



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

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

**VALORACION *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE
DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO, CRIOPRESERVADO EN
DILUYENTES FORMULADOS CON TREHALOSA Y UNA BAJA
CONCENTRACIÓN DE GLICEROL**

T E S I S
**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA
OSCAR GUTIERREZ PEREZ**

**TUTOR:
María Elena Trujillo Ortega**

**COMITÉ TUTORAL:
María de Lourdes Juárez Mosqueda
Salvador Uribe Carvajal**

México, D. F.

2009



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.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IN206506.

El autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 162790.

DEDICATORIA

Hace años cuando mis familiares me cuestionaban sobre por que quería ser veterinario y que tal vez debería estudiar algo que dejara mas dinero, mi Madre solía responder “que sea lo que el quiera que para eso vino a este mundo a vivir con lo que le gusta hacer, además siendo veterinario aunque sea con gallinas le han de pagar, así que hambre no ha de pasar...”; por fortuna, desde que termine la carrera he sido afortunado y nadie ha tenido que pagarme “con gallinas” y en efecto hambre tampoco he tenido que pasar...

Pero de mi Madre no solo no solo recibí apoyo, también fue una imagen a seguir pues de ella aprendí el significado de la palabra determinación, pocas personas afrontan su pobreza con tantas ganas de superación y llegan a obtener las satisfacción de dejar este mundo mejor de cómo lo encontraron... así fue mamá

Al iniciar este proyecto tal vez ya no era necesario su apoyo verbal ni su consentimiento, aunque se que de haberlo sabido lo hubiese hecho suyo y fue en gran medida este convencimiento, el que me impulso a seguir adelante hasta terminar lo planeado y a respetar el compromiso que me había planteado, por eso deseo dedicar en primera instancia este trabajo a su memoria, pues como dicen por ahí: “es mas Madre quien te crío, que quien te parió”; así que mil gracias Yayita hasta donde te encuentres...

No puedo dejar de agradecer además a mi pareja el apoyo que siempre me ha demostrado, sobre todo por haber reforzado la idea de que en una relación un sueño debe ser compartido y tu soportaste cada uno de mis tropiezos, perdón por las horas robadas, por las ausencias involuntarias y hasta por los gastos imprevistos... otra vez como todos los días gracias por estar aquí, mi amor y mi cómplice...

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos y maestros: **María Elena Trujillo**, gracias por tu ejemplo de serenidad y paciencia, por tus consejos, pero sobre todo gracias por tu amistad y por creer en mí. A **Lourdes Juárez**, gracias por enseñarme que las metas solo se alcanzan con esfuerzo, sin tu apoyo, orientación y comentarios no habría logrado llegar hasta aquí, gracias también por tu amistad y confianza. A **Salvador Uribe**, de quien aprendí que la ciencia no puede separarse de la vivencia y eso debe reflejarse en nuestro trabajo, gracias por tus puntuales observaciones que siempre van acompañadas de una buena reflexión.

A mis revisores por sus enriquecedoras observaciones: **Miguel Angel Cornejo**, gracias por tu apoyo en mi candidatura (fue un gran alivio); **Santiago Anzaldúa**, por tu confianza y amistad, tu buena vibra es contagiosa; **Alfredo Medrano**, por tu objetiva evaluación a este trabajo y por todos los conocimientos transmitidos sobre el apasionante mundo de la criobiología; **Rosi Viguera**, no existen palabras para demostrarte mi agradecimiento, una gran fortuna contar con tu amistad y también gracias por despertar mi conciencia crítica como investigador.

A Chepina, por tu amistad, pero sobre todo por compartir conmigo tus amplios conocimientos, gracias por iniciarme en el apasionante mundo del ovocito.

A Jorge por darme carta blanca y el permiso para hacer del laboratorio de morfología mi otra casa por más de tres 3 años. Gracias a Pancho por ayudarme al montaje de las técnicas histológicas. A la unidad de microscopía electrónica, gracias Joel por el procesado de las muestras y a Carlos Cedillo por su confianza.

A Marianita por tu entusiasmo contagioso y tu ayuda incondicional; a Marco Arenas por toda la talacha realizada en la etapa más dura de congelación, a Yazmin Elizabeth, mil gracias amiga por estar ahí, se que siempre puedo contar contigo, a Manuel hasta paso de

ovejas mi agradecimiento amigo, a Lupita por su apoyo y su cariño, mi agradecimiento hasta Nayarit; a Beto por el apoyo para conseguir los ovarios...gracias a todos una vez mas.

A Ferchu, por que no tengo palabras par describir lo que significas para mí. A Giorgio por ser el sobrino ideal. A Bequina la inteligente de la familia. A Santi por tus sonrisas cotidianas. A Julio Cesar, el pequeño torbellino, gracias a todos por su cariño. A Rosita y a Miriam Pérez, gracias por sus palabras de aliento. A Fernando Rodríguez y a Jorge Caballero, por su amistad.

INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE	6
Lista de Tablas	8
Lista de Figuras	9
Declaratoria del autor	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. Introducción	15
2. Antecedentes	17
2.1 Potencial del semen congelado	17
2.2 Teoría del daño celular por congelación	18
2.3 Alteraciones en diferentes estructuras espermáticas inducidas por la congelación	24
2.4 Diluyentes para congelación	26
2.5 Toxicidad del glicerol	27
2.6 La trehalosa	29
2.7 Las pruebas dinámico-fisiológicas de evaluación espermática como herramientas para la predicción de la fertilidad del semen descongelado	37
2.8 Hipótesis	39
2.9 Objetivos específicos	39
2.10 Objetivos de proceso	39
3. Material y Método	40
3.1 Métodos generales de colección del eyaculado y congelación de la muestra	41
3.1.1 Colección de semen y contrastación seminal	41
3.1.2 Método de congelación	42
3.2 Formulación y selección de diluyentes	43

3.2.1 Determinación de la concentración molar de trehalosa	43
3.2.2 Efecto de la concentración del glicerol	44
3.2.3 Efecto de la adición de Cloruro de Potasio (KCL)	46
3.2.4 Monitoreo de la curva de enfriamiento y temperatura optima de descongelación	48
3.3 Valoración de la integridad celular	48
3.3.1 Motilidad progresiva por microscopio óptico	48
3.3.2 Tipo de movimiento (vigor o rango cinético) y porcentaje de viabilidad espermática por tinción vital eosina-nigrosina.....	49
3.3.3 Prueba de integridad acrosomal por tinción con el azul brillante de Coomassie (BBC)	50
3.3.4 Comprobación de integridad membranal por microscopia electrónica de transmisión	50
3.4 Estimación del potencial fertilizante por pruebas dinámicas de respuesta fisiológica	51
3.4.1 Prueba corta de termoresistencia (sTMT)	52
3.4.2 Prueba dual de resistencia hiposmotica/ azul brillante de Coomassie (HOST/CBB)	52
3.5 Comprobación y comparación <i>in vitro</i> de la capacidad fertilizante de espermatozoides descongelados, por pruebas de penetración homologa	54
3.5.1 Maduración de ovocitos	54
3.5.2 Verificación de la madurez por microscopiaelectrónica de transmisión (presencia de gránulos corticales periféricos)	55
3.5.3 Enriquecimiento de espermatozoides motiles.....	56
3.5.4 Prueba de penetración homologa <i>in vitro</i>	57
3.6 Análisis estadístico.....	57
4. Resultados	60
4.1 De la formulación de los diluyentes.....	60
4.1.1 Determinación de la concentraciónde trehalosa.....	60

4.1.2 Efecto de la concentración de glicerol	61
4.1.3 Valoración de los efectos de la adición de KCl sobre los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática.....	62
4.1.4 Evaluación de las curvas de temperatura	62
4.1.5 Efecto de la temperatura de descongelación	63
4.2 Valoración de la integridad celular ofrecida por los diluyentes seleccionados	64
4.2.1 Efecto de la adición de trehalosa sobre la motilidad.....	64
4.2.2 Valoración de la motilidad del espermatozoide al descongelado ...	64
4.2.3 Valoración de los porcentajes de viabilidad espermática	66
4.2.4 Valoración de la integridad acrosomal.....	67
4.2.5 Integridad ultraestructural	68
4.3 Estimación del potencial fertilizante por pruebas dinámicas de respuesta fisiológica.....	68
4.3.1 Resultados de la prueba de termoresistencia (sTMT).....	68
4.3.2 Resultados de la prueba HOST/BBC	70
4.3.3 Resultados de filtración.....	70
4.3.4 Porcentajes de penetración homologa <i>in vitro</i> (hIVP)	71
5. Discusión	73
6. Referencias.....	86

Lista de Tablas

Tabla 1 Concentrado del efectos de la inclusión de trehalosa en diluyentes para congelación de semen de diferentes especies	33
Tabla 2 Formulación de diluyentes para determinación de concentración de trehalosa en base a motilidad espermática (Fase 1)	44
Tabla 3 Formulación para valorar el efecto de concentraciones de glicerol	45
Tabla 4 Efecto de la concentración de glicerol	61
Tabla 5 Medias del porcentaje de motilidad en los 16 eyaculados, obtenidas por macho y por tratamiento al descongelado	65
Tabla 6 Número de espermatozoides viables por macho y por tratamiento después del proceso de descongelación (tinción eosina-nigrosina)	67
Tabla 7 Número promedio de espermatozoides con acrosomas íntegros por macho y por tratamiento	67
Tabla 8 Diferencias entre porcentajes de motilidad, tipo de movimiento e integridad acrosomal de espermatozoides G4 y T1 descongelados, obtenidos por la prueba de termoresistencia	69
Tabla 9 Concentrado de resultados estadísticos de los diferentes parámetros analizados entre diluyentes	71

Lista de Figuras

Figura 1 Cambios producidos por la congelación en la membrana plasmática.....	21
Figura 2 Propuesta para el mecanismo de protección de la trehalosa	30
Figura 3 Imágenes de espermatozoides de cerdo descongelados evaluados con triple tinción	46
Figura 4 Interpretación de la prueba HOST/BBC.....	54
Figura 5 Imágenes de la metodología aplicada para la prueba de penetración homologa <i>in vitro</i> (hIVP)	59
Figura 6 Efecto de la concentración mM de trehalosa sobre el porcentaje de motilidad espermática	60
Figura 7 Efecto de la adición de KCl sobre porcentajes de motilidad espermática	62
Figura 8 Curvas de enfriamiento obtenidas con Los diferentes diluyentes.....	63
Figura 9 Efecto de diferentes temperaturas de descongelación sobre los porcentajes de motilidad espermática.....	64
Figura 10 Detección de trehalosa por tinción azul alciano y MET	66
Figura 11 Microscopias electrónicas de cortes de cabeza de espermatozoides descongelados de cerdo.....	69
Figura 12 Imágenes de ovocitos de cerda en MIV y hIVP	72

Declaratoria del autor

El autor da consentimiento al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliográfico que estime conveniente.

M.V. Z. Oscar Gutiérrez Pérez

RESUMEN

Por su capacidad para estabilizar proteínas y membranas biológicas, la trehalosa es un disacárido que ha sido utilizado para disminuir el daño ocasionado por la congelación sobre la integridad espermática de diferentes especies. En el caso del cerdo, la inclusión de trehalosa en diluyentes para la congelación de semen, no ha sido reportada. Por otra parte, el glicerol es el crioprotector más utilizado, pero muestra un efecto citotóxico, por lo cual en el caso del cerdo se recomienda su inclusión en concentraciones que no exceden el 4%. Por lo anterior el presente trabajo valoró la capacidad fertilizante de semen porcino criopreservado en un diluyente adicionado con trehalosa 250 mM y una concentración del 1% de glicerol (T1) en comparación con un diluyente convencional con el 4% de glicerol y libre de trehalosa (G4). El estudio se realizó en cuatro etapas progresivas: 1) Formulación y selección de los diluyentes en base a los efectos de la concentración molar de trehalosa y concentración de glicerol sobre viabilidad, motilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides al descongelado; 2) Valoración de la integridad celular ofrecida por los medios de congelación comparados, sobre porcentajes de motilidad y vigor espermático, viabilidad por prueba eosina-nigrosina (EN) e integridad acrosomal por tinción azul brillante de Coomassie (BBC) y comprobada mediante microscopia electrónica de transmisión (MET); 3) Estimación del potencial fertilizante por medio del test corto de termóresistencia (sTMT) y la prueba dual de respuesta hipo osmótica/integridad acrosomal (HOST/BBC); 4) Comprobación de la capacidad fertilizante por prueba de penetración homóloga *in vitro* (hIVP). Los resultados mostraron que la inclusión de 250 mM de trehalosa y una disminución en el porcentaje de glicerol hasta el 1%, favorecen la integridad acrosomal ($p < 0.05$), sin pérdida de viabilidad espermática ($p < 0.05$), aunque con una ligera disminución no significativa en los porcentajes de motilidad ($p > 0.05$). Sometidos a sTMT, los espermatozoides criopreservados en T1 presentaron mejor tipo de movimiento ($p < 0.005$) y mayor integridad acrosomal ($p = 0.005$) en comparación con los G4. La prueba dual HOST/BBC mostró un mayor número de espermatozoides vivos con acrosoma integro en T1 que en G4 ($p < 0.05$). El número de espermatozoides por ovocito en las pruebas de penetración fue ligeramente mayor en T1, pero sin diferencia significativa ($p > 0.05$). Los espermatozoides T1 alcanzaron rangos intermedios de penetración (56.8%), pero sin diferencia con los G4. Los mejores resultados en las pruebas sTMT y HOST/BBC en

los espermatozoides T1 sugieren que probablemente, estos contarán con una mayor resistencia y un mayor tiempo de vida fértil en el tracto reproductivo de la cerda a la inseminación, que los criopreservados en G4. El medio T1 demostró ser una opción para la aplicación de técnicas de reproducción asistida e investigación como la fertilización *in vitro* (IVF) y la inyección intracitoplasmática (ICSI). Se sugiere continuar con la investigación valorando si la integridad acrosomal obtenida en este trabajo con la inclusión de trehalosa, tiene algún efecto positivo en la técnica de sexado de semen, explorar la capacidad crioprotectora de la trehalosa aplicada de manera intracitoplasmática en el espermatozoide y las posibilidades de la aplicación de la trehalosa como crioprotector en la liofilización de espermatozoides porcinos.

Palabras clave: trehalosa, glicerol, diluyente, congelación de semen, espermatozoide porcino, pruebas de penetración.

ABSTRACT

The disaccharide trehalose stabilizes proteins and biologic membranes during cryopreservation and has been used to diminish injury caused by freezing on spermatozoon of several species. In boar semen the trehalose supplementation to freezing extenders, it has not been reported. On the other hand, the use of glycerol due to toxicity has been recommended a concentration below 4% glycerol for boar semen cryopreservation. The aim to this work was to evaluate the cryoprotective effect on sperm fertility of 1% glycerol/ 250 mM extender *versus* 4% glycerol and trehalose free extender (G4). The study carries out in four progressive stages: 1) formulation and selection of extenders based on effects of trehalose and glycerol concentration on viability, motility and acrosomal integrity of frozen-thawed boar semen; 2) valuation of the cellular integrity offered by the compared extenders on motility percent and individual motility type (vigor), viability by eosin-nigrosin dye (IN) and acrosomal integrity by Coomassie brilliant blue dye (BBC) and proven by transmission electronic microscopy (TEM); 3) Estimate the potential fertility by short thermal stress test (sTMT) and by hyposmotic swelling/ acrosomal integrity test (HOST/BBC); 4) Evaluation of penetration capacity by homologous *in vitro* penetration assay (hIVP). Dyes test and transmission electronic microscopy (TEM) valuation showed that the T1 extender favors acrosomal integrity ($p < 0.05$), without lost of spermatic viability, although with a slight non significant decrease in the percentages of motility ($p > 0.05$). In sTMT assay, T1 spermatozoa showed better motility type ($p < 0.005$) and high acrosomal integrity ($p = 0.005$) that G4 spermatozoa. The dual test HOST/BBC showed a bigger number of alive sperms with acrosomal integrity in T1 that in G4 ($p < 0.05$). No founded differences between T1 and G4 sperm number by oocyte in hIVP tests or ranges of penetration (both showed medium ranges). The best results from T1 sperm in the sTMT and HOST/BBC assays suggest a possible increased resistance and time of fertile life in reproductive tract of sow after insemination those G4 spermatozoa. T1 extender showed to be an option for research and the applied reproduction techniques like *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmatic injection (ICSI). We suggested exploring the possibilities of the application of the trehalose in freeze dried storage of boar semen and/or the capacity to increase their cryoprotection applied trehalose intracytoplasmatic way.

Keywords: trehalose, glycerol, freezing extender, frozen-thawed boar spermatozoa, homologous *in vitro* penetration assay.

1. INTRODUCCION

La criopreservación es una biotecnología que permite el almacenamiento del semen de las especies domésticas por tiempo prolongado e inició cuando los investigadores británicos C. Polge, A. Smith y A. Parkes descubrieron por *serendipia*, los efectos crioprotectores del glicerol en 1949 [Polge *et al.*, 1949]. Esta tecnología se ha visto limitada en el caso del semen porcino, ya que si bien es cierto que éste se caracteriza por ser producido en mayor volumen que el de otras especies domésticas, los espermatozoides son más sensibles al enfriamiento posterior a la recolección; siendo esta marcada termosensibilidad en el semen de esta especie lo que ha restringido el desarrollo de esta tecnología, por lo que buscando optimizar la técnica se han desarrollado diversos protocolos para la congelación que combinan distintos diluyentes, crioprotectores, tasas de enfriamiento y condiciones de procesado para la congelación y descongelación [Watson, 1995; Royere, 1996; Johnson, 2000; Holt, 2000a ,2000b; Curry, 2000; Batellier *et al.*, 2001; Stornelli *et al.*, 2005], en la actualidad se acepta su gran potencial de aplicación [Bailey *et al.*, 2008].

Para poder diseñar protocolos que minimicen el deterioro celular inducido por la criopreservación, es necesario conocer la mecánica que produce el daño celular, así como el nivel al que el espermatozoide se ve afectado: Durante la congelación el espermatozoide sufre cambios osmóticos, deshidratación y formación de hielo, procesos a los que se ve expuesto nuevamente durante el descongelado con el ascenso de temperatura. La concentración del crioprotector, la velocidad de enfriamiento y la temperatura de descongelación utilizada, contribuyen a incrementar el estrés al que el espermatozoide es sometido, lo que se refleja en alteraciones morfológicas evidentes en membrana plasmática, acrosoma, mitocondrias, citoesqueleto y núcleo espermático [Watson, 1995; Medrano *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2003; Storey *et al.*, 1998; Petrunkina *et al.*, 2004, 2005], por lo que valorar el nivel de impacto de estas alteraciones sobre la funcionalidad del espermatozoide, requiere de pruebas dinámico-fisiológicas que revelen el verdadero grado de daño sufrido [Petrunkina *et al.*, 2007].

Para minimizar el daño por congelación, se han propuesto modificaciones a los diferentes protocolos de criopreservación como son promover adecuaciones en la velocidad

de enfriamiento y temperatura de descongelación, así como en la mejora de los diluyentes de congelación, donde se han encontrado los avances mas efectivos [Flores, 2005]. En general los diluyentes para congelación de semen porcino se basan en la inclusión de yema de huevo, que se combina con otros agentes como azúcares, amortiguadores, aditivos y crioprotectores permeables, que son los elementos que dan capacidad a los espermatozoides de manejar convenientemente los cambios osmóticos asociados a las interacciones agua-soluto generadas en el proceso de congelación-descongelación [Hammerstetd *et al.*, 1992; Watson, 1995, 2000; Holt, 2000].

Entre los crioprotectores no permeables la trehalosa ha demostrado ser efectiva en una gran diversidad de líneas celulares, ya que posee la capacidad de interactuar con lípidos y proteínas incrementando la estabilidad celular [Singer y Linqvist, 1998; Chen *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2004]. La inclusión de este disacárido en las fórmulas de los diluyentes para congelación de semen en diversas especies ha favorecido la viabilidad, la motilidad e integridad espermática al descongelado [Storey *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2001; Sztein *et al.*, 2001; Aboagla *et al.*, 2004; Aisen *et al.*, 2005; Bucack *et al.*, 2007; Berlinguer *et al.*, 2007; Yamashiro *et al.*, 2007; Dalimata y Graham, 2008; Hu *et al.*, 2009].

Al inicio de esta investigación no existían reportes de la utilización de trehalosa en medios de congelación para semen de cerdo, por lo que el objetivo de la misma fue valorar el efecto crioprotector de la inclusión de trehalosa en medios de congelación para semen de esta especie, esperando mejorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides con base al mantenimiento de buenos porcentajes de motilidad, integridad y viabilidad al descongelado, los que se reflejarían en los resultados obtenidos en pruebas dinámico-fisiológicas de estimación *in vitro* de la fertilidad, favoreciendo, por lo tanto los índices de penetración homologa obtenidos, en comparación con los parámetros presentados por espermatozoides de cerdo criopreservados en un medio convencional con el 4% de glicerol y libre de trehalosa.

2 ANTECEDENTES

2.1 Potencial del semen congelado

En la actualidad tan solo el 1% del total de las inseminaciones realizadas en el mundo en la especie porcina se efectúa con semen descongelado, sin embargo son varias las características que convierten a la congelación de semen de cerdo en una biotecnología con potencial de aplicación [Cerolini *et al.*, 2001]. La congelación favorece en gran medida la distribución de las características deseables para una rápida mejora genética, ya que el semen congelado es fácilmente transportable a través de largas distancias, sin importar que las hembras estén o no en estro al momento de la recepción. Por otra parte permite el uso de dicho material genético aun después de que el macho donador haya muerto, se encuentre enfermo o deba ser desechado del hato reproductor [Bailey *et al.*, 2008].

El semen congelado también puede apoyar en el control y prevención de la transmisión de enfermedades, ya que permite el monitoreo adecuado del semen antes de su ingreso al hato reproductor, descartando oportunamente la presencia de patógenos transmisibles, como por ejemplo los circovirus porcinos tipo 2 (PCV2) [Mc Intosh *et al.*, 2006] o el virus del síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRS) [Yanger *et al.*, 1993], ya que la ausencia de signos clínicos, la viremia y el estatus serológico de estas enfermedades en sementales, no son indicadores adecuados para descartar la presencia de estos virus en el semen [Christopher *et al.*, 1995]. La detección de patógenos seminales demanda de pruebas diagnósticas que requieren de cierto tiempo, por lo que es aconsejable que los eyaculados permanezcan almacenados en espera de los resultados antes de su aplicación [Guerin *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2008]. Esto brinda por lo tanto la oportunidad de asegurar una bioseguridad global, de hecho para el mercado internacional existen condicionantes que obligan al exportador de semen a mantener almacenadas en nitrógeno líquido y en recipientes esterilizados muestras de los eyaculados comercializados por un mínimo de 28 días [WAHO, 2006].

El desarrollo de mejores protocolos de criopreservación favorecerían también la utilización a escala comercial de semen de cerdo sexado por citometría de flujo, lo que a su vez facilitaría la implementación de nuevos esquemas de cruzamiento que tendría gran impacto en las estrategias de mercado y en la eficiencia reproductiva [Bathgate *et al.*, 2008; Roth y Johnson, 2008].

Por otra parte, la creación de bancos de semen congelado con normas altas de bioseguridad podría mantener una reserva genética que minimizará los efectos del brote repentino de alguna enfermedad infectocontagiosa o de algún desastre natural [Purdy *et al.*, 2008]. Estos mismos bancos pueden funcionar como almacenes de adaptabilidad genética que permitan hacer frente al riesgo latente de demandas alimenticias inesperadas surgidas de cambios medioambientales, avances en el conocimiento de los requerimientos nutricionales humanos, fluctuaciones del mercado o presiones derivadas de la demanda social. De hecho la conservación de la variación génica (variantes alélicas), es particularmente importante para mantener tanto la biodiversidad de las poblaciones de cerdos autóctonas altamente adaptadas a su territorio de procedencia, como para tener un centro de acopio de donde seleccionar las características que los productores soliciten para producir animales mas uniformes con base a las demandas mercantiles [Bailey *et al.*, 2008].

2.2 Teoría del daño celular por congelación

Para entender la problemática asociada a la congelación de las células espermáticas debe partirse de la teoría más aceptada sobre los causantes del daño celular por congelación. Esta teoría se basa en los cambios físicos que afectan la estabilidad celular y estos cambios son el sobreenfriamiento, la transición de fases, la formación de hielo, la liberación de calor latente y el daño por concentración de solutos [Flores, 2005].

El **sobreenfriamiento** ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0°C y el agua extracelular se congela, mientras que la intracelular no lo hace al mismo tiempo, ya que la membrana funciona como una barrera que impide que el cristal extracelular continúe creciendo hacia el interior de manera continua, de ahí que se recomienden tasas de enfriado lentas que permitan al agua salir de la célula y congelarse dentro y fuera de ella [Watson, 1995].

La **transición de fases** es el cambio que sufren los lípidos de la membrana plasmática, que se encargan de mantener su impermeabilidad, y que favorecen que en un estado fisiológico normal, la membrana se encuentre en un estado laminar liquido cristalino, y que al congelarse la fluidez de la membrana disminuya y se vuelva rígida y poco elástica al adoptar un estado de gel [Holt, 2000; Chen, 2002; Patist *et al.*, 2005].

La **formación de hielo** intracelular es otra consecuencia del descenso en la temperatura que puede evitarse disminuyendo la velocidad de congelación, es decir, debe ser lo

suficientemente lenta para que permita la salida de agua al exterior y lo suficientemente rápida para evitar que se forme hielo en el interior; la curva de supervivencia espermática depende de una velocidad intermedia de congelación y que se puede graficar en forma de U invertida (campana de Gauss) [Holt, 2000].

Al producirse cambios de estado físico se libera el denominado “**calor latente**” de fusión, subiendo la temperatura desde el punto en que se forma el hielo hasta cerca del punto teórico de congelación de la solución y se mantiene así hasta que el calor se disipa, esto dependerá de la concentración de solutos del medio y el nivel de crioprotector incluido, para evitar daño celular éste calor latente debe ser disipado lo mas rápido y uniformemente posible [Palacios, 1994].

A su vez la formación de hielo provoca la deshidratación espermática lo que provoca que la **concentración intracelular de solutos** exceda su solubilidad, por lo cual estos se congelan y se precipitan, esto se conoce como punto **eutectico**, lo cual provoca cambios en la osmolaridad y encogimiento de la membrana [Watson, 1995]. Por otra parte la concentración de solutos en el medio de congelación extracelular favorece la concentración de espermatozoides cerca de las zonas donde estos solutos se precipitan, por lo cual en esas zonas se concentran el mayor número de espermatozoides lo que mediante estudios de criomicroscopía se ve como una serie de bandas densas con un gran número de células espermáticas adheridas [Medrano, 2002].

A últimas fechas **la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)** se ha considerado como fuente potencial de daño durante la criopreservación; por ejemplo la liberación de ROS a partir de cadena respiratoria en células somáticas en refrigeración (4°C) aumenta de un 2% a un 5%, aunque esto no está comprobado en el espermatozoide, esta podría ser una fuente de ROS en el caso de estas células. Las contaminaciones con leucocitos estimulan el incremento de ROS en semen congelado y por otra parte estudios realizados en carnero y toro han demostrado la activación de una oxidasa liberada al parecer de los espermatozoides muertos lo que se refleja en la disminución de viabilidad espermática [Kessopoulou *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 2000].

2.3 Alteraciones en diferentes estructuras espermáticas, inducidas por la criopreservación

La transición de fases termodependiente es inducida por el descenso y posterior reascenso de la temperatura durante la congelación-descongelación y afecta directamente la organización natural de la **membrana plasmática, la membrana acrosomal externa y la membrana mitocondrial**. La pérdida de asimetría en la bicapa lipídica se refleja en un desorden de la fluidez que provoca una expectativa de vida mucho más reducida para el espermatozoide [Nobles, 1997; Patist y Zoeb, 2005], al perder capacidad para manejar convenientemente los cambios osmóticos asociados a las interacciones agua-soluto, que se dan a través de la cristalización del hielo extracelular y que provoca la salida del agua y la entrada de iones, lo cual ocasiona cambios osmóticos que al no ser regulados adecuadamente pueden dañar a su vez otras estructuras [Locksley *et al.*, 1988; Watson, 1995; Holt, 2000; ; Córdova *et al.*, 2002; Medrano *et al.*, 2002]. Por su parte la deshidratación sufrida por la membrana altera su permeabilidad y estabilidad promoviendo fracturas y rupturas en la misma, lo que al parecer provoca un estado en el que coexisten regiones planares y curvadas entre la bicapa lipídica de la membrana osmóticamente colapsada debidas a las alteraciones sufridas por las interacciones entre las cargas de los grupos polares [Biondi *et al.*, 1992]. Otro suceso es un marcado decremento en el contenido de colesterol y de ácidos grasos poliinsaturados, esto último se puede asociar a una contaminación a partir del medio de dilución o a una peroxidación inducida por ROS [Cerolini *et al.*, 2001].

