



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**LA UTILIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA LA
LIBERACIÓN INTRACELULAR DE TREHALOSA Y SU
EFECTO SOBRE LA INTEGRIDAD Y FUNCIONALIDAD
ESPERMÁTICA DE SEMEN PORCINO
CRIOPRESERVADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MVZ. CLAUDIA DENISSE MENDOZA VIVEROS

TUTOR

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ (FMVZ)

COMITÉ TUTORAL

DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA (FMVZ)

DR. MIGUEL ÁNGEL CORNEJO CORTÉS (FESC)

PROFESOR INVITADO

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD (FQ)

MEXICO, CD. MX.

AGOSTO 2016



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.

DEDICATORIA

A dios, por prestarme la vida y salud para cumplir este sueño.

A mi papá, mamá y hermanas, por siempre estar presentes en cada uno de los pasos que he dado a lo largo de mi vida, apoyándome, dándome su cariño e impulsándome a dar lo mejor de mí. Quiero que sepan que gracias a ustedes soy lo que soy como persona y que este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca económica otorgada durante la realización de este proyecto.

A los doctores **María Josefa Bernad Bernad y Oscar Gutiérrez Pérez** por el conocimiento, tiempo y paciencia brindados para llevar a cabo este trabajo.

A mi comité tutorial formado por los doctores **María Elena Trujillo Ortega y Miguel Ángel Cornejo Cortés**, cuyas observaciones enriquecieron de forma importante este trabajo.

Al **Dr. Manuel Barrientos Morales** por brindarme su apoyo desde el inicio de mi vida profesional.

A la **QFB. Mónica A. Linares Alba** por toda la ayuda y tiempo brindados durante la realización de esta investigación.

Al **Dr. Víctor Zaldívar** por su asesoría, tiempo y comentarios que complementaron este trabajo.

RESUMEN

La trehalosa es un disacárido empleado como crioprotector impermeable en la congelación de semen porcino, no obstante se ha reportado que se requiere su presencia en ambos lados de la bicapa lipídica para mostrar su máxima protección. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue evaluar si la adición de liposomas cargados con trehalosa en diluyentes para congelación de semen de cerdo, permiten mejorar los índices de viabilidad y motilidad al descongelado. La primera fase del proyecto consistió en la preparación y caracterización de liposomas a base de lecitina de soya en presencia de 300 mM de trehalosa y vacíos, evaluándose su tamaño, índice de polidispersión, potencial zeta, morfología, concentración de fosfolípidos y porcentaje de encapsulación. Posteriormente, durante la segunda fase se valoró el efecto de estos liposomas sobre la viabilidad y motilidad del espermatozoide al descongelado, utilizándose 4 grupos experimentales de acuerdo al diluyente de congelación (trehalosa 300 mM, androstar® cryoplus, liposomas cargados con trehalosa y liposomas vacíos). Los resultados de la caracterización de liposomas demostraron la presencia de partículas esféricas con un porcentaje de encapsulación del 73%, un tamaño promedio de 357 nm y aglomerados. En referencia a la valoración de la viabilidad espermática, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos analizados, no obstante el porcentaje más alto fue de $26.93 \pm 1.70\%$ presentado por la trehalosa control, en tanto que en los liposomas cargados se observó un $19.68 \pm 2.95\%$. Al contrario, en la motilidad si hubo diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los liposomas cargados ($14.80 \pm 1.70\%$) y el resto de los grupos, siendo el porcentaje del androstar® cryoplus el más alto ($23.33 \pm 1.66\%$). En conclusión, el uso de liposomas cargados con trehalosa permite mantener la viabilidad del espermatozoide de cerdo al descongelado, no así la motilidad, requiriéndose mayor investigación enfocada a la concentración de trehalosa intraliposomal.

Palabras clave: Trehalosa, liposomas, espermatozoide porcino, criopreservación, viabilidad, motilidad.

