



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“RELACION ENTRE EL DAÑO DE LA TECA PERINUCLEAR Y LA
DESCONDENSACION DEL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE
CRIOPRESERVADO EN EL CAPRINO”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MANUEL ADRIÁN FERNÁNDEZ PARRILLA

TUTOR: DR. JAVIER DE J VALENCIA MÉNDEZ

COMITÉ TUTORAL: DRA. MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

DR. JAIME GALLEGOS SANCHEZ

MEXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Declaración

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

Manuel Adrián Fernández Parrilla

DEDICATORIAS

A mis padres

Por que a pesar de los malos tiempos seguimos siempre apoyándonos y aprendiendo juntos.

A Laura

Por que en esta ocasión tu mayor defecto me ayudo mucho, te quiero a pesar de las canas verdes.

A todos mis amigos

Por seguir creyendo en mí, principalmente Polo, Ale, Juan y todos los que conocí en este camino de crecimiento.

A Chris

Por estar a mi lado siempre con una palabra de aliento y no dejarme caer.

A Lina

Por brindarme su mano hasta el final y hacer mas fácil este trayecto.

A Saturno

Que me dejo una gran lección de vida, "que nada se da gratis".

A V Lupita

Para saldar el trato hecho.

A Lencho

El primer paso, por todo lo vivido, por que la vida continúa y hay que cerrar ciclos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada

Al DGAPA de la UNAM proyecto PAPIIT IN-206506

A los miembros de mi comité tutorial: Dr Javier Valencia Mendez, Dra María de Lourdes Juárez Mosqueda y Dr Jaime Gallegos Sánchez, por su conocimiento e infinita paciencia hacia mi persona.

A los miembros de mi jurado: Dra María Elena Trujillo Ortega y Dr Carlos Gerardo García Tovar.

A la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, por permitirme el acceso a sus instalaciones y animales para la realización del trabajo.

Al departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogerme y brindarme su ayuda durante este trabajo.

A la unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A la Dra Rosa Ma. Viguera Villaseñor, y al Laboratorio de Histomorfología, del Instituto Nacional de Pediatría, por toda la ayuda brindada.

INDICE

INDICE.....	V
Índice de figuras	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I.- INTRODUCCION.....	1
II.-ANTECEDENTES.....	7
Citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos.....	4
Proteínas de la Teca Perinuclear (TP).....	9
Daños por criopreservación sobre la célula espermática.....	10
Descondensación nuclear <i>in vitro</i>	11
III.-OBJETIVO.....	14
General.....	14
Específicos.....	14
IV.-HIPOTESIS.....	15
V.- MATERIAL Y METODOS.....	16
Diseño experimental.....	16
Procedimientos.....	17
VI.- RESULTADOS.....	25
VII.- DISCUSION.....	32
VIII.- CONCLUSIONES.....	37
IX.- REFERENCIAS.....	38
X.- ANEXOS.....	47

Índice de Cuadros y Figuras

Cuadro 1 Comparación de la viabilidad en semen fresco y descongelado.....	47
Figura 1 Esquema de la cabeza del espermatozoide de mamífero.....	8
Figura 2 Cabezas espermáticas sin ningún tratamiento (Ctrl).....	48
Figura 3 Cabezas espermáticas tratadas con heparina (H10).....	49
Figura 4 Cabezas espermáticas tratadas con DTT (D10).....	50
Figura 5 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a un minuto después de aplicado el tratamiento (H/D1).....	51
Figura 6 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 3 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D3).....	52
Figura 7 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 5 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D5).....	53
Figura 8 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 7 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D7).....	54
Figura 9 Cabezas de espermatozoides tratados con heparina y DTT durante diez minutos usando las técnicas de Faloidina rodaminada y Hoechst.....	55
Figura 10 Cabezas de espermatozoides tratados en conjuncion de heparina y DTT en diferentes tiempos usando las técnicas de Faloidina rodaminada y Hoechst.....	56
Figura 11 Patrón electroforético de las proteínas extraídas durante la descondensación en semen fresco y descongelado con diferentes procedimientos descondensantes.....	57

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue observar la relación existente entre el daño de la teca perinuclear ocasionado después del proceso de congelación/descongelación y la modificación en el proceso de descondensación de la cromatina nuclear espermática así como la extracción de las proteínas de la teca perinuclear por medios químicos.

Para el desarrollo de ésta investigación, se utilizaron tres eyaculados de dos sementales caprinos sexualmente activos de razas lecheras. Cada eyaculado se dividió en dos partes, semen fresco y semen sometido al proceso de congelación-descongelación. En cada una de las muestras se observó el estado de la subestructura de la teca perinuclear (sTP) en el microscopio electrónico de transmisión; el proceso de descondensación progresiva se valoró por observación directa y micrografías electrónicas después de la aplicación de DTT/Heparina a los 0, 1, 3, 5 y 7 minutos, adicionalmente se determinó el efecto descondensante del DTT y la heparina por separado a los 10 minutos; se extrajeron las proteínas de la teca perinuclear durante la descondensación para realizar pruebas de electroforesis; con la finalidad de evaluar el comportamiento de la actina y el material genético se utilizaron métodos de fluorescencia (faloidina rodaminada y Hoechst 33342).

Debido al proceso de congelación y descongelación la subestructura de la teca perinuclear se ve alterada y dañada ya que la criopreservación modifica el proceso de descondensación nuclear, alterando la velocidad de descondensación normal, ésta modificación, estaría más relacionada con la pérdida de algún factor regulador de la teca perinuclear, que con una sobrecondensación nuclear. Los descondensantes de manera individual no alcanzan a descondensar completamente las cabezas espermáticas, pero en conjunción dan buenos resultados. Los patrones de localización de la actina se ven modificados durante la descondensación, viéndose aminorada la cantidad de esta durante el proceso. El patrón de descondensación del material nuclear en el caprino se ve iniciado en la región postacrosomal yéndose rostralmente hasta completar la totalidad de la cabeza.

Palabras Clave: espermatozoide caprino, cromatina nuclear, teca perinuclear, descondensación.

ABSTRACT

The main objective of this work was to observe the damage in the perinuclear theca (PT) after freezing-thawing process and the alteration in the sperm nuclear chromatin decondensation, as well the extraction of perinuclear theca proteins by chemical methods.

For development of this research, three ejaculates were collected from two sexually active bucks. Every ejaculate was divided into 2 parts, fresh and frozen-thawed semen. All samples were decapitated before treatments by shaking and papain, after that, sperm heads were divided in aliquots which were incubated with DTT and heparin. Samples were fixed at preestablished times (0, 1, 3, 5, 7 minutes, posttreatment), additionally at 10 minutes were studied the decondense effect of Heparin and DTT by itself. All samples were examined by Electron microscopy to watch the PT substructure (PTs) and fluorescence methods were used to evaluate actin and nuclear chromatin (phalloidin-rhodamine and Hoechst 33342). During decondensation progress the extraction of perinuclear theca proteins were made by electrophoresis SDS-PAGE, differences were observed in the band patterns.

By the freezing-thawing process the PTs is damaged and the velocity of nuclear decondensation process is altered, this modification is more related to a loss of some regulating factor instead of overcondensation. Heparin and DTT by itself were not strong enough to decondense sperm, but together had better results. The actin patterns were modified, reducing its quantity during decondensation process. The nuclear chromatin also was modified, initiating in the postacrosomal region and continuing to the front until complete all the head of the sperm. The difference in the band patterns observed during the extraction of perinuclear theca proteins demonstrated a biochemical destabilization of PT after freezing-thawing process, showing lesser number of proteic bands.

Keywords: buck spermatozoa, nuclear chromatin, perinuclear theca, nuclear decondensation.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación es una biotécnica que permite el almacenamiento del semen de las especies domésticas a largo plazo. Su aplicación ha permitido acelerar el mejoramiento genético y hacer un uso más eficiente de los machos reproductores. Esta técnica, es muy utilizada en las especies domésticas, en los caprinos juega un papel importante, especialmente en los sistemas de producción intensivos, donde se trata de mejorar la reproducción, la producción láctea, de pelo y carne. También hace posible producir líneas selectas, crear bancos de germoplasma para la conservación de determinadas líneas y razas autóctonas, prevenir enfermedades infectocontagiosas, conservar material genético de individuos sobresalientes que deban ser sacrificados y la producción comercial de dosis para exportación hacia países con esquemas de selección establecidos (Johnson, 2000; Lebouef *et al.*, 2000).

Sin embargo, se conoce que la fertilidad del semen congelado es generalmente menor que la del semen fresco, esto debido a que el almacenaje en congelación del semen causa daño ultraestructural, bioquímico y funcional al espermatozoide, dando como resultado una reducción de la motilidad, viabilidad y finalmente de la misma fertilidad (Lebouef *et al.*, 2000).

La criopreservación se asocia a diferentes daños en la función del espermatozoide, incluyendo hinchazón, ruptura y pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana y cambios en la fluidez de la misma, reducción en la motilidad, en la actividad enzimática y en la viabilidad (Thundathil *et al.*, 1999).

En la mayoría de los espermatozoides de mamíferos, los cambios de temperatura durante la congelación afectan la bicapa lipídica de la membrana, lo que ocasiona separación de fase, evento parcialmente reversible al regresarlos a la temperatura ambiente (Holt y North, 1984; de Leeuw *et al.*, 1990).

Robertson *et al.* (1986, 1988) mencionan que el incremento en la permeabilidad de la membrana después de la congelación, pudiera deberse al debilitamiento generalizado de la membrana, dado especialmente por las proteínas integrales de la membrana las cuales se agrupan al darse la separación de la fase lipídica, alterándose la función especialmente de las proteínas estructurales que modulan el paso de iones.

Estudios previos usando ASMA (Computer automated sperm-head analysis) han demostrado que la criopreservación afecta las dimensiones de la cabeza espermática en comparación con el semen fresco tanto en el humano (Thompson *et al.*, 1994), como en toros (Gravance *et al.*, 1998), garañones (Arruda *et al.*, 2002) y venados (Esteso *et al.*, 2003), con valores menores después de la descongelación. En la especie caprina, la criopreservación no causa diferencias significativas en la morfometría, sin embargo el proceso tiene efectos en los eyaculados de algunos sementales caprinos, lo cual indica que algunos son más sensibles a la criopreservación que otros (Gravance *et al.*, 1997).

El descenso en las dimensiones morfométricas después de la criopreservación puede ser debido a la deshidratación progresiva de la célula espermática durante el proceso de criopreservación, donde hay una alta

proporción de espermatozoides con daño en el acrosoma y subsecuente pérdida acrosomal, cambios en la estructura de la cromatina y pérdida de la funcionalidad de la membrana espermática (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1993; Gravance *et al.*, 1998). Sin embargo existen cambios en la cromatina en la especie caprina, a este respecto Hidalgo *et al.* (2006) señalan que esto podría deberse a que seguido de la criopreservación hay una sobrecondensación de la cromatina, sin embargo ellos no ahondan en este hallazgo dado que su investigación sobre el núcleo no arroja evidencias específicas ni concluyentes que sustenten el hecho. La sobrecondensación de la cromatina puede afectar el proceso de fertilización e inducir muerte o pobre desarrollo embrionario (Hamamah *et al.*, 1990).

La cromatina nuclear es empaquetada principalmente en los últimos estadios de la espermiogénesis, en donde se reemplazan las histonas por proteínas de bajo peso molecular llamadas protaminas (Bench *et al.*, 1996; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998), las cuales se caracterizan por altos niveles de arginina y cisteína, esta última forma numerosos puentes disulfuro los que le dan estabilidad a la cromatina (Carrell *et al.*, 1998), esta estabilidad es necesaria para la inactivación del DNA y la protección del mismo a factores ambientales (Bedford y Calvin, 1974). Sin embargo una excesiva interacción entre protaminas puede formar una cromatina altamente estable, la cual dificulte la descondensación por la no ruptura de los puentes disulfuro y esto puede retrasar la formación del pronúcleo paterno e inducir la temprana muerte embrionaria (Carrell *et al.*, 1998; Madrid-Bury *et al.*, 2005).

El proceso de descondensación *in vitro* se lleva a cabo mediante el uso de heparina que es un polianión conocido por tener una fuerte afinidad a las moléculas de las protaminas (Motoishi *et al.*, 1996) formando un complejo insoluble. La disociación del complejo protamina-DNA, inducida por la heparina, puede producir, al descondensarse la cromatina, un incremento en el volumen nuclear (Jager *et al.*, 1990), “probablemente debido a la competencia del DNA por los enlaces con las protaminas” (Kobayashi *et al.*, 1999).

Motoishi *et al.*(1996) demostraron que al descondensar espermatozoides bovinos, la heparina se combina con las protaminas para liberar el DNA, pero es necesario un tratamiento previo con Dithiothreitol (DTT), el cual es un agente químico usado para reducir los puentes disulfuro espermáticos, dando como resultando una descondensación artificial *in vitro* de los espermatozoides de los mamíferos (Seligman *et al.*, 1994; Motoishi *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2003, Nakai *et al.*, 2006).