Estas alteraciones se verán reflejadas en fusión entre bicapas, goteo de contenido al medio, fases de separación lateral por medio de la cual los fosfolípidos simples forman mezclas complejas y pérdida de conformación que se da cuando hay una translocación de fosfolípidos que generalmente se encuentran en la región citosólica de la membrana plasmática hacia el exterior como es el caso de la fosfatidil etanolamina y la fosfatidilserina (Figura 1), todo esto es agravado por la termodependencia de algunas enzimas que se activan durante los cambios de temperatura participando en la pérdida de la asimetría de la membrana [Watson, 1995] .

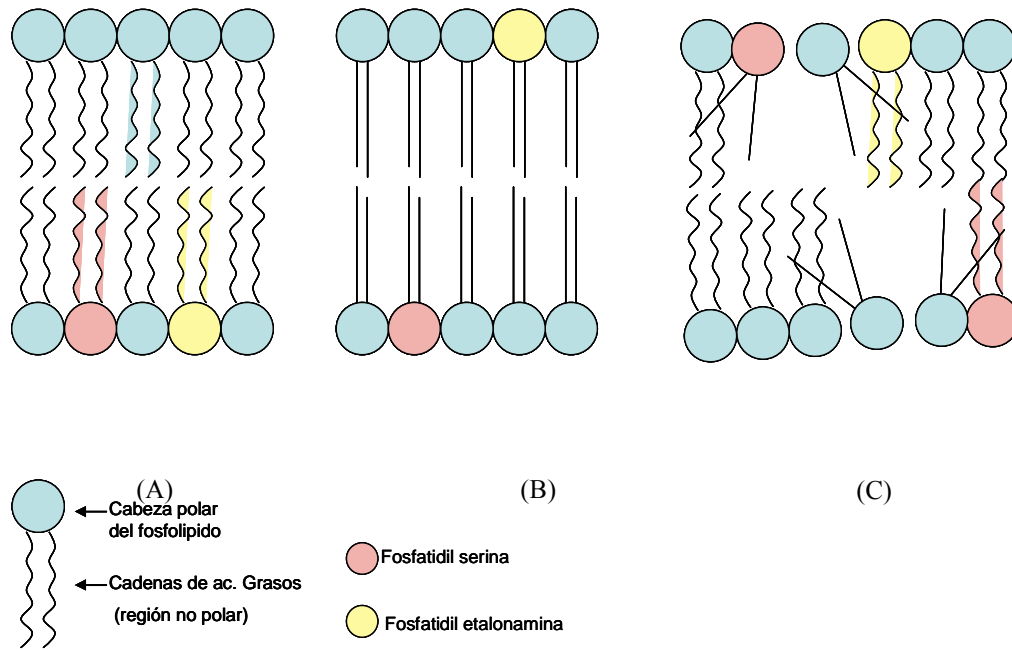


Figura 1 Cambios producidos por la congelación en la membrana plasmática.

- (A) bicapa lipídica fisiológicamente normal (fase líquida)
- (B) la bicapa en estado de gel antes de la deshidratación
- (C) pérdida de integridad tras la deshidratación.

(Gutiérrez-Pérez, 2009).

Al microscopio electrónico de transmisión (MET), las alteraciones en las membranas provocadas por la congelación-descongelación han sido descritas en espermatozoides de múltiples especies [Healey, 1969; Okada *et al* 2001; Silva *et al.*, 2001; Nizanski and Kuroпка, 2005; Aisen *et al.*, 2005; Sa-Ardrit *et al.*, 2006], en general pueden observarse como: distensión y abombamiento de la membrana plasmática del área de la cabeza, descrita también como distensión de la membrana plasmática e hinchazón de la membrana acrosomal; ondulamiento de la membrana acrosomal externa; vesiculación de la membrana acrosomal externa con o sin pérdida del contenido acrosomal; distensión de la membrana plasmática de la región de la pieza media del flagelo y anomalías en la vaina mitocondrial

Utilizando el microscopio electrónico de barrido (MES), también ha sido posible constatar los cambios ultraestructurales ocurridos en las membranas a través de especímenes tratados por criofractura, de tal manera que en espermatozoides frescos (37°C) procesados por dicha técnica, es posible apreciar en la región de la cabeza una distribución aleatoria de diversas partículas mientras que en la pieza media del flagelo, estas partículas se hallan homogéneamente dispersas u organizadas en bandas circunferenciales. Por su

parte la pieza principal demuestra una distribución de partículas también homogénea. Al exponer a los espermatozoides a temperatura de 0°C se observan cambios en la agregación de partículas intramembranas en la región de la cabeza, que ahora adoptan una apariencia de racimos tanto en la región acrosomal como en la postacrosomal. En el flagelo la acción del descenso de temperatura provoca áreas circulares libres de partículas de apariencia plana en la región de la pieza principal. Por último al descongelado (recalentamiento hasta 38°C) los racimos de partículas en cabeza y las zonas claras y aplanadas desaparecen. La apariencia general de las partículas es de nueva cuenta uniforme. Estos cambios han sido interpretados como una redistribución lateral de las partículas intramembranas de las regiones de la cabeza y la pieza principal del flagelo, esta separación lateral se asocia a la transición de fases, sufrida por la membrana [Leeuw *et al.*, 1990]. Este daño está estrechamente influenciado por la interacción entre la curva de velocidad en el proceso de congelado y la concentración de glicerol. De acuerdo con Fiser *et al.*, [1993], la optimización simultánea de estas dos variables deberá reflejarse en la motilidad y en la integridad acrosomal [Fiser y Fairfull, 1990; Fiser *et al.*, 1993]; estos investigadores proponen para el espermatozoide del cerdo una velocidad de enfriamiento de 30°C por min., una concentración de glicerol del 3% y una velocidad de descongelado de 1200°C por minuto.

Por otra parte, si bien la termosensibilidad del espermatozoide de cerdo ha sido relacionada con la composición lipídica de su membrana [Cerolini *et al.*, 2001], **el daño acrosomal** parece ser independiente del mismo [Watson, 1995] lo cual se relaciona con el fenómeno de criocapacitación que incrementa la proporción de espermatozoides que sufren una falsa capacitación o capacitación inducida [Bailey *et al.*, 2000; Curry, 2000; Green, 2001; Cerolini, 2001; Petrunkina *et al.*, 2005)]. Aunque su mecanismo no se ha descrito completamente se especula existen diferencias entre esta criocapacitación y la capacitación fisiológica que se da en el tracto reproductor de la hembra. En la capacitación fisiológica las modificaciones membranales inducidas por las secreciones del istmo de la tuba uterina, estimulan la fosforilación por tirosina de las proteínas espermáticas mediante la acción de una adenil ciclasa que aumenta la concentración de calcio intracelular, lo que favorece la continuación del desencadenamiento de nuevas cascadas de fosforilación; al parecer esto no ocurre de la misma manera en espermatozoides descongelados ya que la aparición de proteínas fosforiladas se da inmediatamente después del descongelado mientras que en

espermatozoides frescos el proceso para que se detecten estas proteínas por lo menos dura cuatro horas [Bailey *et al.*, 2000].

Aunque el daño membranal es evidente otros grupos de investigación proponen que la incapacidad del espermatozoide para manejar los cambios osmóticos es el resultado principal del daño que sufre **el citoesqueleto** [Martinez *et al.*, 2006, Arancibia-Salinas *et al.*, 2007], que es responsable de mantener el volumen celular espermático y que se altera al fallar la regulación de los anclajes citoesqueléticos en la membrana que participan en la modulación del intercambio hídrico y que evitan el daño a estructuras internas por cambios hipertónicos, de hecho se ha reportado que las proteínas del citoesqueleto que soportan las membranas plasmáticas y acrosomal presentan una despolimerización y repolimerización dependientes de temperatura, lo cual se refleja en los rápidos cambios de volumen que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación [Watson, 1995; Storey *et al.*, 1998; Petrunkina *et al.*, 2004, 2005]. En estudios sobre espermatozoides de ratón se ha visto que el estrés osmótico, ocasionado por la congelación al afectar la permeabilidad de la membrana, altera la **energía de activación necesaria para la conductividad hidráulica** y ésta a su vez es dependiente de las interacciones membranales con el citoesqueleto, que se encarga de mantener los parámetros de conductividad hidráulica al permitir las adaptaciones de la célula a los cambios osmóticos [Noiles, 1997; Storey *et al.*, 1998].

La principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide es **la teca perinuclear**, que es un elemento que se encuentra entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y que tiene un papel importante en la espermiogénesis, ya que participa dando forma al núcleo, y se convierte en el soporte estructural que dará la forma definitiva a la cabeza, además de servir como punto de anclaje para el acrosoma. La teca perinuclear no solo protege al núcleo espermático al cual envuelve, si no que además tiene un papel importante en procesos relacionados con la fecundación, tales como la penetración de las envolturas del óvulo, participación en los procesos de fusión, la activación del ovocito y la descondensación del material genético tras la fertilización [Sutovsky *et al.*, 1997, 2000;

Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999; Mújica *et al.*, 2003]. Se ha demostrado que esta estructura también sufre alteraciones posteriores al descongelado [Martínez *et al.*, 2006; Arancibia-Salinas *et al.*, 2007] y que esto puede relacionarse tanto con una redistribución

de dominios de membrana [Orozco *et al.*, 2008], como con la pérdida del acrosoma [Barrientos-Morales *et al.*, 2009].

La regulación del volumen celular es crítica durante el proceso de criopreservación, ya que se forman gradientes osmóticos locales que atraviesan la membrana plasmática a través de canales iónicos, éstos canales se establecen para mantener un proceso de transferencia de osmolitos hacia dentro y hacia fuera de la célula, que trata de restablecer el equilibrio osmótico. Investigaciones en diferentes líneas celulares (células tumorales, ovocitos de *Xenopus l.*, leucocitos y espermatozoides porcinos) sugieren que el citoesqueleto juega un papel importante en el envío y traducción de las señales que controlan los cambios de volumen por lo cual un citoesqueleto íntegro es de vital importancia en la supervivencia celular tras la congelación [Storey *et al.*, 1998; Petrunkina *et al.*, 2004].

El axonema, por su parte parecía ser mas resistente a los efectos de la congelación, por lo que la disminución de la motilidad no se asociaba de manera directa al daño de sus elementos microtubulares [Courtens, 1989], sin embargo estudios posteriores *in vitro*, revelaron que el daño de las diferentes estructuras citoesqueléticas del flagelo más bien son reflejo de la despolimerización de tubulina que altera la relación de los microtúbulos y sus proteínas asociadas, afectando la respuesta celular a estímulos externos, ya que algunos elementos del citoesqueleto se propone participan en la activación de diversas cascadas de señalización que participan en la motilidad [Keates, 1980 ; Keates, 1984 ; Hammerstedt y Graham, 1992]. La falta de motilidad también se ha asociado al daño mitocondrial interno ya que después del descongelado el material interior de la mitocondria es menos electrodensito al análisis microscópico [Watson, 1995], estudios recientes demuestran que la funcionalidad mitocondrial se ve afectada por la congelación lo que se observa con las nuevas técnicas de valoración del potencial mitocondrial [Hu *et al.*, 2009].

El núcleo es otra estructura que en un principio parecía ofrecer una resistencia relativa a sufrir daño por el proceso de congelación-descongelación. Reyes *et al.*, [2001] estudiando el efecto de la criopreservación en núcleos espermáticos de bovino y carnero no encontraron alteraciones en cuanto mediciones morfométricas (área total, perímetro, largo o ancho de los núcleos), durante el proceso de congelado en el rango de los 5 °C a los -5°C, aunque por otro lado sí encontraron variación significativa en la hidrólisis del fluoróforo FDA, lo que interpretaron como una pérdida en la funcionalidad nuclear espermática y que

con cuerda con lo reportado por Royere *et al.*, [1988], Hamama *et al.*, [1990] y Córdova *et al.*, [2003], quienes en sus trabajos mencionan no haber encontrado daño en la estructura de la cromatina nuclear en el espermatozoide del cerdo, pero si un fenómeno de retraso en el proceso de descondensación que ellos llaman “sobrecondensación”. Este se traduce en la pérdida de sincronía en la formación de los pronúcleos tras la fertilización, lo que si bien no interfiere para que se sobrepase el estado de cigoto, se ha asociado con reabsorciones embrionarias [Córdova, 2002]. Por otro lado los porcentajes de daño al DNA no parecen acrecentarse de manera significativa como lo demuestran los resultados obtenidos por diferentes investigadores utilizando el ensayo cometa (análisis para una sola célula en electroforesis en gel) y pruebas fluorescentes para verificar el daño producido al DNA por la criopreservación, donde el daño porcentual se ve incrementado en un 2 a un 4 % con respecto al 2% de DNA con alteraciones presente en el semen fresco [Rybar R *et al.*, 2004; Fraser y Strzezek, 2005 y 2006]. Por otra parte se ha comprobado que el DNA es más accesible para el fluoróforo bromuro de etidio después del proceso de congelación descongelación y más sensitivo a la hidrólisis por HCl. De hecho, al efectuar crió secciones nucleares y analizarlas bajo rayos X de energía dispersante se ha visto una ligera separación entre el DNA y sus nucleoproteínas lo que podría ser resultado de modificaciones nocivas en el ambiente nuclear durante el descongelado [Courtens *et al.*, 1989]. También se consideraba que el DNA espermático del cerdo era más resistente al daño por congelación que el de otras especies por ejemplo el DNA espermático humano estudiado con naranja de acridina en citometría de flujo presenta mayor número de bandas simples, que el del cerdo que se nota mas estable [Royere *et al.*, 1988; Hamamah *et a.*, 1990]; Actualmente se ha comprobado utilizando una prueba modificada de ensayo cometa que si existe daño en la integridad al DNA del espermatozoide porcino [Fraser y Strzezek, 2004, 2005] y que el grado de alteración puede ser minimizado con la utilización de variaciones en el diseño del envase y la formulación del diluyente [Fraser y Strzezek 2007; Jiang *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008].

2.4 Diluyentes para Congelación

Ya se ha mencionado que para la protección de la célula espermática no solo se toman en cuenta los daños físicos que pueden provocar el congelado y el descongelado *per se*, sino que para ello se han propuesto diferentes protocolos de criopreservación que manejan diferentes tasas de enfriado y descongelado buscando modificar la dinámica de la formación de hielo y evitando el daño intracelular. Sin embargo los verdaderos crioprotectores se encuentran en el diluyente que es el que mantiene el pH, provee fuentes de energía y disminuye los daños producidos por el congelamiento y los cambios osmóticos [Watson, 1995; Medrano y Holt, 1998].

En general los diluyentes están compuestos por azúcares, proteínas y lipoproteínas, amortiguadores, aditivos y agentes crioprotectores y en base a sus constituyentes se pueden clasificar en diluyentes con amortiguadores o sin ellos. Entre los primeros se tiene el diseñado por Polge en 1970 a base de yema de huevo–glucosa; el de Wensterdof en 1975 a base de yema de huevo-lactosa; y el de Milanov en 1974 a base de yema de huevo-sacarosa-EDTA-sales de Mg^{2+} y Ca^{2+} . Entre los que contienen amortiguadores podemos mencionar los Betsville de Pursel y Johnson [Johnson, 2000].

De manera general un elemento compartido por la mayoría de los diluyentes para congelación es la inclusión de yema de huevo, la cual disminuye el choque por frío ya que contiene una lipoproteína de baja densidad a la cual se le atribuye este efecto [Watson, 2000; Holt, 2000b]. La yema de huevo se combina con otros agentes como azúcares, amortiguadores, aditivos y crioprotectores. De éstos el más utilizado es el glicerol que atraviesa la membrana plasmática y evita la formación de cristales de hielo a nivel intracelular.

A pesar de que los crioprotectores han sido seleccionados a partir de la crioprotección que brindan a las células durante el proceso de congelación, hoy en día se presentan dos puntos trascendentales a tomar en cuenta antes de su aplicación [Fahy, 1986]: 1) La toxicidad de los mismos limita las concentraciones en que de estos aditivos pueden aplicarse a los medios de dilución. 2) Esta toxicidad puede jugar un papel importante en la producción del criodaño celular.

De hecho se puede crear una analogía entre el daño por congelación y la toxicidad de los crioprotectores ya que a determinadas concentraciones los crioprotectores pueden provocar deshidratación, por hiperosmolaridad extracelular; caídas dramáticas en la inhibición de

catalasas y peroxidasas, liberando radicales libres que impliquen criodañó, choques osmóticos y pueden alterar la polaridad del ambiente celular lo que se traduce en daño membranal. Además los crioprotectores permeables pueden llegar a inducir fusión de membranas bajo ciertas condiciones. Todos los procesos anteriores se pueden ver potencializados por el proceso de congelación de ahí la importancia de su utilización en los niveles adecuados.

2.5 Toxicidad del glicerol

El glicerol es el crioprotector de primera elección desde que fue propuesto como tal por Polge *et al.*, en 1949, ya que penetra dentro de la célula espermática y evita la formación de cristales de hielo intracelular, y evita la concentración de electrolitos. Sin embargo, el grado de tolerancia varía con la especie, por ejemplo en los espermatozoides de gallo la adición de glicerol suprime su capacidad fertilizante, la cual se recupera mediante un proceso de descongelado que retira el glicerol de manera gradual [Hammerstedt y Graham, 1992]. La concentración del glicerol debe ser muy baja pues resulta tóxico para la célula ya que afecta la viscosidad citoplasmática y la síntesis y utilización del ATP [Hammerstedt y Graham, 1992; Watson, 1995; Storey *et al.*, 1998; Holt, 2000, Morris *et al.*, 2006].

Existen diferentes teorías que pretenden explicar la toxicidad del glicerol; una de ellas se refiere a la acción osmótica del mismo, ya que la introducción y remoción de crioprotectores permeables puede producir grandes cambios de volumen osmótico. Por otra parte también se ha comprobado una sensibilidad a los cambios de volumen especie específica, por ejemplo el espermatozoide de ratón es más sensible que el del humano a estos cambios [Noiles, 1997]. Un factor importante para que se den alteraciones graves por la introducción-remoción del glicerol, puede ser la utilización subóptima del mismo pero también se sabe que concentraciones mayores provocan variaciones de volumen en respuesta a los cambios osmóticos que dañan la célula. Por otra parte los cambios de volumen dramáticos pueden evitarse aplicando el glicerol en etapas [Katkov *et al.*, 1998].

Otra teoría sobre el efecto del glicerol se relaciona con su capacidad para ser metabolizado por los espermatozoides de carnero, toro, macho cabrío y verraco ya que el espermatozoide es incapaz de utilizar el glicerol como sustrato para una glicólisis por la vía clásica, aunque se ha comprobado en estas especies que se ve estimulado su consumo de

oxígeno [Johnson, 1985]. También se ha comprobado que los espermatozoides de rata, de humano y de verraco tienen la capacidad de oxidar al glicerol hasta CO_2 [Jones, 1992].

Como se mencionó anteriormente las vías metabólicas que el espermatozoide utiliza para su degradación difieren de los de otros tipos celulares, por ejemplo en los hepatocitos el glicerol es fosforilado por una cinasa que a su vez es activada por una deshidrogenasa NADP-dependiente. Este mecanismo en el espermatozoide es desconocido, de hecho la vía metabólica clásica en la que el glicerol-3-fosfato se oxida a fosfato-dihidroxiacetona requiere de una glicerol cinasa; esta enzima aunque presente en el espermatozoide de verraco, tiene una actividad muy baja. A pesar de ello el espermatozoide es capaz de utilizarlo como energético, lo cual compromete el balance entre síntesis de ATP y utilización del mismo. La célula espermática en congelación se encuentra con deficiencia de ATP, donde el control metabólico depende de iones para activar los procesos celulares, al parecer este mecanismo se encuentra comprometido y provoca la activación inapropiada de fosfolipasas produciendo daño celular irreversible [Jones, 1992].

En apoyo a esta teoría se ha detectado en el espermatozoide una concentración significativa de metilglioxal, que es producto de reacciones no-oxidativas que se llevan a cabo durante la glucólisis anaerobia a partir de glicerol. Este compuesto ha demostrado ser un agente citotóxico y genotóxico en casos de diabetes *mellitus* donde es proveniente de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados y también del catabolismo de los cuerpos cetónicos y de la treonina. Además, el metilglioxal funciona como precursor del diacilglicerol (DAG), un activador de la proteína cinasa C (PKC) [Riddle y Lorenz, 1973].

Por lo anterior se propone que el glicerol debe ser utilizado en concentraciones bajas que en la mayoría de las especies domésticas y de laboratorio está cercana al 1M aunque por otra parte existe una relación entre concentración y tiempo de exposición al glicerol; por ejemplo si se ponen en contacto los espermatozoides de ratón por menos de 5 minutos a concentraciones 0.8 M de glicerol se recupera un mayor número de espermatozoides viables [Katkov, 1998]. En el cerdo la recomendación para su inclusión van del 1 al 3%, del volumen final del diluyente, para evitar el incremento en los porcentajes de daño acrosomal [Johnson, 1985].

El tiempo de exposición y la temperatura son factores que pueden potenciar el efecto tóxico del glicerol para el espermatozoide del cerdo, de tal manera que la exposición a 5 y

10% de glicerol por 6 horas a 5°C o por 30 min a 20°C no reduce los rangos de fertilización *in vitro*, pero la combinación de 6 horas a 20°C si los afecta, esto es resultado de que la membrana a 5°C reduce la cantidad de glicerol que logra atravesarla [Wilmot *et al.*, 1973; Amlid y Johnson, 1988]; por otra parte la toxicidad por exposición tiene una relación inversa a la concentración de tal manera que la mayor protección se obtiene con periodos de contacto de 5 a 20 segundos para concentraciones de 8% de glicerol; de 30 segundos para concentraciones de 6% y de 5 a 10 minutos para concentraciones del 4% [Wilmot *et al.*, 1973].

2.6 La trehalosa

Algunos disacáridos como la sacarosa, la lactosa y más recientemente la trehalosa, han demostrado capacidad crioprotectora y actualmente son utilizados como excipientes para la liofilización y estabilizadores durante la rehidratación. En la naturaleza la trehalosa se produce de forma natural en diversos organismos como respuesta al estrés provocado por la deshidratación [Leslie *et al.*, 1995; Cerrui *et al.*, 2000], temperaturas extremas [Ramlov *et al.*, 1992; Tibbet *et al.*, 2002] y cambios osmóticos [Hounsa *et al.* 1998], por ejemplo algunos organismos anhidrobiotes, soportan la deshidratación extrema mediante la acumulación de elevadas concentraciones de disacáridos, de los cuales los mas importantes son la sacarosa y la trehalosa [Patist y Zoerb, 2005]. La trehalosa fue descrita por Wigger en 1832, como un azúcar desconocido presente en el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), que más tarde también fue aislada de capullos o pupas del escarabajo *Larinus mucalata*, estos capullos llevan el nombre común de “trehala”, de aquí que Bertelot la denominara trehalosa [Singer y Linqvist, 1998].

Este disacárido esta compuesto por dos unidades de D-glucopiranosas unidas en su carbono $\alpha 1$, lo que le confiere características fisicoquímicas y biológicas muy particulares como son dos puntos de fusión y alto grado de rotación molecular, que a su vez le brindan una estructura muy estable [Singer y Linqvist, 1998; Patist y Zoerb, 2005]. Existen tres teorías que pueden conjugarse para explicar el mecanismo por medio del cual la trehalosa es capaz de estabilizar a una gran diversidad de biomoléculas (Figura 2): a) indirectamente al reemplazar las moléculas de agua por puentes de hidrógeno [Rudolph y Crowe, 1985; Crowe *et al.*, 1987; Tsvetkva *et al.*, 1988; Sola y Meyer 1998; Alison *et al.*, 1999]; b) la formación de una capa que atrapa las moléculas de agua cercanas a la superficie

biomolecular [Chen *et al.*, 2000; Patist y Zoerb, 2005] y c) el mantenimiento de la estructura biomolecular al envolverla con una película de alta viscosidad que mantiene su conformación [Chen *et al.*, 2000, 2002; Sampedro 2004; Patist y Zoerb, 2005].

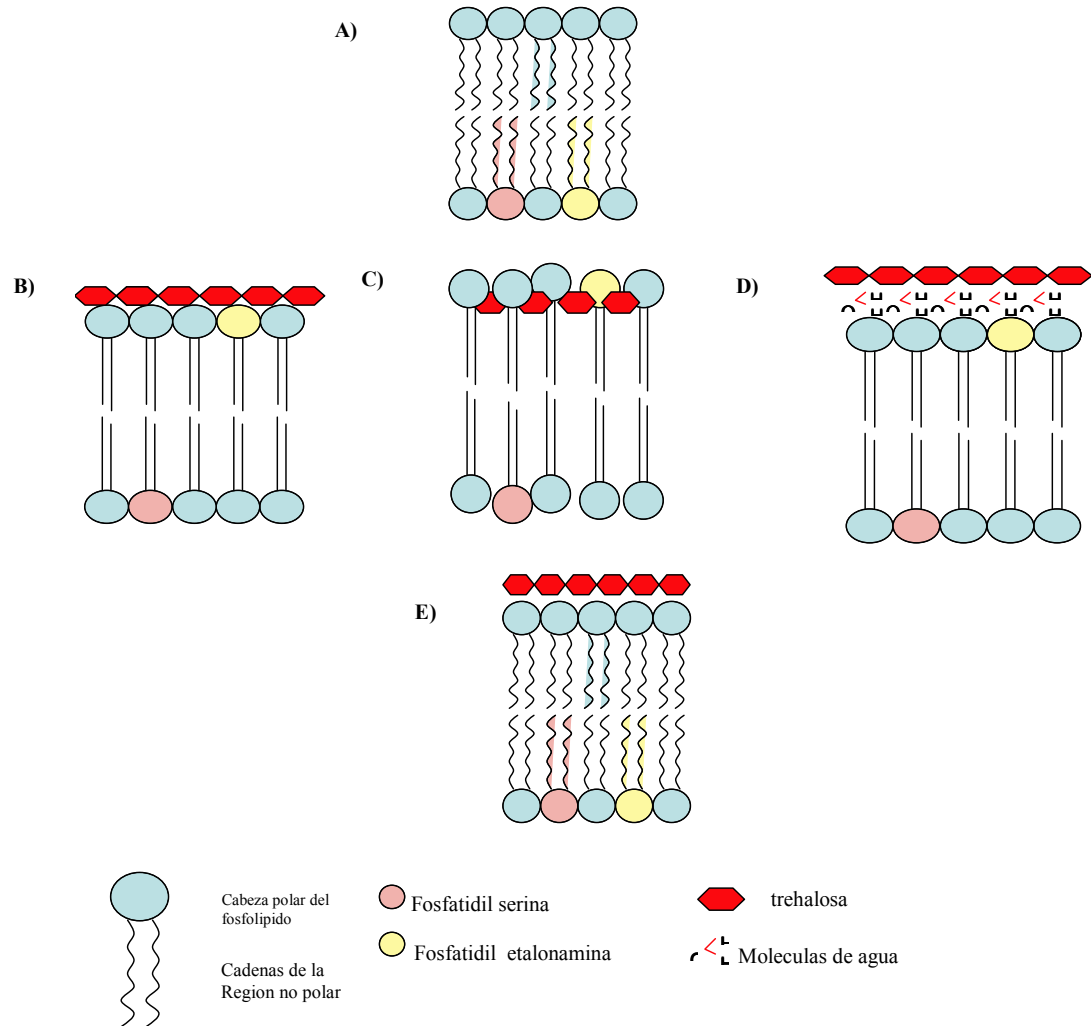


Figura 2 Propuestas para el mecanismo de protección de la trehalosa: A) Esquema de membrana antes de la congelación; B) Mantenimiento de la estructura biomolecular al envolverla con una película de alta viscosidad que mantiene su conformación; C) Protección indirecta al reemplazar las moléculas de agua por puentes de hidrógeno; D) Formación de una capa que atrapa las moléculas de agua cercanas a la superficie biomolecular; E) membrana que permanece intacta al descongelado (Gutiérrez-Pérez, 2009).

Sea uno o los tres mecanismos los que confieren protección y estabilidad biomolecular, los beneficios de la adición de trehalosa se reflejan en la inhibición de la fusión entre las bicapas lipídicas mediante la disminución de la separación lateral de los fosfolípidos y la estabilización de vesículas lipídicas que permiten que las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos se mantengan en estado fluido sin llegar al estado de gel, pero además estabilizando la estructura tridimensional de las proteínas integrales.

Este poder crioprotector ha permitido su utilización para la preservación de distintos tipos celulares, por ejemplo las células de la piel de origen fetal [Erdag *et al.*, 2002], o la de su inclusión en las formulaciones para preservación de las células de los órganos destinados al trasplante [Chen *et al.*, 2004; Sasnoor *et al.*, 2005]; también ha demostrado su efectividad para la liofilización de glóbulos rojos, disminuyendo la hemólisis y aumentando la recuperación celular en la rehidratación [Kheirulomoon *et al.*, 2005]. Su capacidad crioprotectora se comprueba con la criopreservación exitosa de ovocitos humanos sin la presencia de otros crioprotectores [Eroglu *et al.*, 2002] y con mayor recuperación de embriones viables criopreservados de rata [Honadel *et al.*, 1988].