ABSTRACT

Trehalose is a disaccharide commonly used like a nonpermeating cryoprotectant in boar semen cryopreservation, however it has been reported that its presence is required on both sides of the lipid bilayer to show maximum protection. By the above mentioned, the aim of this project was to evaluate if the addition of liposomes loaded with trehalose in boar freezing extenders, can improve the rates of post-thaw viability and motility. The first phase of the project involved the preparation and characterization of lecithin-based liposomes in presence of 300 mM trehalose and empty, evaluating the size, polydispersity index, zeta potential, morphology, phospholipid content and entrapment efficiency. During the second phase, the effect of these liposomes on the post-thaw sperm viability and motility was assessed using four experimental groups according to the freezing extender (300 mM trehalose, Androstar® CryoPlus, liposomes loaded with trehalose and empty liposomes). The results of the liposomes characterization showed the presence of spherical vesicles with an entrapment efficiency of 73%, an average size of 357 nm and agglomerates. Referring to the sperm viability assessment, there were no significant differences ($P > 0.05$) between groups. Nevertheless the highest percentage was $26.93 \pm 1.70\%$ presented by trehalose control, while in the loaded liposomes $19.68 \pm 2.95\%$ was observed. On the contrary, in motility there was a statistical difference ($P < 0.05$) between the loaded liposomes ($14.80 \pm 1.70\%$) and the other groups, being the percentage of Androstar® CryoPlus the highest ($23.33 \pm 1.66\%$). In conclusion, the use of trehalose-loaded liposomes allows maintain the post-thaw viability but not motility, requiring further investigation focused on the intraliposomal trehalose concentration.

Keywords: Trehalose, liposomes, boar sperm, cryopreservation, viability, motility.

INDICE

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Ventajas del semen congelado	3
2.2. La criopreservación espermática y el daño celular	4
2.3. Composición de la membrana plasmática del espermatozoide porcino y su susceptibilidad al daño por criopreservación	7
2.5. La trehalosa como crioprotector espermático	10
2.6. Uso de liposomas en células	12
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVO GENERAL	15
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1. Preparación de liposomas.....	16
6.2. Caracterización de las formulaciones de liposomas.....	17
6.2.1. Tamaño de la partícula y PDI.....	17
6.2.2. Potencial Zeta	18
6.2.3. Microscopia electrónica.....	18
6.2.4. Cuantificación colorimétrica de fosfolípidos.....	18
6.2.5. Cuantificación de trehalosa y porcentaje de encapsulación	20
6.4. Congelación espermática.....	23
6.5. Descongelación	24
6.6. Valoración espermática	24
6.6.1. Motilidad progresiva.....	25
6.6.2. Viabilidad espermática	25
6.7. Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS	27
7.1. Caracterización de las formulaciones de liposomas.....	27
7.1.1. Caracterización física de liposomas.....	27
7.1.2. Cuantificación colorimétrica de fosfolípidos	28

7.1.3. Cuantificación de trehalosa y porcentaje de encapsulación	29
7.2. Valoración espermática al descongelado	31
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	33
10. REFERENCIAS	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Formulación de liposomas	17
Tabla 2. Formulación de diluyentes para congelación	23
Tabla 3. Caracterización física de liposomas	27
Tabla 4. Cuantificación final de fofolípidos	28
Tabla 5. Análisis cromatográfico de liposomas cargados	30
Tabla 6. Valoración del estado de los eyaculados en fresco	31
Tabla 7. Efecto de liposomas sobre la motilidad y viabilidad al descongelado	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de dispersión entre la concentración de trehalosa y el ABC	29
Gráfico 2. Cromatograma de lisado de liposomas	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ritmos de enfriamiento y eventos durante la congelación	4
Figura 2. Molécula de trehalosa	10
Figura 3. Modelo de liposoma cargado con trehalosa	12
Figura 4. Liposomas esféricos visualizados por TEM	28
Figura 5. Tinción de E-N de espermatozoides de cerdo descongelados	32