La teca perinuclear es un citoesqueleto en forma de cápsula que cubre el núcleo espermático, esta es formada durante la espermiogénesis entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, rellena efectivamente la mayor parte del espacio citoplasmático disponible en la cabeza del esperma. Estructuralmente se divide en 2 regiones: 1) Región subacrosomal, intercalada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear. 2) Región postacrosomal, extendida distalmente desde el segmento de la cubierta ecuatorial entre la membrana plasmática y envoltura nuclear (Juárez-Mosqueda y Mujica, 1999; Sutovsky *et al.*, 2003).

La teca perinuclear participa en el ensamblaje del acrosoma y en darle forma a la cabeza del espermatozoide durante la espermiogénesis. También provee una protección rígida al núcleo espermático durante la maduración espermática y la fertilización y contribuye con señales moleculares que pueden ser importantes para el desencadenamiento de la defensa contra la poliespermia, activación del oocito y el desarrollo temprano de embrión (Sutovsky *et al.*, 2003).

Se ha observado que está formada por diferentes tipos de proteínas, entre ellas una de las principales es la F-actina, la cual se ha visto que interactúa con la calicicina en ambas regiones (subacrosomal y postacrosomal), sugiriendo que la F-actina es el blanco de la calicicina, la cual forma polímeros *in vitro* que proveen a la teca perinuclear de rigidez (Lecuyer *et al.*, 2000). Esta estabilidad que brinda la F-actina se pudo comprobar en el estudio realizado por Juárez-Mosqueda y Mujica (1999) en donde se observó que los espermatozoides retuvieron la teca perinuclear después de ser tratados con faloidina, la cual es una droga estabilizadora de actina, y trabaja previniendo la despolimerización de los filamentos de actina y cambiando el equilibrio de monómeros a filamentos de la misma (Cooper, 1987; Cuneo *et al.*, 1995; Juárez-Mosqueda y Mujica, 1999; Hernández-González *et al.*, 2000).

Debido a que se han reportado alteraciones en la morfología, viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación del semen, el objetivo principal de este trabajo es observar la relación existente entre el proceso de descondensación por medios químicos en

espermatozoides frescos y descongelados de la especie caprina y el daño de la teca perinuclear.

ANTECEDENTES

Citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos:

La teca perinuclear (TP) es el elemento principal del citoesqueleto de la cabeza de los espermatozoides, cubre al núcleo espermático (fig 1; Longo *et al.*, 1987), ocupando la mayor parte del espacio citoplasmático disponible en la cabeza espermática; se divide principalmente en 2 regiones:

1. Región subacrosomal: se intercala entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear.
2. Región postacrosomal: se extiende distalmente desde el segmento ecuatorial entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear.

Ésta se encuentra compuesta principalmente por proteínas y a pesar que varias de las mismas ya han sido caracterizadas, otras continúan siendo desconocidas. (Longo *et al.*, 1987; Mujica *et al.*, 2003).

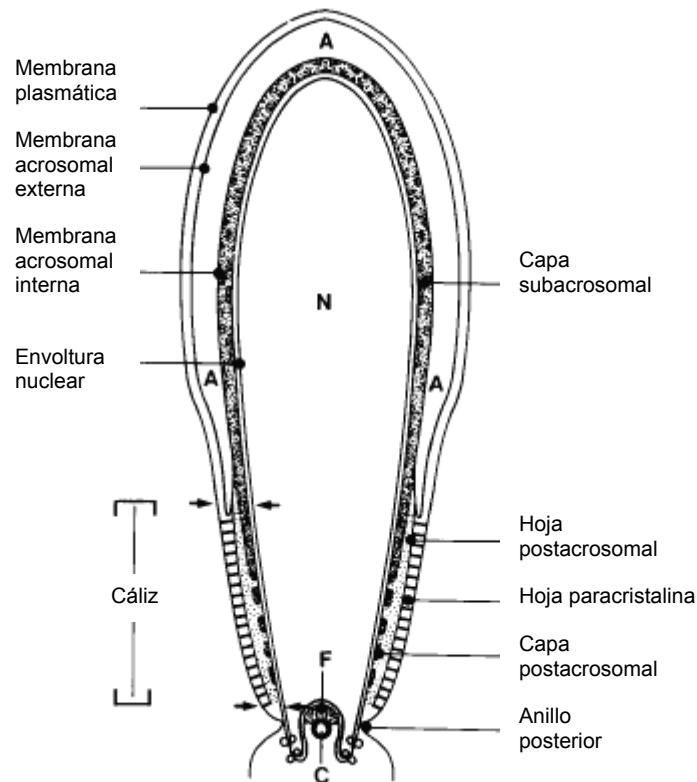


Figura 1 Esquema de la cabeza del espermatozoide de mamífero (Longo *et al.*, 1987). La teca perinuclear, componente citoesquelético de la cabeza del espermatozoide, está subdividida en la capa subacrosomal, anteriormente y en el cáliz, posteriormente. Este último formado por la capa postacrosomal, adherida a la membrana nuclear externa, la hoja postacrosomal y la capa paracristalina, en contacto con la cara interna de la membrana plasmática del espermatozoide. N, núcleo; A interior del cromosoma; F, fosa de implantación; C, complejo centriolar.

Entre los límites de la región postacrosomal y el segmento ecuatorial de la TP, se localiza la subestructura de la teca perinuclear. (Juárez-Mosqueda y Mujica, 1999), la morfología de la subestructura es especie específica mencionándose que tiene forma, ya sea de filamentos delgados en el cobayo (Mujica *et al.*, 2003); cadena de eslabones en el cerdo (Gutierrez, 2006) y en el bovino y ovino se conforma de forma de grecas (Martínez *et al.*, 2006).

Proteínas de la Teca Perinuclear (TP):

Se han caracterizado varias moléculas de la teca perinuclear, la más importante de ellas es la actina con un peso molecular de 43 kD (Flaherty *et al.*, 1986), la cual se puede presentar en dos diferentes formas, la globular (actina-G) y la filamentosa (actina F), a pesar de que no se sabe con certeza el papel de la actina-F y sus interacciones con otras proteínas de la TP se sugieren varias posibles funciones: 1) anclar el acrosoma a la envoltura nuclear y a la membrana plasmática, 2) dar forma al acrosoma o núcleo cubriendo la envoltura nuclear, y 3) organizar dominios especializados de la membrana espermática.

Principalmente, las proteínas de la TP están relacionadas a la actina, estas incluyen:

- ❖ Calicina con un peso molecular de 60 kD (Longo *et al.*, 1987) la cual es integrante de la familia *kelch*, esta proteína es inicialmente súper impuesta a la actina en el espacio subacrosomal durante la espermiogénesis, también la calicina tiene la habilidad de formar homomultímeros los cuales pueden contribuir a la rigidez de la TP, gracias a esto se cree que la calicina esta involucrada en el anclaje de la envoltura nuclear con estructuras adyacentes (Lécuyer *et al.*, 2000).

- ❖ La cilicina I y II de 74 y 53 kD respectivamente, se encuentran principalmente en la región postacrosomal del espermatozoide (Hess *et al.*, 1993, 1995) son miembros de la banda multipeptídica (MBP), grupo de proteínas muy básicas (56-74 kD) las cuales fueron descritas primeramente por Longo *et al.* (1987), se han identificado distribuidas en ambas láminas subacrosomal y postacrosomal (calix).

❖ Proteínas C β 3 y C α 3 (31 y 33.74kD respectivamente) se han encontrado en la parte postacrosomal del espermatozoide o cáliz (von Bülow *et al.*, 1997), su función se desconoce.

❖ Proteínas Arp-T1 y Arp-T2 (40kD) han sido descritas recientemente en la región postacrosomal (Heid *et al.*, 2002).

❖ PERF15 (15.5 kD) es relacionada a la superfamilia de proteínas que se unen a ácidos grasos y es la principal proteína de la TP subacrosomal, se cree que interactúa con la membrana acrosomal, jugando un papel en el arreglo estructural y estabilidad del acrosoma durante la espermiogénesis, debido a sus propiedades de unión a lípidos. (Oko y Morales, 1994; Oko y Maravei, 1995; Pouresmaeili *et al.*, 1997; Breed *et al.*, 2000).

Daños por criopreservación sobre la célula espermática:

La criopreservación produce potenciales daños sobre las células, ocasionados por el choque térmico, estrés tóxico y osmótico, la formación y disolución de cristales de hielo en el ambiente intra y extra celular (Watson, 2000).

Estas alteraciones se encuentran en todos los niveles del espermatozoide desde la membrana plasmática, donde se cree que la ruptura de la membrana podría ser causada por la fricción que provoca el rápido paso del agua a través de ella (Muldrew y McGann, 1990); hasta el citoesqueleto donde se han encontrado cambios estructurales de la teca perinuclear (TP) por el congelamiento y descongelamiento, concluyéndose que existe una relación que es inversamente proporcional del número de espermatozoides vivos al porcentaje de los mismos con la TP dañada (Martínez *et al.*, 2006).

El material genético no parece resultar dañado por este proceso, sin embargo Hamamah *et al.* (1990) encontraron una “sobrecondensación” que no daña la estructura de la cromatina nuclear pero si produce un retraso en el proceso de descondensación, recientes resultados también en cerdos encontraron el mismo retraso en el proceso de descondensación pero sin la sobrecondensación que otros autores mencionan (Gutierrez, 2006).

Descondensación nuclear *in Vitro*

En las últimas décadas se han buscado los mecanismos que lleven a cabo la descondensación espermática, tomando en cuenta que el espermatozoide maduro es resistente a diferentes agentes químicos (Strzezek y Kordan, 2003).

In vitro se han utilizado diferentes sustancias como descondensantes y las mezclas de éstos. Siendo los más representativos:

- DTT (Dithiothreitol) sirve como reductor de enlaces disulfuro llegando a descondensar espermatozoides al utilizarse solo, pero obteniéndose mejores resultados al ser combinado con otros agentes o detergentes como Tritón X-100, Emulphogene, Np-40, Tween 80; en combinación con estos agentes se obtuvo la descondensación de espermatozoides de conejo, en los cuales el proceso de descondensación inició en la región postacrosomal y procedió distalmente y rostralmente hasta abarcar todo el núcleo (Zirkin, *et al.*, 1985). La combinación de DTT con thioglicolato ha sido empleada para descondensar el material nuclear de espermatozoides de rata (Fornes 1994); la utilización de DTT y

tripsina produce resultados positivos en la descondensación de cabezas de espermatozoides de ratón (Gall y Ohsumi, 1976). En otros estudios utilizando sólo el DTT se observó que hasta grandes dosis de éste (22.5 o 50mM) provocan alteraciones en la región subacrosomal de la teca perinuclear del cobayo, sin embargo la subestructura de la misma a los tiempos del estudio permaneció íntegra, lo que indica que la estabilidad de la subestructura no depende de la formación de enlaces disulfuro (Juárez y Mujica, 1999).

- Glutati6n (GSH).- Existen reportes de que en el espermatozoide del bovino el GSH sólo no logra producir la descondensaci6n nuclear, pero en combinaci6n con la heparina se logra la descondensaci6n de éstos; lo cual muestra que la ruptura de los puentes disulfuro causada por el GSH no es suficiente para lograr la descondensaci6n, y que son necesarias las cargas negativas de la heparina para competir con el ADN por las protaminas (Delgado *et al.*, 2001).
- Heparina.- A grandes dosis es capaz de descondensar núcleos espermáticos como lo demostr6 Ocampo (1995) quien descondens6 núcleos de cobayo usando una dosis de 1,500 USP de heparina; tambi6n se ha utilizado en combinaci6n con otros descondensantes como el GSH, como en los casos de Reyes *et al.* (1996) y S6nchez *et al.* (1996) los cuales lograron descondensar núcleos espermáticos de hamsters (los primeros) y de rata y rat6n (los segundos). Estudios m6s recientes han utilizado la heparina en conjunto con el DTT

obteniéndose mejores resultados para la descondensación de los espermatozoides que al utilizarlos individualmente. Aunado a estos resultados, se ha encontrado que la teca perinuclear participa en la estabilidad del núcleo espermático, ya que al tratar la teca con faloidina, para evitar la despolimerización de Actina F, la descondensación del núcleo se ve retardada y la subestructura se mantiene por un mayor tiempo, lo cual indica que posiblemente la subestructura debe sufrir una desestructuración para favorecer la descondensación (Hernández, 2004; Gutiérrez, 2006).

OBJETIVO GENERAL

Probar que existe una relación entre el daño de la teca perinuclear ocasionado después del proceso de congelación/descongelación y la modificación en el proceso de descondensación de la cromatina nuclear espermática y la extracción de las proteínas de la teca perinuclear.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Descripción del daño sufrido por la teca perinuclear posterior a la criopreservación.
- Valorar morfológicamente el proceso de descondensación nuclear en los espermatozoides frescos y descongelados tratados con la combinación Heparina/DTT, y ambos compuestos por separado.
- Evaluar el comportamiento de la actina durante el proceso de descondensación nuclear en los espermatozoides frescos y descongelados tratados con faloidina rodaminada.
- Evaluar el comportamiento del ADN durante el proceso de descondensación nuclear en los espermatozoides frescos y descongelados.
- Evaluar la extracción diferencial de las proteínas de la teca perinuclear durante la descondensación del núcleo espermático

HIPÓTESIS

Los daños en la subestructura de la teca perinuclear, ocasionados por el proceso de congelación-descongelación, están relacionados con una alteración de la descondensación de la cromatina espermática y con la estabilidad de las proteínas de la teca perinuclear.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron tres eyaculados de dos sementales caprinos sexualmente activos de razas lecheras, pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los eyaculados obtenidos se dividieron en dos partes, una para ser utilizada como semen fresco y la otra para someter a los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación.