En cuanto a la criopreservación de espermatozoides, los reportes de los resultados obtenidos por la adición de trehalosa varía de acuerdo con la especie y con los equipos de investigación (Tabla 1), lo cual puede deberse a la variación en la formulación de los diluyentes utilizados por los diversos investigadores, de tal manera que en el bovino dos autores reportan que el porcentaje de motilidad y viabilidad no ha sido significativamente mejor que los controles [Chen *et al.*, 1992; Foote *et al.*, 1993] y un tercero encuentra mejoras significativas en integridad y viabilidad [Woelders *et al.*, 1997]. En los espermatozoides del ciervo rojo ibérico, la adición de trehalosa deprimió la motilidad, sin afectar la integridad de la membrana [Fernandez-Santos *et al.*, 2007]. En un estudio al comparar un diluyente comercial a base de glicerol para rumiantes contra diluyentes adicionados con trehalosa en tres especies de gacelas africanas, los diluyentes con trehalosa mostraron menores porcentajes de viabilidad, motilidad e integridad acrosomal [Garde *et al.*, 2002]. Lo mismo se reporta en el garañón [Squires *et al.*, 2004].

Se han obtenido mejoras en espermatozoides de carneros, donde se reporta mayor porcentaje de células sin alteraciones en la membrana, mayor porcentaje de motilidad y

mayor fertilidad después del descongelado [Aisen *et al.*, 2000, 2002, 2005; Bucack *et al.*, 2007]. La integridad y el porcentaje de motilidad también se incrementaron en espermatozoides de machos cabríos criopreservados con trehalosa [Aboagla *et al.*, 2003,2004]; lo mismo que en muflones europeos, donde además, se incrementó el porcentaje de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* (IVF) [Berlinguer *et al.*, 2007]. Resultados similares han sido alcanzados en estudios de criopreservación de semen de ratón, mejorando la viabilidad, la integridad acrosomal y el porcentaje de embriones producidos por IVF [Storey *et al.*, 1998; Sztein *et al* 2001; Thompson *et al.*, 2001]. En estudios realizados en semen de conejo la combinación de trehalosa con metil celulosa incrementó el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto [Dalimata y Graham., 2008], a diferencia del espermatozoide de la liebre europea que muestra un efecto detrimental con la adición de trehalosa [Kozdrowski *et al.*, 2009]. En espermatozoides de perro se ha observado un incremento en los porcentajes de motilidad, integridad y viabilidad al adicionar trehalosa al medio de congelación [Yildiz *et al*, 2000; Yamashiro *et al.*, 2007].

En el caso de los espermatozoides porcinos, al inicio de este proyecto doctoral no existían referencias sobre la utilización de la trehalosa en los medios de criopreservación, aunque existe el antecedente del medio Reading, diluyente de larga duración para conservación de semen a 16°C que fue desarrollado por Revell y Glossop [1989], que incluye 1 gramo de trehalosa por litro (2.6 mM) en su composición, y que demostró incrementar el porcentaje de integridad acrosomal, mantuvo la motilidad al sexto día y aumento la fertilidad y el número de embriones obtenidos al compararlo contra un diluyente control sin trehalosa.

Recientemente un grupo de investigadores chinos encontraron que la trehalosa confiere cierta protección contra el daño por congelación generado al DNA espermático y mantiene la integridad mitocondrial e incrementa la viabilidad, motilidad e integridad acrosomal al descongelado [Hu *et al.*, 2008, 2009a, 2009b].

Tabla 1 Concentrado del efecto de la inclusión de trehalosa en diluyentes para congelación de semen de diferentes especies.

Especie	% trehalosa	Diluyente	Protocolo	Conclusiones	Autor/año	Revista
carnero	90.9 mM	Tris+ acido cítrico+ fructosa+ glicina 9.4% yema de huevo	Sustitución de yema de huevo por glucosa	Se mantiene viabilidad y normalidad celular pero con decremento de motilidad, mejor integridad acrosomal, menos HOST+ y menos embriones hIVF	Valente <i>et al.</i> , 2009	Animal Reproduction Science En prensa
	50 y 100 mM	Tris base + Taurina +Cisteína+ hialuronan	Comparativo entre dos diluyentes y adición de antioxidantes	50 mM mayor motilidad que el control (P<0.01), los antioxidantes no fueron significativos, aunque mejoro ligeramente con la Taurina	Bucak <i>et al.</i> , 2007	Theriogenology 67;1060-1067
	375 mM	Tris ac. cítrico glucosa	Motilidad	La adición de BSA 5% a un medio con trehalosa mejoro la motilidad	Yamashiro 2006	Journal of Reproduction and Development 52;3: 407-414
	76 grs L 100 mM	Tris + EDTA 1.5g/l	HOS , MET, Peroxidacion ,GSH y GSSG	Trehalosa mejoro Integridad de membrana , por poder antioxidante, disminuye ROS	Aisen 2005	Cryobiology 50;239-249
	0, 50, 100,200 y 400 mM	Tris citrato, Glicerol 3%	HOS, motilidad, IA poscervical	Mejor [] 100 mM, mayor ai, mas Mot., mas corderos nac.	Aisen 2002	Theriogenology 57; 1801-1808
	76 grs L 100 mM	Tris + EDTA 1.5g/l	HOS,	T+EDTA mejoro acrosoma y motilidad	Aisen 2000	Theriogenology 53; 1053-1061
	Chivo	370 mM	Tris-glucosa –ac. cítrico // yema de huevo SDS	Motilidad , IA FITC-PNA	SDS+T mejoro mot a 0.1% Concentraciones altas son detrimentales .05 mas acrosoma	Eiman 2004

	375 mM		FITC-PNA, merocyanina 540/Yopro	Mantiene membranas funcionales después del descongelado	Eiman 2003	Biology of Reproduction 69; 1245-1250
Muflon europeo	147 mM		FITC-PSA , IP, IVF	Mejoró viabilidad, más acrosomas.aumento en porcentajes IVF, y embriones(blastocistos)	Berlinguer 2007	Reproduction in Domestic Animals 42: 202-207
Toro	200 mM	Tris Yema de huevo Glicerol 581 mM	Motilidad exclusion de Hoechst, y acr.	Sucrosa protegió mas que la trehalosa, motilidad se deprime en medios hipertónicos	Woelders 1997	Cryobiology 35: 93-105
	25.6g/l	Leche, suero bovino y 7% glicerol	Retorno a 59 d post IA	Mejoró mínimamente la fertilidad (no significativo) Pero proponen que un volumen norml a20x10 ₆ puede beneficiarse con su adición	Foote 1993	Journal of Dairy Science 76: 1908-1913
	100 mM	Yema de huevo tris	Motilidad y viabilidad	Mejoró la motilidad y la viabilidad pero no de manera significativa	Chen 1993	Cryobiology 30: 423-431
Garañon	900 mM	SMEY	Motilidad	Resultados no concluyentes, mejoras relativas pero no significativas	Squires 2004	Theriogenology 62: 1056-1065
Ciervo Rojo Ibérico	400 mM	Comparado con otras azúcares Tris citrato fructosa	Motil, acr, DNA , JC1 y meriocianina 540	Detrimental en motilidad,,no diferencias en viabilidad, protección a integridad membranal	Fernandez-Santos 2007	Theriogenology 67: 738-753
Gacelas	3.8%	TES –tris Yema de huevo (% glicerol)	Motilidad, ACRO, HOS	Los valores más bajos en comparación con otros diluyentes (triladil y tris glicerol) diferencia entre especies.	Garde 2003	Biology of Reproduction 69:602-611
Conejo	91 mM	Tris yema de huevo + hepes+ glucosa+lactosa+acetamida libre de glicerol	Viabilidad e integridad acr FITC-PNA IP	Aumento en vivos-acrosoma intacto (P>0.05) con metil celulosa , no sola	Dalimata 1997	Theriogenology 48:831-841

	Liebre	50 y 100 mM	Tris 250mM+acido cítrico 80 mM Glucosa 70mM+DMSO 1.0 M; yema de huevo 17% kanamicina 80 mg/l	Motilidad (CASA) Viabilidad e integridad por citometría de flujo	Menor motilidad progresiva en 100 mM y decremento en el tipo de movimiento a 3 hrs en 50 mM	Krozdrowski 2009	Animal Reproduction Science In press
Perro	Poodle	375 mM	Tris- yema de huevo	FITC-PNA Thermal resitent test	Mejoraron la motilidad y la integridad acrosomal sobre todo al utilizar VA	Yamashiro 2007	Animal Reproduction Science 102: (1-2) ;165-171
	Beagle	70mM	Tris ac. cítrico, glucosa y glicerol 8% yema de huevo 20%	Eosina-nigrosina Viabilidad, integ ac y motilidad	Mejoraron viabilidad, motilidad y rango de espermatozoides activos totales.	Yildis 2000	Theriogenology 54: 579-585
Ratón		7.5%	6% glicerol + MJB	Vivos muertos IVF, retiran el medio con diálisis	Espermatozoides de epidídimo, mejoraron su integridad y mejoraron % de IVF	Storey 1998	Cryobiology 37: 46-58
		300 mM	Leche y Buffer libres de glicerol	Vivos muertos SYBR 14	Mejoro motilidad Produjo menos daño cel 79 vs 11% embriones	Sztein 2001	Cryobiology 41:28-39
	Ratón	220 mM	Buffer libre de bicarbonato 6% de glicerol	IVF	21.7 de 30 blastocistos 7.3 de 12 ratoncitos 44% de embriones	Thompson 2001	Journal of Andrology 22: 2; 339-344
	Elefante asiático	100 y 375 mM	2.41 g TES; 0.58 g Tris; 0.1g Fructosa; 5.5 g lactosa; 20% yema de huevo; 4% glicerol.	Motilidad 0h, 30 min y 3 hrs. Integridad morfológica y viabilidad	Espermatozoides sin motilidad pero con mejor morfología y viabilidad que los otros experimentales	Saragusty <i>et al.</i> , 2008	Animal Reproduction Science En prensa
CERDO		2.6 mM (1 gr por litro)	READING (medio para conservación de semen a 16°C por 7 días)	Viabilidad e integridad acrosomal	Incrementos en porcentaje de integridad acrosomal, mantuvo la motilidad al sexto día y aumento la fertilidad y el número de embriones	Revell y Glossop 1989	Animal Production 48: 579-584
		100 mM	200 mM tris; 77 mM acido cítrico; 61 mM Fructosa; 20% yema de huevo	Integridad de DNA por ensayo cometa	Mejoras en motilidad , integridad acrosomal y membranal, disminución	Hu <i>et al.</i> , 2008	Cryobiology 57; 257-262

					de daño a DNA pero no mejor que usando LDL de yema de huevo		
		0,25,50,100,200 mM	200 mM tris; 77 mM ácido cítrico; 61 mM Fructosa; 20% yema de huevo	Motilidad, integridad acrosomal, HOST+ y CTC	100 mM de trehalosa mejora motilidad integridad membranal y acrosomal y reducción de la criocapacitación	Hu et al., 2008	Animal Reproduction Science 112: (1-2); 107-118
Otras especies	Macacos rhesus		Comparan contra CZB, almacenaje de 1 mes , a temperatura ambiente , (semen liofilizado)	ICSI	Mismos resultados en producción de embriones que con semen fresco en ICSI	Sánchez-Partida (Australia) 2006	10 Congreso Mundial de espermatología Madrid 2006
	Ostiones	750mM	DMSO 5.5%	Determinaron niveles de espermatozoides obtenidos	Los niveles de obtención fueron los adecuados para producir desarrollo de larvas. (New Zeland)	Smith 2006	10 Congreso Mundial de espermatología Madrid 2006

2.7 Las pruebas dinámico-fisiológicas de evaluación espermática como herramientas para la predicción de la fertilidad del semen descongelado

Por otra parte, el poder predecir la capacidad fertilizante del semen es de gran importancia económica para los hatos porcinos que utilizan semen criopreservado, sobre todo si se toma en consideración que los resultados de fertilidad obtenidos por su aplicación no han sido satisfactorios [Johnson *et al.*, 1981; Holt, 2000a ,2000b; Curry, 2000; Batellier *et al.*, 2001; Stornelli *et al.*, 2005]. En la actualidad, los métodos de rutina para llevar a cabo la evaluación seminal como la concentración de células, la motilidad progresiva, el porcentaje de células vivas y la integridad acrosomal no son del todo confiables para predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides al descongelado, ya que la información que brindan solo se refiere a calidad seminal por lo que detectan sólo las muestras más afectadas [Martínez *et al.*, 1993; Petrunkina *et al.*, 2007], de ahí la necesidad de utilizar otras pruebas que permitan ampliar el criterio para predecir de manera más acertada la capacidad fertilizante del semen descongelado.

La prueba rápida de termo resistencia (sTMT), modificada por Fiser *et al.* [1991], valora la viabilidad del semen descongelado con base al daño latente que no se hace patente inmediatamente después de la descongelación, pero si durante cierto periodo de incubación a una temperatura constante (42°C). Uno de los cambios que se puede presentar es la disminución del porcentaje de motilidad, el cual ha sido atribuido a la liberación de una amino oxidasa que posee un efecto tóxico sobre el espermatozoide. La integridad acrosomal también puede verse deteriorada por la incubación; en parte por los espermatozoides que lleven a cabo la reacción acrosomal normal y en parte por los que sufran la pérdida anormal del acrosoma por daño membranal [Fiser *et al.*, 1991]. Se ha señalado que la duración de la motilidad posterior a la incubación es un indicativo del tiempo que el espermatozoide sobrevivirá en el tracto reproductivo de la hembra y tolerará el proceso de capacitación.

La prueba hipo osmótica (HOST) es otro ensayo sencillo que valora la funcionalidad e integridad estructural de la membrana del flagelo espermático y su uso permite ampliar la valoración de la calidad espermática, además de que se ha encontrado una alta correlación

entre los resultados de esta prueba y los porcentajes de penetración *in vitro* [Pérez-Llano *et al.*, 2001].

Por su parte el ensayo de penetración homologa *in vitro* (hIVP), permite la interacción de ambos gametos de la misma especie, lo que brinda información que no aportan fertilizaciones *in vitro* heterólogas. Por otra parte se ha comprobado que la hIVP presenta alta correlación con las pruebas de fertilidad *in vivo*, lo que la convierte en una prueba muy práctica para predecir la fertilidad de eyaculados descongelados [Matas *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1993,1998].

2.8 Hipótesis

Si la adición de trehalosa a los diluyentes de criopreservación de diferentes especies han mejorado la viabilidad e integridad espermática y que su inclusión en un diluyente de larga duración mejoró la fertilidad del semen porcino, por lo tanto su utilización en un medio de crió preservación para semen de cerdo, podría favorecer la integridad, viabilidad y capacidad fecundante del espermatozoide porcino.

2.9 Objetivos generales

- Valorar el efecto crioprotector de la trehalosa sobre los espermatozoides de cerdo, comparándolo con la protección conferida con diluyentes de congelación convencionales.
- Mantener la integridad y viabilidad espermática del espermatozoide porcino descongelado, favoreciendo su capacidad fecundante.

2.10 Objetivos específicos

- Determinar la concentración molar de trehalosa que favorezca la criopreservación del espermatozoide porcino.
- Valorar la protección conferida por la trehalosa sobre la integridad de la membrana, la integridad acrosomal, el porcentaje de viabilidad, el porcentaje de motilidad progresiva y el tipo de movimiento presentados por el espermatozoide de cerdo al descongelado
- Valorar la respuesta del espermatozoide de cerdo criópreservados en trehalosa a las pruebas hiposmótica (HOST) y de termoresistencia (sTMT).
- Valorar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de cerdo criópreservados en trehalosa por medio de los porcentajes obtenidos en la prueba de penetración homologa *in vitro* (hIVP).

3 Material y Métodos

El proyecto se realizó en cuatro etapas progresivas que se describen de manera general a continuación, posteriormente se detallan los experimentos realizados en cada etapa.

Etapas 1.- Formulación y selección de los diluyentes.

En esta etapa se formularon los diversos diluyentes experimentales que se utilizaron durante los experimentos. Su diseño se basó en el efecto de sus diferentes constituyentes sobre la viabilidad, la motilidad, la funcionalidad membranal y la integridad acrosomal, de los espermatozoides criopreservados. Para valorar dicho efecto se realizó un primer experimento para determinar la concentración molar de trehalosa más adecuada para continuar con el protocolo. En el segundo experimento se valoró el efecto de la concentración de glicerol y el efecto de la adición de KCl. Una vez formulada se verificó la molaridad y el pH de todos los medios elaborados. Asimismo se monitoreó la curva de enfriamiento y se valoró el efecto de las temperaturas de congelación y descongelación sobre la motilidad espermática.

Etapas 2.- Valoración de la integridad celular (efecto crioprotector conferido por la trehalosa).

En la segunda etapa se valoró la crioprotección ofrecida por los medios de congelación sobre la integridad y funcionalidad espermática mediante los siguientes ensayos:

- a) Valoración del porcentaje de la motilidad progresiva y el tipo de movimiento (vigor) por observación directa al microscopio óptico.
- b) Porcentaje de viabilidad espermática por tinción vital eosina-nigrosina.
- c) Integridad del acrosoma por prueba de azul brillante de Coomassie

Etapas 3.- Estimación del potencial fertilizante por pruebas dinámicas de respuesta fisiológica

En esta etapa se estimó el potencial fertilizante de los espermatozoides criopreservados en los diferentes diluyentes, por medio de las siguientes pruebas:

- a) *Test* corto de termoresistencia
- b) Prueba dual de respuesta hiposmótica/ integridad acrosomal

Etapa4.- Comprobación y comparación *in vitro* de la capacidad fertilizante de espermatozoides descongelados, por pruebas de penetración homologa.

En esta etapa se realizaron los siguientes ensayos:

- a) Maduración *in vitro* de ovocitos de cerda
- b) Enriquecimiento de la muestra espermática por columnas de sephadex
- c) Capacitación de espermatozoides
- d) Prueba de penetración homóloga *in vitro*

3.1 Métodos generales de colección del eyaculado y congelación de la muestra (utilizados en todas las etapas del proyecto).

3.1.1 Colección de semen y contraste seminal

Se obtuvieron eyaculados de cuatro sementales maduros, pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina (CEIEPP) de la FMVZ de la UNAM. Los eyaculados se recolectaron por medio de la técnica de la mano enguantada, colectando únicamente la fracción rica en espermatozoides, la cual se filtró a través de doble gasa estéril. El volumen se determinó con base al peso del eyaculado (1kg = 1lt). La concentración espermática se calculó por conteo en hematocitómetro (cámara de Neubauer), utilizando un factor de dilución 21 (25 µl de semen diluido en 500 µl de solución salina adicionada con formol al 0.4%) y aplicando la siguiente formula:

No. de espermatozoides contados x 21 x 10,000 x 5 = concentración de espermatozoides por ml.

La determinación del número de morfoanomalías se realizó de manera simultánea durante el conteo en el hematocitómetro. La motilidad se evaluó por observación directa al microscopio óptico, realizándola siempre el mismo evaluador, para disminuir la valoración subjetiva de la misma. Como norma los eyaculados con menos del 85% de motilidad o más del 15% de morfoanomalías no fueron incluidos en el experimento, sin embargo no fue necesario aplicar esto. Los eyaculados se diluyeron 1:1 (vol:vol) en medio Betsville Thawing Solution (BTS) para su transporte al laboratorio, que se realizó en caja de

poliuretano atemperada. La temperatura se mantuvo por medio de bolsas de gel calentadas en baño maría.

3.1.2 Método de congelación

Se siguió el protocolo a dos tiempos (refrigeración y glicerolización), propuesto por Westendorf *et al.*, [1975] y modificado por Córdova *et al.*, [2001]. El semen diluido 1:1 en BTS a 37°C, alcanzó los 23°C durante el trayecto de transporte. En el laboratorio se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación (800gx 10min), posteriormente se reconstituyó agregando la mitad del volumen final del diluyente de congelación (fracción A libre de glicerol, etapa de refrigeración), ajustando la concentración espermática a 600×10^6 espermatozoides por mililitro, manteniéndolo por una hora y media a 16°C para su estabilización.

Las muestras estabilizadas a 16°C se colocaron en refrigeración (4°C) por 2 hrs. Posteriormente se les agregó la segunda mitad del diluyente (fracción B, etapa de glicerolización). La fracción B se introdujo en el refrigerador al mismo tiempo que las muestras diluidas en la fracción A del diluyente con el fin de que se encontrara a la misma temperatura al momento de su adición. La fracción B se elaboró con el total del glicerol para alcanzar la concentración final deseada y fue agregada de forma gradual en cuatro tiempos (5, 10, 15 y 20% del volumen total de esta fracción), con intervalos de 10 minutos entre cada adición (con el fin de disminuir el estrés osmótico atribuido a la adición del glicerol). Como último paso se almacenó en pajillas de 0.5 ml. La concentración espermática final fue de 300×10^6 espermatozoides por pajilla. Cada pajilla fue sellada con alcohol polivinílico, después de lo cual se expusieron a vapores de nitrógeno (-130 a -150°C) durante 20 min. Para su exposición a los vapores se utilizó una caja de poliuretano y se dejó una distancia de 18 a 20 cm sobre el espejo líquido del nitrógeno, colocando las pajillas sobre una gradilla de metal para tubos de ensaye. Posteriormente fueron almacenados en tanque de nitrógeno líquido (-196°C). El proceso de glicerolización y el envasado, se llevó a cabo en cámara de refrigeración a una temperatura de 4°C.

3.2 Formulación y selección de los diluyentes

Se utilizó 20% de yema de huevo de gallina, como base para la dilución. La metodología de obtención fue retirando la clara y las *chalazas* de manera manual. La yema de huevo se adicionó con los azúcares en las proporciones adecuadas para cada diluyente experimental, esta dilución fue separada en dos fracciones, la fracción A o de congelación (sin adición de glicerol) y la fracción B o de glicerolización (con la concentración total de glicerol requerida para cada diluyente experimental). Ambas fracciones se centrifugaron por separado a 800g x 10 min, con el fin de recuperar el sobrenadante y descartar la mayor cantidad de lipoproteínas de alta densidad presentes en la pastilla.

Todos los diluyentes fueron adicionados con 100 µg/ml de Gentamicina y monitoreados con potenciómetro (pH 510 meter, OAKTON[®]), para estandarizar su pH dentro de un rango de 6.8 a 7.2.

El diluyente control (G4) con el que se compararon todos los diluyentes experimentales en las diversas fases y etapas experimentales, se elaboró con 20% yema de huevo, 4% glicerol, 230.8 mM de dextrosa y agua bidestilada c.b.p el volumen final.

Los diluyentes experimentales se fueron diseñando de manera progresiva de acuerdo con la etapa del proyecto en proceso. La formulación de cada uno de los diluyentes experimentales se especifica por etapa en las Tablas 2 y 3. Todos los medios fueron llevados a un pH entre 6.8 a 7.2. Para la medición de la osmolaridad de cada uno de los medios, se utilizó un osmómetro de depresión del punto de congelación (modelo 5002 OSMETTE A, Precision System Inc., Natick, Mass). La lectura de la osmolaridad se efectuó en ausencia de glicerol reemplazándolo con agua para obtener el volumen final correcto, con la intención de obtener la medida de la contribución osmótica brindada por los solutos no permeables (Hu *et al.*, 2008).

3.2.1 Determinación de la concentración molar de la trehalosa

Con el fin de determinar la concentración molar más adecuada a utilizar en todas las etapas del proyecto se elaboraron 5 diluyentes experimentales con base a 20% de yema de huevo adicionada con 100, 150, 250, 300 y 500 mM de trehalosa, estos diluyentes se denominaron T100, T150, T250, T300 y T500 en base a su formulación. En estos

diluyentes experimentales se suprimieron el glicerol y la dextrosa con el fin de evaluar la motilidad al descongelado de espermatozoides criopreservados en cada uno de estos diluyentes (Tabla 2).

Tabla 2: Formulación de diluyentes para determinación de concentración de trehalosa en base a motilidad espermática (fase 1).

Nombre del diluyente en base a concentración mM de trehalosa	T1	T150	T250	T300	T500
Yema de huevo (20%) (ml)	2	2	2	2	2
Agua desionizada (ml)	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9
Gentamicina (ml)	10	10	10	10	10
Trehalosa (g)	0.3	0.567	0.945	1.135	1.891
Volumen total (ml)	10	10	10	10	10

Para la evaluación se congelaron 2 eyaculados de cada uno de cuatro sementales (8 eyaculados en total). Se congelaron 20 pajillas de cada eyaculado en cada uno de los medios experimentales, utilizando el método anteriormente descrito (punto 3.2.1).

Transcurridos 15 días de almacenaje se descongelaron 2 pajillas por cada uno de los eyaculados y tratamientos; la descongelación se llevó a cabo utilizando baño maría a 37°C por 30 segundos. El contenido de las pajillas descongeladas se colocó en tubos de ensayo atemperado, que luego se adicionaron con diluyente BTS 1:6 v/v, manteniéndolos a 37°C por diez minutos para su estabilización. La evaluación del porcentaje de motilidad al descongelado se realizó siempre por el mismo evaluador por observación directa al microscopio óptico.

3.2.2 Efecto de la concentración de glicerol.

El segundo experimento se realizó con la finalidad de determinar la concentración mínima de glicerol que permitiera una motilidad aceptable, en un medio adicionado con trehalosa, por lo cual el diluyente T250 fue suplementado con diferentes concentraciones

finales de glicerol: 0.5, 1, y 2 % (Tabla 3). La disminución del porcentaje de glicerol tuvo a su vez la intención de reducir el potencial tóxico de este crioprotector permeable.

Tabla 3: Formulación para valorar el efecto de concentraciones de glicerol.

% de Glicerol	4	2	1	0,50	0
20% Yema de huevo (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	0
Glicerol (ml)	0.4	0.2	0.11	0.5	0
Trehalosa 250mM	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945
agua bidest. (cbp 10ml)	7.6	7.8	7.9	8	10
Gentamicina (100 mg/lt) (µl)	10	10	10	10	10

Para la evaluación se congelaron 2 eyaculados de cada uno de tres sementales (6 eyaculados en total). Se congelaron 20 pajillas de cada eyaculado en cada uno de los medios experimentales, utilizando el método anteriormente descrito (punto 3.2.1).

Transcurridos 15 días de almacenaje se descongelaron 3 pajillas por cada uno de los eyaculados y para cada uno de los cinco tratamientos; la descongelación se llevó a cabo utilizando baño maría a 37°C por 30 segundos. El contenido de las pajillas descongeladas se colocó en tubos de ensaye atemperado, que luego se adicionaron con diluyente BTS 1:6 v/v, manteniéndolos a 37°C por diez minutos para su estabilización.

Para la evaluación de viabilidad en este experimento y tomando en consideración que la valoración era el efecto de la concentración del glicerol en el medio se optó por la prueba de **triple tinción** propuesta por Talbot y Chacón (1981), ya que existen reportes de que la utilización de glicerol, al ser un crioprotector permeable, puede interferir con la prueba vital de exclusión eosina-nigrosina y su interpretación para el porcentaje de viabilidad.

Para realizar la triple tinción, se tomaron alícuotas de 35×10^6 espermatozoides /ml de cada una de las pajillas descongeladas y se lavaron por centrifugación a $800 \times g$ 10 min, desechando el sobrenadante para retirar el diluyente de congelación (yema de huevo), recuperando la pastilla y se reconstituyendo en PBS (3 lavados). De las muestras reconstituidas se tomaron 100 µl de cada muestra y se colocaron en tubos de ensaye atemperados, agregando 100 µl de azul de tripano al 2% en PBS, incubando a 37 °C durante 15 minutos. Después se lavó por centrifugación $800 \times g$ 10min reconstituyendo en

PBS, para retirar el exceso de colorante. El último lavado se reconstituyó en un volumen de 0.5 ml y se fijó con 0.5 ml glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilatos 0.1 M (1.07 g de ácido cacodílico en 50 ml de agua bidestilada) a pH de 7.4, por una hora a 4°C. El fijador se retiró por centrifugación 800xg 10 minutos (2 lavados), resuspendiendo en PBS y tomando la muestra para preparar frotis secado al aire. Posteriormente el frotis se tiñó por inmersión en Café Bismarck al 0.8% (en agua desionizada, acidificada a pH 1.8 con HCl 2 N), a 37 °C durante 50 minutos. Se enjuagó con agua bidestilada para retirar exceso de colorante y se seco al aire. Inmediatamente se procedió a teñir por inmersión con Rosa de Bengala al 0.8% (buffer Tris 0.1 M acidificado a pH 5.3), a temperatura ambiente por 30 minutos. Se volvió a enjuagar con agua bidestilada para retirar exceso de colorante (rosa de bengala) y se seco al aire. Para clarificar los patrones de tinción se paso por batería de alcoholes 100%, 90 % y 100%, entrada por salida y se deja secar al aire. Por último se montaron con resina y cubreobjetos, para su evaluación al microscopio óptico.

