glicerol no pudieron ser contrarrestados por los inhibidores utilizados, en cuanto al daño en la sTP.

14. Referencias

- (1) Hafez E. S. E. 1997. Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana. México. Pp. 632-644.
- (2) Mazur P. The freezing of biological system. *Science. Cryobiology.* 1970; 168: 939-949.
- (3) Parks J. E. Graham J. K. Effects of cryopreservation procedures on spermatozoa membranes. *Theriogenology.* 1992; 38: 209-222.
- (4) Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7: 871-891.
- (5) Wilmut I. and Polge C. The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79° C. *J. Reprod. Fertil.* 1974; 38: 105-113.
- (6) Pursel V. G. Schulman L. L. Johnson L. A. Effect of glycerol concentration on frozen sperm. *Theriogenology.* 197; 89: 305-312.
- (7) Watson P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:481-492.
- (8) Wevar V. C. Torreta M. E. Forchetti O. Evaluación de dos técnicas de congelación de semen porcino. Resultados preliminares de fertilidad. *Arch. Latinoam. Proa Anim.* 1997; 5 (Supl. 1): 448-449.
- (9) Polge C. Salamon S. and Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 1970; 87: 424-428.
- (10) Crabo B. G. and Einarsson S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.* 1971; 12: 125.
- (11) Cerolini S. Maldjian A. Pizzi F. Gliozzi T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reprod.* 2001; 121: 395-401.

- (12) Córdova I. A. Perez J. F. Lleo B. Garcia A. Martin Rillo S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.* 2001; 36: 199-202.
- (13) Bamba K, Adam L. C. E. Freezing rabbit's semen by the use of BFS diluent. *Lab. Anim.* 1990; 24: 172-175.
- (14) Martinez C. O. Juárez M. M. L. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the Perinuclear theca. *Theriogenology.* 2006; 66: 1969–1975.
- (15) Hammerstødt R. H. Graham J. K. and Nolan J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11: 73-88.
- (16) Osinowo O, Salamón S. Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 1976; 29: 325-333.
- (17) Fiser P. S. Fairfull R. W. Combined Effects of Glycerol Concentration and Cooling Velocity on Motility and Acrosomal Integrity Boar Spermatozoa Frozen in 0.5 ml Straws. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25: 123-129.
- (18) Hammerstødt R. H. Graham J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology.* 1992; 29: 26-38.
- (19) Fiser P. S. Fairfull R. W. Hansen C. Panich P. L. Shrestha J. N. B. and Underhill L. The Effects of Warming Velocity on Motility and Acrosomal Integrity of Boar Sperm as Influenced by the Rate of Freezing and Glycerol Level. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 34: 190-195.
- (20) Jones A. R. Chantrill L. A. Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 129-134.

- (21) Igor I. Katkov. Nadezhda Katkova. John K. Crister and Peter Mazur. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*. 1998; 37: 325-338.
- (22) Riddle V. M. and Lorenz F. W. Nonenzymic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxiacetona in ringer's phosphate suspensions of avian spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973; 50: 27-34.
- (23) Fiser P. S. and Fairfull R. W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1989; 26: 64-69.
- (24) Gao G. Y. Ashworth E, Watson P. F. Kleinhans F. W. Mazur P. Crister J. K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 1993; 49: 112-123.
- (25) Meyers S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 89: 57-64.
- (26) Murdoch R. N. and Jones R.C. The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54: 419-422.
- (27) Gao D. Y. Liu C. prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1109-1122.
- (28) Healy P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J. Reprod. Fertil.* 1969; 18: 21-27.
- (29) Marquez B. J. and Ogasawara F. X. Ultrastructural changes in turkey spermatozoa after immersion in glycerolyzed media and during various steps of cryopreservation. *Poultry Science* 1977; 56: 1806-1813.
- (30) Harris G. C. Jr. Thurston R. L. And Cundall J. Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw. *J. Reprod. Fertil.* 1973; 34: 389-394.