Por lo tanto cada muestra se analizó en dos momentos, una antes de la congelación y otra después de este proceso. Las características evaluadas fueron:

- 1) Estado de la subestructura de la teca perinuclear (sTP) en el semen fresco o semen descongelado antes de la aplicación del tratamiento descondensante.
- 2) La descondensación nuclear en los espermatozoides tratados con Heparina/DTT en combinación y por separado. Para ello se definieron dos grupos de muestras, el grupo de números naturales para contemplar a los espermatozoides frescos (#) y el grupo de los números primos (#') para los espermatozoides descongelados.

Los resultados se obtuvieron por observación directa al microscopio electrónico de transmisión, tomando micrografías de cada uno de los “tiempos progresivos de descondensación” establecidos.

3) El patrón de proteínas extraídas de la teca perinuclear durante la descondensación.

4) y 5) El comportamiento de la actina y del material genético por los métodos de fluorescencia (faloidina rodaminada y Hoechst 33342).

PROCEDIMIENTOS

Obtención de la muestra:

Los eyaculados fueron obtenidos por la técnica de la vagina artificial, después fueron divididos en dos fracciones; una para ser utilizada como semen fresco y otra para su congelación, haciendo un total de 6 muestras.

Evaluación del semen:

Antes de proceder a la congelación se valoró la calidad del semen, empleando para ello el método tradicional (movimiento progresivo, concentración espermática y morfología). Esta valoración se realizó antes y después de la congelación de las células espermáticas.

- **Movimiento progresivo:** La evaluación de la motilidad espermática se realizó en gotas de semen observadas con el objetivo de 40x en microscopio de luz.
- **Concentración espermática:** Se efectuó en una cámara de Neubauer, para esto a 500µl de Triton X-100 al 0.1% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 9.6mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.4), se le adicionaron 25µl de semen, homogenizándose gentilmente. El conteo se realizó en cinco recuadros y se aplicó la siguiente fórmula para obtener el total de espermatozoides: $FD \times No. \text{ Células} \times 10,000 \times 5$; donde: FD es el factor de dilución (en este caso es 21);

No. De células contadas en los 5 recuadros; 10,000 está dado por la dimensión de la cámara; 5 es el número de cuadros contabilizados.

- Morfología: El porcentaje de anomalías morfológicas se efectuó junto con el conteo celular y se comprobó en frotis teñidos con eosina-nigrosina. Para esta última se tomó una muestra espermática de 10 μ l, a una concentración de 35×10^6 células/ml, la que se colocó sobre un portaobjetos junto con 10 μ l de eosina-nigrosina al 2 % en PBS, y se cubrieron con un portaobjetos para su observación en el microscopio de luz. Los eyaculados que no cumplieron con los parámetros establecidos: porcentaje de motilidad mayor al 80% y presencia de morfoanomalías menores al 15% fueron desechados.

Después de su valoración las muestras fueron lavadas por centrifugación, después resuspendidas en PBS hasta alcanzar una concentración de 500×10^6 células/0.5ml para su posterior decapitación.

Congelación:

Para la congelación se utilizó el método de 1 paso, en donde se le aplicó un diluyente al momento de colectar el semen con la finalidad de evitar la deshidratación del eyaculado y protegerlo contra el choque por frío, el cual se preparó de la siguiente forma:

Solución madre:

- | | | |
|---|--------------------------------|---------|
| • | Tris (Hidroximetilaminometano) | 18.020g |
| • | D-glucosa | 9.978g |
| • | Acido cítrico | 7.440g |
| • | Agua bidestilada | 500ml |

De la solución madre se tomaron 35ml a la cual se le agregó 10ml de yema de huevo y 3.5ml de glicerol y se aforó a 50ml con agua bidestilada.

Después de este proceso se empaquetaron las muestras en pajillas tipo francés de 0.5ml y se sellaron con alcohol polivinílico, después de esto se refrigeraron hasta llegar a los 5°C, donde permanecieron un periodo de equilibrio de aproximadamente 2 horas, luego estas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido en posición horizontal, aproximadamente a 5 cm. de distancia, para alcanzar una temperatura entre -130 a -150°C, durante 20 minutos para después sumergirlas en el nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196°C hasta su procesamiento (Valencia, 1994).

Descongelación:

Después de transcurridos mínimo 15 días de almacenaje en el nitrógeno líquido, se descongelaron las pajillas de cada muestra. Las cuales fueron descongeladas en baño María a 37°C por 16 segundos, y se resuspendieron en PBS, donde se valoró el porcentaje de motilidad y se decapitaron para la aplicación de los tratamientos de experimentación especificados en cada fase del estudio.

Decapitación:

Se realizó después de resuspender las muestras a una concentración de 500×10^6 células/0.5ml a las cuales se les agregó 0.5 ml de una solución de papaina (Sigma) en una concentración de 2mg/ml quedando una concentración final de 1mg/ml de papaina en una muestra de 500×10^6 células/1ml, esta mezcla se homogenizó durante 1 minuto en un vortex (IKA-WORKS, Minishaker modelo MS 1) a 600 rpm, pasado este tiempo se les agregaron 50µl de inhibidores de

proteasas (Complete de Roche) y se mantuvieron homogenizando en el vortex por un minuto más, transcurrido este tiempo se les aumentó la velocidad a 2500 rpm durante 5 minutos y por último se lavaron nueve veces en PBS por centrifugación/resuspensión a 2500rpm, lo cual permitió extraer los flagelos; obteniéndose un grado de pureza de cabezas arriba del 85%.

Después las cabezas espermáticas se resuspendieron a una concentración de 100×10^6 cabezas/ml.

Exposición de la teca perinuclear (TP):

Después del ajuste de la concentración, las muestras fueron tratadas con el detergente neutro Brij 36-T (1.2% concentración final) dejándolas incubar por 10 segundos a temperatura ambiente con la finalidad de dejar la teca perinuclear expuesta (cabezas espermáticas con TP expuesta; Juárez y Mújica ,1999).

Una vez tratados con Brij las cabezas espermáticas se lavaron 3 veces y resuspendieron en PBS para la aplicación de los diferentes tratamientos.

Tratamientos de los espermatozoides con los agentes químicos descondensantes:

La adición a los núcleos desnudos de DTT y heparina han resultado ser una efectiva combinación de agentes descondensantes por la acción reductora del DTT sobre los enlaces disulfuro existentes entre las protaminas del núcleo espermático y la acción de la heparina de secuestrar a las mismas protaminas al competir por ellas con el ADN debido a su carga.

Después de ser retirado el Brij 36T de las muestras (cabezas con TP expuesta) se aplicaron los diferentes tratamientos descondensantes de la siguiente manera:

Se prepararon alícuotas de 1ml para cada tratamiento descondensante, una alícuota de la muestra fue tratada con DTT en una concentración final de 3.75mM, una segunda alícuota fue tratada con 5USP de heparina y las 4 últimas con una combinación de heparina 5USP/DTT 3.75mM. Una alícuota de cada muestra fue tomada como control antes de la adición de los agentes descondensantes. Posteriormente las alícuotas fueron tomadas como se indica en la tabla 1 y fijadas.

Todas las muestras después de transcurrido su periodo de descondensación se centrifugaron a 2500rpm (Centrifuga clínica Hermle modelo Z300) durante 3 minutos, los sobrenadantes fueron recuperados y se colocaron en acetona a 4°C en una relación de 1:3 y se mantuvieron a -20°C por 12 hrs, para precipitar a las proteínas. Las pastillas fueron resuspendidas en 1ml de PBS y se dividieron en dos partes, una se fijo en Karnowsky para el procedimiento de las cabezas para Microscopia Electrónica y la otra se fijo en Glutaraldehido al 4% para su procesamiento para fluorescencia.

	Control	Heparina	DTT	1 min (60s)	3 min (180s)	5 min (300s)	7 min (420s)
Fresco	0	H10	D10	H/D 1	H/D 3	H/D 5	H/D 7
Descongelado	0'	H10'	D10'	H/D 1'	H/D 3'	H/D 5'	H/D 7'

Tabla 1 Esquema utilizado para los diferentes tratamientos descondensantes.

Electroforesis SDS-PAGE:

Para realizar la electroforesis fue necesario centrifugar los sobrenadantes en acetona (ver descripción anterior) previamente incubados a -20°C a 3000rpm/10min y las pastillas se solubilizaron en 120 μl de amortiguador de muestra para electroforesis y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C . Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12 % aplicando una corriente de 100volts constantes durante 2-2:30hrs, todo esto a 4°C (Laemmli, 1970); se usaron marcadores de bajo peso molecular para referencia y análisis del corrimiento (Bio-Rad). Después de la electroforesis a las proteínas se les realizó una tinción argéntica (Oakley, 1980; Morrissey, 1981).

Microscopia electrónica:

Con la finalidad de retirar el fijador, las muestras de los diferentes tratamientos se lavaron tres veces con PBS filtrado por centrifugación a 2500 rpm/3 minutos, tres lavados más en agua bidestilada también filtrada. Las muestras se resuspendieron en agua bidestilada.

Posteriormente las muestras fueron montadas en rejillas de cobre de 300 mesh, para ello, un pedazo de papel parafilm se extendió sobre la base de una caja de Petri de cristal y cada rejilla se colocó sobre éste con la cara que presente la membrana de colodión-carbón hacia arriba y una gota de cada muestra se colocó sobre las rejillas. Esta gota se dejó sedimentar sobre la rejilla por diez minutos a temperatura ambiente, transcurriendo éste tiempo se retiró el exceso de muestra con papel filtro.

Para la tinción negativa de las células, se aplicó una gota de acetato de uranilo al 0.1% filtrado. Para ello la gota se colocó sobre cada rejilla y se dejó por

un tiempo no mayor a 12 segundos, transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de acetato de uranilo con papel filtro y se procedió a enjuagar las rejillas con agua destilada filtrada.

Las rejillas fueron identificadas por su ubicación en un portarejillas para su valoración en el microscopio electrónico de transmisión.

Para la valoración de las muestras se utilizó el microscopio electrónico de transmisión Zeiss M9 perteneciente al Departamento de patología de la FMVZ de la UNAM. La valoración se llevó a cabo en varias sesiones donde se analizó la secuencia de descondensación presentada en cada uno de los grupos experimentales. De cada grupo se tomaron micrografías electrónicas con las imágenes de los espermatozoides representativos de cada tiempo y grupo experimental.

Fluorescencia

Con la finalidad de retirar el fijador, las alícuotas de las muestras fijadas de los diferentes tratamientos (ver procedimiento con agentes químicos descondensantes), se lavaron tres veces con PBS filtrado por centrifugación a 2500 rpm/3 minutos, tres lavados más en agua bidestilada también filtrada. Las muestras se resuspendieron en agua bidestilada. Después de esto se realizó un frotis de cada tiempo de descondensación antes mencionado y se dejó secar al aire; se colocaron en acetona por 10 minutos y se volvieron a dejar secar al aire, ya listos los frotis se les aplicó una solución de faloidina rodaminada (10µg/ml) junto con Hoechst 33258 (10ng/ml) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos en cámara húmeda, después de la incubación los frotis se lavaron en PBS y agua bidestilada; después se realizó el montaje con glicerol-PBS (9:1)

utilizando cubreobjetos, por último se observaron en el Microscopio de Florescencia Leica DMLS con cámara Leica DFC3 FX perteneciente al Laboratorio de Histomorfología del Instituto Nacional de Pediatría, tomando fotos digitales de cada tiempo de descondensación de las muestras.

Análisis estadístico:

Se realizó una ANOVA para la viabilidad de los espermatozoides.

El proceso de descondensación se valoró a través de fotografías y micrografías secuenciales del proceso.

Para esto se utilizó el programa de computo SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS

Viabilidad Espermática

La viabilidad de los espermatozoides, valorada empleando la tinción de eosina-nigrosina, fue significativamente menor en el semen descongelado en comparación con el fresco (55.17 ± 9.61 vs 150 ± 5.56 ; $P < 0.05$; Cuadro 1).

Tratamientos de descondensación

El tratamiento de los espermatozoides de caprino con papaina, y el detergente neutro Brij 36T permitió la decapitación y desintegración de las membranas y del acrosoma respectivamente. Quedando al descubierto la teca perinuclear lo que permitió la observación de la subestructura para evaluar los cambios morfológicos de ésta a través del proceso de descondensación.

En las cabezas espermáticas control (sin ningún tratamiento) provenientes del semen fresco, la subestructura de la TP no se conservó íntegra, ya que en algunas los eslabones no se observaron completos. (fig. 2a, 2b), sin embargo en las cabezas del semen descongelado también sin ningún tratamiento el desarreglo de la subestructura fue más evidente, ya que la forma de eslabones de la misma fue menor, llegando a mostrar inclusive una aparente línea electrolúcida en el sitio donde se encontraba la subestructura. (fig. 2d, 2e); adicionalmente la porción apical de la region subacrosomal en este tipo de muestra presentó áreas de desprendimiento mayores en las cabezas descongeladas en comparación con las cabezas frescas, en las que apenas se inicia el desprendimiento. (fig. 2f y 2c)

La incubación de las cabezas en 5USP de heparina por 10 minutos no produjo cambios significativos; en la ultraestructura de las cabezas del semen fresco, las principales consistieron en el ensanchamiento de los eslabones de la subestructura, la pérdida de homogeneidad en los mismos (fig. 3b) y el desprendimiento de algunas áreas en la región subacrosomal de la TP (fig. 3c). En las cabezas descongeladas los cambios fueron la desestructuración por completo de la subestructura, dejando áreas electrolúcidas en su lugar. (fig. 3d, 3e).