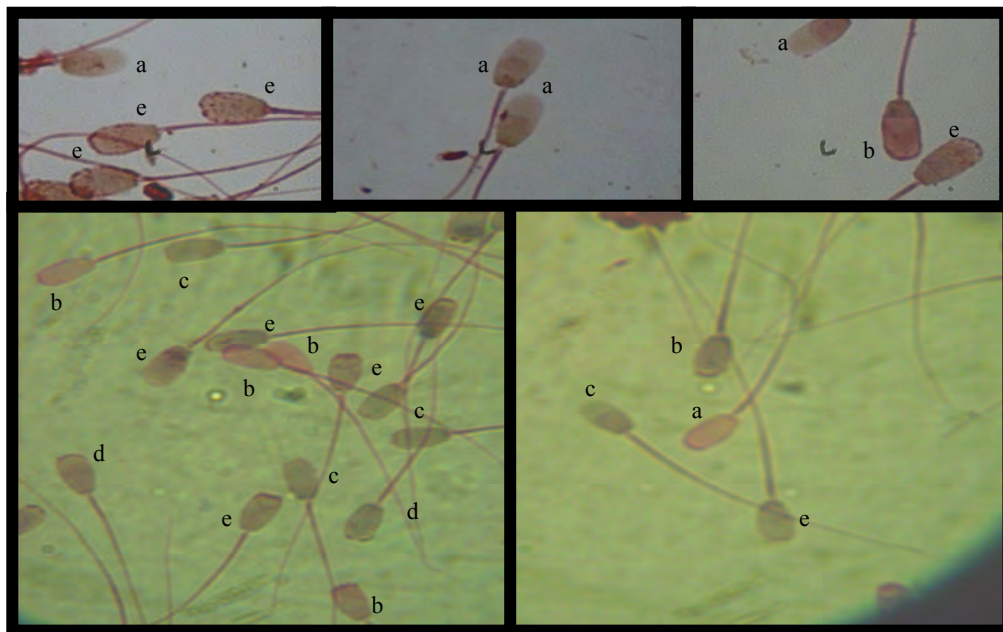


Figura 3 Imágenes de espermatozoides descongelados evaluados con triple tinción:
a) espermatozoides vivos sin acrosoma; b) espermatozoide vivo con acrosoma;
c) espermatozoide muerto sin acrosoma; d) espermatozoide muerto con acrosoma;
e) espermatozoides no contabilizados por presentar acrosomas no íntegros o coloración de difícil interpretación. (100x).
Gutiérrez-Pérez 2009.

La interpretación de la prueba se basó en la coloración adquirida (Talbot y Chacon, 1981): Cabeza blanca-azul o café grisáceo translúcido: espermatozoides muertos sin acrosoma; Cabeza rosa-café oscuro o azulado: espermatozoides muertos con acrosoma intacto; Cabeza rosa-café muy claro: espermatozoides vivos con acrosoma intacto; Cabeza blanca-café muy claro: espermatozoides vivos con reacción acrosomal (Figura 3).

3.2.3 Efecto de la adición de cloruro de potasio (KCl).

Con el fin de mejorar la motilidad observada al descongelado se experimento con el efecto que la adición de KCl al diluyente T250 adicionado con 1% de glicerol, con el objeto de favorecer los mecanismos de regulación osmótica del espermatozoide ya que el KCl tiene la capacidad de ser una fuente de ion cloruro, funcionando como un restaurador biológico de electrolitos. Se eligió este ion porque Revell y Glossop [1989] en la formulación de su diluyente de larga duración para preservación de semen de cerdo a 16°C, reportan que la combinación de 3.3 mM de KCl con trehalosa favorece la estabilidad acrosomal de manera significativa; de ahí que en el presente estudio se decidió valorar el efecto de la adición del cloruro de potasio (KCl) sobre los porcentajes de viabilidad y motilidad de los espermatozoides descongelados.

Para la valoración del efecto de la inclusión de este ion sobre la motilidad espermática, se elaboró un nuevo diluyente adicionado con 3.3 mM de KCl (0.25grs/lt), que se comparo con el diluyente G4 y el diluyente T1. En este experimento se congelaron 2 eyaculados de cada uno de tres sementales (6 eyaculados en total). Se congelaron 20 pajillas de cada eyaculado en cada uno de los medios experimentales, utilizando el método anteriormente descrito (punto 3.2.1).

Transcurridos 15 días de almacenaje se descongelaron 2 pajillas por cada uno de los eyaculados y cada uno de los tres tratamientos; la descongelación se llevó a cabo utilizando baño maría a 37°C por 30 segundos. El contenido de las pajillas descongeladas se colocó en tubos de ensaye atemperado, que luego se adicionaron con diluyente BTS 1:6 v/v, manteniéndolos a 37°C por diez minutos para su estabilización. La evaluación del porcentaje de motilidad al descongelado fue realizada por observación directa al microscopio óptico y la viabilidad se valoró por medio de la prueba de eosina-nigrosina.

3.2.4 Monitoreo de la curva de enfriamiento y temperatura óptima de descongelación

La curva de enfriamiento fue monitoreada tomando lecturas del descenso de temperatura cada 10 minutos mediante la inmersión en los medios de dilución de termocoples conectados a un termómetro dual digital (marca Lutron, modelo TM-916). Estas lecturas se efectuaron durante el proceso de congelación desde los 22°C (temperatura ambiente) hasta los 4°C.

Buscando mejorar el porcentaje de motilidad progresiva se realizó un experimento para determinar la temperatura de descongelación óptima para nuestro diseño experimental. Después de un mínimo de 15 días de criopreservación en nitrógeno líquido, se tomaron 4 pajillas seleccionadas azahar de 3 eyaculados congelados en los medios G4, T1 y T0.5, y se descongelaron por inmersión en baño María bajo dos protocolos con diferentes temperaturas de descongelación. 2 pajillas de cada muestra se descongelaron a una temperatura de 56 ° C por 12 seg (protocolo de rutina utilizado en este laboratorio). Simultáneamente, otras 2 pajillas de cada una de las muestras se descongelaron a una temperatura de 37°C por 30 segundos [Bwanga *et al.*, 1990]. Inmediatamente después, la temperatura alcanzada en el interior de la pajilla al descongelado se monitoreó con filamentos termocoples introducidos en las mismas y conectados al termómetro dual digital (TM-916). Después de descongelado el contenido de las pajillas se colocó en tubos de ensaye atemperados, que se adicionaron con el diluyente de descongelación BTS 1:6 v/v y se mantuvo a 37°C por diez minutos para su estabilización antes de evaluar el porcentaje de motilidad para valorar el efecto de la temperatura al descongelado.

De aquí en adelante todas las muestras requeridas para cada experimento se descongelaron en baño maría a 37°C por 30 segundos adicionando diluyente BTS volumen 1:6 y manteniéndolos a 38°C hasta su utilización.

3.3 Valoración de la integridad celular

En la segunda etapa se comparó la crioprotección ofrecida por los medios T1, T0.5 y G4 sobre la integridad celular de los espermatozoides criopreservados en estos medios.

Con el fin de confirmar que la crioprotección observada fuera efecto de la adición de trehalosa y no de la baja concentración de glicerol utilizada, se elaboró un cuarto diluyente experimental con una concentración final del 1% de glicerol pero libre de trehalosa, que se denominó G1 (Tablas 5, 6 y 7).

Para la valoración se congelaron 4 eyaculados de cada uno de cuatro sementales (16 eyaculados en total). Se congelaron 20 pajillas de cada eyaculado en cada uno de los medios experimentales, utilizando el método anteriormente descrito (punto 3.2.1).

Transcurridos 15 días de almacenaje se descongelaron 2 pajillas por cada uno de los eyaculados y tratamientos; la descongelación se llevó a cabo utilizando baño maría a 37°C por 30 segundos. El contenido de las pajillas descongeladas se colocó en tubos de ensaye a temperatura ambiente, que luego se adicionaron con diluyente BTS 1:6 v/v, manteniéndolos a 37°C por diez minutos para su estabilización y posteriormente fueron analizados con los ensayos descritos a continuación.

3.3.1 Motilidad progresiva y tipo de movimiento (vigor o rango cinético).

Para la valoración del porcentaje de motilidad y el tipo de movimiento, se tomaron alícuotas con una concentración de 35×10^6 espermatozoides /ml de cada una de las muestras descongeladas. La determinación del porcentaje de motilidad progresiva se realizó por observación directa en microscopio óptico, ésta valoración es subjetiva por lo que todas las observaciones fueron realizadas por el mismo evaluador para minimizar el sesgo.

El tipo de movimiento (vigor o rango cinético) es una medida de la calidad del movimiento exhibido por los espermatozoides motiles, la valoración se realizó en base a una escala cualitativa del 0 al 5, de donde 5 representó espermatozoides con movimientos progresivos, vigorosos y muy rápidos que atraviesan el campo de visión, 4 son espermatozoides con movimientos rápidos, 3 son espermatozoides con movimientos progresivos lentos y sinuosos, 2 son espermatozoides con movimientos anormales y algunos progresivos, 1 son espermatozoides sin movimiento progresivo girando sobre sí mismos y 0 sin movimiento [Fiser *et al.*, 1991].

3.3.2 Porcentaje de viabilidad espermática por tinción vital eosina-nigrosina.

La viabilidad (Vb) al descongelado se valoró mediante la técnica de eosina nigrosina (E-N), descrita por Dott y Foster, [1972] y modificada por Bamba K [1988], para ello fue necesario que las muestras de los espermatozoides descongelados se lavaron por centrifugación (800xg 10 min), para retirar el diluyente sobrenadante y resuspender la pastilla en el medio mínimo de cultivo propuesto por Rogers y Yanagimachi [1975] (105.08 mM NaCl, 25.07 mM NaHCO₃, 1.71 mM CaCl₂, 0.25mM Piruvato de Na, 20.0 mM Lactato de Na, pH 7.4). Posteriormente se diluyeron 1:8 con la tinción eosina-nigrosina (eosina amarilla 0.67grs., nigrosina 5grs, glucosa 5% 40ml, agua desionizada c.b.p. 100 ml) atemperada a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se elaboraron frotis en portaobjetos atemperados a 37°C, se dejaron secar al aire y se montaron con resina y cubreobjetos para el conteo posterior de 200 células, diferenciando entre vivos (no teñidos) y muertos (parcial o totalmente teñidos).

3.3.3 Prueba de integridad acrosomal por tinción con el azul brillante de Coomassie (BBC)

Veinte microlitros de las muestras descongeladas, de las estabilizadas a 37°C por diez minutos y de las incubadas para la prueba de sTMT fueron tomados y se adicionaron con 20 µl de solución de paraformaldehído al 4 % (en agua desionizada, pH 7.4), y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. El paraformaldehído se retiró por centrifugación (800xg 10 min), reconstituyendo la muestra en PBS y lavada dos veces más para reconstituirla en el volumen inicial en cloruro de amonio 50 mM en PBS. Se realizaron frotis sobre portaobjetos desengrasados y se dejaron secar al aire. Los frotis se sumergieron en solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie Blue G -250 de Fisher Scientific al 0.22 %, Metanol 50%, Ac. Acético 10 %, agua bidestilada c.b.p.), por dos minutos. Los frotis fueron retirados y lavados utilizando agua bidestilada para remover el exceso de colorante. Los frotis se secaron al aire por segunda vez, se montaron con resina y se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x). Se contaron un mínimo de 10 campos por muestra con un número no menor a 100 células. Se interpretó la integridad acrosomal como: integra (acrosoma bien definidos e intensamente teñidos),

dañada (acrosoma difusamente teñido, con pérdida de continuidad y/o pérdida de material) y ausente (ausencia definitiva de acrosoma).

3.3.4 Comprobación de integridad membranal por microscopia electrónica de transmisión.

Al descongelado se tomaron alícuotas con una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml de cada una de las pajillas descongeladas y se reconstituyeron en BTS adicionado con un 20% de diluyente de congelación que se estabilizaron por 10 min a 37°C. Pasado este tiempo las muestras se lavaron 2 veces por centrifugación (800g x 10 min) reconstituyendo en PBS y se fijaron con solución de Karnovsky (glutaraldehído al 25% 2.6ml; paraformaldehído al 10% 11.2ml; PBS 26 ml; agua bidestilada 13.2 ml), v/v por 2hrs. El exceso de fijador se retiró por centrifugación (800xg 10min) reconstituyendo en PBS (2 lavados). La postfijación se realizó con OsO_4 x 2 hrs que se retiró por centrifugación (800xg 10 min) reconstituyendo en PBS (2 lavados). Posteriormente se procedió a deshidratación progresiva en alcoholes: alcohol 30% (15 min), alcohol 50% (15 min), alcohol 70% (15 min); alcohol 90% (15 min); alcohol 100% (20 min); alcohol 100% (20 min), para después infiltrar con alcohol /resina (3:1) 20min; alcohol /resina (1:1) 20 min y alcohol / resina (1:3) 20 min. Posteriormente se cambiaron a resina pura 2 hrs y resina pura 1 hr, para después pasar a la confección de bloques y polimerización a 60°C x 36 hrs. La evaluación de los cortes finos se realizó utilizando el microscopio de transmisión Zeiss M9 de la unidad de microscopia electrónica de la FMVZ-UNAM.

3.4 Estimación del potencial fertilizante por pruebas dinámicas de respuesta fisiológica.

Para la realización de esta etapa se decidió utilizar 2 machos previamente probados en nuestro laboratorio como congeladores aceptables (en base a los parámetros espermáticos obtenidos al descongelado), optando por hacer tres repeticiones de un solo eyaculado en todos los experimentos y valoraciones, con el fin de disminuir la variabilidad reportada en la eficiencia de la fertilización *in vitro* (IVF), que se atribuye a las características

espermáticas individuales que se presentan entre machos y aun entre eyaculados del mismo macho (Gil *et al.*, 2008).

Los tratamientos a probar fueron el diluyente T1 (20% yema de huevo, 1% glicerol, 250 mM de trehalosa y agua bidestilada c.b.p.) contra el diluyente G4 (20% yema de huevo, 3% glicerol, 230.8 mM dextrosa y agua bidestilada c.b.p.).

3.4.1 Prueba corta de termoresistencia (sTMT).

Para la realización de esta prueba se tomaron alícuotas de 35×10^6 espermatozoides descongelados/ml y se diluyeron con 8 ml de BTS atemperado a 37°C y adicionado con un 20% de diluyente de congelación y se estabilizaron por 10 min. Una vez estabilizados se les determinó el porcentaje de motilidad progresiva por medio de observación directa al microscopio óptico a 40x, también se elaboró un frotis control donde se valoró la integridad del acrosoma por medio de BBC. Por otra parte se evaluó el tipo de movimiento (vigor o rango cinético) con el mismo criterio descrito en el punto 2.4.2. Posteriormente la temperatura de las muestras se llevó a 42°C y se incubaron por 45 minutos; transcurrido éste tiempo se elaboraron frotis para el conteo de integridad acrosomal por la prueba BBC e inmediatamente se valoraron el porcentaje de motilidad progresiva y el tipo de movimiento post estrés térmico para su comparación con los resultados obtenidos inmediatamente después de la descongelación (Fiser *et al.*, 1991).

3.4.2 Prueba dual de resistencia hipo osmótica/ azul brillante de Coomassie (HOST/BBC).

Alícuotas (35×10^6 espermatozoides/ml) lavadas por centrifugación (800xg 10 min) se reconstituyeron en PBS para retirar el diluyente. Se obtuvo una muestra de 30 µl de semen a la cual se adicionó 300 µl de una solución de 100 mOsM (solución hiposmótica: 4.9 g de citrato de Na, 9 g de fructosa por litro de agua destilada), con el objeto de valorar la integridad funcional de la membrana espermática en base al número de colas enrolladas. Para lo cual se tomó una gota al momento de la dilución para hacer un frotis testigo y el resto de la muestra se incubó por 60 min a 38°C [Bucket *et al.*, 1997]. Pasado el tiempo de incubación se fijaron en paraformaldehído al 4% v/v por 10 minutos a temperatura

ambiente. Se retiró el fijador lavando dos veces por centrifugación y reconstituyendo en cloruro de amonio (50 mM en PBS) para después realizar frotis que se dejaron secar al aire y teñirlos con la técnica BBC (ver punto 2.2.4). Una vez secas se montaron con resina y cubreobjetos para posterior conteo de 200 células por laminilla con objetivo de inmersión en microscopio óptico.

La combinación de la prueba HOST y la tinción BBC se realizó buscando una mejor interpretación, de los resultados al aportar información sobre estado funcional de la membrana plasmática e integridad acrosomal. Para la interpretación de la prueba HOST se consideró como positivos a los espermatozoides que presentaron flagelos doblados, enrollados, en ovillo y en látigo. La BBC tuvo la misma interpretación descrita en el punto 2.2.4. Con anterioridad a la prueba HOST, se realizó un frotis control inmediatamente después del descongelado que también se tiñó con BBC, para restar la diferencia entre los espermatozoides con colas enrolladas, en látigo y en ovillo provocadas por el estrés osmótico propio de la congelación y la reacción acrosomal inducida por el proceso. El reporte de los porcentajes presentados en los resultados es la diferencia entre estas dos lecturas, que son los espermatozoides HOST+ con acrosoma íntegro, resultantes de la prueba (Figura 4).



Figura 4 Interpretación de la prueba HOST/BBC: a) campo de espermatozoides Host/BBC 40x, los espermatozoides con el flagelo enrollado son considerados positivos (HOST+), aquellos con la zona apical intensamente teñida de azul presentan acrosoma íntegro (AI) y aquellos que presentan la cabeza sin teñir han sufrido reacción acrosomal. b) y c) acercamiento de espermatozoides HOST + AI (acrosoma íntegro), nótese la curvatura del flagelo. d) acercamiento de una cabeza espermática sin acrosoma; e) acercamiento de una cabeza sufriendo reacción acrosomal; f) acercamiento de una cabeza espermática con acrosoma íntegro. Gutiérrez-Pérez 2009

3.5 Comprobación y comparación *in vitro* de la capacidad fertilizante de espermatozoides descongelados, por pruebas de penetración homóloga

3.5.1 Maduración de ovocitos.

Para la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), se recolectaron ovarios de cerdas recién sacrificadas en el rastro y se trasladaron en solución salina estéril a 37°C (1 hora de trayecto), al llegar al laboratorio se lavaron los ovarios con solución salina estéril a temperatura a 37°C. Los ovocitos se obtuvieron por punción de los folículos con diámetro mayor a 3 mm utilizando una jeringa estéril. El líquido folicular recolectado se depositó en un tubo de plástico de fondo cónico para permitir la sedimentación de los ovocitos y facilitar su recolección. Los ovocitos se evaluaron al microscopio estereoscópico invertido

(Figura 5a) y se recolectaron los que mostraron una capa de células foliculares compactas (Figura 5c), que se denominaron complejo cumulo-ovocito (COC's). De 20 a 30 COC's fueron colocados en gotas de 200 μ l de medio de maduración suplementado con hormonas (2.5 mM de Hepes, 100 μ g/ml de cisteína, 0.91 mM de piruvatode Na, 5mM de dextrosa, 50 μ g/ml de gentamicina, 10% de fluido folicular porcino, 10% de suero bovino neonato, 50 UI de FSH, 50 UI de LH, TCM 199 c.b.p.).

Las gotas previamente colocadas en cajas de petri estériles y cubiertas con aceite mineral prelavado en solución salina fueron incubadas con los ovocitos en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C por 22 hrs, al término de las cuales los COC's fueron trasladados a medio de maduración libre de hormonas por otras 22 hrs. Los ovocitos maduros se seleccionaron en base a su integridad, presencia de células de la granulosa semiexpandidas, zona pelucida nítida y/o presencia de cuerpo polar (meiosis I) (Figura 5d).

3.5.2 Verificación de la madurez por microscopia electrónica de transmisión (presencia de gránulos corticales periféricos).

Para verificar la madurez de los ovocitos y disminuir la subjetividad de la evaluación, 2 muestras se procesaron para microscopia electrónica (MET), donde 20 ovocitos por muestra se fijaron en solución de Karnovsky por 1 hora a 4°C. Se retiró el exceso de fijador con pipeta Pasteur y se procedió a la postfijación en OsO₄ al 1% por dos horas. Se retiró el exceso de fijador y se lavó con buffer de cacodilatos 0.2M para retirar el exceso de postfijador y montar en una gota de agarosa de bajo peso molecular al 1%. Después se procedió a deshidratación en acoholes: 50% (5min); 60% (5min); 70% (8 min); 80% (15 min); 90% (15 min), 100% (15 min), oxido de propileno (15 min) y se infiltró con oxido de propileno/resina: 3/1 (20min), 1/1 (20 min). En este paso los ovocitos infiltrados se colocaron en estufa precalentada a 60°C por 2 min para evaporar el oxido de propileno sobrante y se centrifugó a 800xg 10 min para sedimentar los ovocitos. Se agregaron dos cambios de resina pura por 1 hora y se repitió la centrifugación en ambos pasos. En este segundo paso los ovocitos se pusieron a polimerizar por 24 hrs a 60°C. La evaluación de los cortes se realizó observando la presencia de gránulos corticales en la periferia y en contacto

con la membrana plasmática del ovocito. Las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio de transmisión Zeiss M9.

3.5.3 Enriquecimiento de espermatozoides motiles

Con el fin de incrementar el número de los espermatozoides potencialmente fertilizantes, las pajillas descongeladas se filtraron en columnas de sephadex activado. La separación se basó en la técnica descrita por Graham y Graham [1990], con algunas modificaciones realizadas al protocolo original durante el desarrollo de este proyecto, por lo cual se presenta a continuación la metodología aplicada que ya incluye esas modificaciones.

La activación del sephadex se realizó agregando un gramo de sephadex G-10 a 16 ml de citrato de Na al 2.9% (volumen final de 6.25% p/v), se dejó reposar a 4°C x 24 hrs. Al día siguiente se elaboraron las columnas colocando una cama de fibra de vidrio a manera de tapón en la salida de una jeringa de 10 ml para evitar la pérdida del sephadex. Sobre este soporte se armó la columna de sephadex de 1.5 cm de espesor. La columna se mantuvo hidratada con citrato de Na al 2.9%. El paso de los líquidos se controló por medio de una llave de dos vías en la punta de la jeringa. La jeringa se montó sobre un soporte universal. Ya montada se lavó el citrato de la columna con el diluyente BTS, atemperado para evitar choques térmicos en los espermatozoides. La pajilla descongelada se decantó sobre la columna y ahí se llevó a un volumen de 3 ml, se dejaron caer las 2 primeras gotas y se monitoreó la motilidad, recuperando las gotas necesarias para obtener una concentración espermática motil de 20×10^6 espermatozoides por ml (Figura 6b).

Las gotas obtenidas se tiñeron con el fluorocromo vital Hoechst 33342 (1 µg/ml del medio), por 10 minutos a 38 °C. Los espermatozoides teñidos se centrifugaron a 800xg 10 min para retirar el excedente del fluorocromo y se resuspendieron en Tyrode's medio completo (NaCl 116mM, KCl 3.1 mM, MgSO4 0.4mM, Na H2PO4 0.3 mM, CaCl2 4.5 mM, NaHCO3 15 mM, Glucosa 5 mM, Lactato de Na 21.7 mM, Piruvato de Na 1M, HEPES 20 mM, BSA 3 mg/ml, Kanamicina 100 µg/ml, rojo fenol 20 µg/ml), incubándolos a 38°C por una hora para inducir su capacitación antes de su interacción con los ovocitos.

3.5.4 Prueba de penetración homóloga *in vitro*

Los ovocitos seleccionados como maduros se incubaron en hialuronidasa (0.1% en TCM 199) por dos minutos para retirar las células del cúmulo. El excedente de hialuronidasa se retiró con lavados en TCM 199 y se incubaron en naranja de acridina (AO 6µg/ml en TCM 199) con la finalidad de dar una tinción de contraste a los ovocitos en comparación con los espermatozoides y facilitar los conteos de penetración; los ovocitos se lavaron con TCM 199 para retirar el exceso de colorante. Se colocaron 20 ovocitos por gota 200 µl de medio NCSU-23 desarrollado por Peters y Wells [1993] (109 mM NaCl; 4.78 mM KCL; 1.19 mM Mg S0₄7H₂O; 1.19 mM KH₂PO₄; 1.7 mM CaCl₂7H₂O; 25.7 mM NaCHO₃; 5.55 mM glucosa; 7mM Taurina; 1mM hipotaurina) y se pusieron a interactuar con 40,000 espermatozoides previamente filtrados y teñidos con el fluoróculo Hoechst 33342 (Figura 5e y 5f). Las gotas previamente cubiertas con aceite mineral se incubaron por 16-18 hrs en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 38°C. Finalizado este tiempo por pipeteo se eliminaron los espermatozoides adheridos débilmente. Los ovocitos fertilizados, se montaron en una gota de medio Glicerol-PBS (9:1) en portaobjetos desengrasados y se cubrieron de la luz para su posterior observación en microscopio de epifluorescencia (olimpus Bx 51), utilizando filtros de excitación de 330-380 nm para Hoechst y de 420-490 para AO. La penetración de la zona pelúcida fue dada como positiva cuando las cabezas espermáticas se veían adheridas al ovocito y ligeramente aumentadas de tamaño o descondensadas. Todas las observaciones se realizaron en varios planos para descartar falsos positivos. Para corroborar la penetración se efectuó colocalización de las fluorescencias utilizando microscopía confocal.

3.6 Análisis estadístico

Las medias de los porcentajes de motilidad al descongelado fueron comparadas por medio de una prueba de ji cuadrada. Las diferencias en los conteos de las tinciones de viabilidad y BBC, se obtuvieron mediante comparación entre medias a través de una prueba de T student. Las diferencias en motilidad, tipo de movimiento e integridad acrosomal antes/después de la prueba de termorresistencia corta (sTMT) se analizaron por medio de la prueba T pareada. Las diferencias de estos mismos parámetros entre tratamientos (G4 vs.