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en el sector pecuario es una herramienta que se ha desarrollado en forma exitosa desde principios del siglo XX, atribuyéndosele beneficios tales como el mejoramiento genético acelerado de la producción (Bailey y col. 2008). Actualmente, en el caso específico de la especie porcina, ésta se lleva a cabo empleando semen diluido en medios comerciales que permiten su conservación por hasta 10 días a una temperatura de 15 a 20°C, obteniéndose buenas tasas de fertilidad y prolificidad. En cuanto al uso de semen criopreservado en cerdos, éste representa diversas ventajas para la industria, sin embargo las condiciones de estrés térmico a la que es sometida la célula espermática durante el congelado resultan en alteraciones a diversas estructuras de ésta, como la membrana plasmática, que por su composición estructural la hacen susceptible al daño celular (Watson, 2000; Medeiros y col. 2002; Maldjian y col. 2005; Bailey y col. 2008; Vadnais y Althouse, 2011), DNA (Thi Men y col. 2013; Fraser y Strzezec, 2007; Hu y col. 2008) citoesqueleto y acrosoma (Barrientos-Morales y col. 2009; Gutiérrez-Pérez y col. 2011).

Con el propósito de minimizar estas alteraciones, se han utilizado diversos crioprotectores como el glicerol que estabilizan al espermatozoide bajo estas condiciones extremas. No obstante los resultados obtenidos en el cerdo muestran efectos adversos al utilizarlo en concentraciones superiores al 4% (Buhr y col. 2001). Esta situación ha impulsado la búsqueda y desarrollo de alternativas entre las que se encuentra la trehalosa, que estabiliza a la célula tras la congelación (Crowe, 2002).

El efecto de la trehalosa ya ha sido probado en espermatozoides de cerdo (Gutiérrez Pérez y col. 2009; Malo y col. 2010), búfalo (Shiva Shankar Reddy y col. 2010), macho cabrío (Naing y col. 2010), borrego (Aisen y col. 2002) y perro (Yamashiro y col. 2007), al mejorarse los parámetros de viabilidad celular al descongelado. No obstante ha sido reportado que para obtener la máxima protección conferida por el azúcar, se requiere su presencia en ambos lados de la

célula (Chen y col. 2001; Costa Morato y col. 2008). Lo que conlleva la necesidad de encontrar métodos para favorecer su ingreso al interior de la célula, entre los que se encuentran la utilización en fibroblastos de una proteína formadora de poros (α -hemolisina) en condiciones de desecación (Chen y col. 2001). Con el mismo fin pero en el caso de eritrocitos sometidos a criopreservación, se ha probado la eficacia de liposomas, en donde el tratamiento con estos mejoró significativamente la integridad de la membrana plasmática (Holvati y col. 2009). Respecto al uso de liposomas en la congelación espermática, en especies como el bovino, búfalos y equinos se observó un efecto positivo al descongelado (Röpke y col. 2011; Kumar y col. 2015; Wilhelm y col. 1996).

Cabe mencionar que a la fecha no existen reportes de la utilización de liposomas cargados con trehalosa en la criopreservación de espermatozoides, por lo cual el objetivo de este proyecto es evaluar si la adición de liposomas cargados con trehalosa en un diluyente comercial para la criopreservación de semen porcino, permite mejorar los índices de viabilidad y motilidad al descongelado, a fin de contar con una alternativa más para poder llevar a cabo la congelación de semen en condiciones que permitan la conservación del mayor número de células.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ventajas del semen congelado

La criopreservación espermática tiene sus inicios a partir de las observaciones con espermatozoides humanos en 1776 y 1866 de Spallanzani y Mantegazza respectivamente (Yeste, 2016). Sin embargo no fue hasta 1949 con la primera descripción del glicerol como crioprotector que comenzó su desarrollo (Curry, 2000).

En la industria pecuaria la utilización de semen congelado facilita la distribución de genes deseables, al permitir transportarlo a través de largas distancias y con esto su importación y exportación. Así mismo, su uso se puede programar hasta que las hembras se encuentren en estro. Adicionalmente y particularmente en la especie porcina, la criopreservación de semen puede ser una herramienta más para el control de la transmisión de ciertos patógenos como el circovirus tipo 2 y el virus del PRRS, ya que se pueden mandar a analizar muestras de semen congelado mediante pruebas que requieran cierto tiempo para determinar la presencia de estos. En relación a tecnologías reproductivas se ha mencionado que la criopreservación de semen facilita la selección de sexo por citometría de flujo, técnica cuya aplicación impactaría significativamente en los programas reproductivos de las explotaciones porcinas (Bailey y col. 2008).