El tratamiento de las cabezas con DTT a una concentración de 3.75 mM además de ocasionar en las cabezas frescas el ensanchamiento mayor de los eslabones de la subestructura, provocó mayor pérdida de material donde se alcanza a distinguir solo restos de subestructura, regiones más electrolúcidas en la cabeza (fig. 4a, 4b), desprendimiento mayor de la teca en la región subacrosomal (fig. 4a, 4c). En cuanto a las cabezas descongeladas este tratamiento descondensante ocasionó la formación de fenestraciones sobre toda la cabeza denotando una apariencia esponjosa, en donde aún es posible observar algunos restos de subestructura (fig. 4d, 4e); la región subacrosomal presentó una pérdida uniforme de material (fig. 4f).

La utilización en conjunto de los dos descondensantes (Heparina 5USP/DTT 3.75mM) al minuto de tratamiento produjo algunas diferencias entre las cabezas frescas y las descongeladas teniendo las frescas una mejor definición de la subestructura que las descongeladas, en las cuales solamente fue posible distinguir restos de subestructura y una línea más electrolúcida en su lugar (fig. 5a, 5b, 5d, 5e), notándose en los dos tipos de muestra la pérdida de material en la zona apical de la región subacrosomal (fig. 5c, 5f).

En las cabezas expuestas a estos descondensantes a los tres minutos se produjeron cambios muy marcados entre las cabezas frescas y las descongeladas. Si bien la pérdida de la subestructura se produjo en ambos tipos de muestras, presentaron zonas electrolúcidas, denotando la descondensación del material genético, en las cabezas frescas estas se presentaron principalmente en la zona postacrosomal (fig. 6a, 6b, 6c), mientras que en las descongeladas estas se encontraron en toda la cabeza dando a la misma una apariencia esponjosa e inclusive con desprendimiento de material en la región postacrosomal (fig. 6d, 6e, 6f).

A los cinco minutos con este mismo tratamiento las cabezas frescas principalmente mostraron desprendimiento de material en la región postacrosomal, empezando a tener también una apariencia esponjosa debido a la aparición de fenestraciones en toda la cabeza (fig. 7a, 7b, 7c). En cuanto a las cabezas descongeladas, aunque estas siguieron presentando una apariencia esponjosa las fenestraciones eran más numerosas; además presentaron abultamiento de la región ecuatorial y la pérdida de material de ambas regiones de la TP (fig. 7d, 7e, 7f).

A los siete minutos postratamiento, las cabezas frescas mostraron mayormente una apariencia esponjosa, debido a la presencia de zonas electrolúcidas y presentando también pérdida de material de la región postacrosomal (fig. 8a, 8b, 8c); en cuanto a las cabezas descongeladas a este tiempo de incubación presentaron más zonas electrolúcidas, material desprendiéndose de la zona postacrosomal y solo algunos restos de teca en la zona subacrosomal (fig. 8d, 8e, 8f).

Comportamiento de la Actina y del ADN

Se conoce que la principal proteína citoesquelética de las células en mamíferos es la actina (Howes *et al.*, 2001). Para saber como se comportaba esta proteína en el proceso de descondensamiento del espermatozoide del caprino se utilizó la faloidina-rodaminada. Al mismo tiempo se utilizó el colorante Hoechst 33342 para analizar el comportamiento del material genético de las cabezas espermáticas.

En las cabezas provenientes del semen fresco, la faloidina-rodaminada mostró una fluorescencia brillante en toda la cabeza en la cabeza, principalmente en la región ecuatorial y postacrosomal (fig. 9a); el material genético teñido con el Hoechst mostró una coloración azul uniforme en toda la cabeza, exceptuando una franja en la región ecuatorial donde se observó una especie de cinturón (fig. 9b).

Sin embargo en las cabezas de espermatozoides descongelados la fluorescencia fue ligeramente menor, en la región postacrosomal que los frescos (fig. 9c); por otra parte aunque el Hoechst tiñó toda la cabeza la fluorescencia detectada fue débil (fig. 9d).

Después del tratamiento por 10 minutos con heparina (5USP), la fluorescencia de ambos marcadores disminuyó tanto en las cabezas frescas como descongeladas (fig. 9e, 9f, 9g, 9h).

El tratamiento por 10 minutos con DTT (3.75mM), ocasionó mayores cambios en las cabezas de los espermatozoides descongelados, los cuales junto con la pérdida de la definición de la porción caudal de la región postacrosomal, mostraron la pérdida de marca por actina (fig. 9k); también la pérdida de material genético marcado por Hoechst en estas zonas fue evidente (fig. 9l);

contrariamente, aunque débil se siguió conservando la fluorescencia para actina en las cabezas frescas siendo inclusive más notoria en el segmento ecuatorial (fig. 9i). En estas últimas la marca de Hoechst se distribuyó sobre toda la cabeza excepto en la región ecuatorial, donde se continuó distinguiendo una banda oscura (fig. 9j)

En las cabezas sometidas a ambos agentes descondensantes (Heparina 5USP/DTT 3.75 mM) a un minuto de tratamiento se observó la marca para actina en la región postacrosomal con más fluorescencia que en la subacrosomal; siendo más evidente en las cabezas de los espermatozoides frescos (fig. 10a, 10c). Sin embargo a los tres minutos las diferencias comenzaron a ser más notorias en cuanto a la distribución de actina, ya que mientras que en las cabezas frescas se conservó la fluorescencia en la región postacrosomal y más evidente en la región ecuatorial (fig. 10e), en las cabezas descongeladas se presenta una reorganización de la actina, presentándose la fluorescencia en los bordes de la región postacrosomal, mostrando un aumento de tamaño de las cabezas (fig. 10g). Tanto en las cabezas frescas como en las descongeladas a los 3 minutos postratamiento se observó un aumento en la fluorescencia con la técnica de Hoechst (fig. 10f, 10h) en comparación a las controles (sin tratamiento; fig 9b, 9d) y a las de un minuto (fig. 10b, 10d).

A los cinco minutos con el mismo tratamiento las cabezas frescas continúan mostrando una mayor fluorescencia para la marca de actina en la región postacrosomal, observándose todavía levemente el cinturón en la zona ecuatorial (fig. 10i), sin presentar gran modificación en tamaño. La fluorescencia del material genético fue similar al de las cabezas frescas de tres minutos (fig. 10j). Las

cabezas descongeladas observadas en este mismo tiempo presentaron una fluorescencia para la actina más débil en toda la cabeza (fig. 10k), y un ligero hinchamiento de la región ecuatorial principalmente (fig. 10l).

Finalmente, a los siete minutos de tratamiento, aunque las cabezas frescas continuaron mostrando el patrón de fluorescencia para actina, aunque menos intenso, en la región postacrosomal y se presentó un ligero ensanchamiento en la región postacrosomal cuyo borde caudal mostró una banda fluorescente de actina (fig. 10n). En cuanto a las cabezas descongeladas únicamente se presentó una mancha de fluorescencia para actina, siendo más notoria en la periferia de las mismas (fig. 10p), sin embargo fue notorio el aumento de tamaño principalmente de las cabezas descongeladas las cuales perdieron totalmente su forma original y presentaron una mayor marca de Hoechst en comparación a las anteriores (fig. 10q).

Electroforesis del extracto protéico obtenido durante la descondensación de las cabezas espermáticas.

En la figura 11 se muestran los patrones electroforéticos obtenidos de los extractos protéicos obtenidos de las cabezas espermáticas sometidas a los diferentes agentes descondensantes. La electroforesis reveló mayor número de bandas en los extractos de las cabezas espermáticas frescas que en las descongeladas, siendo en las cabezas frescas 9 las bandas polipeptídicas mayoritarias cuyos pesos relativos fueron de 14 hasta 89 kDa y en las descongeladas de 3 bandas polipeptídicas fueron las mayoritarias cuyos pesos relativos fueron de 15 hasta 31 kDa. Las principales diferencias en los tratamientos descondensantes se encontraron en la intensidad de las bandas

mayoritarias siendo notablemente mas intensas las bandas en el tratamiento con DTT que con Heparina tanto en las muestras frescas como descongeladas, siendo las mayoritarias las de 15, 21, 26 y 32 kDa en las muestras frescas tratadas con heparina; las de 15, 21, 29, 42, 49 y 65 kDa las bandas mayoritarias en las muestras frescas tratadas con DTT; en comparación sólo 2 bandas se tiñeron más intensamente en las muestras descongeladas tratadas con Heparina (23 y 29 kDa) y las tratadas con DTT las de 22 y 29 kDa.

El aumento de intensidad en las bandas mayoritarias también se observó durante el proceso de descondensación empleando ambos descondensantes, las cuales conforme avanzó el tiempo de incubación aumentó la intensidad de las bandas teñidas; en las muestras de cabezas de semen fresco, las bandas más intensamente teñidas fueron las de 14, 23, 30, y 42 kDa; y de 19, 26 y 31 kDa en las muestras de semen descongelado.

DISCUSIÓN

Se sabe que en los mamíferos la teca perinuclear es el principal elemento citoesquelético de la cabeza espermática (Sutovsky *et al.*, 2003), y que ésta es sensible al proceso de congelación, como ha sido reportada por Martínez (2006), Gutiérrez (2006) y Aceves (2008). Estos autores propusieron a la subestructura de la teca, como marcador morfológico del daño general sufrido durante el proceso de congelación-descongelación tanto en el bovino, en el cerdo, como en el caprino. En cada una de las investigaciones anteriores se manifestó contundentemente este daño causado por la criopreservación como pérdida de la integridad y continuidad de la subestructura, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo (fig. 4b, 4e). Sin embargo, no fue posible cuantificarse, como en los proyectos antes mencionados, debido a que la subestructura ya se encontraba ligeramente dañada en las cabezas de los espermatozoides control, esto posiblemente debido al método de decapitamiento de los espermatozoides, ya que la proteasa empleada (papaina) pudo dañar a la subestructura; sin embargo sí se observó un daño mayor en la subestructura de las cabezas descongeladas que en las frescas.

El proceso de criopreservación modificó el tiempo de descondensación de las cabezas provenientes del semen descongelado, adelantandolo en relación a las cabezas espermáticas frescas. Siendo esto más notorio cuando se aplicaron ambos agentes descondensantes juntos (Heparina 5USP/DTT 3.75mM). Estos resultados difieren a lo descrito en cerdo por Hamamah *et al.* (1990), Córdova *et*

al. (2002) y Gutiérrez (2006) en el espermatozoide criopreservado del cerdo, quienes observaron un retraso en la descondensación. Hamamah *et al.* (1990) y Córdova *et al.* (2002) atribuyen tal retraso a una sobrecondensación de la cromatina; lo cual es poco probable que haya sucedido en este estudio ya que las cabezas espermáticas descongeladas tratadas únicamente con DTT presentaron una mayor reacción al descondensante que las cabezas espermáticas frescas. Esto último también fue encontrado por Gutiérrez (2006), el cual sugiere que la respuesta no está basada en una sobrecondensación como lo manifiestan Hamamah *et al.* (1990) y Córdova *et al.* (2002) donde existirían mayor número de enlaces disulfuro, haciendo más retardado el efecto de este reductor de puentes disulfuro, sino a otro tipo de alteración originada por la criopreservación sobre la teca, lo que posiblemente afecte el proceso de descondensación, tomando en consideración que la teca tiene gran cantidad de proteínas y algunas de ellas podrían servir como activadoras en diversos procesos de señalización.

Aunque el tratamiento con la heparina (5USP) no tuvo grandes repercusiones sobre las cabezas espermáticas, si tuvo efecto sobre la descondensación de las mismas, y sobre la subestructura, la cual en las cabezas espermáticas frescas produjo un ensanchamiento de los eslabones de la subestructura, mientras que en las descongeladas ocasionó la pérdida de la misma. Esto posiblemente se deba a las características de las proteínas de la teca perinuclear, ya que se ha reportado que dichas proteínas tienen un carácter básico (Gutiérrez, 2006; Longo, 1987). Con los resultados observados en este estudio con el tratamiento de DTT, podemos sugerir que este compuesto podría

funcionar como descondensante único a una mayor concentración en los espermatozoides descongelados.

La localización de actina, por medio del empleo de faloidina rodaminada en las cabezas de los espermatozoides control fue similar a la mencionada para otras especies, siendo más brillante la flórescencia en la zona postacrosomal, como se menciona para los borregos (de las Heras *et al.*, 1997); sin embargo, no está descrito en ninguna especie el patrón de localización de la actina relacionada al proceso de descondensación en los espermatozoides congelados-descongelados. Respecto a ésto la redistribución de la actina de la región postacrosomal, la cual se fue despolimerizando y perdiendo flórescencia hasta verse similar a la de la región subacrosomal debido a la descondensación en esta región; siendo importante mencionar estos resultados sirven como base para posteriores investigaciones al respecto.