T1) se analizaron por medio de la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias entre viabilidad, integridad acrosomal, células HOST + y número de espermatozoides por ovocito se analizaron por medio de la prueba exacta de Fisher. La correlación existente entre viabilidad y células HOST + se estableció por medio de una prueba de Pearson. Las diferencias entre los porcentajes de penetración de cada tratamiento se analizaron por medio de la prueba de Mann-Whitney. Todas las pruebas se corrieron utilizando el programa estadístico Minitab™ versión 13.1

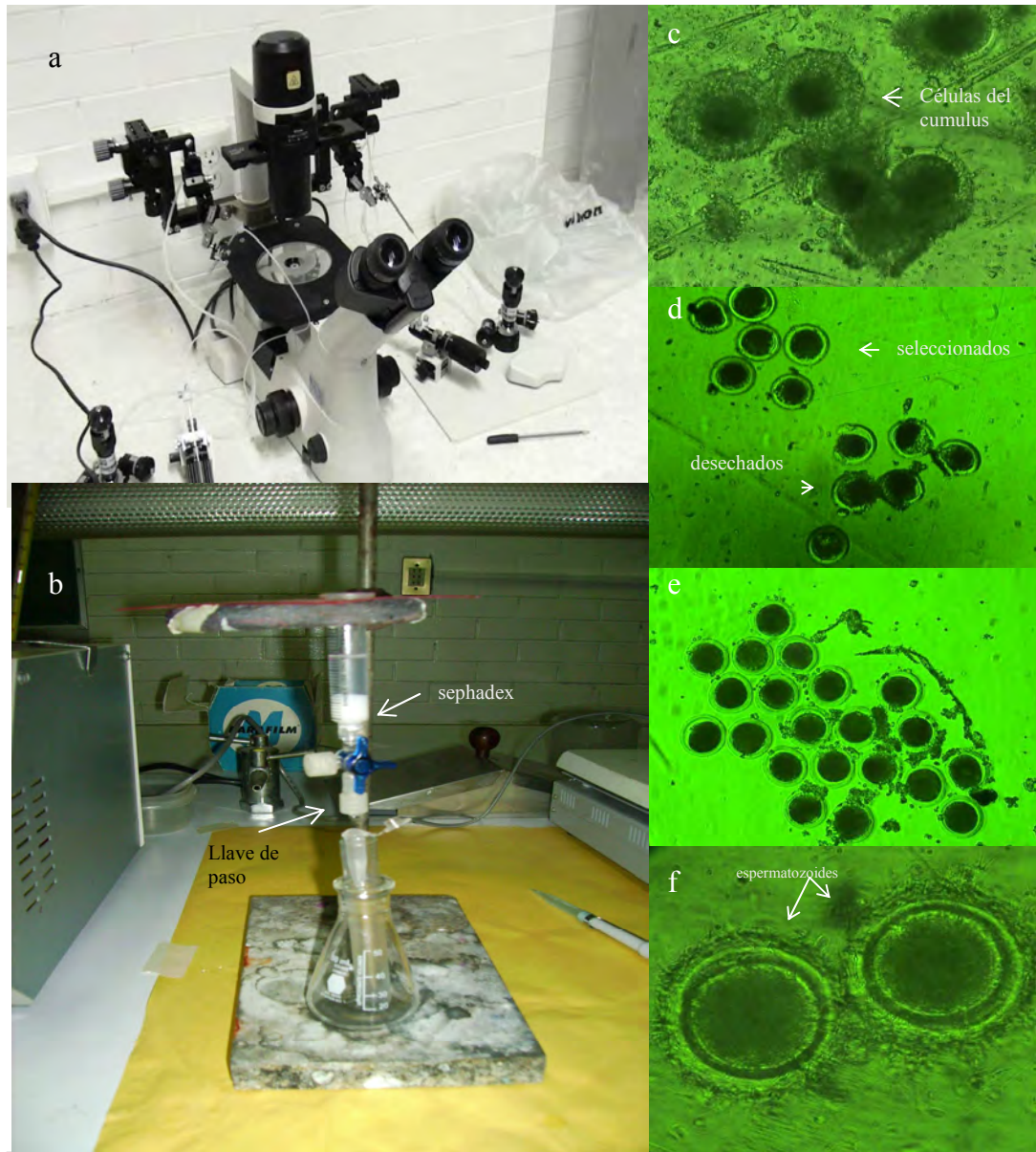


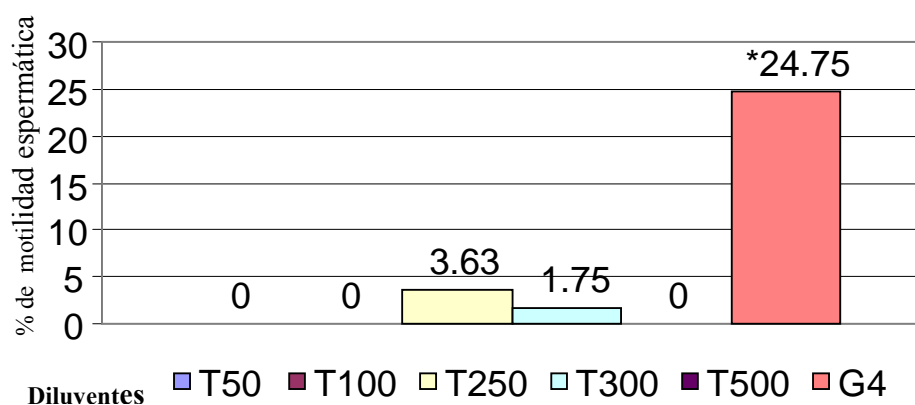
Figura 5 imágenes de la metodología aplicada para la prueba de penetración heteróloga *in vitro* (hIVP): **a)** Microscopio invertido en donde se realizaron las observaciones para la selección e interacción de gametos; **b)** columna de sephadex activado, montado sobre un soporte universal. La llave de paso de dos vías permitió la recolección de las gotas que cayeron sobre un vial de plástico atemperado; **c)** ovocitos recién recolectados donde se observan las células del cumulo compactadas alrededor de los mismos; **d)** selección de ovocitos, los ovocitos con compactos, con zonas pelúcidas íntegras y presencia de cuerpos polares se muestran en la parte superior izquierda. En la zona inferior derecha del recuadro se observan los ovocitos desechados; **e)** gota con 20 ovocitos maduros listos para interactuar con los espermatozoides; **f)** interacción de gametos, espermatozoides adheridos a la zona pelúcida de los ovocitos.

4. Resultados

4.1 Formulación de los diluyentes

4.1.1 Determinación de la concentración de trehalosa

El porcentaje de motilidad obtenido en los cinco grupos (T50, T100, T250, T300 y T500) se presentan en la Figura 6, donde se puede observar que las concentraciones molares de trehalosa entre 250 y 300 mM favorecen la motilidad, en un medio sin crioprotectores permeables. Los bajos porcentajes de motilidad obtenidos (3.63%, 1.75%) reflejan la necesidad de la utilización de un crioprotector permeable para potencializar el efecto crioprotector de la trehalosa. Las motilidades con concentraciones de 50 y 100, no ofrecen crioprotección y concentraciones mayores (500 mM) también parecen ser dañinas.



* $p < 0.05$ por prueba χ^2

Figura 6 Efecto de la concentración mM de trehalosa sobre el porcentaje de motilidad espermática

Se establece que el medio experimental por lo menos deberá alcanzar la motilidad del control (G4) que en este caso fue de $24.75 \pm 5.3\%$, de aquí surgió el siguiente experimento con la idea de valorar si la disminución en la concentración final de glicerol (Figura 6), favorecería el incremento de la motilidad. Por otra parte las lecturas en el osmómetro confirmaron que los crioprotectores no permeables de la formulación

con trehalosa incrementaron la osmolaridad del medio (416 mOsm en T1 versus 284 mOsm en G4).

4.1.2 Efecto de la concentración de glicerol.

Los resultados de la adición de diferentes porcentajes de glicerol sobre porcentaje de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal se muestran en la tabla 4, donde se puede observar que el 1% de glicerol mostró mayor número de células viables incluso que el diluyente control con 4% de glicerol ($p < 0.05$); por otra parte la motilidad es menor en los grupos experimentales que en el grupo control, es decir, un diluyente con trehalosa con 1% de glicerol muestra mayor número de células vivas, aunque con menor % de motilidad. La integridad acrosomal también se vio favorecida por la disminución en la concentración de glicerol, de ahí que a la concentración del 2% se obtuvo menor integridad que a la concentración de 1% ($p < 0.05$).

Concentración de glicerol (%)	% motilidad	Tipo de Movimiento	% de viabilidad	Integridad acrosomal
4 (G4)	26.4±0.62 ^a	3.9±0.06 ^a	18.3±0.73 ^a	7.9±0.40 ^a
2	16.4±0.47 ^b	4.1±0.10 ^b	17.9±0.52 ^a	5.4±0.42 ^b
1	16.6±0.46 ^b	4.6±0.12 ^c	21.3±0.70 ^b	10.0±0.42 ^c
0.5	14.3±0.34 ^c	4.7±0.11 ^c	14.6±0.31 ^c	7.1±0.51 ^a

medias ± error estándar
^a literales diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por comparación entre medias prueba t.

4.1.3 Valoración de los efectos de la adición de KCl sobre los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática.

Como se puede apreciar en la Figura 7, la adición de de 3.3 mM de KCl (0.25g/l) favorece el mantenimiento del equilibrio osmótico por el espermatozoide, lo que mejoró los porcentajes de motilidad al descongelado aunque sin diferencia significativa ($p > 0.05$). Por su parte la mejora en los porcentajes de viabilidad con la suplementación de KCl si mostró diferencia ($p < 0.05$).

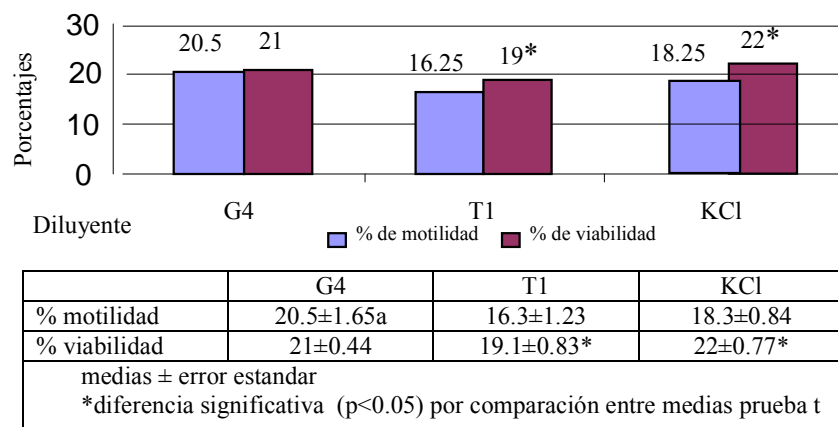


Figura 7 Efecto de la adición de KCl sobre porcentajes de motilidad y viabilidad espermática

4.1.4 Evaluación de las curvas de temperatura.

No se encontraron diferencias ($p>0.05$) entre las curvas, de enfriamiento monitoreadas en ambos diluyentes (G4 y T1). Ambos mantienen el mismo patrón de descenso, alcanzando los 4°C en el mismo lapso de tiempo, aunque el diluyente con trehalosa mostró una curva inicial más lenta y el diluyente a base de glicerol parece alcanzar más rápidamente la temperatura de estabilización a 16°C, esta tendencia disminuye conforme se alcanza la temperatura de congelación (Figura 8). Por otra parte, las lecturas durante el proceso de enfriamiento, parecen indicar que el periodo de tiempo en que la muestra llega de los 16°C a los 4°C se aproxima a los 200 minutos, por lo que el periodo de tiempo brindado por el protocolo de congelación que es de 180 minutos en la cámara fría mas 40 minutos de estabilización a 4°C durante el proceso de glicerolización, permite al semen empajillado alcanzar la temperatura requerida para llevar las muestras a los vapores de nitrógeno líquido, para ambos diluyentes (Figura 8).

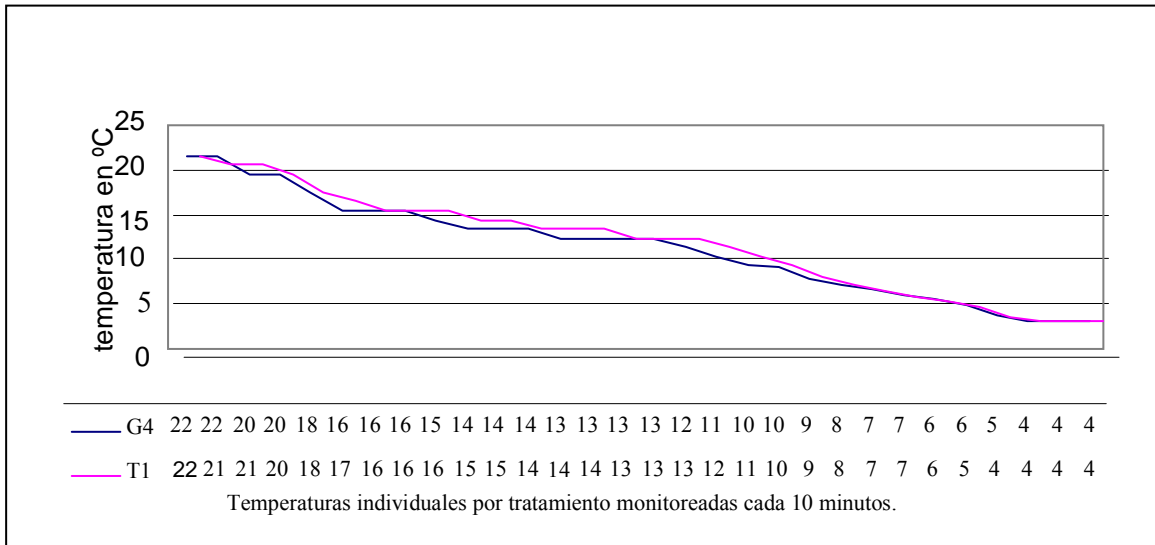
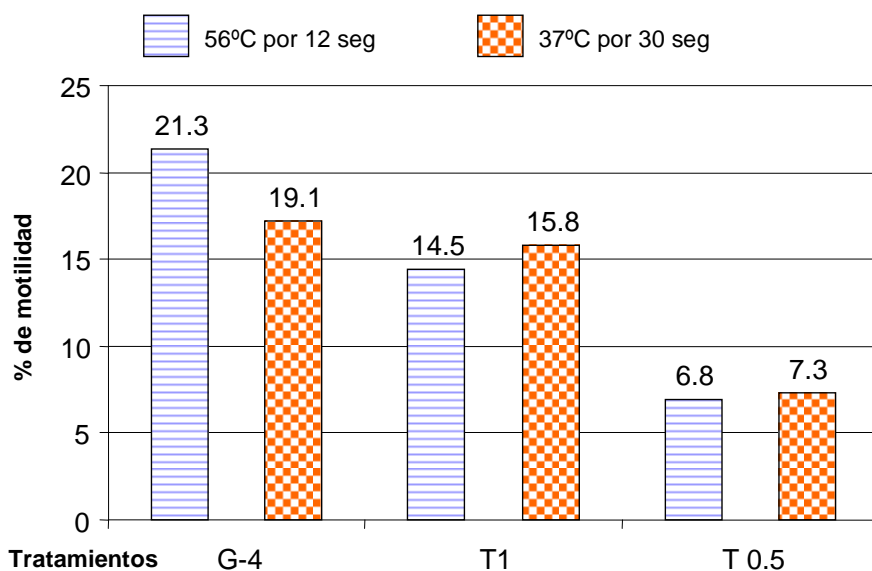


Figura 8 Curvas de enfriamiento obtenidas con los dos diferentes diluyentes.

Es importante señalar que durante el monitoreo de la curva se observó que los espermatozoides T1 mantuvieron el tipo de movimiento progresivo durante mas tiempo que los espermatozoides G4, estos últimos parecen entrar en anabiosis mas rápidamente (los espermatozoides en trehalosa no pierden el vigor ni aun llegando a los 4°C).

4.1.5 Efecto de la temperatura de descongelación.

En la Figura 9, se presenta el promedio de motilida obtenido de ocho eyaculados descongelados con las diferentes temperaturas (37°C y 56°C), para cada uno de los diferentes medios. Se puede apreciar que la mejor motilidad de la muestras criopreservadas en trehalosa se alcanzó empleando la temperatura de 37°C por treinta segundos para su descongelación, pese a que esta mejora no fue estadísticamente significativa, es importante resaltar que T1 presentó una mejora porcentual de 1.4 y T0.5 una mejora de 0.4 por ciento en comparación con la motilidad obtenida a la temperatura de descongelación de 56°C por doce segundos. Adicionalmente, la medición de la temperatura alcanzada dentro de las pajillas, valorada por medio del termómetro con filamentos termocoples, fue de 30.3°C para el descongelado a 37°C por 30 segundos y de 25°C para el descongelado de 56°C por 12 segundos.



Temp. descong.	G4	T1	T 0.5
56°C por 12 seg	21.33±0.98	14.5±0.99	6.83±0.37
37°C por 30 seg	19.16±0.79	15.8±0.749	7.33±0.49
Valor p (columna)	0.121	0.311	0.415
medias ± error estandar			
*diferencia significativa (p<0.05) por comparación entre medias prueba t			

Figura 9 Efecto de diferentes temperaturas de descongelación sobre el porcentaje de motilidad

4.2 Valoración de la integridad celular ofrecida por los diluyentes seleccionados

4.2.1 Efecto de la adición de trehalosa sobre la motilidad.

Al valorar la motilidad (M) obtenida al descongelado entre muestras (Tabla 5), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$); los espermatozoides criopreservados en el medio T1 presentaron mejor motilidad que los criopreservados en el medio T0.5 (18.59 ± 8.4 vs 7.75 ± 5.2); mientras que el medio G1, en el cual se incluyó glicerol al 1%, pero no trehalosa, presentó la menor motilidad de los cuatro medios evaluados (7.18 ± 75).

Ninguno de los medios igualó la motilidad del control G4 (Tabla 5). Al valorar la motilidad obtenida al descongelado entre machos se encuentra diferencia significativa ($P < 0.05$), entre el macho 3 y el resto de los machos evaluados (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje promedio de motilidad obtenida por macho y por tratamiento al descongelado de los 16 eyaculados bajo los diferentes diluyentes.				
Macho	T1	T0.5	G4	G1
1	21.6±3.5	9.0±1.3	24.1±3.7	7.0±1.13
2	19.2±2.1	10.8±1.7	21.2±2.7	7.5±0.6
3	12.2±2.2	3.6±1.9	12.25±2.49	5.25±1.63
4	21.25±2.9	7.5±1.6	23.6±2.4	9.0±0.37
Promedios	18.59±8.4^a	7.75±5.2^b	20.31±9.18^a	7.18±7.5^b
media ± SEM. Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P > 0.05$) obtenidas por la prueba ji-cuadrada.				

4.2.2 Valoración de la motilidad de los espermatozoides al descongelado.

Se encontró que la trehalosa no se retira completamente con los lavados por centrifugación, en la Figura 10 se observan espermatozoides lavados por centrifugación (800xg 10 min) y resuspendidos en BTS. Una tinción histológica simple de azul alciano demostró la presencia de sacáridos en el medio (Figura 10c). La comprobación por microscopia electrónica de transmisión utilizando tinción negativa, mostró agregados electrolúcidos en espermatozoides de las mismas muestras (Figura 10a), no presentes en espermatozoides descongelados y lavados del medio G4. La adición de trehalasa al medio de descongelación para facilitar la digestión de la trehalosa (resultados no presentados), demostró ser detrimental sobre viabilidad y motilidad espermáticas.

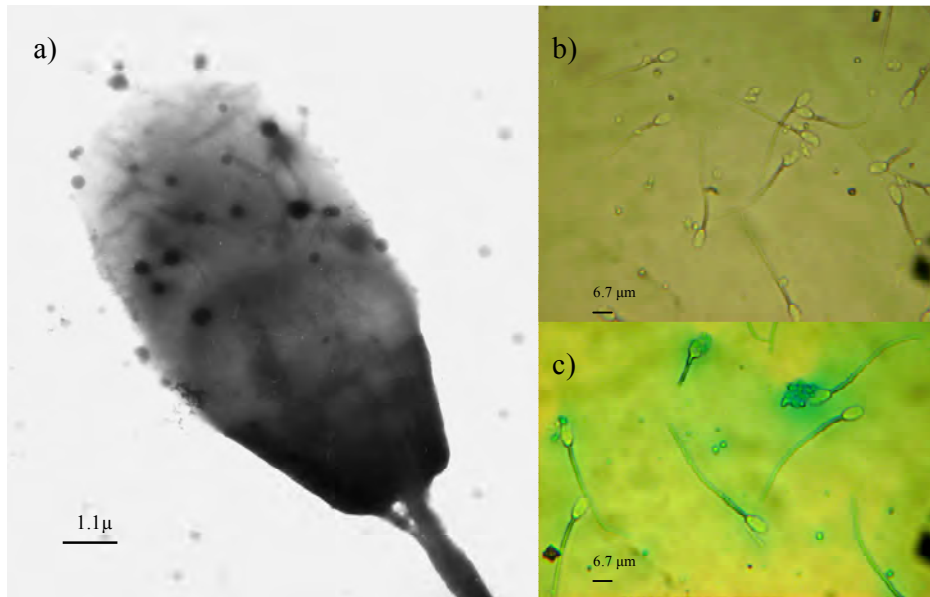


Figura 10 Detección de trehalosa por tinción azul alcian y MET.

a) Micrografía electrónica de cabeza espermática descongelada y lavada, contrastada con tinción negativa. Se observan agregados electrodensos en la membrana plasmática que no se presentan en espermatozoides descongelados en el medio G4. b) espermatozoides lavados por centrifugación y aparentemente libres de la yema de huevo del medio de congelación. c) la misma muestra de espermatozoides lavados y resuspendidos en BTS y teñidos con azul alcian, se hace evidente una coloración azul que indica la presencia de azúcares.

4.2.3 Valoración de los porcentajes de viabilidad espermática.

Los resultados de los conteos celulares de viabilidad se muestran en la tabla 6, donde se puede observar que de acuerdo al porcentaje promedio ninguno de los diluyentes adicionados con trehalosa superó el número de células vivas presentado por el diluyente G4 (control). Sin embargo, al comparar T1 contra G4 no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$). Por otra parte, sí se encontraron diferencias entre machos, siendo el macho 4 el que presentó una mejor viabilidad que el resto de los machos ($p < 0.05$), mientras que el macho 3 presentó la más baja viabilidad (Tabla 6). Adicionalmente aunque no hay diferencia significativa en la respuesta de viabilidad al tratamiento entre los machos 1 y 4, el macho 4 presentó más células viables en el medio T1 mientras que el macho 1 presenta mayor número de células viables en G4 (Tabla 6).

Tabla 6. Número de espermatozoides viables por macho y por tratamiento después del proceso de descongelación (tinción eosina-nigrosina)

Macho	T1	T0.5	G4
1	41.5±3.3	39.6±5.8	55.1±6.8
2	42.6±10.1	41.9±12.2	39.7±7.4
3	31.3±5.3*	29.5±6.6*	33.2±2.7*
4	53.5±11.9	45.25±7.35	51.0±6.6
Promedios	42.25±4.24^a	39.06±4.12^a	44.78±3.35^a
media ± SEM. Literales diferentes por línea indican diferencia significativa (P< 0.05) obtenida por medio de la prueba t. * diferencia significativa por columna			

4.2.4 Valoración de la integridad acrosomal

La Tabla 7 presenta los resultados de los conteos de integridad acrosomal, en donde puede observarse que los diluyentes adicionados con trehalosa (T1 y T0.5) mantuvieron la integridad acrosomal ($p < 0.05$) de manera notable, pues inclusive el número de células con acrosoma íntegro llegó a ser el doble al de los espermatozoides del grupo G4 (control).

Tabla 7. Número promedio de espermatozoides con acrosomas íntegros por macho y por tratamiento.			
Macho	T1	T0.5	G4
1	58.13±7.23	67.63±9.12	29.75±3.96
2	71.13±6.85	74.63±7.90	41.38±4.83
3	66.25±5.83	74.50±5.84	30.0±5.67
4	84.75±12.1	82.3±12.1	42.0±5.17
Promedios	70.0±4.33^a	74.75±4.39^a	35.78±3.57^b
media ± SEM. Literales diferentes por línea indican diferencia significativa (P< 0.05) obtenida por medio de la prueba t.			

4.2.5 Integridad ultraestructural

Ultraestructuralmente un 70% de los espermatozoides criopreservados en T1 presentaron íntegra tanto la membrana plasmática como el acrosoma (Figura 11a y 11b); por el contrario el 64% de los espermatozoides criopreservados en G4, presentaron discontinuidad de la membrana plasmática (Figura 12c), así mientras en algunos casos se presentó la pérdida evidente del material acrosomal, en otros sólo se hizo patente una franca distensión de la membrana plasmática (Figura 12d). También se hizo aparente una ligera hinchazón de la membrana plasmática que recubre el flagelo. Adicionalmente

en ninguno de las dos muestras analizadas en este estudio, se observó un cambio en la estructura de las mitocondrias o en la integridad de las estructuras microtubulares del flagelo (Figura 11c).

4.3 Estimación del potencial fertilizante por pruebas dinámicas de respuesta fisiológica.

4.3.1 Resultados de la prueba corta de termóresistencia (sTMT).

En la Tabla 8 se muestran los comparativos antes y después de la prueba sTMT. Se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de motilidad de los espermatozoides T1 ($P=0.003$), mostrando un incremento al transcurrir los 45 min (8.8 ± 0.6 contra 13.6 ± 0.84). Aunque los espermatozoides G4 presentaron un ligero decremento en su motilidad esta no fue significativa ($P>0.005$). Al comparar las motilidades entre tratamientos, se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos antes y después de la prueba, donde el tipo de movimiento fue mejor en los espermatozoides T1 que en los G4, aunque sin diferencia significativa. La integridad acrosomal fue mayor en los espermatozoides T1 que en los G4 ($P= 0.005$), incluso transcurridos los 45 minutos donde se ve la protección ofrecida por la trehalosa contra el estrés de la prueba de sTMT.

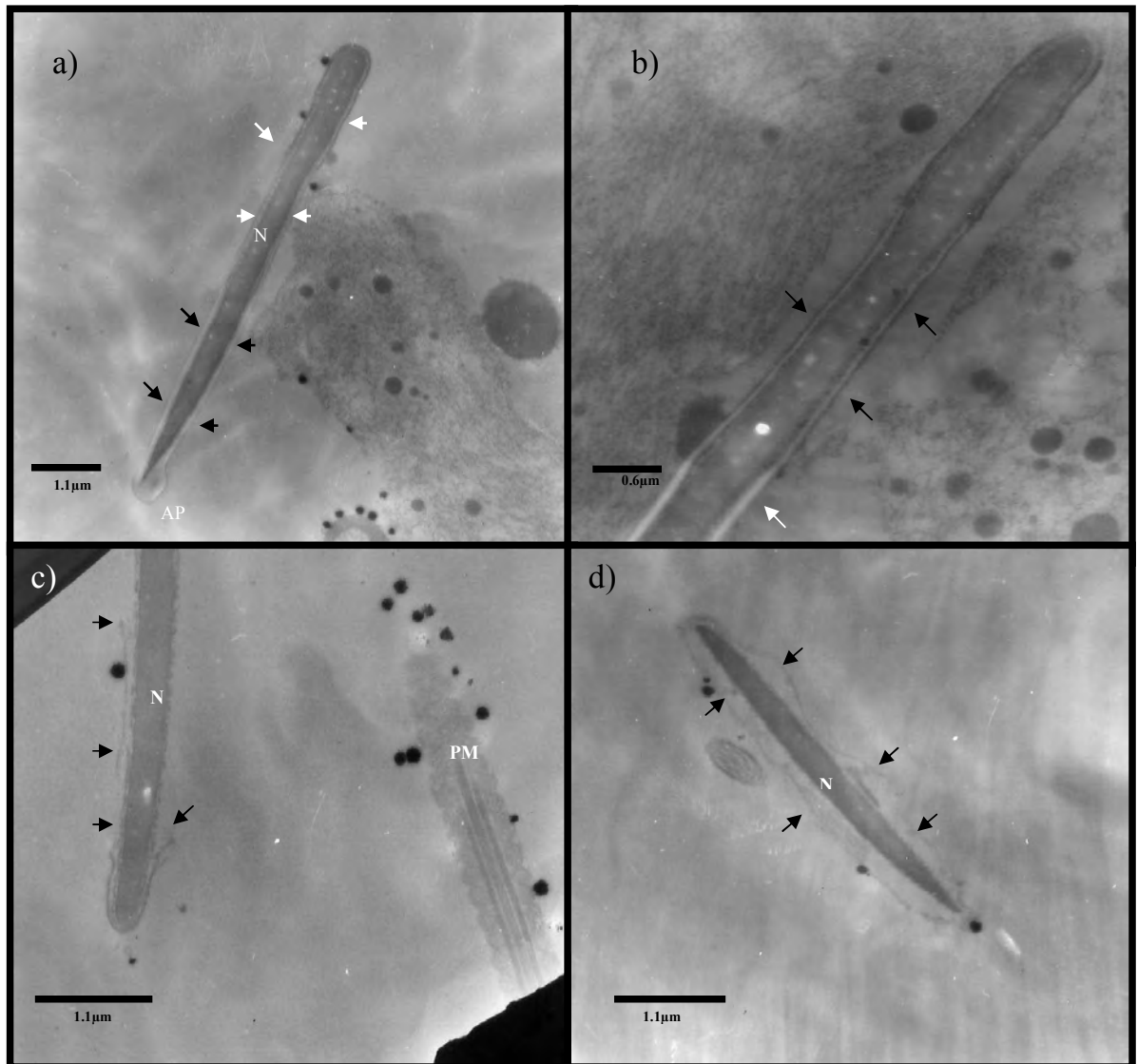


Figura 11. Micrografías electrónicas de cortes de cabezas de espermatozoides descongelados de cerdo.
a) Corte sagital de la cabeza de un espermatozoide criopreservado en trehalosa (T1). Las flechas negras señalan la región acrosomal. Las flechas blancas indican la región postacrosomal recubierta por membrana plasmática. N: núcleo; AP: protuberancia apical. **b)** Acercamiento de la región postacrosomal (flechas negras), la región más electrolúcida corresponde a la región acrosomal (flecha blanca). N: núcleo. **c)** Corte transversal de cabeza de espermatozoide criopreservado en el medio G4, donde se aprecia la pérdida de continuidad membrana (flechas negras). N: núcleo; PM: corte diagonal de la pieza media del flagelo, de otro espermatozoide donde se aprecian las mitocondrias y las estructuras microtubulares. **d)** Corte transversal de cabeza espermática criopreservada en el diluyente G4. Las flechas indican las zonas que muestran una franca distensión de membrana. N: núcleo; F: corte de un flagelo.

Tabla 8: Diferencias entre porcentajes de motilidad, tipo de movimiento e integridad acrosomal de espermatozoides descongelados en ambos medios (G4 y T1) obtenidos en la prueba de termoresistencia.									
Porcentaje de motilidad			Tipo de movimiento			Acrosomas íntegros †			
G4	T1	valor P	G4	T1	valor P	G4	T1	valor P	

			(línea) ^b			(línea) ^b			(línea) ^b
10 min	26.1±1.68	8.8± 0.6	0.004*	4.3±0.21	4.5±0.22	0.640	110.7±10.6	149.7±18.1	0.128
45 min	23.0±1.37	13.6±0.84	0.005*	2.1±0.30	2.6±0.21	0.246	49.2±4.8	77.6±8.9	0.005*
Diferencia	3.17±1.17	4.8±0.9		2.1±0.30	1.8±0.30		61.5±9.9	72±11.2	
Valor P (columna) ^a	0.042	0.003*		0.002*	0.001*		0.002*	0.001*	
^a valor p (columna) diferencia obtenidas antes y después del tratamiento (T pareada) ^b valor p (línea) diferencia obtenida con la comparación entre diluyentes (Mann-Whitney) * diferencias significativas (P<0.005) † número de espermatozoides con integridad de 200 contabilizados.									