- (31) Barry A. Ball and Anthony Vo. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 2001; 22: 1061-1069.
- (32) Fahy G. M. The relevance of cryoprotectants “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology.* 1986; 23: 1-13.
- (33) Moore H. D. M. Localization of Specific Glycoproteins Secreted by the rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* 1980; 22: 705-718.
- (34) Bellvé A. R. and O’ Brien D. A. The Mammalian Spermatozoon: Structure and Temporal Assembly. In *Mechanism and control of animal fertilization.* J. F. Hartman, editor. Acad. Press, Inc., New York. 1983; 55- 137.
- (35) Courtens J. L., Courot M. and Fléchon J. E. The perinuclear substances of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J. ULtrastruct. Res.* 1976; 57: 54-64.
- (36) Fawcett D. W. A. comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Reprod.* 1970; Supplement. 2: 90-127.
- (37) Fouquet J. P. and M. L. Kann. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol. Cell.* 1994; 81: 89-93.
- (38) Longo F. J. Development of the male pronucleus. In: *fertilitation.* Chapman and Hall Ltd (Ed.) London/New York 1987; pp. 117-125.
- (39) Juárez-Mosqueda M. L. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de doctorado, 2000.
- (40) Alberts B. Johnson A. Lewis J. Raff M. Roberts K. and Water P. *The molecular biology of the cell.* 2002; 4th edition, Gerland sciences.

- (41) Nogales E., Wolf S. G., and Downing K. H. Structure of $\alpha\beta$ tubulina dimer by electron crystallography. *Nature*. 1998; 391: 199-203.
- (42) Howes E. A. Hurst S. M. and Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J. Androl*. 2001; 22: 62-72.
- (43) Malhotra S. K. and Shnitka. The cytoskeleton-microtubules and microfilaments. Chapter 2, structural biology. *Fundamentals of medical cell biology*. University of Wisconsin, Madison. JAI PRESS INC. 1991; 2: 77-115.
- (44) Keates, R. A. B. Effects of glycerol on microtubule polymerization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1980; 97: 1163-1169.
- (45) Skoufías D. A. and Scholey J. M. Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Cu. Opin in cell biol*. 1993; 5: 95-105.
- (46) Mújica A, Navarro F. G. Hernández G. Juárez M. M. L. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilitation. *Microsc. Res. Tech*. 2003; 61: 76-87.
- (47) Bellvé A. R. Chandrika R. Martinova Y. S. Barth A. H. The Perinuclear matrix as structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol. Reprod*. 1992; 47: 451-456.
- (48) Sutoksky P. Manandhar G. Wu A. Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the Oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc. Res. Tech*. 2003; 61: 362-378.
- (49) Juárez M. M. L. Mújica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J. Struc. Biol*. 1999; 128: 225-236.
- (50) Breitbart H. Naor Z. Protein Kinase in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Rev. Reprod*. 1999; 4: 151-159.

- (51) Lecuyer C., Dacheux J. L. Hermand E. Mazeman E. Rosseaux-Prévost R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 1801-1810.
- (52) Castellani-Ceresa L. Brivio M. F. and Radaelli G. F-actin in acrosome-reaction boar spermatozoa *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 33: 99-107.
- (53) Moreno-Fierros L. Hernández E. O. Salgado Z. O. and Mújica A. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 33: 172-181.
- (54) Noiles E. E. Bailey J. L. and Storey B.T. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0° C. *Cryobiology.* 1995; 32: 220-238.
- (55) Storey B.T. Noiles E.E. and Thompson K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalosa, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 1998; 37: 46-58.
- (56) Stornelli M. C. Tittarelli C. M. Savignone C. A. Stornelli M. A. Cryopresevation Effects on Fertility. *Analecta Veterinaria* 2005; 25 (2): 28-35.
- (57) Maxwell Evans W. M. C. Evans G. Rhodes S. L. Hillard M. A. Bindon B. M. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low number of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993; 5: 57-63.36.
- (58) Gutiérrez-Pérez O. correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis de Maestría, 2006.
- (59) Fulton A. *In* Brammar, W. J. and Edidin, M. (Eds). *The cytoskeleton: Cellular Architecture and Choreography.* Pp. 1-72. Chapman and Hall, London. 1984.

- (60) Higashi S. and Miyazaki K. identification of amino acid residues of matrix metalloproteinase-2 essential for its selective inhibition by β -amyloid precursor protein-derived inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2008; 1-20.
- (61) Mohri H. Hasegawa S. and Masaky J. Seasonal changes in glycerol kinase activity of goat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1970; 2; 352-355.
- (62) Fiser P. S. Fairfull R. W. and Panich P. L. Glycerol equilibration time revisited. *Reprod. Dom. Ani.* 1996; 31:141-146.
- (63) Almlid T. and Johnson L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Animal Sci.* 1988: 2899-2905.
- (64) Arancibia-Salinas K. Trujillo-Ortega M. E. Hernández-González E. Montaldo-Valdenegro H. H. Juárez-Mosqueda M. L. Efecto del proceso de congelación-descongelación sobre la integridad bioquímica de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo. Tesis de Doctorado, 2005.