Por otra parte la descondensación del material nuclear inició en la región postacrosomal, lo que difiere con lo reportado en la literatura *in vivo*, ya que se menciona que dicha descondensación inicia cerca de la región ecuatorial del espermatozoide, donde también se inicia la desestructuración de la teca perinuclear y de la envoltura nuclear (Yaganimachi, 1994; Sutovsky, 2003). Lo anterior también difiere de lo encontrado en el cerdo, el cual inicia la descondensación por la zona apical de la región subacrosomal (Gutiérrez, 2006). Sin embargo, coincide con lo encontrado por Gall y Ohsumi (1976) los cuales descondensaron cabezas espermáticas de ratón, rata, cobayo y conejo, describiendo el inicio de la descondensación por la región postacrosomal, lo interesante de estos trabajos es que para la decapitación también utilizaron una

proteasa (tripsina) antes de descondensar con la misma proteasa y DTT, la posible acción que pudo haber ejercido la proteasa sobre las proteínas de la región postacrosomal fue la de debilitarlas y hasta degradarlas permitiendo la descondensación del material nuclear de esta región y dar patrones de descondensación similares a los obtenidos en este estudio, ya que para el proceso de decapitación se utilizó la papaina, la cual es otra proteasa que ellos mismos mencionan podría sustituir a la tripsina, sin embargo, es importante mencionar que los patrones de descondensación obtenidos pudieron ser una variación de especie.

Las proteínas constituyentes de la teca perinuclear están siendo alteradas por el proceso de criopreservación, posiblemente debido a la termosensibilidad que presentan algunas proteínas citoesqueléticas (Hall *et al.*, 1993; Watson, 1995), por este motivo se presentaron diferencias en la extracción de las proteínas de la teca perinuclear en cabezas espermáticas de semen caprino fresco y descongelado. Se observó una diferencia en el número de bandas, siendo mayor el número en las muestras frescas (9 bandas) que en las descongeladas (3 bandas); coincidiendo estos resultados con lo descrito en el cerdo, donde se obtuvieron 16 bandas en las muestras frescas y 13 bandas en las muestras descongeladas (Arancibia, 2006); ambas especies difieren a lo observado en el bovino, donde se obtuvieron en promedio un menor número de bandas en las muestras frescas (4 bandas) que en las descongeladas (7 bandas; Felipe, 2006), lo que podría sugerir una diferencia en el contenido proteico entre especies.

En la extracción diferencial de las proteínas de la teca perinuclear, en este estudio se obtuvieron bandas proteicas similares a las reportadas para las

proteínas que componen la teca perinuclear del espermatozoide de bovino (Oko y Maravei, 1994). Las bandas proteicas encontradas en este estudio se encuentran en el rango de 14-97kDa, las cuales coinciden con las proteínas reportadas existentes como integrantes de la teca perinuclear de bovino como: la Perf 15 de 15.5 kDa (Oko y Maravei, 1994); proteínas solubles en álcalis de 25-60 kDa (Oko y Maravei, 1994); CP α 3 y CP β 3 de 31 y 34.74 kDa (Von Bülow *et al.*, 1997); actina de 43 kDa (Flaherty *et al.*, 1988); banda multipeptídica (MBP) de 56-74 kDa (Longo *et al.*, 1987); Calicina de 60 kDa (Oko y Maravei, 1994); Cilicina I y Cilicina II de 74 y 53.5kDa (Hess *et al.*, 1995).

También en este trabajo se observó que el tratamiento con DTT logró una mejor descondensación que el tratamiento con heparina, esto se corrobora gracias a una mayor extracción diferencial de proteínas la cual se visualiza como una mayor intensidad de bandeo, lo que nos permite suponer que el DTT para semen de caprino podría funcionar como descondensante único a una mayor concentración; sin embargo en conjunto ambos descondensantes tienen una acción sinérgica, demostrada en la extracción proteica con el aumento de intensidad de las bandas conforme avanza el proceso de descondensación, ya que el DTT ayuda a liberar al material genético debido a que es un reductor de enlaces disulfuro y con la ayuda de la heparina, que compite con el ADN por las protaminas, se logra realizar la descondensación en menor tiempo y concentración de ambos descondensantes (Seligman *et al.*, 1994; Motoishi *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2003, Nakai *et al.*, 2006).

Conclusiones

- Durante el proceso de congelación y descongelación la subestructura de la teca perinuclear se ve alterada y dañada.
- El menor número de bandas proteicas observadas en el extracto de la TP, indican una desestabilización bioquímica de la TP después del procedimiento de congelación-descongelación.
- La criopreservación modifica el proceso de descondensación nuclear, ya que los espermatozoides alteran la velocidad de descondensación normal. Esta modificación en la velocidad de descondensación podría estar más relacionada con la pérdida de algún factor regulador de la teca perinuclear, que con una sobrecondensación nuclear.
- Los descondensantes (Heparina y DTT) de manera individual no alcanzan a descondensar completamente las cabezas espermáticas, pero al combinarlos la descondensación ocurre en minutos.
- Los patrones de la actina se ven modificados durante la descondensación, viéndose disminuida la cantidad de esta durante el proceso.
- El patrón de descondensación del material nuclear en el caprino se inicia en la región postacrosomal y continúa posteriormente hasta completar la totalidad de la cabeza.

EFERENCIAS

- Aceves A. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la Teca Perinuclear del Espermatozoide de Caprino. Tesis de Nivel Maestria. FMVZ-UNAM. México 2008.
- Arancibia K. Valoración de la integridad de la teca perinuclear de los espermatozoides criopreservados de cerdo. Tesis de Nivel Doctorado. FMVZ-UNAM. México 2006.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 2002;58:253-256.
- Bailey JL, Buhr MM. Cryopreservation alters the Ca^{2+} flux of bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* 1994;74:45-51.
- Bedford JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of $-S-S-$ crosslinks in sperm head, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974;88:137-155.
- Bench GS, Friz AM, Corzett MG, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996;23:263-271.
- Breed WG, Idriss D, Oko RJ. Protein composition of the ventral processes on the sperm head of Australian hydromyine rodents. *Biol Reprod* 2000;63:629-634.
- Carrell DT, Emery BR, Peterson CM. The correlation of sperm chromatin decondensation following in vitro exposure to heparin and sperm penetration rates. *J Assisted Reprod Genetics* 1998;15:560-564.

- Córdova 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.
- Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 1987;105:1473-1478.
- Cuneo P, Trombetta G, Magri E, Grazi E. The “in vitro motility assay” and phalloidin-F-actin. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;211:614-618.
- de Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural change in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 1990;27:171-183.
- Delgado NM, Sánchez-Vázquez, ML, Reyes R. Nucleons, 1: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Arch Androl* 1999;43:85-95.
- Delgado NM, Flores A, Rodríguez H, Merchant LH, Reyes R. Heparin and glutathione II: Correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Arch Androl* 2001;47:47-58.
- Esteso MC, Fernández-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryoletters* 2003;24:261-268.
- Felipe YE. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación del semen bovino. Tesis de Nivel Maestría. FMVZ-UNAM. México 2006.
- Flaherty SP, Winfrey VP, Olson GE. Localization of actin in human, bull, rabbit and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat Rec* 1988;221:599-610.

- Fornes MW, Bustos OE. Study of nuclear decondensation of the rat spermatozoa by reducing agents during epididimal transit. *Andrologia* 1994;26:87-92.
- Gall WE, Ohsumi Y. Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Exp Cell Res* 1976;102:349-358.
- Gravance CG, White C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim Reprod Sci* 1997;49:37-43.
- Gravance CG, Vishwanth R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl* 1998;19:704-709.
- Gutiérrez O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación de del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis de Nivel Maestria. FMVZ-UNAM. México 2006.
- Hall SM, Evans J, Haworth SG. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:106-114.
- Hamamah S, Royère D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. 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.
- Heid H, Figge U, Winter S, Kuhn C, Zimbelmann R, Franke W. Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* 2002;279:177-187.

- Hernández EJ. ¿Depende la descondensación del núcleo espermático del cobayo de la estabilidad de la subestructura de la teca perinuclear?. Tesis de nivel Maestría en Ciencias. FMVZ-UNAM, México 2004.
- Hernández-González EO, Lecona-Valera AN, Escobar-Herrera J, Mujica A. Involvement of the F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;46:43-58.
- Hess H, Heid H, Franke WW. Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol* 1993;122:1043-1052.
- Hess H, Heid H, Zimbelmann R, Franke WW. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp Cell Res* 1995;218:174-182.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci* 2007;100:61-72.
- Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1994;51:414-424.
- Howes EA, Hurst SM, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J Androl* 2001;22:62-72.
- Jager S, Wijchman J, Kremer J. Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J Exp Zool* 1990;256:315-322.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:143-172.
- Juárez M 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 Journal of Structural Biology* 1999;128:225-236.
- Kobayashi J, Kohsaka T, Sasada H, Umezu M, Sato E. Fluorescence in situ hybridization with Y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999;52:1043-1054.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
- Lebouef B, Restall B, Salomón S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000;62:113-141.
- Lecuyer C, Dacheux JL, Hermand E, Mazeman E, Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol Reprod* 2000;63:1801-1810.
- Longo FJ, Kronhne G, Franke WW. Basic proteins of the Perinuclear Theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol* 1987;105:1105-1120.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Pintado B, Gutiérrez-Adán A, de la Fuente J, Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 2005;64:232-241.

- Martínez OC, Juárez-Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006;66:1969-1975.
- Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Annal Biochem* 1981;117:307-310.
- Motoishi M, Goto K, Tomita K, Ookutsu S, Nakanishi Y. Decondensation of bull and human sperm nuclei by dithiothreitol and/or heparin. *J Reprod Dev* 1996;42:7-13.
- Muldrew K, Mc Gann LE. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 1990;57:525-532.
- Mujica A, Navarro-García F, Hernández González EO, Juárez-Mosqueda ML. Perinuclear Theca During Spermatozoa Maturation Leading to Fertilization. *Microsc Res Tech* 2003;61:76-87.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. Morphologic changes in boar sperm nuclei with reduced disulfide bonds in electrostimulated porcine oocytes. *Reproduction* 2006;131:603-611.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1980;105:361-363.
- Ocampo LJ. Identificación de actina durante la descondensación *in vitro* de la cromatina del espermatozoide del cuy. Tesis de nivel Maestría. CINVESTAV-IPN, México 1995.
- Oko R, Maravei D. Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. *Microsc Res Tech* 1995;32:520-532.

- Oko R, Morales CR. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev Biol* 1994;166:235-245.
- Pouresmaeili F, Morales CR, Oko R. Molecular cloning and structural analysis of the gene encoding PERF15 protein present in the perinuclear theca of the rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;57:655-659.
- Reyes R, Sánchez V ML, Merchant LH, Rosado A, Delgado NM. Effect of heparin-reduced glutathione on hamster sperm DNA unpacking and nuclear swelling. *Arch Androl* 1996;37:33-45.
- Robertson L, Watson PF. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil* 1986;77:177-185.
- Robertson L, Watson PF, Plummer JM. Prior incubation reduce calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subject to cold shock. *Cryo letters* 1988;9:286-293.
- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993;47:279-285.
- Sánchez VML, Reyes R, Delgado NM, Merchant LH, Rosado A. Differential decondensation of class I (rat) and class II (mouse) spermatozoa nuclei by physiological concentrations of heparin and glutathione. *Arch Androl* 1996;36:161-176.
- Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil* 1994;101:435-443.

- Strzezek J, Kordan W. Effects of decondensing agents on chromatin stability of boar spermatozoa radioisotope study. *Animal Science Papers and Reports* 2003;3:167-181.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003;61:362-378.
- Thompson LA, Brook PF, Warren M, Barrat C, Cooke I. A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm. *J Androl* 1994;15:337-342.
- Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Soderquist R, Mapletoft H, Rodriguez-Martinez H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* 1999;22:366-373.
- Valencia J, González G, González M, Trejo A. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 y 0.50ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperature. *Vet Mex.* 1994;25:127-131.
- Von Bülow M, Rackwitz HR, Zimbelmann R, Franke WW. CP β 3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* 1997;233:216-224.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:871-891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:481-492.

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautière P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 1998;80:117-128.

Zirkin BR, Soucek DA, Chang TSK, Perreault SD. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res* 1985;11:349-365.

	FRESCO	DESCONGELADO
Vivos	150.00±5.56 ^a	55.17±9.61 ^b
Muertos	49.67±6.80 ^b	128.17±9.61 ^a

Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$), medias±ee

Cuadro 1 Comparación de la viabilidad en semen fresco y descongelado.