4.3.2 Resultados de la prueba HOST/BBC.

En la tabla 9 se puede observar que los conteos de los flagelos positivos a la prueba HOST (HOST+) fueron mayores en los espermatozoides G4 ($p < 0.05$) con diferencia estadística con el grupo T1. La viabilidad también favoreció numéricamente a los espermatozoides G4 aunque no hubo diferencia estadística con el grupo T1. Por otra parte si bien la viabilidad de los espermatozoides G4 encontrada mediante la tinción E-N, fue mayor que la de los espermatozoides T1, al evaluarse por HOST/BBC se comprueba que pese a estar vivos muchos de ellos no presentan integridad acrosomal, de hecho a pesar de no encontrar diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$), el número de espermatozoides G4 HOST+ con acrosoma integro disminuyen de manera notable. La prueba de Pearson demostró que la correlación existente entre viabilidad y células HOST positivas fue alta (0.737) y significativa ($P = 0.006$), por lo que puede interpretarse que todos los espermatozoides HOST+ contabilizados están vivos y con una membrana funcional.

4.3.3 Resultados de filtración

Los espermatozoides recuperados fueron analizados con triple tinción para valorar la viabilidad e integridad acrosomal de los mismos disminuyendo el error atribuible a la subjetividad en la valoración de la motilidad, se hizo evidente que al pasar por la columna de sephadex, la viabilidad en los espermatozoides del volumen recuperado aumento (30.8 vs 68.8%), aunque la integridad acrosomal se vio ligeramente disminuida sin diferencia estadística (64.3 vs 59.7%; $p < 0.05$).

4.3.4 Porcentajes de penetración homologa *in vitro* (hIVP)

Los porcentajes de penetración observados en la prueba hIVP (Figura 12), no mostraron diferencias significativas entre G4 y T1 ($p > 0.05$) (Tabla 9). De igual forma el

número de espermatozoides promedio, que penetró en los ovocitos ($p>0.05$), tampoco mostró diferencias entre espermatozoides G4 y espermatozoides T1 ($p>0.05$).

Tabla 9. Concentrado de resultados estadísticos entre diluyentes de los diferentes parámetros analizados.					
Diluyente	Host+ *	Vivos *	Host+ AI *	espz x ovo *	% penetración''
G4	36.66± 3.89 ^a	55.33± 2.1 ^a	23.16± 4.2 ^a	14.1±0.10 ^a	62.6±6.6 ^a
T1	21.66±3.33 ^b	47.33± 4.8 ^a	20.0± 3.7 ^a	14.4±0.14 ^a	56.8± 5.33 ^a
Valor p	0.015	0.119	0.588	0.488	0.229
Host+ = espermatozoides con respuesta positiva a prueba hiposmótica Vivos= espermatozoides vivos por prueba eosina-nigrosina Host+ AI= espermatozoides positivos a prueba hiposmótica co acrosoma integro espz x ovo= promedio de espermatozoides penetrados por ovocito % penetración= porcentaje de ovocitos con espermatozoides penetraos					
* diferencias entre medias por prueba exacta de Fisher, se presentan medias± error estándar '' diferencias entre medianas por prueba Mann-Whitney; se presentan medianas± error estándar ^a Superíndices diferentes por columna indican diferencia significativa					

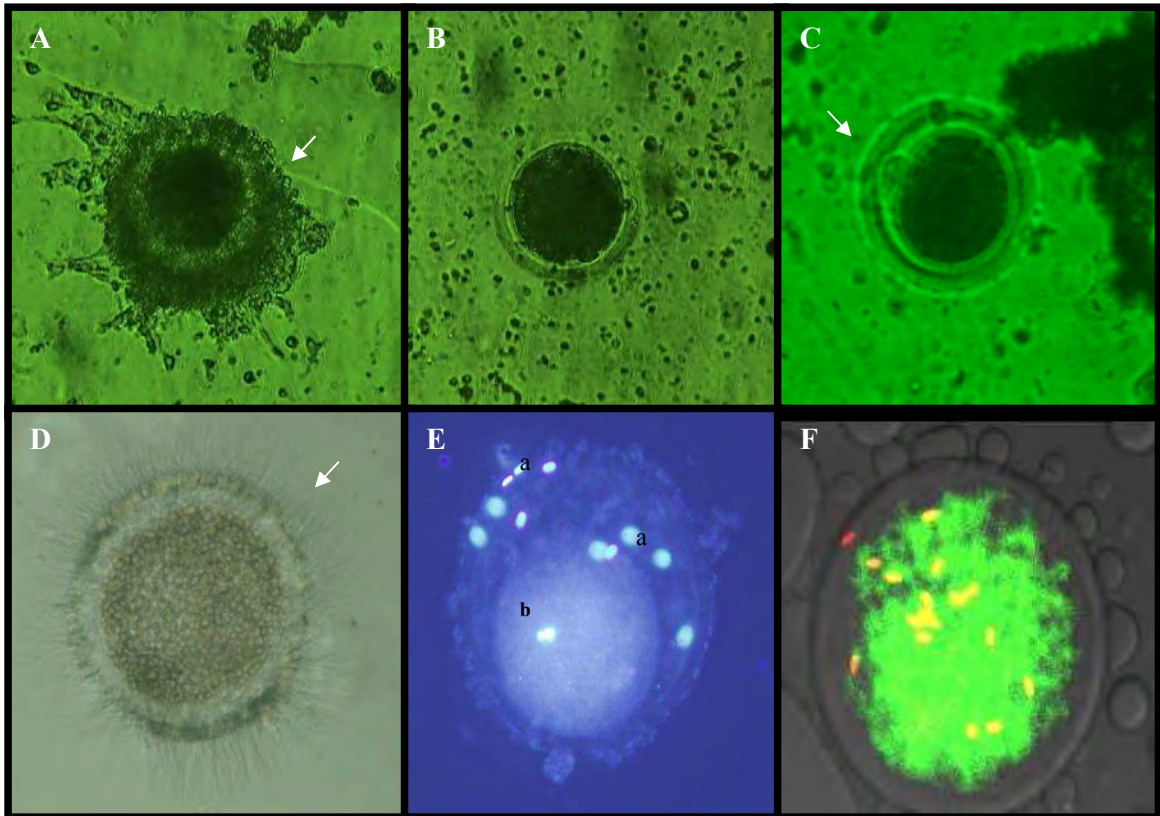


Figura 12 Imágenes de ovocitos de cerda en MIV e hIVF. **A)** Complejo cúmulo ovocito (COC), con las células del cúmulo muy compactas (flecha). **B)** Ovocito después del tratamiento con hialuronidasa para retirar células del cumulo a las 22 hrs de MIV. **C)** Ovocito después de 44 hrs de MIV, nótese el cuerpo polar (flecha). **D)** espermatozoides descongelados interactuando con el ovocito, se ven claramente adheridos a la zona pelucida. **E)** Penetración de zona por espermatozoides teñidos con Hoechst 342, **a** espermatozoides adheridos a la zona pelucida muy superficiales, **b** espermatozoide con mayor intensidad y en descondensación. **F)** Colocalización de espermatozoides Hoescht 342 con ovocito naranja de acridina (OA), al microscopio confocal.

5. DISCUSION

El diseño de un diluyente para congelación es un proceso que debe contemplar las características fisicoquímicas y el modo de acción de cada uno de los ingredientes utilizados en su formulación. La hipótesis de trabajo del presente proyecto aventuró que la utilización de trehalosa mejoraría la crioprotección celular ofrecida por el diluyente. Se sabe que los espermatozoides poseen diferente grado de tolerancia al proceso de congelación-descongelación dependiente de la especie [Watson, 2000], de ahí que en primera instancia pueda pensarse que es esta criotolerancia especie-específica la que explica el porqué de las diferencias en la respuesta a la criopreservación espermática con trehalosa en las diversas especies previamente reportadas. Sin embargo, éstas encuentran una mejor explicación si se abordan las diferencias como el resultado de la formulación de los diluyentes utilizados en los diversos protocolos que incluyeron este disacárido y no a una respuesta especie-específica hacia la adición de trehalosa.

De ahí que existan buenos resultados con la adición de trehalosa en espermatozoides de carnero a la concentración de 100mM [Aisen *et al.*, 2000, 2002, 2005; Bucack *et al.*, 2007], en espermatozoides de ratón con 198, 220 y 300 mM [Storey *et al.*, 1998; Sztejn *et al.* 2001; Thompson *et al.* , 2001] y en espermatozoides caninos con 375 mM [Yildiz *et al.*, 2000; Yamashiro *et al.*, 2007]. Los resultados reportados por Dalimata y Graham [2008], a pesar de la baja concentración de trehalosa utilizada (91mM), puede atribuirse a que en la formulación de su diluyente adicionó metil celulosa (polímero de glucosa) que favoreció o potenció el efecto crioprotector del disacárido. En el caso del bovino, Woelders *et al.*, [1997] reportan que la trehalosa disminuye el daño membranal y aumenta la viabilidad espermática, lo que a primera vista puede contradecir los resultados presentados por Chen *et al.*, [1992] y Foote *et al.*, [1993], que no reportan mejoras con respecto a su control, sin embargo estos últimos investigadores utilizaron concentraciones de trehalosa de 67 y 100mM respectivamente, a diferencia de Woelders *et al.*, que adicionaron a su medio 200mM. Por otra parte, Woelders utilizó un diluyente a base de tris-yema de huevo mientras que los segundos utilizaron leche descremada en la formulación de su diluyente y se ha reportado que el Ca^{++} tiene un efecto detrimental sobre el efecto crioprotector de la

trehalosa [Bakás y Disalvo, 1991]. La utilización de leche descremada también pudo afectar los resultados en garañones [Squire *et al.*, 2004], que no reporta resultados significativos a la adición de trehalosa y que por otra parte adicionó una baja concentración del disacárido que sólo fue de 9 mM.

En el presente estudio cuando se inició el proyecto, en el año de 2006, no existían reportes de la adición de este disacárido a criodiluyentes para espermatozoides porcinos, porque el primer punto a determinar fue conocer cual sería la concentración más adecuada para alcanzar dicho objetivo. An *et al.*, [2000] y Molinia *et al.*[1994], consideran que la crioprotección ofrecida por la trehalosa depende de la concentración de la misma en la solución del diluyente, lo que Koshimoto y Mazur [2002], interpretan como un efecto crioprotector dependiente de la masa de azúcar, que se refleja en la formación de una película protectora muy estable sobre la membrana plasmática evitando su deshidratación. Por otra parte también proponen que no sólo la masa es importante ya que la protección es proporcional a la molaridad, y esta proporcionalidad es debida al efecto coligativo del azúcar presente en la porción no congelada del medio, la que actúa como agente supresor evitando que las sales excedan su solubilidad, se congelen y se precipiten (punto eutectico), provocando cambios en la osmolaridad y encogimiento de la membrana. En este caso la propiedad coligativa de la trehalosa dependera del número de moles del disacárido presentes y no del tamaño o la naturaleza química de la misma.

Los presentes resultados sugieren que la concentración molar de trehalosa más adecuada en un medio a base de yema de huevo y glicerol para mantener la motilidad al descongelado, se encuentra entre 250 y 300mM. Esta concentración es alta si se compara con la concentración utilizada en los trabajos recién publicados por Hu *et al.*,[2008]; quienes en la formulación de su diluyente utilizan una concentración de trehalosa de 100 mM, reportando mejoras en motilidad, integridad acrosomal, integridad membranal, protección contra la capacitación inducida y reducción del daño al DNA espermático. Por otra parte también reportan que 200 mM de trehalosa disminuyen la tolerancia espermática al proceso de criopreservación. Sin embargo hay que hacer notar que el diluyente que ellos utilizan tiene una base de Tris-ácido cítrico-fructosa mas lipoproteínas de yema de huevo de baja densidad (LDL), a diferencia del presente que se elaboró con yema de huevo-

trehalosa; la coincidencia entre ambos diluyentes es la osmolaridad en su caso 430 y en el nuestro fue de 416 mosm/kg de agua. Esto sugiere que el efecto crioprotector de la trehalosa se ve favorecido por el efecto de la osmolaridad total del medio, de hecho Zeng *et al.*, [2001], reportan que al descongelado de espermatozoides de cerdo criopreservados en diluyentes con diferentes osmolaridades, un rango entre 420 y 510 mOsm/kg presenta la mayor integridad membranal y mejores porcentajes de motilidad.

El espermatozoide es considerado un osmómetro natural con una gran capacidad de contraerse y cambiar de volumen para manejar las concentraciones de agua intracelular, con lo que pretende mantener el equilibrio de solutos entre su compartimiento interno y el medio extracelular [Gao *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 2000; Ball y Anthony 2001; Petrunkina *et al.*, 2005]. Esta capacidad de respuesta se ve favorecida por medios de congelación ligeramente hiperosmóticos y se refleja principalmente en la prevención de alteraciones membranales [Gao *et al.*, 1993; Woelders *et al.*, 1997]. Nuestros resultados indican que en el caso del espermatozoide criopreservado del cerdo, la trehalosa es capaz de mantener la motilidad espermática siempre y cuando el rango de molaridad del medio se mantenga ligeramente hiperosmótico por lo cual adiciones molares por debajo de 100 o mayores a 300 mM de trehalosa a un diluyente a base de yema de huevo-glicerol, se verán reflejados en la ausencia de motilidad. Aisen *et al.*, [2002], reportan que la crioprotección sobre espermatozoides de carnero con un diluyente adicionado con trehalosa fue dependiente de la concentración del disacárido y que al utilizar concentraciones hipertónicas de éste (200 y 400 mM), la membrana espermática perdió su capacidad permeable y disminuyeron los porcentajes de motilidad al descongelado. Se ha reportado que la utilización de disacáridos como la lactosa (Corcuera *et al.*, 2007), afecta adversamente la motilidad pero provee crioprotección efectiva sobre los acrosomas [Koshimoto *et al.*, 2002].

A su vez, una disminución en la motilidad a causa de la trehalosa ha sido reportada por Garde *et al.*, [2002], en espermatozoides criopreservados de gacelas y Fernández-Santos *et al.*, [2007], reportan en el ciervo rojo que la adición de disacáridos fue en detrimento de la motilidad, aunque no interpretan por qué, podemos suponer que la motilidad se vio comprometida al utilizar un medio con una concentración tan alta como 400mM de trehalosa. Saragusty *et al.*, [2008] por su parte reportan ausencia total de motilidad en

espermatozoides criopreservados de elefante, aunque encuentran aumentos significativos en integridad celular y en viabilidad, es decir células con mejor morfología, vivas pero inmóviles.

Los resultados encontrados por Saragusty *et al.*, [2009], son muy similares a los nuestros ya que en nuestro caso la adición de trehalosa mejoró de manera significativa la integridad acrosomal y en menor porcentaje la viabilidad espermática; pero de manera similar obtuvimos gran cantidad de células vivas e integra pero inmóviles. Se ha mencionado que los disacáridos como la trehalosa deprimen la motilidad [Woelders *et al.*, 1997; Fernández-Santos *et al* 2007], lo cual puede ser el reflejo de la molaridad o/y la concentración molar de la trehalosa que aumenta la viscosidad del medio al que son adicionados [Chen *et al.*, 2000; Sampedro y Uribe, 2004]. Este aumento característico de la viscosidad de las soluciones en las que es agregada, es una de las propiedades que este disacárido ofrece para proteger a las membranas biológicas [Chen *et al.*, 2000, 2002; Sampedro y Uribe 2004; Patist y Zoerb, 2005], por lo que posiblemente esta viscosidad podría ser la que impidió el movimiento flagelar de los espermatozoides en el presente estudio. Woelders *et al.*, [1997], en su trabajo sobre el efecto de medios de congelación ligeramente hiperosmóticos sobre espermatozoides de bovino y en cuya composición se incluye la trehalosa, lograron recuperar la motilidad suprimida, retirando el azúcar de las células criopreservadas por medio de lavado y resuspensión en un medio isotónico. En ese caso los porcentajes de motilidad recuperados fueron más bajos al compararlos con los espermatozoides criopreservados en medios isotónicos. En nuestro estudio el lavado del semen criopreservado para retirar la trehalosa no permitió recuperar la motilidad de los espermatozoides. Adicionalmente, se comprobó que el retiro de la trehalosa de la suspensión espermática no es total después de dos lavados ya que las células lavadas continúan tiñéndose alrededor con azul alcian, detector de azúcares ácidos.

Una propuesta razonable es pensar que la disminución de la motilidad provocada por la trehalosa podría verse incrementada por el daño provocado por las repetidas centrifugaciones que implica el proceso de congelación-descongelación, ya que este proceso es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar daño celular irreversible [Kessopoulou *et al.*, 1992; Gosalvez *et al.*, 2003; Membrillo *et al*

2003]. Sin embargo ha sido reportado que la trehalosa posee un efecto antioxidante [Kikawada *et al.*, 2007], que se ve reflejado en la protección conferida a espermatozoides descongelados de carnero [Aisen *et al.*, 2005] y de cerdo [Hu *et al.* 2008] favoreciendo la integridad del DNA, por lo que podemos minimizar el efecto aditivo que las ROS tuvieran sobre la supresión de la motilidad en nuestro estudio, aunque no descartamos el daño mecánico provocado por las múltiples centrifugaciones.

Por otra parte se sabe que la crioprotección ofrecida por los azúcares (protectores no permeables) es incompleta, por lo que su combinación con un crioprotector permeable es lo más indicado. Esto fue patente en nuestra investigación ya que los medios a base de trehalosa-yema de huevo libre de glicerol (T250 y T300), no mostraron motilidades aceptables como para su aplicación al descongelado. De ahí que se optara por aplicar glicerol, ya que se ha reportado que su adición potencia de manera sinérgica la capacidad crioprotectora de la trehalosa [Aisen *et al.*, 2002; An *et al.*, 2000]. En contraparte, Tada *et al.*, [1990], demostraron que la crioprotección sobre espermatozoides brindada únicamente por el glicerol resulta inefectiva, mientras que Koshimoto *et al.*, [2000], proponen que la mezcla de un azúcar (en su caso refinosa) y glicerol es incluso menos efectiva que la protección brindada por el azúcar en sí. En nuestro estudio se comprobó que la motilidad observada en medios convencionales libres de trehalosa, un medio adicionado con 1% de glicerol (medio G1), presentó una motilidad menor en comparación con el diluyente control (G4) que contenía 4 % de glicerol, lo que se interpreta como la insuficiente crioprotección espermática que bajas concentraciones de glicerol ofrecen sin la presencia de un crioprotector no permeable adecuado. La menor motilidad presentada por espermatozoides G1 en este estudio contrasta incluso, con la observada en espermatozoides criopreservados en T0.5 (trehalosa + 0.5% glicerol) que presentó ligeros incrementos numéricos de motilidad, aunque sin diferencia significativa ($P > 0.05$). Por su parte el medio T1 que contenía trehalosa más 1% de glicerol, aun cuando no superó el porcentaje de motilidad observado con el medio G4, no presentó diferencia estadística con el mismo ($P > 0.05$), lo que permite proponer que la adición de trehalosa 250mM, permite disminuir la concentración de glicerol sin que la motilidad se vea severamente afectada, lo que abrió la

posibilidad de utilizar estos eyaculados congelados en T1 para las pruebas de fertilidad *in vitro*.

Por su parte la adición de KCl potencializó el efecto crioprotector de la trehalosa, lo cual concuerda con lo reportado por Revell y Glossop [1989], que reportaron diferencias significativas al agregar trehalosa y KCl a un diluyente de conservación a 16°C de mediana duración (5 días de almacenaje). Al respecto Drobnis *et al.*, 1992 reportan aumentos abruptos del KCl cerca del fin de la transición termotrópica de fases de la bicapa lipídica de la membrana celular de espermatozoides congelados de cerdo y de camarón. De acuerdo con estos autores, este incremento es un sello característico del daño por congelación. Es muy sugestivo que las mejoras obtenidas en nuestros experimentos en cuanto a viabilidad y motilidad con la adición de KCl, sean debidas a que este ion pueda ser utilizado por el espermatozoide porcino para regular su osmolaridad durante la transición de fases a la que su membrana se ve sometida durante el proceso de congelación-descongelación.

El efecto de la temperatura fue otro punto abordado por nuestros experimentos en la búsqueda de incrementar la motilidad al descongelado. Al estudiar esta variable encontramos que el semen criopreservado en un diluyente con trehalosa y envasado en pajillas de 0.5 ml, no presenta diferencia significativa entre el porcentaje de motilidad a una temperatura de descongelación de 37°C por 30 segundos y un descongelado a 56°C por 12 segundos, aunque a 37°C obtuvimos una ligera mejoría numérica, por lo cual optamos por esta temperatura de descongelación para continuar nuestro trabajo. Por otra parte las tasas de enfriamiento y descongelado son las variables que influyen la criosupervivencia espermática que pueden ser ajustadas con mayor facilidad. Por ello establecer las temperaturas de congelación-descongelación mas adecuadas, se convierte en un prerrequisito para establecer un protocolo de criopreservación óptimo. Se ha demostrado que tanto la velocidad de descongelado como la de enfriamiento son importantes ya que en ambos procesos el espermatozoide debe cruzar zonas críticas de temperatura que provocan daño celular, por ejemplo entre los 0, -15 y -25°C que son temperaturas con formación de hielo, con el consecuente estrés osmótico provocado por la deshidratación [Watson, 2000; Holt, 2000a]. La consideración general es que la respuesta espermática al descongelado depende del rango de la velocidad de congelación utilizado. Por ejemplo de acuerdo con

Fiser *et al.*, [1993], la mejor respuesta a una velocidad de congelación de 30°C por minuto, es un rápido descongelamiento de 1200°C por minuto. Son diversos los autores que reportan estos protocolos de descongelación manejando velocidades rápidas de descongelado para evitar el menor daño posible celular, al acortar los tiempos en que la célula esta sometida al estrés debido a las diversas transiciones de fase de la membrana [Larsson y Einarsson, 1976]. Bwanga *et al.*, [1990], obtienen mejores resultados descongelando a 37°C por 30 segundos a un pH de 6.3. En contraparte Gosálvez *et al.*, [2003], buscando disminuir la influencia de los individuos con baja calidad seminal (malos congeladores) mediante el uso de dosis heteroespérmicas (mezclando eyaculados de diferentes sementales), encontraron que el descongelado del semen a 42°C por 20 segundos dio los mejores porcentajes de motilidad; Cordova *et al.*, [2001] también reportan buen resultado al descongelar a 42°C pero con la variante en tiempo, su propuesta es por 12 seg. Nuestros resultados sugieren que la motilidad espermática al descongelado, se relaciona con la temperatura alcanzada por la muestra en el interior de la pajilla, ya que en el descongelado a 37°C la temperatura fue de 30.3°C mientras que a 56°C fue de 25 °C, es decir la primera tuvo una mayor temperatura en el interior de la pajilla; de acuerdo con Faiser y Fairfull [1990], un incremento en el rango de descongelado reduce la recristalización del hielo intracelular, disminuyendo el daño a estructuras internas, pero por otra Mazur [1984], sugiere que una rápida velocidad de descongelación puede inducir estrés osmótico, ya que la descongelación inmediata de la solución extracelular causa un desbalance intracelular por la rápida entrada de agua y la salida del crioprotector; al parecer una rápida curva de descongelación tiene efectos favorables sobre viabilidad, motilidad e integridad acrosomal [Pursel y Johnson, 1975; Eriksson y Rodriguez-Martínez, 2000; Cordova-Izquierdo *et al.*, 2006].

Por otra parte la prueba de termoresistencia demostró que el porcentaje de motilidad menor de los espermatozoides T1 al descongelado se ve mejorado a los 45 min de incubación a 42 °C, a diferencia de los G4 que muestran un ligero decremento en la motilidad, proporcional al periodo de incubación, por lo tanto parece ser que los espermatozoides criopreservados en 250 mM de trehalosa, tardan un poco mas en salir de la anabiosis, pero a su vez presentan mejor respuesta al estrés por aumento de temperatura.

Un decremento en el porcentaje de motilidad en pruebas de termoresistencia se ha asociado a un efecto tóxico por la liberación de amino oxidasas provenientes de los espermatozoides muertos [Fiser *et al.*, 1991], podría asumirse que la protección que la trehalosa brinda contra la temperatura durante la prueba de termoresistencia puede implicar la protección contra estas amino oxidasas. De hecho el tipo de movimiento presentado por los espermatozoides T1 es de mejor calidad que los G4, esto es importante ya que desde hace tiempo se ha reportado que el porcentaje de motilidad no es reflejo fiel de la capacidad fertilizante de un eyaculado, mientras que el tipo de movimiento tiene una mayor correlación con los índices de fertilidad obtenidos, al menos con la aplicación de semen fresco refrigerado [Estienne *et al.*, 2007].

En el presente trabajo la trehalosa, mejoró la integridad acrosomal de los espermatozoides del cerdo de manera significativa ($p < 0.05$) en más de un 35% lo que es el doble de células con acrosomas íntegros presentados al descongelado por el medio G4. Estos resultados concuerdan con lo reportado en carnero [Aisen *et al.*, 2002], conejo [Dalimata y Graham, 1997], perro [Yildiz *et al.*, 2000; Yamashiro *et al.*, 2007] y ratón [Sztein *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2001], especies donde la integridad acrosomal fue elevada. Por otra parte también concuerda con las mejoras obtenidas con el diluyente Reading de larga duración que disminuyó un 9.7 por ciento los acrosomas perdidos al compararlo contra un diluyente sin trehalosa, aún y cuando este sólo lleva una mínima cantidad de trehalosa (2.6mM) en su formulación [Revell y Glossop *et al.*, 1989] y que de acuerdo a los autores debe a la presencia de este azúcar, el mayor porcentaje de células con acrosoma íntegro. Saragusty *et al.*, [2008] no reportan motilidad al descongelado, pero obtienen un 72% de integridad acrosomal muy cercana al 77-78% que se reporta en los espermatozoides frescos. Es interesante notar que en nuestro trabajo a una menor concentración de glicerol (0.5%) los porcentajes de acrosomas íntegros obtenidos en presencia de 250 mM de trehalosa son ligeramente mayores que los obtenidos a mayores concentraciones de glicerol lo que parecer ser provocado por la citotoxicidad de este crioprotector permeable, siendo el acrosoma una de las principales estructuras alteradas por el mismo [Fahy, 1986; Murdoch y Jones, 1978; Faiser *et al.*, 1993; Buhr *et al.*, 2001].

Las observaciones al MET confirmaron lo antes expuesto ya que la trehalosa fue capaz de mantener una mayor integridad en la membrana plasmática y acrosomal, lo cual concuerda con lo reportado por Aisen *et al.*, [2005], al evaluar por MET espermatozoides de carnero criopreservados en trehalosa y que encontró aumento significativo en la integridad celular posterior al descongelado. Esto se debe a la capacidad de este disacárido de interactuar con las moléculas de agua, creando un complejo estabilizador por medio de la interacción de puentes de hidrogeno que estabiliza la membrana durante sus fases de transición, manteniendo hidratados a sus fosfolípidos integrales y a su vez manteniendo a las cadenas hidrocarbonada de los mismos en estado fluido, disminuyendo con ello la separación lateral de dichos fosfolípidos e inhibiendo el efecto de fusión entre bicapas lipídicas de las membranas celular y acrosomales [Crowe *et al.*, 1978; Tsvetkova *et al.*, 1988; Chen *et al.* 2000].

Otra variable a considerar en nuestros resultados es el efecto aportado por el semental, ya que ahora se sabe que existe una marcada diferencia individual en la tolerancia espermática a la congelación [Larsson y Einarsson, 1976; Medrano *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2005 Roca *et al.*, 2005], lo que se reflejó al valorar el porcentaje de motilidad individual, donde se encontró diferencia significativa entre el macho 3 y el resto de los machos evaluados. Esta diferencia también se presentó en los índices de viabilidad donde el macho 4 presentó una mejor viabilidad que el resto de los machos, mientras que el macho 3 presentó la más baja viabilidad (Tabla 5). También se observó que aunque no hay diferencia significativa en la respuesta de viabilidad al tratamiento entre los machos 1 y 4, el macho 4 presentó más células viables en el medio T1 mientras que el macho 1 presentó mayor número de células viables en G4 (Tabla 6). Estos resultados hacen patente cierta variabilidad individual que Waterhouse *et al.* [2006], interpretaron en un estudio comparativo como el resultado parcial de las diferencias en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) presentes en las membranas plasmáticas de los espermatozoides que varían de individuo a individuo. De hecho en ese mismo estudio la comparación se efectuó no solo entre individuos sino también entre dos razas porcinas, llegando a la conclusión de que el factor individuo y no la raza es el factor decisivo para los rangos de supervivencia e integridad membranal obtenidos al descongelado. Es con base a

esta marcada criotolerancia individual que Gil *et al.*[2005] proponen un análisis multivariado postdescongelado espermático, para predecir la fertilidad *in vitro*. Mas recientemente Hernández *et al.*, [2007], propone ajustes a las condiciones de criopreservación que reduzcan la incidencia de eyaculados con bajo rendimiento a la descongelación.

La prueba dual HOST/BBC de la cual no tenemos reportes anteriores publicados, demostró ser una combinación práctica para obtener rápidos resultados. Los flagelos reaccionados a la prueba HOST, sugieren a primera vista, que la protección de la trehalosa sobre la integridad acrosomal, no es igualmente efectiva para mantener la funcionalidad de la membrana plasmática. Sin embargo la prueba HOST/Coomassie, nos permitió enriquecer la muestra al seleccionar a los espermatozoides que permitieron la entrada de agua buscando restablecer el equilibrio osmótico, pero que además mostraban un acrosoma integro, lo que se reflejó en que la diferencia estadística, encontrada entre los HOST+ de G4 y T1, se pierde al analizar espermatozoides HOST+ AI (Tabla 9).

A pesar de que se ha encontrado una alta correlación entre los resultados de la prueba HOST y los porcentajes de penetración *in vitro* [Matas *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1998]. Esteves *et al* [2007], afirman que en semen humano fresco, la correlación entre espermatozoides vivos y HOST+ es alta, mientras que en descongelado no se ha podido correlacionar. En nuestro caso, la correlación encontrada en nuestros experimentos entre vivos-HOST+ fue alta (0.737) y significativa (P= 0.006), por lo que interpretamos que todos los espermatozoides HOST+AI contabilizados estaban vivos, lo que sugiere que pese a las diferencias en motilidad, el número de espermatozoides potencialmente fértiles en ambos tratamientos es el mismo. Por su parte Hu *et al.*, [2008], reportan que la trehalosa es capaz de disminuir la criocapacitación de los espermatozoides de cerdo, lo cual en teoría, aumentaría el tiempo de vida fértil espermática.

En este trabajo se optó por la utilización de la prueba hIVP, para comprobar el potencial fertilizante de los espermatozoides, por ser una prueba que ha demostrado tener una alta correlación con los porcentajes de fertilidad obtenidos con semen de cerdo [Martínez *et al*, 1993,1998; Matas *et al.*, 1998], ya que al superar las barreras de unión y penetración de la zona pelucida en gametos homólogos, provee un mejor indicador sobre la

capacidad fertilizante espermática que los sistemas IVF heterologos. Ha sido reportado que la utilización de ovocitos inmaduros recién recolectados de ovarios de hembras sacrificadas en rastro, puede aportar la misma información que los ovocitos maduros en una prueba hIVP, si se toma la precaución de retirar las células del cúmulo de los primeros [Matas *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1993,2001]; sin embargo en este trabajo se optó por la utilización de ovocitos maduros porque un objetivo *a posteriori* de este equipo de investigación es la obtención de embriones *in vitro*.

Aunque la prueba hIVP no mostró diferencias entre espermatozoides G4 y T1, tomando como referencia el estudio realizado por Gadea *et al.* [1988], los porcentajes de penetración obtenidos permiten clasificar nuestras muestras descongeladas como eyaculados de fertilidad intermedia (entre 40 a 60% de penetración). Existe una fuerte correlación, entre esta prueba y los resultados de fertilidad. Por lo tanto, las fertilidades esperadas deberían entrar dentro de este rango (40 a 60%), lo cual deberá comprobarse mediante la inseminación directa de hembras en estro.

Al término de esta investigación hemos comprobado que la crioprotección extracelular ofrecida por la trehalosa, mantiene la integridad acrosomal, la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides de cerdo, lo que a su vez abre interrogantes que pueden plantearse como propuestas para futuras líneas de investigación. La primer propuesta parte de que otras tecnologías de reproducción asistida no se ven limitadas por la disminución o ausencia de motilidad espermática por ejemplo, Sánchez-Partida *et al.*, [2008] al liofilizar espermatozoides de mono *rhesus* con una solución de trehalosa 300mM, encuentran a la rehidratación limitada viabilidad y nula motilidad, pero la mayoría de los centriolos proximales intactos. Ahora se conoce la importancia que los centriolos proximales espermáticos juegan durante la fertilización, ya que se convertirán en el núcleo organizador del citoesqueleto de las primeras etapas del embrión [Schaten, 1994; Palermo *et al.*, 1997], por lo que la integridad ofrecida por la trehalosa convirtió a estos espermatozoides liofilizados de mono en herramientas potenciales para la utilización en inyecciones intracitoplasmáticas. Esto abre interesantes perspectivas para la investigación y aplicación de la trehalosa en este tipo de tecnologías. La liofilización de espermatozoides de cerdo ha sido reportada con éxito por lo menos una vez [Kwon *et al.*, 2004]; en ese protocolo no se

incluye trehalosa pero los resultados de integridad y la presencia de espermatozoides vivos inmóviles obtenidos en nuestros experimentos apoyan la teoría de que la trehalosa tendría la capacidad de mantener la integridad espermática de espermatozoides porcinos sometidos a liofilización, de hecho actualmente hay por lo menos una investigación en proceso sobre este particular [Fernandez *et al.*, 2005].

La segunda propuesta retoma la idea de que varios organismos son capaces de producir trehalosa interna lo que les confiere un alto grado de protección contra el estrés medioambiental provocado por la desecación y altas o bajas temperaturas, por lo tanto es muy probable que la protección intracelular aportada por la trehalosa pudiera ser más benéfica que la aportada de manera extracelular. De hecho Eroglu *et al.*, [2002], ya han explorado esta idea inyectando trehalosa en ovocitos humanos y comprobando que una pequeña cantidad intracelular es capaz de proveer una significativa protección contra el estrés provocado por la congelación. Desde luego la inyección de un ovocito es un procedimiento viable por ser una célula mucho mayor que un espermatozoide, sin embargo existen mecanismos que ahora se encuentran en proceso de investigación como es el caso de transportadores membranales que promueven la permeabilidad de la trehalosa [Kikawada *et al.*, 2007] o la formación de canales transitorios con el mismo propósito [Gonzales *et al.*, 2000], que podrían ser empleados para introducir la trehalosa dentro de la célula espermática que va a ser congelada.

En conclusión el medio formulado con trehalosa durante este experimento, no cumplió con nuestras expectativas de mejorar significativamente la fertilidad del semen porcino al descongelado, sin embargo nuestros resultados sugieren que la adición de trehalosa:

- a) Disminuye el daño acrosomal provocado por el proceso de criopreservación del semen de cerdo.
- b) Permite la disminución en el porcentaje de glicerol hasta el 1% del volumen final de un diluyente a base de yema de huevo-trehalosa sin pérdida de la viabilidad pero con depresión en la motilidad.
- c) No favorece los rangos de penetración espermática en comparación con los obtenidos por espermatozoides criopreservados en un medio sin la presencia de trehalosa.

- d) Favorece la respuesta espermática a la pruebas de termoresistencia, mejorando los índices de integridad celular lo que sugiere que espermatozoides criopreservados con trehalosa contarán con mejor probabilidad de mantenerse potencialmente fértiles dentro del tracto reproductivo de la hembra por un periodo mas prolongado que los espermatozoides criopreservados en un medio convencional.
- e) Convierte al medio adicionado con trehalosa y bajo en concentración de glicerol en una opción para trabajar en técnicas de reproducción asistida e investigación como son la fertilización in vitro (IVF) y la inyección intracitoplasmática (ICSI).

Por lo tanto, las **recomendaciones** que sugerimos para la continuación de este proyecto son:

- a) Valorar si la integridad acrosomal obtenida en este trabajo con la inclusión de trehalosa, tiene algún efecto positivo en la técnica de sexado de semen.
- b) Probar la adición intracelular de trehalosa con la intención de experimentar la factibilidad del proceso y determinar si tiene algún efecto positivo al descongelado de los espermatozoides criopreservados de cerdo.
- c) Explorar la capacidad de la trehalosa como crioprotector en la liofilización de espermatozoides porcinos.

6. Referencias

1. Aisen EG, Alvarez HI, Venturino A y Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53:1053-1061.
2. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57:1801-1808.
3. Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalosa-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 2005; 50: 239-249.
4. Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69:1245-1250.
5. Aboagla E.M. Terada T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 809-818.
6. Allison SD, Chang B, Randholp WT, Carpenter JF. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* 1999; 365 (2): 289-298.
7. Almlid T, Johnson L. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci* 1988; 66: 2899-2905.
8. An TZ, Iwakiri M, Edashig K, Sakurai T, Kasai M. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2000; 40: 237-249.
9. Arancibia-Salinas K, Juárez-Mosqueda ML, Montaldo HH, Gutiérrez CG, Trujillo OME, Hernandez-González, Muñoz GR. Morphological perinuclear theca alterations are related to acrosome loss in cryopreserved boar spermatozoa. *Vet Res* 2007; 1(2): 49-56.
10. Bailey JL, Lesard C, Jacques J, Brèque c, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 2008; 70: 1251-1259.
11. Ball BA, Vo A. 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.

12. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10 (1): 49-62.
13. Barrientos-Morales M, Arancibia-Salinas K, Trujillo OME, Muñoz-Gotera RJ, Montiel-Palacios F, Juárez-Mosqueda ML. Is there relationship between the PT-substructure an acrosome loss of boar spermatozoa following freezing – thawing or acrosomal reaction. *J Anim Vet A* 2009; 8 (1): 155-164.
14. Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29: 1245-1251.
15. Batghate R. Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and is potential for artificial insemination. *Theriogenology* 2008; 70: 1234-1241.
16. Bakás LS, Disalvo EA. Effect of Ca⁺⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 1991; 28: 347-353.
17. Berlinguer F , Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M, Naitana S. Cryopreservation of Eropean Mouflon (*Ovis gmeli musimon*) semen during the non-breeding season by the use of trehalosa. *Reprod Dom Anim* 2007; 42: 202-207.
18. Bhur M, Fiser P, Bailey J and Curtis E. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alter boar sperm and their membranes. *J Androl* 2001; 22 (6) ; 961-969.
19. Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. Morfolgia espermàtica en porci=Morfología espermática en porcino=Morphology of boar spermatozoa, Institut d'estudis Catalans, Barcelona, 2000, pp. 47-48.
20. Bucak M N, Atessahim A, Varisli Ö, Yüce A, Tekin N, Akcay A. The influence of trehalosa, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 2007; 67:1060-1067.
21. Bwanga CO, Braganga MD, Einarsson S, Rodriguez-Martinez. Cryopreservation in mini- and maxi-straws. *J Vet Med A* 1990; 37: 651-658.
22. Campos I, Coy P, Romar R, Ruiz S, Gadea J. Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus–oocyte complexes *in vitro* penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* 2001; 55: 1489-1500.

23. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F and Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 2001; 121: 395-401.
24. Cerruti P, Segovia de Huergo M, Galvagno M, Schebor C, Buera M. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54: 575-580.
25. Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Med J* 2004; 45 (6) : 1107-1114.
26. Chen T, Bhowmick S, Sutteck A, Fowler A, Toner M. The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 2002; 44: 301-306.
27. Chen T, Fowler A, Toner M. Brief communication, Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40: 277-282.
28. Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm, *Cryobiology* 1993; 30: 423-431.
29. Christopher-Henings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ. Persistence of porcine reproductive syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 456-464.
30. Cordova-Izquierdo BA, Oliva JH, Lleo B, García-Artiga B, Corchera BD, Pérez-Gutiérrez JF. Effect of different thawing temperatures on the viability, *in vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Anim Reprod Sci* 2006; 92: 145-154.
31. Córdoba IA, Gutiérrez JF. *In vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml straws. *Theriogenology* 2002; 57: 2119-2128.
32. Córdoba IA, Pérez JF, Lleo B, García A, Martín 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.
33. Cordova IA, Hernandez P E, Fernandez R F, Saltijeral OJ, Pérez G JF, Martín R S, García A C, Lleo C.B. Congelación del semen de Verraco, UAM -X, Division CBS 2001.

34. Crowe JH, Crowe LW, Carpenter JF, Aurell WC. Stabilization of dry phospholipid bilayers and protein by sugars. *Biochem J* 1987; 242: 1-10.
35. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 2000; 5: 46-52.
36. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Cryobiology* 1997; 48: 831-841.
37. Eriksson BM, Rodríguez-Martínez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2000; 63: 205-220.
38. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* 2002; 77(1) : 152-158.
39. Erdag G, Eroglu A, Morgan JR, Toner M. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 2002; 44: 218-228.
40. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *Inter Braz J Urol* 2007; 33(3) : 364-376.
41. Estienne MJ, Harper AF, Day JL Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol* 2007; 7(3): 221-231.
42. M.G. Fahy. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1-3.
43. Fernández–Santos MR, Martínez- Pastor F, Garcia-Macia V, Estes MC, Soler AJ, Paz P, Anel L, Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian reed deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67:738-753.
44. Fernandez DL, Turlant-Labeaga J, Meyers S. A novel technique for preservation of boar sperm: Desiccation using the disaccharide trehalose. Project 05-04-112. California State University Agricultural Research Initiative. <http://ari.calstate.edu/Projects/ProjectDetails.aspx?ProjectNumber=05-04-112>
45. Fiser P, Fairfull R, Hansen C, Panich P, Shrestia J, Underhill L. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm a

- influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Rep Dev* 1993; 34:190-195.
46. Fiser PS, Hansen C, Underhill L, Marcus GJ. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 1991; 28: 454-459.
 47. Fiser PS, Fairfull R. Combined Effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol Rep Dev* 1990; 25: 123-129.
 48. Foote RH, Chen C, Brockett C, Kaproth MT. Fertility of bull frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J Dairy Sci* 1992; 76: 1908-1913.
 49. Flores GHF. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. Fes-C UNAM 2005.
 50. Gadea J, Matás C, Lucas X. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 1998; 56: 95-108.
 51. Garde JJ, Soler AJ, Cassienello J, Crespo C. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol Reprod* 2002;69: 602-611.
 52. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod* 1993; 49: 112-123.
 53. Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology* 2008; 70: 1260-1268.
 54. Gilmore JA, Du j, Tao J, Peter At, Critse JK. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 87-93.
 55. Gosálvez LF, Vidal A, Valdelvira J, Babot D. Influencia del tiempo de crioconservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heterospermicas con baja calidad. *Archiv Zoot* 2003; 52: 81-84.
 56. Graham EF, Graham JK. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and the fertility of bovine semen. *J Dairy Sci* 1990; 73: 91-97.

57. Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001; 122: 889-898.
58. Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70: 1225-1233.
59. Hamamah S, Doyere. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30:59-64.
60. Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29; 26-38.
61. Hammit DG, Martín PA. Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled rate freezing in straws. *Theriogenology* 1989; 32:359-368.
62. Hernandez H, Roca J, Gil MA, Vásquez JM, Martinez EA. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 2007; 67: 1436-1445.
63. Holt WV, Medrano A, Thurston ML, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 2005; 63: 370-382
64. Holt MV, Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences, *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
65. Holt MV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.
66. Honadel TE, Killian GJ. Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology* 1988; 25: 331-337.
67. Hounsa C, Brandt E, Thevelein J, Hohmann S, Prior B. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 1988; 144: 671-680.
68. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 2008; 57: 257-262.

69. Hu JH, Li QW, Gang L, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci* 2009; 112 (1-2): 107-118.
70. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod Dom Anim* 2009; Article in press doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00975.x
71. Huo LJ, Yue KZ, Yang ZM. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during *in vitro* storage at different ambient temperatures. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14: 509-514.
72. Ivanova M, Mollova M. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 1993; 40: 397-410.
73. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-228.
74. Jones AR, Chantril L, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 129-134.
75. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 143-172.
76. Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT, Sybesma W. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J Anim Sci* 1981; 52 (5):1130-1136.
77. Juárez-Mosqueda ML and Mujica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol* 1999; 128: 225-36.
78. Katkov N, Katkova JK, Critser P. Mazur, Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 1988; 37: 325-338.
79. Kessopoulou E, Tomlinson M, Barrat C, Bolton A, Cooke D. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fert* 1992; 94: 463-470.

80. Kheirilomoom A, Satpathy GR, Török Z, Banerjee M. Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells. *Cryobiology* 2005; 51(3): 290-305.
81. Kikawada T, Saito A, Kanamori Y, Nakahara Y, Iwata KI, Tanaka D, Watanabe M, Okuda T. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *PNAS* 2007; 104 (28): 11585-11590.
82. Koshimoto C, Mazur P. The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 2002; 45: 80-90.
83. Koshimoto C, Gamliel E, Maszur P. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of Mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose, *Cryobiology* 2000; 41: 204-231.
84. Krozdrowski R. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of European brown hare (*Lepus eropaeus pallas*, 1778) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; Article in press doi: .1016/j.anireproscy.2009.02.012
85. Kwon, Park K, Niwa K. Activation, pronuclear formation and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1430-1436.
86. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259): 680-685.
87. Larson LJ, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm for several species. *Mol Rep Dev* 1999; 52: 445-449.
88. Larsson K, Einarsson S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa: Influence of thawing diluents and of boars. *Acta Vet Scand* 1976; 17: 43-62.
89. Leslie S, Israeli E, Ligthart B, Crowe J, Crow L. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microb* 1995; 61 (10): 3529-3597.
90. Maes D, Nauwync H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, Kruif A, Van Soom A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination. An overview. *Theriogenology* 2008; 70: 1337-1345.
91. Martinez E, Vazquez JM, Matas C, Roca J, Coy P, Gadea J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 1993; 40: 547-557.

92. Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Blanco O, Lucas X, Matas C, Gil MA. Relationship between homologous *in vitro* penetration assay and boar semen fertility. *Theriogenology* 1998; 49 (1): 371.
93. Martinez OMC, Juárez-Mosqueda ML, Hernandez J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006; 66 (8): 1969-1975.
94. Matas C, Martinez ER, Vázquez J M, Roca J, Gadea J. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 1993; 46: 503-513.
95. Mazur P. Freezing of live cells: mechanisms and implications, *Am J Physiol* 1984; 247: C125-C142.
96. Medrano A, Holt WV. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado descongelado. *Arch Zoot* 1998; 47: 319-327.
97. Medrano A, Watson PF, Holt WV. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction* 2002; 123: 315-322.
98. Membrillo, Cordova A, Hicks J, Olivares I, Martin V, Valencia J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia* 2003; 28 (12): 699-704.
99. Molinia FC, Evans G, Quintana-Casares PI, Maxwell WMC. Effect of monosaccharide and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994; 36: 113-122.
100. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 323-334.
101. Mújica A, Navarro FG, Hernández G, Juárez-Mosqueda ML. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Technique* 2003; 61: 76-87.
102. Murdoch RN, Jones RC. The effects of glycerol on the metabolism and ultra structure of boar spermatozoa. *J Reprod Fert* 1978; 54: 419-422.
103. Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability (Lp) of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on

- interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology* 1997; 35: 79-92.
104. Orozco BMG, Lemus FC, Hernández BJA, Navarrete MR, Juárez- Mosqueda ML. Alterations in the plasmatic membrane due to damages of the perinuclear theca of ig preserved spermatozoa. *Pak J Biol Sci*, 2008; 11(10):1360-64.
 105. O'shea T, Dacheaux JL, Paquignon M, Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen. *J Reprod Fert* 1979; 55: 277-285.
 106. Palermo GD, Colombero LT, Rosenwaks Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod* 1997; 2: 19-27.
 107. Patist A and Zoerb H. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 40:107-113.
 108. Pereira CS, Lins RD, Chandrasekhar I, Freitas LC, Hünerberg PH. Interaction of the Disaccharide Trehalose with a phospholipid bilayer: A molecular dynamics study. *Biophys J* 2004; 86: 2273-2285.
 109. Pérez-Llano B, Lorenzo J L, Yenes P, Trejo A, García-Casado P. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 2001; 56: 387-398.
 110. Peters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Supple* 1993; 48: 61-73.
 111. Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species (Review). *Reproduction* 2007; 134: 3-17.
 112. Petrunkina AM, Gröpper B, Töpfer-Petersen, Günzel-Apel AR. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 2005; 63:1390-1406.
 113. Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF and Töpfer-petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction* 2004; 127: 105-115.
 114. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164:666.

115. Purdy PH. Swine gene banking: A quality control perspective on collection, and analysis of samples for a national repository. *Theriogenology* 2008; 70: 1304-1309
116. Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure, *J Anim Sci* 1975; 40: 99-102.
117. Rath D, Johnson LA. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Dom Anim* 2008; 43(suppl.2): 338-346.
118. Ramlov H, Westh P. Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to -196°C: Effect of cooling rate, trehalose level, and short-term acclimation. *Cryobiology* 1992; 29: 125-130.
119. Revell SG, Glossop CE. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim Prod* 1989; 48: 579-584.
120. Riddle VW, Lorenz FW. Nonenzimatic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in Ringer's phosphate suspension of avian spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 50 (1) 27-34.
121. Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Dom Anim* 2006; 41(suppl.2): 43-53.
122. Roca J, Rodriguez-Martínez H, Vazquez JM, Bolarin A, Hernandez H, Saravia F, Wallgren M, Martinez EA. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination, in: Asworth and Kraeling (Eds.), *Control of pig reproduction VII*, Nottingham University Press, 2005, pp 262-275.
123. Rogers BJ, Yanagimachi. Retardation Guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of piruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 13;568-575.
124. Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázques J, Rodríguez-Martinez H, Martínez EA. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate *in vitro* fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology* 2005; 64: 305-316.
125. Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology*, 2008; 70: 1260-1268.

126. Rudolph A and Crowe. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 1985; 22: 367-377.
127. Sánchez-Partida LG, Simerly CR, Ramhalo S. Freeze-dried primate sperm retains early reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008; 89 (3): 742-745.
128. Sampedro JG and Uribe S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 2004; 256/257: 319-327.
129. Sampedro JG, Cortés P, Muñoz-Clares RA, Fernández, Uribe S. Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1544: 64-73.
130. Sampedro JG, Guerra G, Pardo JP, Uribe S. Trehalose-mediated protection of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration. *Cryobiology* 1998; 37:131-138.
131. Saragusty J, Hilderbrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; (Article in press) doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.11.010
132. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. A combination of trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to *in vitro* migration and adhesion properties. *Transfusion* 2005; 45: 622-633.
133. Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization (Review). *Dev Biol* 1994; 165: 299-335.
134. Singer MA, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin and Yang of trehalose. *TIBTECH Reviews* 1998; 16:460-467.
135. Sola-Peña M, Meyer-Fernandes JR. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Archiv Biochem Biophys* 1998; 360: 10-14.

136. Squires EL, Keith SL and Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 1056-1065.
137. Storey BT, Noiles EE and Thompson KA. Comparison of Glycerol, the Polyols, trehalose, and Raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 1998; 37: 46-58.
138. Sutovsky P and Schatten G. Paternal contributions to the mammalian Zygote: Fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 2000; 195: 1-65.
139. Sutovsky P, Oka R, Hewitson L and Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol* 1997; 188: 75-84.
140. Szein JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 2001; 41: 28-39.
141. Tada N, Sato M, Yamanoi J, Misorgi T, Kasai K, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J Reprod Fert* 1990; 80: 511-516.
142. Thilmant P. Congélation du sperme de verrat en paillette de 0.5 ml resultants sur le terrain. *Ann Méd Vét* 1997; 141: 457-462.
143. Thompson KA, Richa J, Liebhaber SA, Storey B. Dialysis addition of trehalose/ glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young. *J Androl* 2001; 22: 2: 339-344.
144. Tibbet M, Sanders F, Cairney J. Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in *Ectomycorrhizal basidiomycetes (Hebeloma spp.)*. *Mycorrhiza* 2002; 12: 249-255.
145. Tsvetkova N, Tenchov B, Tsonev L, Tsvetkov T. Dependence of trehalose protective action on the initial phase state of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, *Cryobiology* 1988; 25: 256-263.
146. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. Within and between bred differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 2006; 131: 887-894.

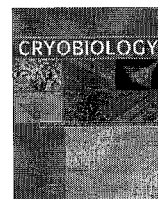
147. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-492.
148. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891
149. Wilmut I, Salamon S, Polge C. Deep freezing of Boar Semen. II. Effects of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen-glycerol contact on survival spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 1973; 26: 231-237.
150. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 1997; 35: 93-105.
151. World Animal Health Organization. Terrestrial Animal Health Code (2006) [http: www.oie.int/eng/normes/mcode/code2006_back/en_chapitre_1.4.6.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2006_back/en_chapitre_1.4.6.pdf)
152. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M and Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2000; 54: 579-785.
153. Yamashiro H, Narita K, Sugimura s, Han YJ, Sugarawa A, Mohoraku K, Nakazato F, Cono T, Yoshida M and Sato E. Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by artificial vagina (AV). *Animal Rep Science* 2007: 102 (1-2); 165-171.
154. Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR. *In vitro* Maturation and fertilization Techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci* 1998; 76: 3079-3089.
155. Zeng WX, Shimada M, Isobe N, Terada T. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology* 2001; 56: 447-458.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycryo

Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity[☆]

Oscar Gutiérrez-Pérez^{a,d,*}, María de Lourdes Juárez-Mosqueda^b, Salvador Uribe Carvajal^c,
María Elena Trujillo Ortega^a

^a Department of Pig Production, FMVZ, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, CP 04510, Mexico

^b Department of Morphology, FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, CP 04510, Mexico

^c Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, CP 04510, Mexico

^d Department of Experimental Medicine, Instituto Nacional de Pediatría, México DF, CP 04530, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2008

Accepted 10 February 2009

Available online 20 February 2009

Keywords:

Trehalose

Glycerol

Boar spermatozoa

Semen cryopreservation

Freezing extenders

Acrosomal integrity

ABSTRACT

The use of glycerol for boar semen cryopreservation results in low fertility, possibly due to toxicity. This has led to recommend the use of solutions with less than 4% glycerol. Trehalose is a disaccharide known to stabilize proteins and biologic membranes during processes such as cryopreservation. Thus, it was decided to evaluate the cryoprotective effect of glycerol/trehalose mixtures. Effects on motility (M), viability (Vb) and acrosomal integrity (nA) were evaluated. Sperm samples were frozen in three different extenders: G4 contained 4% glycerol; T1 contained 1% glycerol plus 250 mM trehalose and T0.5 was constituted by 0.5% glycerol plus 250 mM trehalose. All extenders yielded similar post-freezing/thawing motility rates. Viability was diminished in T0.5 as compared to the others. In regard to acrosome integrity, it was twice as high ($P < 0.05$) in the trehalose enriched media as in G4, the glycerol-only extender. Thus, T1 twice as many spermatozoa were alive, motile and intact, than in either T0.5 or G4, i.e. during freeze/thawing the use of T1 resulted in twice as many fertile cells as when using the other extenders. During our study, we noted that there were wide individual variations both in sperm viability and in motility.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Usually, freezing extenders for boar semen contain egg yolk plus other agents such as buffers, additives and cryoprotectants. The most frequently used cryoprotectant is glycerol, which has to be used at low concentrations (under 4%) due to its potential toxicity [9,31,39]. In this regard, it has been proposed that glycerol and other permeating cryoprotectants are osmotically active, changing water contents and causing stress as they enter or exit the cell [9,32,51]. In the specific case of boar spermatozoa, these cells use glycerol as a carbon source, even in the presence of other substrates such as glucose [40]. The pathway for glycerol utilization is not glycolysis, probably due to the low glycerol kinase activity observed in these spermatozoa [31]. Instead, the non-glycolytic metabolism of glycerol results in the accumulation of toxic metab-

olites such as methylglyoxal [44]. The methylglyoxal-mediated activation of phospholipases and proteases causes irreversible damage to the cell [31,44].

Trehalose is a non-reducing disaccharide, constituted by two units of glucopyranose-D with a glycosidic $\alpha 1-\alpha 1$ link [41]. Trehalose is produced by diverse organisms in response to stress conditions such as dehydration [13,37], extreme temperatures [42,53] and osmotic shock [29]. Trehalose stabilizes a great diversity of biomolecules, including proteins, membranes, cells and tissues. Examples of the ability of trehalose to preserve bio-structures are lyophilized red blood cells [32], cryopreserved fetal skin [19], human oocytes [20], hematopoietic cells [48], murine embryos [28], and organs programmed for transplantation [14]. Probably trehalose protects biomolecular structures through both, the replacement of water in hydrogen bonds [15] and trapping essential hydration water molecules [41]. Also, a role of viscosity in the maintenance of the biomolecular structure has been proposed [46].