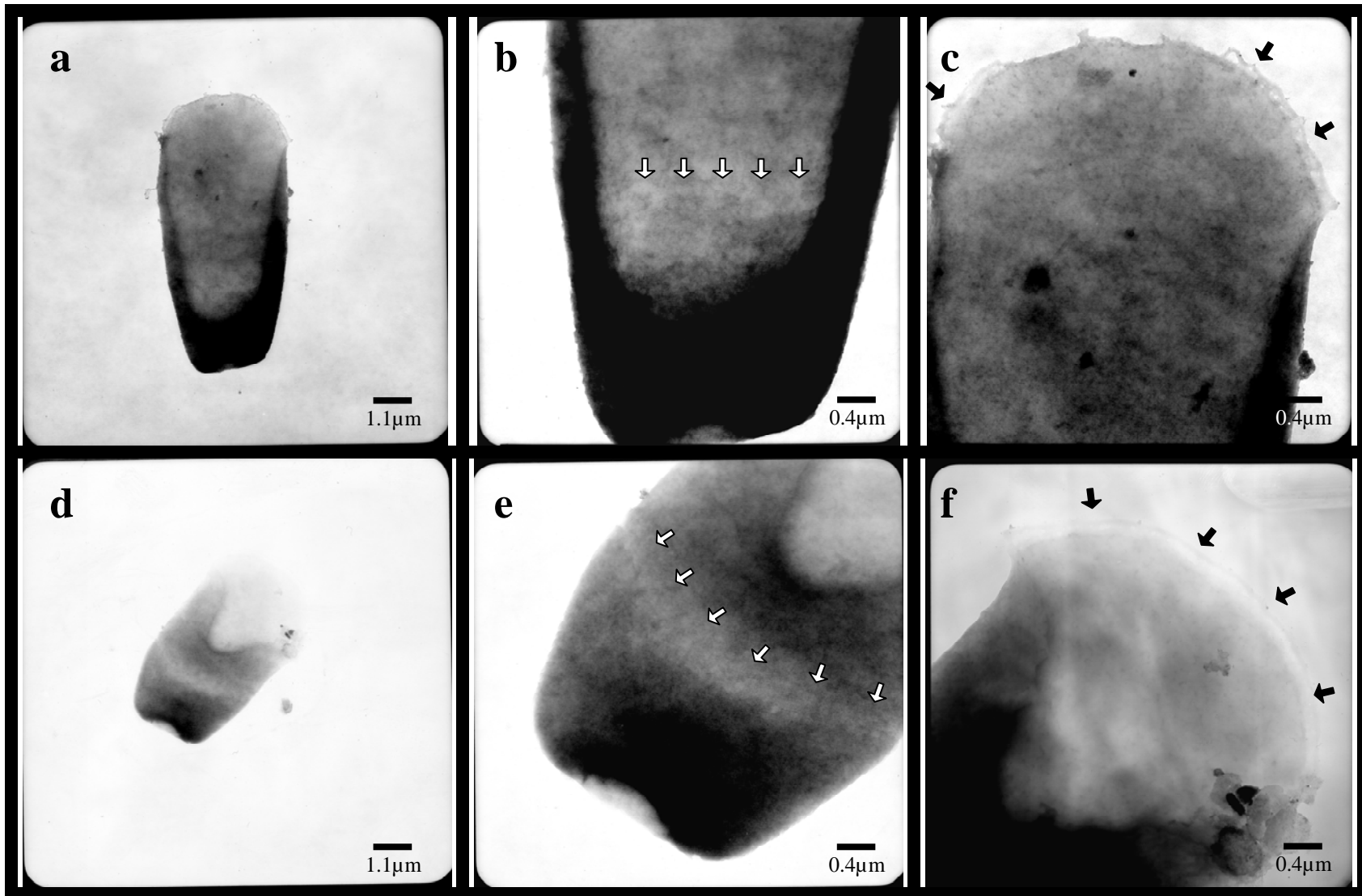


Figura 2 Cabezas espermáticas sin ningún tratamiento (Ctrl)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

b) Se observa que perdió integridad la subestructura de la teca perinuclear, alcanzándose a ver los eslabones de la misma.

c) Se alcanza a percibir el inicio del desprendimiento de la teca en la región subacrosomal.

e) No se definen bien los eslabones de la subestructura, observándose una línea más electrolúcida.

f) Se observa un desprendimiento casi total de la teca subacrosomal.

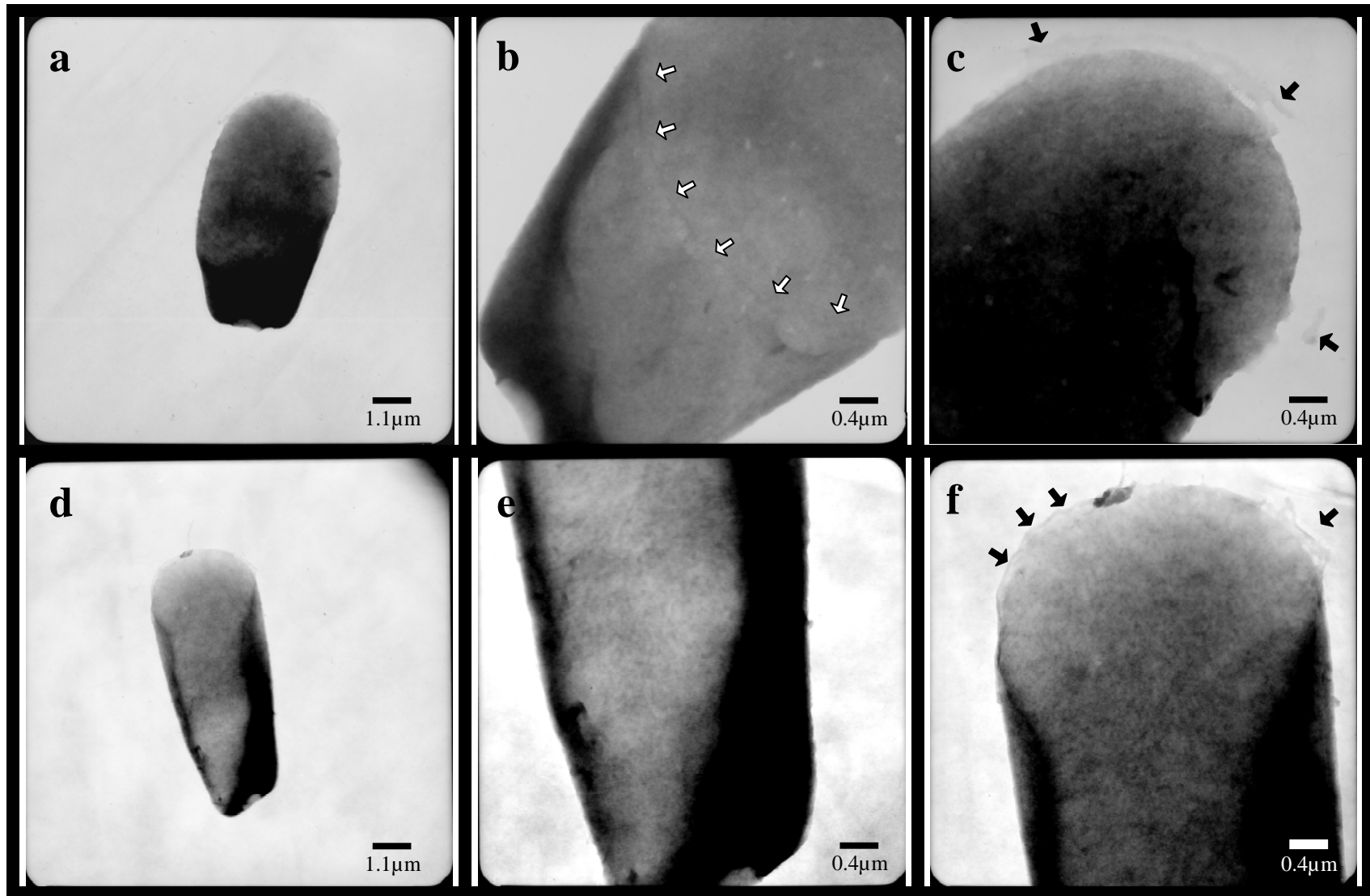


Figura 3 Cabezas espermáticas tratadas con heparina (H10)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

b) Se observa casi en su totalidad la integridad de la subestructura notándose los eslabones ensanchados.

c) Se percibe el desprendimiento de la teca en la región subacrosomal.

e) Desaparece la subestructura y solo se nota una línea mas electrolúcida.

f) Se observa desprendimiento de la teca subacrosomal.

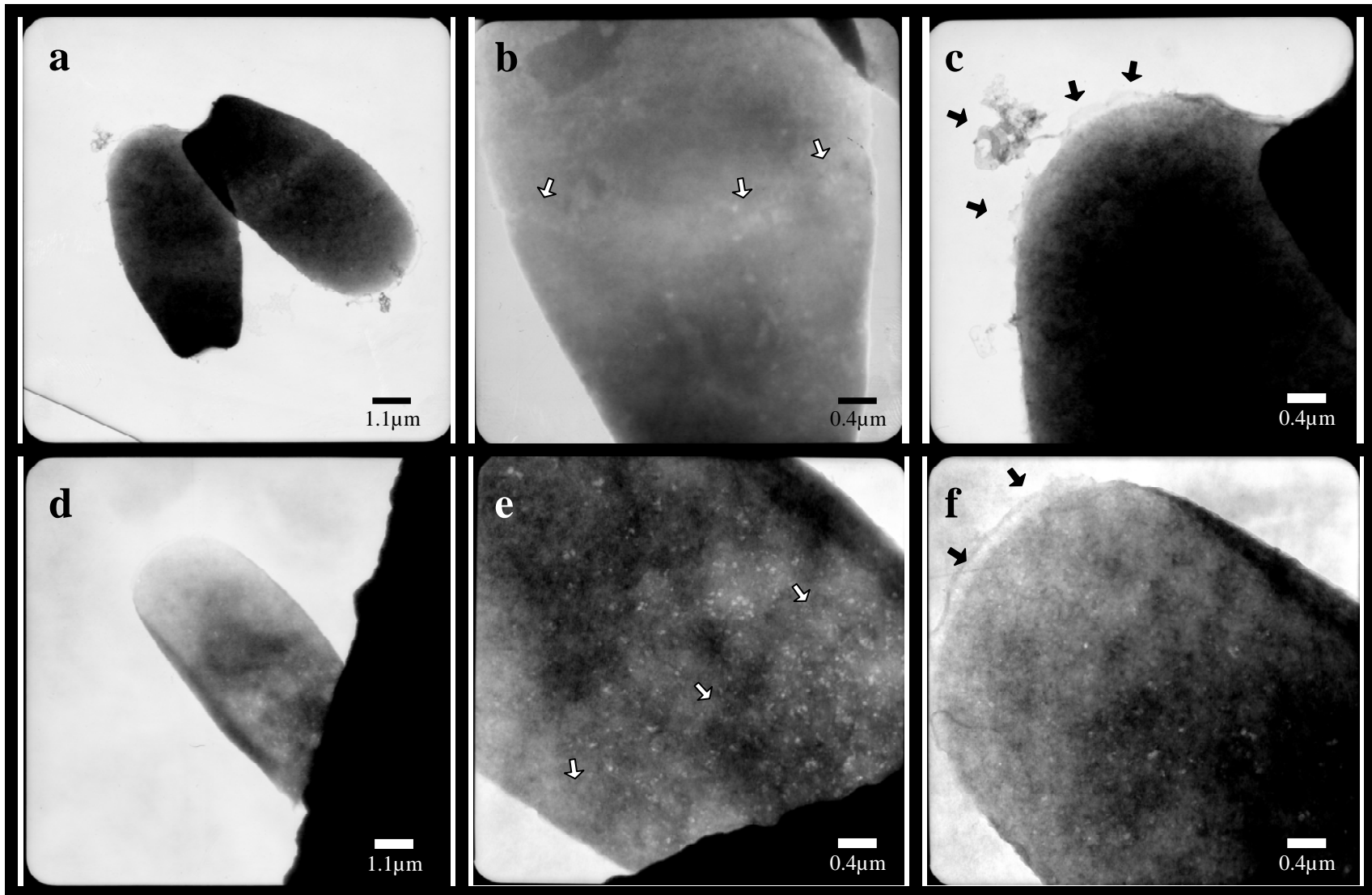


Figura 4 Cabezas espermáticas tratadas con DTT (D10)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

b) Se observan restos de la subestructura.

c) Se percibe el desprendimiento de la teca en la región subacrosomal de forma ondulada, desprendiéndose mayor cantidad de material que con la heparina.

e) Se observan restos de la subestructura.

f) Se observa desprendimiento de la teca subacrosomal.