In regard to the use of trehalose in sperm cryopreservation there are conflicting reports. Trehalose has not been useful in bull [16,23], stallion [49], Iberian red deer [21], and gazelle [24]. In these spermatozoa, the percentage of motility, viability and acrosomal integrity was not significantly better than in the control diluents. In contrast, trehalose did improve the aforementioned

[☆] This work was partially funded by DGAPA-UNAM project PAPIIT IN 206506. Roberto Martínez general manager of CEIEPP-FMVZ provided the boar semen samples.

* Corresponding author. Address: Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, México DF, CP 04510, Mexico. Fax: +52 55 56 22 58 93.

E-mail address: koala630816@yahoo.com.mx (O. Gutiérrez-Pérez).

parameters in ram [3–5,11], goat [1,2], mouse [50,51,54], rabbit [18], european mouflon [8] and two different breeds of dog [57,58]. In all these latter species, after thawing, a greater percentage of cells exhibited intact membranes, higher motility, better fertility rates and higher percentage of embryos obtained by *in vitro* fertilization (IVF).

Until recently, for boar spermatozoa there were no references on the use of trehalose, although there was an antecedent using the Reading medium, which contains trehalose. This long term extender was used for semen preservation at 16 °C [43]. In this report, an increase in the percentage of acrosomal integrity, motility preservation up to the sixth day, increased fertility and number of embryos obtained were observed [43]. In addition, while this manuscript was already under review, a report on the use of a trehalose extender appeared which suggests that the use of trehalose results in better integrity and motility in boar spermatozoa [30].

The aim in the present study was to analyze the cryoprotective effect of glycerol versus trehalose/glycerol mixture extenders on motility, viability and acrosomal integrity rates on the boar spermatozoa. Trehalose addition allowed to decrease the glycerol concentration in the medium and resulted in increased spermatozoa integrity.

Materials and methods

All reagents were of the best quality available commercially. Glycerol and trehalose were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glucose anhydrous powder was purchased from JT Baker Mexico (Xalostoc, Mex) and Coomassie brilliant blue was from AMRESCO (Solon, OH, USA). Eosin Y and nigrosin were from Certistain® MERCK (Darmstadt, F.R. Germany), and Spu's resin, lead citrate and uranyl acetate were from Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, USA).

Medium osmolarities were measured and adjusted in a freezing point osmometer, model OSMETTE A 5002 high sensitivity (Precision Systems Inc.) and pH media, were adjusted in a benchtop pH 510 meter (OAKTON®). Motility, integrity and viability of cells were counted in a LEICA microscope (DM LS II/98 model). MET observations were carried out in a Zeiss M9 transmission electron microscope.

Semen collection and freeze-thawing method

Ejaculates from four mature boars were collected by the hand gloved technique, to evaluate immediately after collection the percentage of motility, determine abnormalities and sperm concentration; ejaculates with less than 85% motility or more than 15% abnormalities were discharged. For transportation to the lab, the selected ejaculates were diluted 1:1 (v:v) in Betsville Thawing Solution (BTS). All boars were property of the Center of Teaching Research and Extension of Swine Production (CEIEPP) from the School of Veterinary Medicine and Zootechny of the Autonomous National University of Mexico (UNAM).

The two-step freezing protocol proposed by Westerndorf, as modified by Córdoba [17] was followed; in first step semen samples were centrifuged by 800g 10 min, and supernatant was discarded. Immediately, a glycerol free diluent A (For diluent composition, see under freezing extenders) was added to semen adjusting to sperm concentration at 600×10^6 ml, and stabilized by 60 min at room temperature. Then extended semen samples were cooled from 22 to 4 °C over a period of 180 min. In a second step (glycerolisation), the cooled sperm samples were mixed with increasing concentrations of glycerol until reaching the desired final concentration (diluent B). This procedure involved mixing a

glycerol-containing diluent (2×) added in five aliquots of 10% of the final volume desired. Additions were made every 10 min. This allowed a gradual increase of glycerol, minimizing possible osmotic stresses. All samples were packed using 0.5 ml plastic straws, and sealed with polyvinyl alcohol. Then straws were held over liquid nitrogen vapors (4 cm) for 20 min before plunging them into liquid nitrogen. This procedure allowed us to reach the optimal rate reported for boar sperm freezing of -30 °C/min [22].

After 15 days of cryopreservation [25], straws were thawed for 30 s in a water bath at 37 °C [12]. Straw contents were placed in tempered assay tubes, previously supplemented with BTS in a 1:6 v/v thawed semen/BTS proportion. Samples were maintained 10 min at 37 °C before evaluating the effect of temperature on motility.

Sperm-freezing extenders

Each ejaculate was divided and suspended in the following extenders: Diluent A contained 20% egg yolk; 230.8 mM glucose (for G1 and G4) or 20% egg yolk, 250 mM trehalose (for T1 and T0.5). From diluent A, diluents B were prepared by adding: G4 4% glycerol; G1, 1% glycerol; T1 1% glycerol; T0.5 0.5% glycerol. The pH was constantly maintained between 6.8 and 7.2.

Cellular integrity assessment

Two straws of each one of the four treatments (G4, T1, T0.5 and G1), from each one of the 16 frozen ejaculates, were thawed to evaluate the motility percentage (M), by direct observation at 10× and 40× under the light microscope from aliquots placed in tempered glass slides at 37 °C. Then, two straws from groups G4, T1 and T0.5 were thawed at 37 °C for 30 s to continue with the viability (Vb) and acrosomal integrity (nA) analysis.

Vb was evaluated by the eosin–nigrosin technique, described by Dott and Foster 1972, modified by Bamba [7]. Thawed spermatozoa were washed by centrifugation (800g for 10 min) and the pellet was BTS reconstituted at a final concentration of 600×10^9 spermatozoa per ml. Thereafter, the sperm sample was diluted 1:8 with the eosin–nigrosin dye tempered at 37 °C (0.67 g yellow eosin, 5 g nigrosin, 40 ml of 5% glucose, in 100 ml bi-distilled water) and were incubated at room temperature for 5 min. Then smears were prepared on tempered microscope slides at 37 °C and were air dried. Once the smears were dried, they were mounted with resin and cover-glasses for the posterior counting of 200 cells, differentiation between live (non-dyed) and dead spermatozoa (partially or totally dyed).

nA was evaluated following the protocol proposed by Larson and Miller [35]. For this purpose, samples were thawed and washed by centrifugation (800g for 10 min) and the pellet was reconstituted in 4% paraformaldehyde v:v for 10 min at room temperature for cell fixation. Immediately the samples were washed twice by centrifugation and were reconstituted in ammonium chloride (50 mM in PBS) in order to make the smears. These were air dried and dyed by immersion in coomassie brilliant blue (CBB) stain (0.22% CBB, 50% methanol, 10% acetic acid, in bi-distilled water). Smears were washed twice by immersion in bi-distilled water to remove the excess dye, and were air dried. Once the smears were dried, they were mounted with resin and cover-glasses for the posterior counting under the light microscope, 200 cells were counted and classified based on their acrosomal integrity as follows: intact (well defined, highly dyed acrosomes), damaged (diffusely dyed acrosomes, with loss of continuity and/or loss of material) and absent (no acrosome detected).

Finally, to confirm ultrastructural integrity, samples from G4 and T1 were compared by transmission electron microscopy (TEM) as described by Bonet et al. [10]. Briefly, samples were fixed in Kar-

novsky solution, post-fixed in osmium-tetroxide (OSO₄), dehydrated on increasing ethyl alcohol concentrations and embedded in Spur's resin. Thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

Statistical analysis

Data obtained from the spermatozoa motility percentages were analyzed by Chi-square test. Differences between means from the live-dead spermatozoa counting and differences between acrosomal integrity were obtained both by ANOVA test using the Mini-tab™ 13.1 version statistical program.

Results

Motility was different depending on the individual boar and on the extender tested

Spermatozoa from G4, and T1 displayed a similar motility of about 20%, while those from T0.5 and G1 were less motile, displaying a significant difference ($P < 0.05$) at 8%. Also, individual variations were observed as boar 3 consistently presented less motility than all the other animals (Table 1). After evaluating these data, it was decided to stop testing sperm from G1.

Viability remained constant in all extenders although it did vary among individuals

The viability results were not significantly different in any of the tested extenders, i.e., in T1, T0.5 and G4 cells presented the viability indexes ranging from 39 to 44%. However, when the individual animals were considered, it was observed that boar 3 presented less viability than the other individuals while boar 4 presented the best sperm viability percentages (Table 2). Additionally, even though there is no significant difference on the viability response to treatment between males 1 and 4, male number 4 presented more viable cells in the T1 medium, meanwhile male number 1 presented a greater number of viable cells in the G4 medium (Table 2).

Trehalose addition resulted in improved acrosomal integrity

In order to penetrate the egg, spermatozooids need an intact acrosomal membrane. When the different solutions were evaluated, it was observed that both trehalose-containing extenders (T1 and T0.5) promoted a higher integrity of the acrosomal membrane, about 70%, while G4, the glycerol-only extender resulted in only 35% intact cells. This is a large, statistically significant ($P < 0.05$) difference (Table 3).

Cell structure is better preserved in trehalose-containing extenders

The cryopreserved spermatozoa from T1 presented intact plasma and acrosomal membranes (Fig. 1a and b). By contrast, sperma-

Table 1
Mean percentage of motility from the 16 ejaculates, obtained by male and by treatment at thawing.

Male	T1	T0.5	G4	G1
1	21.6 ± 3.5	9.0 ± 1.3	24.1 ± 3.7	7.0 ± 1.13
2	19.2 ± 2.1	10.8 ± 1.7	21.2 ± 2.7	7.5 ± 0.6
3	12.2 ± 2.2	3.6 ± 1.9	12.25 ± 2.49	5.25 ± 1.63
4	21.25 ± 2.9	7.5 ± 1.6	23.6 ± 2.4	9.0 ± 0.37
Average	18.59 ± 8.4^a	7.75 ± 5.2^b	20.31 ± 9.18^a	7.18 ± 7.5^b

Media ± SEM. Different letters in line indicate a significant difference obtained by the Chi-square test ($P < 0.05$).

Table 2
Number of viable spermatozoa by male and by treatment after the thawing process (eosine-nigrosin staining).

Male	T1	T0.5	G4
1	41.5 ± 3.3	39.6 ± 5.8	55.1 ± 6.8
2	42.6 ± 10.1	41.9 ± 12.2	39.7 ± 7.4
3	31.3 ± 5.3	29.5 ± 6.6	33.2 ± 2.7
4	53.5 ± 11.9	45.25 ± 7.35	51.0 ± 6.6
Average	42.25 ± 4.24^a	39.06 ± 4.12^a	44.78 ± 3.35^a

Media ± SEM. Different letters on line indicate a significant difference obtained by ANOVA ($P < 0.05$).

Table 3
Average number of spermatozoa with intact acrosomes by male and by treatment.

Male	T1	T0.5	G4
1	58.13 ± 7.23	67.63 ± 9.12	29.75 ± 3.96
2	71.13 ± 6.85	74.63 ± 7.90	41.38 ± 4.83
3	66.25 ± 5.83	74.50 ± 5.84	30.0 ± 5.67
4	84.75 ± 12.1	82.3 ± 12.1	42.0 ± 5.17
Average	70.0 ± 4.33^a	74.75 ± 4.39^a	35.78 ± 3.57^b

Media ± SEM. Different letters in line indicate a significant difference obtained by ANOVA ($P < 0.05$).

tozoa from the G4 extenders presented large plasma membrane deformities suggestive of disorganization (Fig. 1c), i.e. in addition to loss of the acrosomal material, G4 cells presented plasma membrane damage (Fig. 1d). Other abnormalities observed in the G4 samples included swelling and mitochondrial and microtubular structure changes within the flagellum (Fig. 1c).

Discussion

It has been suggested that the main cryoprotective effect of the trehalose-containing freezing extenders used for boar semen is the preservation of membrane structures such as the acrosome. In this regard, in ram [3–5,11], goat [1,2], rabbit [18], dog [57,58] and mouse [50,51], acrosomal integrity was increased when trehalose was added to cryopreservation media.

Revell and Glossop [43] found that the Reading long term extender, containing 2.6 mM trehalose, decreased acrosome loss by 9.7% as compared to an extender without trehalose. This is consistent with our results, indicating that trehalose addition resulted in increased acrosome integrity.

It has been reported that the trehalose-mediated cryoprotection is increased by glycerol, i.e., presenting a synergistic effect [4]. Other synergistic mixtures reported include the combination of the trisaccharide raffinose with glycerol [33,52].

T1 and G4 sperm motilities were not statistically different ($P > 0.05$), demonstrating that trehalose is capable of substituting for glycerol in extenders. Furthermore, when the motility, the viability and the structure results are taken together, it becomes apparent that the T1 extender has more application potential, i.e., the same percentage of cells is motile in T1 and G4, but twice as many cells are intact in the T1 extender. Thus, when it is considered that both structural integrity and high motility are requisites for fertility, it may be concluded that the T1 diluent protects cells much better than the others.

We did attempt to use trehalose-only extenders, however, these yielded largely immotile cells (Results not shown) and thus, work on these extenders was abandoned. Such disaccharide-promoted immotility has been reported also in red deer, where 400 mM trehalose was used [21]. Also, in ram semen, it was reported that 200–

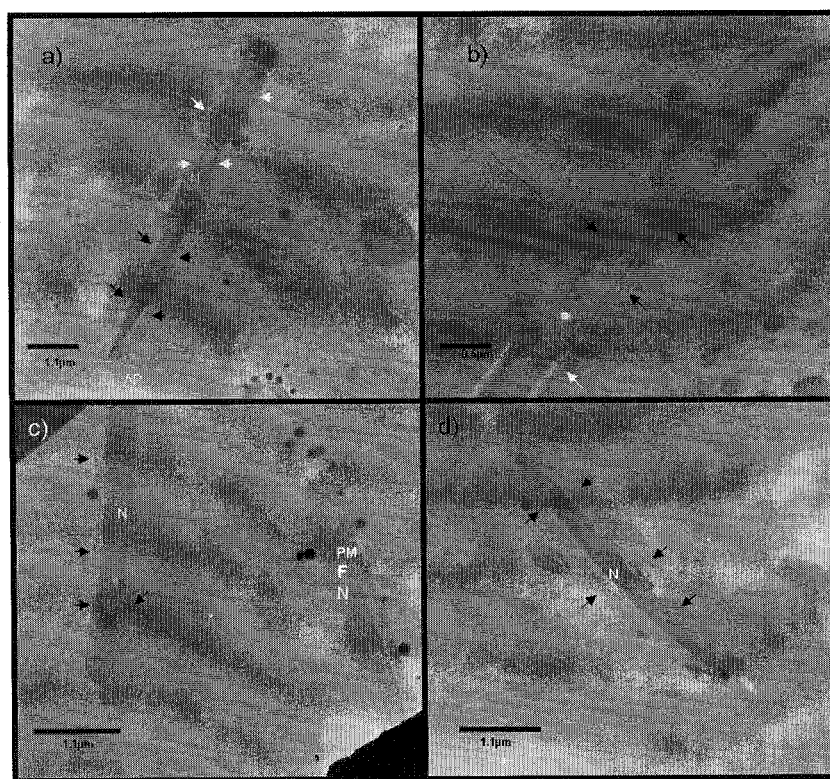


Fig. 1. TEM of boar sperm heads of thawed semen. (a) Sagittal view of the sperm head cryopreserved with trehalose (T1). Black arrows point at the acrosomal region. White arrows indicate the postacrosomal region covered by the plasma membrane. N, nucleus; AP, apical protuberance. (b) Post acrosomal region approach (black arrows), the less electrodense zone corresponds to the acrosomal region (white arrow). N, nucleus. (c) Transversal view of the sperm head cryopreserved in the G4 medium, loss of membrane continuity can be observed (black arrows). N, nucleus; PM, diagonal view of the flagellar mid piece from other spermatozoon where the mitochondrias and microtubular structures can be observed. (d) Transversal view of a sperm head cryopreserved in the G4 extender. Arrows point at the zones that show clear membrane distension. N, nucleus; F, flagellum. Bar = 1.1 μm on a, c and d; and 0.6 μm on b.

400 trehalose reduced motility [4]. Dalimata [18] reported good results of cryoprotection in rabbit spermatozoa at 91 mM trehalose, although he also included methylcellulose in the extender. Perhaps viscosity suppressed the sperm flagellar movement; this is suggested by the observation that in bovine sperm the dilution of the freezing solution resulted in partial recovery of motility [56].

From above mentioned, we could think that in the presence of trehalose-containing extenders, different species exhibit different tolerance ranges to the freezing-thawing process. This missed concept should be reevaluated, as the observed differences might also be due to the wide variations observed in the composition of the extender used; e.g. some protocols use skimmed milk [16,24], even though there are reports indicating that high Ca^{2+} (contained in milk) is detrimental for the cryoprotective effect of trehalose [6].

Even in the absence of motility, intact sperm have been used for intra-cytoplasmic injection of eggs, opening an interesting application for trehalose-preserved, immobilized cells [47]. This procedure might be used in boar, where successful lyophilization has been reported [34].

When the individuals in our study group were compared, large differences in the post-thawing motility and viability were observed. This was a source of variations in our evaluation of each extender. The motility obtained after thawing showed a significant difference ($P < 0.05$) between boar number 3 and the rest of the tested males (Table 1). In regard to sperm viability, male 4 presented the best viability percentages, while semen samples from male 3 presented the lowest viability (Table 2). Additionally, even though there is no significant difference on the viability response to treatment between males 1 and 4, male 4 presented more viable

cells in T1 medium, meanwhile male number 1 presented a greater number of viable cells in G4 medium (Table 2). These results make clear that there is wide individual variability, which is in agreement with reports indicating that within each species, there can be individuals which are good and bad "freezers" [27,36,38,45]. The factors accounting for this variation are far from being understood and many theories have been proposed to explain this variability, e.g. Waterhouse et al. [55] reported that in boar, the sperm of different individuals, there are differences in the concentration of plasma membrane long chain poly unsaturated acids (PUFAs). Furthermore, these differences were wider between swine. From this study, it was concluded the individual factor and not the race is decisive on the surviving rates and membrane integrity obtained after thawing [51]. In order to address the problem of the marked variation in individual cryotolerance between boars, Gil et al. [26] proposed a multivariate analysis on post-thawed semen. This approach would allow predicting the *in vitro* fertility rates.

After submission of our manuscript, a study on the use of trehalose-added extenders on boar cryopreservation appeared as a preprint [30]. This study confirms some of our results, namely, that trehalose increases sperm motility and integrity of post-thawed spermatozoa. It is interesting to see that although the composition of their extenders is different, the final osmolality values are more similar.

In conclusion, our results suggest that in boar spermatozoa, trehalose helps to diminish the acrosomal damage observed during cryopreservation; maintaining viability and motility. Thus, trehalose increases the content of potentially fertile freeze-thawed sperm to roughly double the amount observed in the presence of glycerol.

References

- [1] E.M. Aboagla, T. Terada, Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing, *Biol. Reprod.* 69 (2000) 1245–1250.
- [2] E.M. Aboagla, T. Terada, Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa, *Theriogenology* 62 (2004) 809–818.
- [3] E.G. Aisen, H.I. Alvarez, A. Venturino, J.J. Garde, Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents, *Theriogenology* 53 (2000) 1053–1061.
- [4] E.G. Aisen, V.H. Medina, A. Venturino, Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations, *Theriogenology* 57 (2002) 1801–1808.
- [5] E.G. Aisen, M. Quintana, V. Medina, H. Morillo, A. Venturino, Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders, *Cryobiology* 50 (2005) 239–249.
- [6] L.S. Bakás, E.A. Disalvo, Effect of Ca⁺⁺ on the cryoprotective action of trehalose, *Cryobiology* 28 (1991) 347–353.
- [7] K. Bamba, Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using eosin–nigrosin stain, *Theriogenology* 29 (1988) 1245–1251.
- [8] F. Berlinguer, G.G. Leoni, S. Succu, F. Mossa, M. Galio, M. Madeddu, S. Naitana, Cryopreservation of european mouflon (*Ovis gmelini musimon*) semen during the non-breeding season by the use of trehalosa, *Reprod. Dom. Anim.* 42 (2007) 202–207.
- [9] M. Bhur, P. Fiser, J. Bailey, E. Curtis, Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes, *J. Androl.* 22 (6) (2001) 961–969.
- [10] S. Bonet, M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. García-Gil, E. Badia, Morfologia espermática en porcí=Morfología espermática en porcino=Morphology of boar spermatozoa, Institut d'estudis Catalans, Barcelona, 2000 (pp. 47–48).
- [11] M.N. Bucak, A. Atessahim, Ö. Varisli, A. Yüce, N. Tekin, A. Akcay, The influence of trehalose taurine cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process, *Theriogenology* 67 (2007) 1060–1067.
- [12] C.O. Bwanga, M. De Braganga, S. Einarsson, H. Rodríguez-Martínez, Cryopreservation in mini- and maxi-straws, *J. Vet. Med. A* 37 (1990) 651–658.
- [13] P. Cerruti, M. Segovia de Huerdo, M. Galvagno, C. Schebor, M. Buera, Comercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 575–580.
- [14] F. Chen, T. Nakamura, H. Wada, Development of new organ preservation solutions in Kyoto University, *Yonsei Med. J.* 45 (6) (2004) 1107–1114.
- [15] T. Chen, A. Fowler, M. Toner, Brief communication, Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture, *Cryobiology* 40 (2000) 277–282.
- [16] Y. Chen, R.H. Foote, C.C. Brockett, Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm, *Cryobiology* 30 (1993) 423–431.
- [17] A. Córdova, J.F. Pérez, B. Lleo, A. García, S. Martín-Rillo, *In vitro* fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws, *Reprod. Dom. Anim.* 36 (1) (2001) 199–202.
- [18] A.M. Dalimata, J.K. Graham, Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose, *Cryobiology* 48 (1997) 831–841.
- [19] G. Erdag, A. Eroglu, J.R. Morgan, M. Toner, Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalosa, *Cryobiology* 44 (2002) 218–228.
- [20] A. Eroglu, M. Toner, T.L. Toth, Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes, *Fertil. Steril.* 77 (1) (2002) 152–158.
- [21] M.R. Fernández-Santos, F. Martínez-Pastor, V. García-Macia, M.C. Estes, A.J. Soler, P. Paz, L. Anel, J.J. Garde, Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian reed deer (*cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa, *Theriogenology* 67 (2007) 738–753.
- [22] P. Fiser, R.W. Fairfull, Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws, *Mol. Reprod. Dev.* 25 (1990) 123–129.
- [23] R.H. Foote, C. Chen, C. Brockett, M.T. Kaproth, Fertility of bull frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum, *J. Dairy Sci.* 76 (1992) 1908–1913.
- [24] J.J. Garde, A.J. Soler, J. Cassienello, C. Crespo, A.F. Malo, G. Espeso, M. Gomendio, E.R.S. Roldan, Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*), *Biol. Reprod.* 69 (2002) 602–611.
- [25] L.L. Gosálvez, A. Vidal, J. Valdehira, D. Babet, Influencia del tiempo de conservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heterospermicas con baja calidad (in spanish), *Arch. Zootec.* 52 (2003) 81–84.
- [6] M.A. Gil, J. Roca, T. Cremades, M. Hernández, J. Vázquez, H. Rodríguez-Martínez, E.A. Martínez, Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate *in vitro* fertility of boar individual ejaculates?, *Theriogenology* 64 (2005) 305–316
- [27] W.V. Holt, A. Medrano, L.M. Thurston, P.F. Watson, The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope, *Theriogenology* 63 (2005) 370–382.
- [28] T.E. Honadel, G.J. Killian, Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol, *Cryobiology* 25 (1988) 331–337.
- [29] C. Hounsa, E. Brandt, J. Thevelein, S. Hohmann, B. Prior, Role of trehalose in survival of *saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress, *Microbiology* 144 (1998) 671–680.
- [30] J.H. Hu, Q.W. Li, G. Li, Z.L. Jiang, S. Bu, H. Yang, L.Q. Wang, The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality, *Anim. Reprod. Sci.* 112 (1–2) (2009) 107–118.
- [31] A.R. Jones, L. Chantril, A. Cokinakis, Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa, *J. Reprod. Fert.* 94 (1992) 129–134.
- [32] A. Kheiruloomoo, G.R. Satpathy, Z. Török, M. Banerjee, Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells, *Cryobiology* 51 (3) (2005) 290–305.
- [33] C. Koshimoto, E. Gamliel, P. Maszur, Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of Mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose, *Cryobiology* 41 (2000) 204–231.
- [34] I. Kwon, K. Park, K. Niwa, Activation, pronuclear formation and development *in vitro* of pig oocytes following intracitoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 1430–1436.
- [35] L.J. Larson, D.J. Miller, Simple histochemical stain for acrosomes on sperm for several species, *Mol. Rep. Dev.* 52 (1999) 445–449.
- [36] K. Larsson, S. Einarsson, Fertility of deep frozen boar spermatozoa: influence of thawing diluents and of boars, *Acta Vet. Scand.* 17 (1976) 43–62.
- [37] S. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. Crowe, L. Crow, Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Appl. Environ. Microb.* 61 (10) (1995) 3529–3597.
- [38] A. Medrano, P.F. Watson, W.V. Holt, Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope, *Reproduction* 123 (2002) 315–322.
- [39] R.N. Murdoch, R.C. Jones, The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa, *J. Reprod. Fert.* 54 (1978) 419–422.
- [40] T. Óshe, J.L. Dacheaux, M. Paquignon, Metabolism of boar spermatozoa before, during preparation for, and after storage in liquid nitrogen, *J. Reprod. Fert.* 55 (1979) 277–285.
- [41] A. Patist, H. Zoerb, Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems, *Colloid. Surface. B* 40 (2005) 107–113.
- [42] H. Ramlöv, P. Westh, Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to –196 °C: effect of cooling rate, trehalose level, and short-term acclimation, *Cryobiology* 29 (1992) 125–130.
- [43] S.G. Revell, C.E. Glossop, A long-time ambient temperature diluent for boar semen, *Anim. Prod.* 48 (1989) 579–584.
- [44] V.M. Riddle, F.W. Lorenz, Nonenzymatic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in Ringer's phosphate suspension of avian spermatozoa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50 (1) (1973) 27–34.
- [45] J. Roca, H. Rodríguez-Martínez, J.M. Vazquez, A. Bolarin, H. Hernandez, F. Saravia, M. Wallgren, E.A. Martínez, Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination, in: C.J. Asworth, R.R. Kraeling (Eds.), *Control of Pig Reproduction VII*, Nottingham University Press, 2005, pp. 262–275.
- [46] J.G. Sampedro, S. Uribe, Trehalose–enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity, *Mol. Cell. Biochem.* 256–257 (2004) 319–327.
- [47] L.G. Sánchez-Partida, C.R. Simerly, S. Ramhalo, Freeze-dried primate sperm retains early reproductive potential after intracitoplasmic sperm injection, *Fertil. Steril.* 89 (3) (2008) 742–745.
- [48] L.M. Sasnoor, V.P. Kale, L.S. Limaye, A combination of trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to *in vitro* migration and adhesion properties, *Transfusion* 45 (2005) 622–633.
- [49] E.L. Squires, S.L. Keith, J.K. Graham, Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa, *Theriogenology* 62 (2004) 1056–1065.
- [50] B.T. Storey, E.E. Noiles, K.A. Thompson, Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation, *Cryobiology* 37 (1998) 46–58.
- [51] J.M. Sztain, K. Noble, J.S. Farley, L.E. Mobraaten, Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation, *Cryobiology* 41 (2001) 28–39.
- [52] N. Tada, M. Sato, J. Yamanoi, T. Misorgi, K. Kasai, S. Ogawa, Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol, *J. Reprod. Fert.* 80 (1990) 511–516.
- [53] M. Tibbet, F. Sanders, J. Cairney, Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabinol associated with enhanced tolerance to freezing in *ectomycorrhizal basidiomycetes (Hebeloma spp.)*, *Mycorrhiza* 12 (2002) 249–255.
- [54] K.A. Thompson, J. Richa, S.A. Liebhaber, B. Storey, Dialysis addition of trehalose/glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young, *J. Androl.* 22 (2) (2001) 339–344.
- [55] K.E. Waterhouse, P.O. Hofmo, A. Tverdal, R.R. Miller, Within and between bred differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm, *Reproduction* 131 (2006) 887–894.

- [56] H. Woelders, A. Matthijs, B. Engel, Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing, *Cryobiology* 35 (1997) 93–105.
- [57] H. Yamashiro, K. Narita, S. Sugimura, Y.J. Han, A. Sugarawa, K. Mohoraku, F. Nakazato, T. Cono, M. Yoshida, E. Sato, Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by artificial vagina (AV), *Anim. Rep. Sci.* 102 (1–2) (2007) 165–171.
- [58] C. Yildiz, A. Kaya, M. Aksoy, T. Tekeli, Influence of sugar supplement action of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing, *Theriogenology* 54 (2000) 579–785.