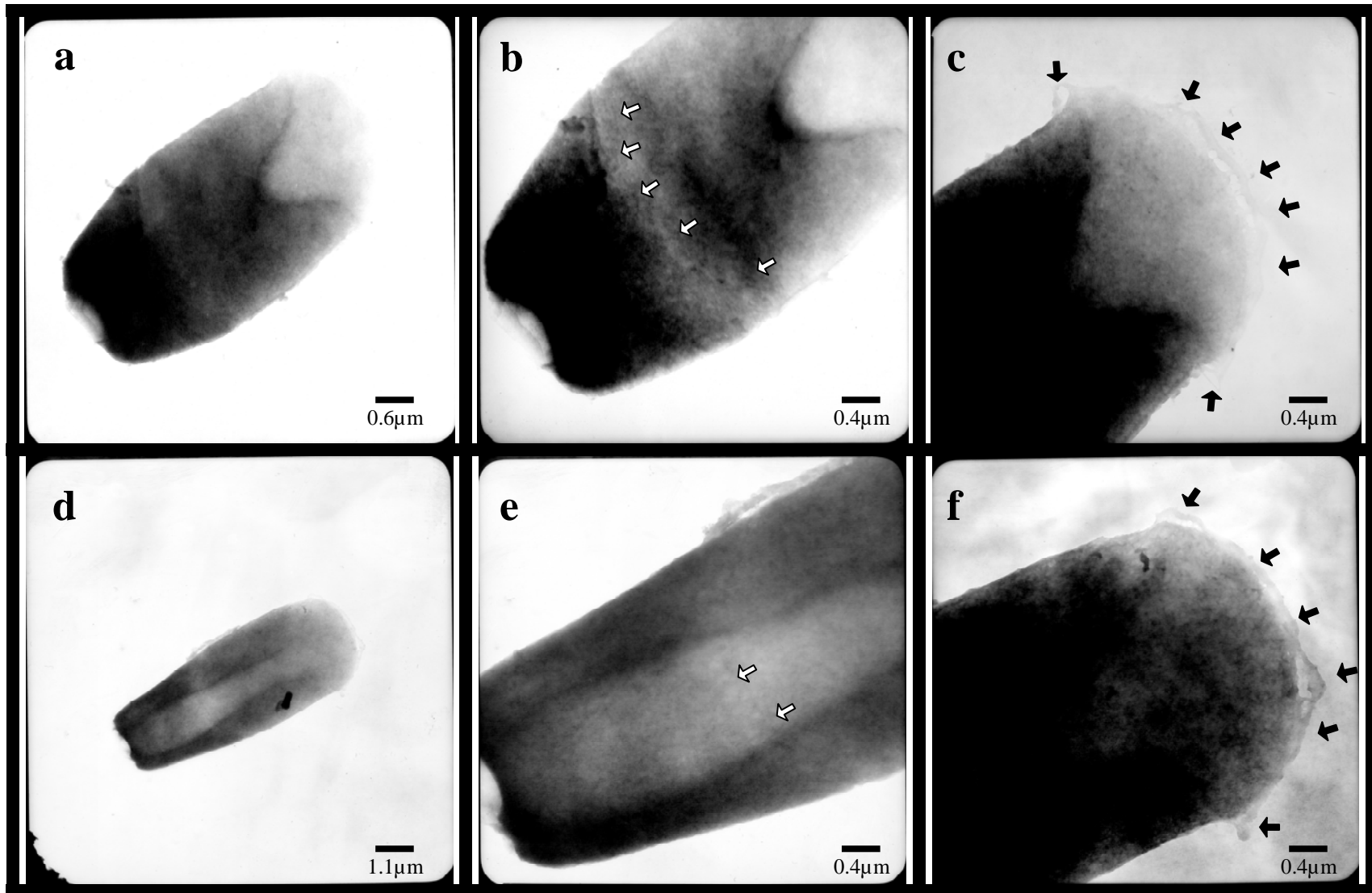


Figura 5 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a un minuto después de aplicado el tratamiento (H/D1)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

a) y d) No se notan grandes cambios. Se puede ver que las diferencias no son aparentes, las cabezas son bien delineadas y la pérdida de material no es muy perceptible.

b) Se observa que perdió integridad la subestructura de la teca perinuclear, alcanzándose a ver algunos eslabones de la misma.

c) Se alcanza a percibir el inicio del desprendimiento de la teca en la región subacrosomal.

e) No se definen bien los eslabones de la subestructura, observándose una línea más electrolúcida.

f) Se alcanza a percibir el inicio del desprendimiento de la teca subacrosomal

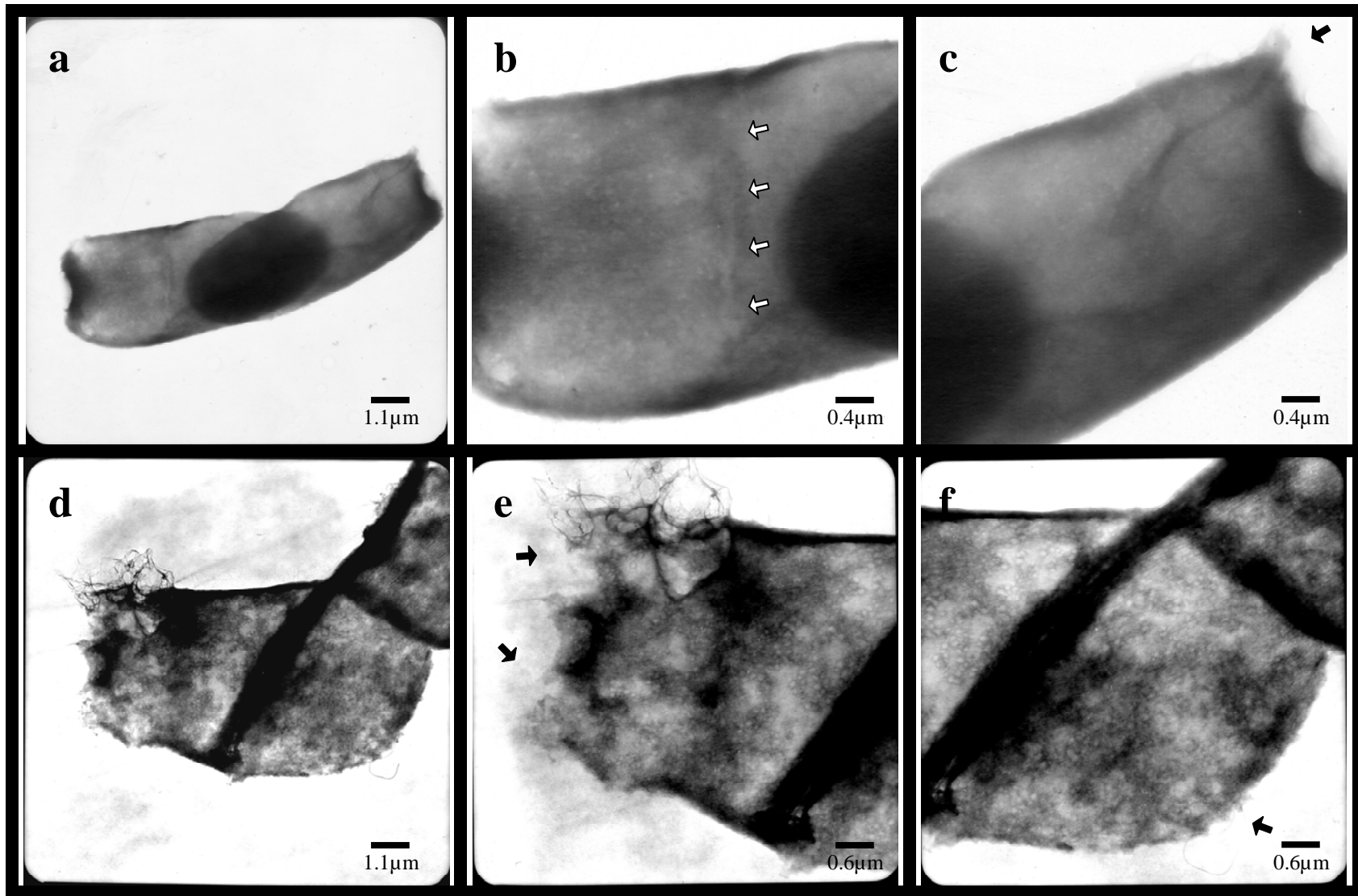


Figura 6 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 3 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D3)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

a) y d) Se notan diferencias en el tamaño de las cabezas, teniendo la descongelada un aspecto esponjoso y más hinchado que la fresca. Observándose zonas electrolúcidas que representan descondensación en la cabeza descongelada.

b) Se perdió la subestructura de la teca perinuclear notándose una línea más electrolúcida marcando la ausencia de ésta.

c) Ya se perdió la subestructura de la teca perinuclear, no se percibe la línea electrolúcida.

e) Se marca el desprendimiento de material por la región postacrosomal.

f) Se observa la cabeza desnuda en la región subacrosomal.

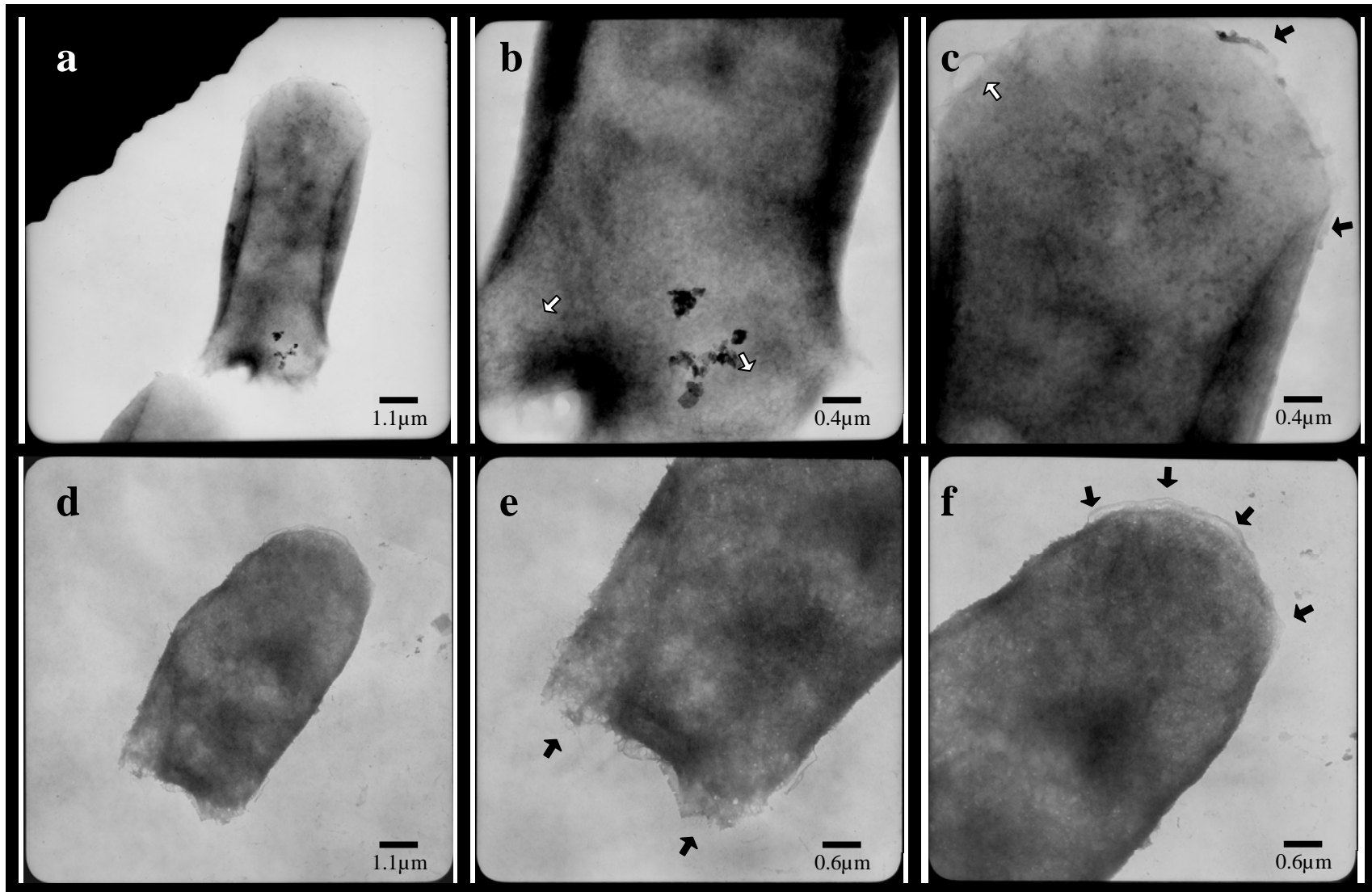


Figura 7 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 5 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D5)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

a) y d) Se notan diferencias en el tamaño de las cabezas, teniendo la descongelada un aspecto esponjoso y más hinchado que la fresca, cerca de la región ecuatorial. Observándose zonas electrolúcidas que representan descondensación en ambas cabezas.

b) Se muestra el desprendimiento de material en la región posacrosomal.

c) Se muestra la pérdida de material en la región subacrosomal.

e) Se observa pérdida de material en la región posacrosomal.

f) Se observa desprendimiento de la región subacrosomal.

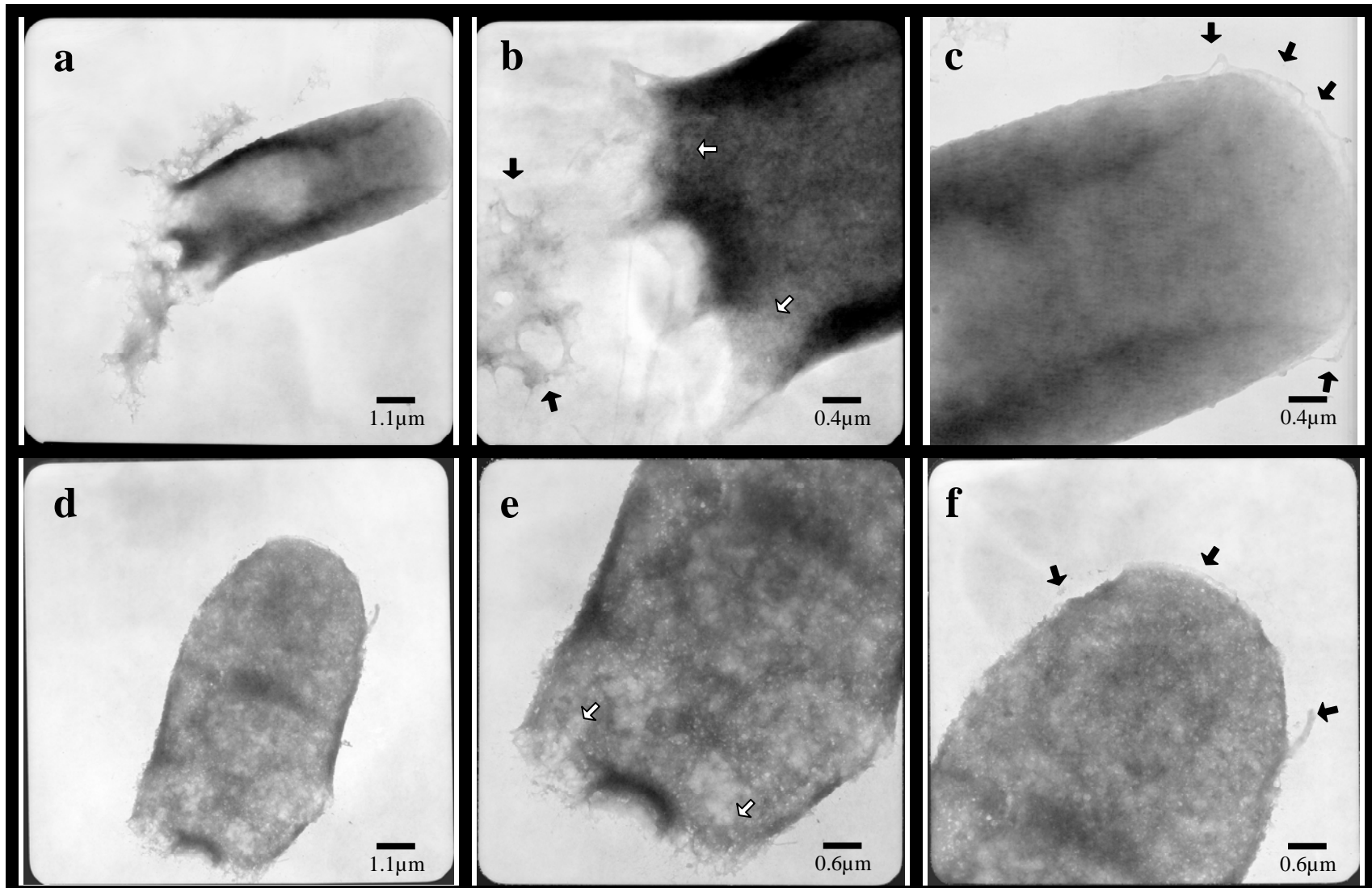


Figura 8 Cabezas espermáticas tratadas con heparina/DTT a 7 minutos después de aplicado el tratamiento (H/D7)

Panel superior cabeza de espermatozoide fresco y panel inferior cabeza de espermatozoide descongelado: a) y d) cabezas completas, b) y e) acercamientos a la región postacrosomal, c) y f) acercamiento a región subacrosomal.

a) y d) Se notan diferencias en el tamaño de las cabezas, teniendo la descongelada un aspecto esponjoso y más hinchado que la fresca, cerca de la región ecuatorial. Observándose zonas electrolúcidas que representan descondensación en ambas cabezas.

b) Se muestra el desprendimiento de material en la región posacrosomal.

c) Se muestra la pérdida de material en la región subacrosomal.

e) Se observa pérdida de material en la región posacrosomal.

f) Se observan restos de la teca subacrosomal.

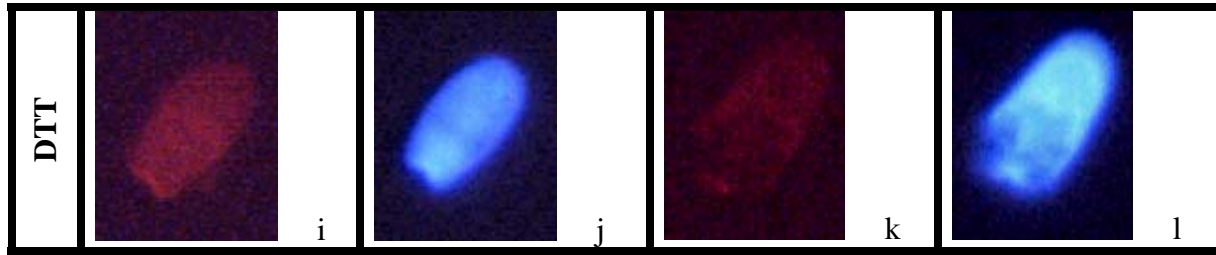


FIGURA 9 CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES TRATADOS CON HEPARINA Y DTT DURANTE DIEZ MINUTOS USANDO LAS TÉCNICAS DE FALOIDINA RODAMINADA Y HOECHST

- a) y b) Control Fresco (Ctrl)
- c) y d) Control Descongelado (Ctrl')
- e) y f) Heparina Fresco (H10)
- g) y h) Heparina Descongelado (H10')
- i) y j) DTT fresco (D10)
- k) y l) DTT Descongelado (D10')

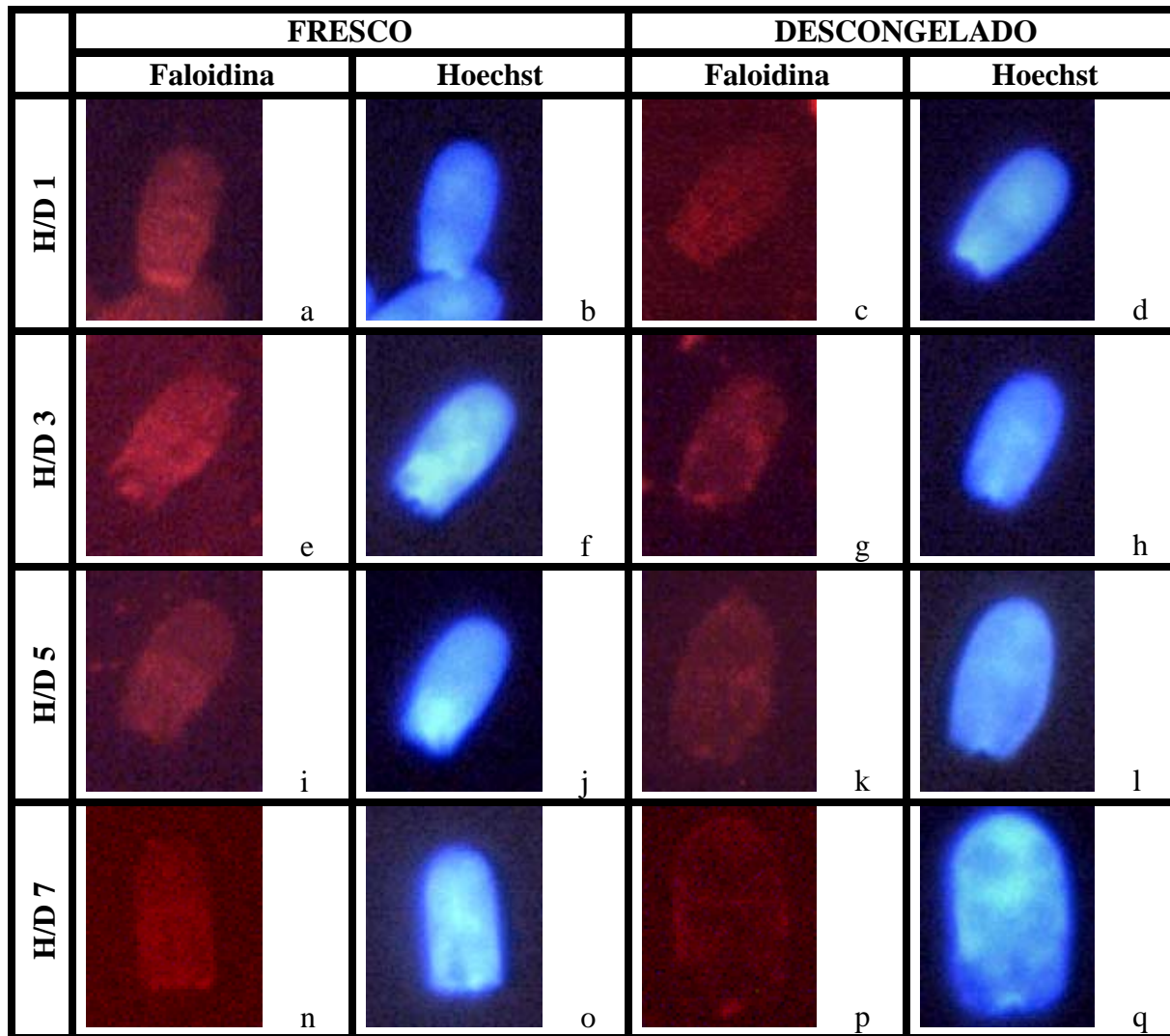


FIGURA 10 CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES TRATADOS EN CONJUNCIÓN DE HEPARINA Y DTT EN DIFERENTES TIEMPOS USANDO LAS TÉCNICAS DE FALOIDINA RODAMINADA Y HOECHST

- a) y b) Heparina/DTT 1 minuto Fresco (H/D1)
- c) y d) Heparina/DTT 1 minuto Descongelado (H/D1')
- e) y f) Heparina/DTT 3 minutos Fresco (H/D3)
- g) y h) Heparina/DTT 3 minutos Descongelado (H/D3')
- i) y j) Heparina/DTT 5 minutos Fresco (H/D5)
- k) y l) Heparina/DTT 5 minutos Descongelado (H/D5')
- n) y o) Heparina/DTT 7 minutos Fresco (H/D7)
- p) y q) Heparina/DTT 7 minutos Descongelado (H/D7')

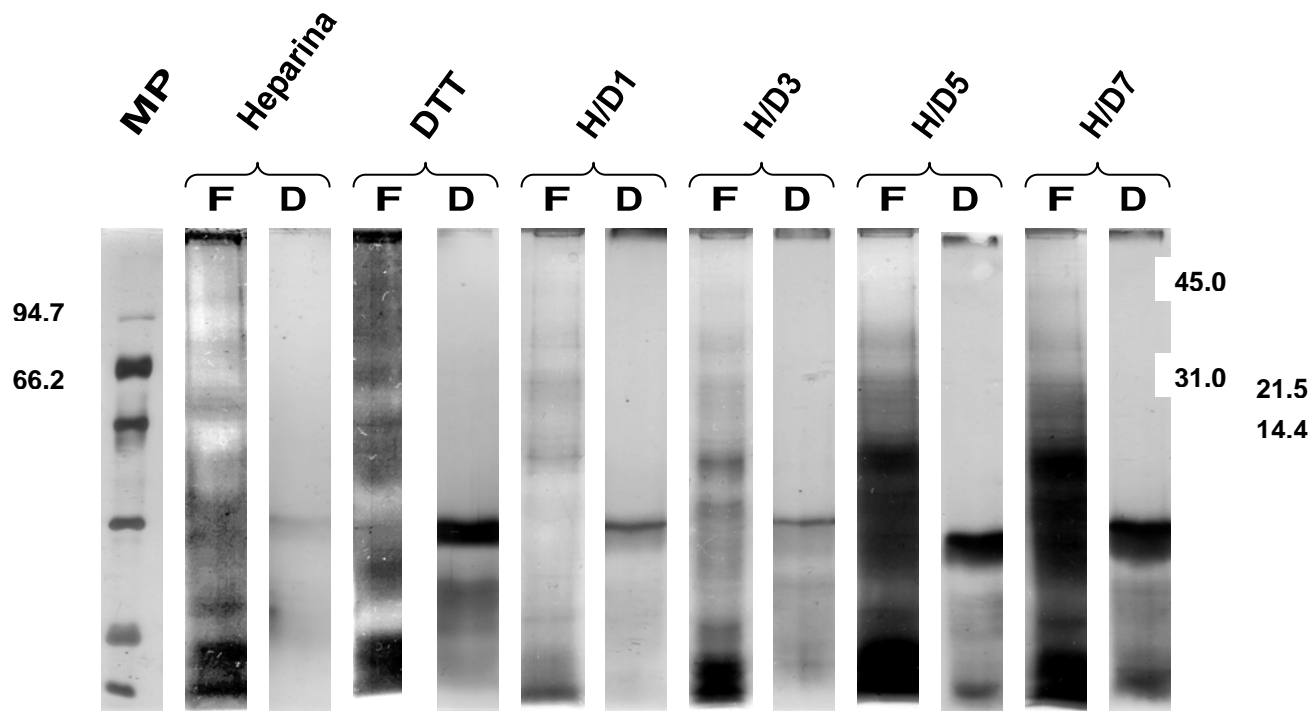


Figura 11 Patrón electroforético de las proteínas extraídas durante la descondensación en semen fresco y descongelado con diferentes procedimientos descondensantes. La barra marcada con MP muestra los marcadores de peso. Las barras marcadas con F muestran las bandas proteicas extraídas del semen fresco. Las barras marcadas con D muestran las bandas proteicas extraídas del semen descongelado. Los procedimientos descondensantes fueron los mencionados anteriormente.