La implementación de bancos de semen congelado es otro aspecto relevante, a fin de contar con una reserva genética que actúe contrarrestando los efectos de desastres naturales como el brote de una enfermedad (Johnson y col. 2000; Bailey y col. 2008).

A diferencia de la producción bovina donde se emplea el semen congelado a gran escala, en la especie porcina su uso se encuentra limitado al 1% del total de las inseminaciones artificiales debido a la sensibilidad de los espermatozoides a las bajas temperaturas, lo que resulta en una reducción de la tasa de fertilidad y en el número de lechones por camada (Curry, 2000; Johnson y col. 2000). Es por esto

que tras décadas de investigación no se ha logrado aún establecer exitosamente de forma comercial.

2.2. La criopreservación espermática y el daño celular

Se ha demostrado que el estrés producido por el shock térmico al que es sometida la célula espermática durante el proceso de criopreservación, ocasiona una baja sobrevivencia de las células debido principalmente a la velocidad de enfriamiento. Este hecho puede ser explicado mediante la “hipótesis de dos factores” en la cual se establece que al utilizar rangos de enfriamiento rápidos, las pérdidas en cuanto al número de células están relacionadas con la formación intracelular de hielo y en el caso de rangos de enfriamiento lentos, estas serán debido a la deshidratación (Figura 1). Por esto, es necesario desarrollar este procedimiento a un rango óptimo de enfriamiento para minimizar el daño y mejorar la sobrevivencia celular tras el descongelado (Gläfke y col. 2012; Holoavati y col. 2009).

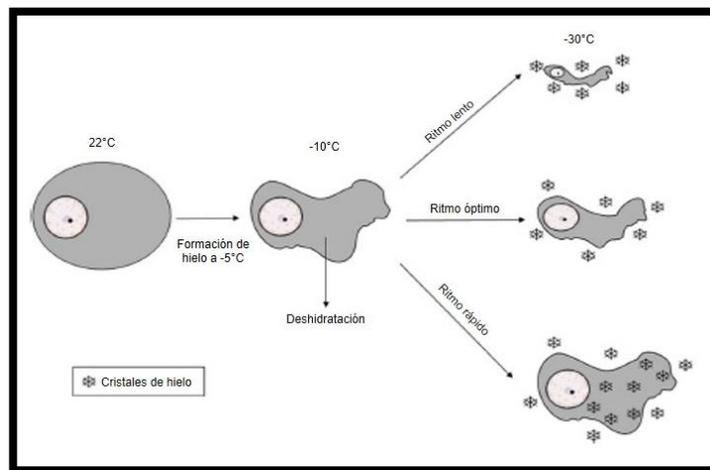


Figura 1. Ritmos de enfriamiento y eventos durante la congelación. Cuando la temperatura disminuye a -5 °C se forma hielo en el medio extracelular y el agua fluye fuera de la célula, si el subsecuente ritmo de enfriamiento es rápido, el agua intracelular no fluye completamente y se forman cristales de hielo dentro de la célula. Si el ritmo de enfriamiento es lento la célula se deshidrata y disminuye su volumen. El ritmo de enfriamiento optimo es aquel que es lo suficientemente lento para evitar la formación de hielo intracelular y lo suficientemente rápido para minimizar el daño por la criopreservación (Adaptada de Yeste, 2016).

Aunado a lo anterior, durante este proceso se alteran diversas estructuras celulares como las que se describen a continuación, afectándose tanto la integridad como la capacidad fecundante del espermatozoide.

La membrana plasmática es considerada el principal sitio de daño al sufrir ciertas condiciones como son: la transición de fase, es decir el paso de un estado líquido, presente en condiciones normales, a un estado de gel (Zeron y col. 2002; Gläfke y col. 2012); pérdida en la asimetría de la membrana, al producirse cambios en la distribución de la fosfatidilserina que pasa de la monocapa interna a la externa (Vadnais y Althouse, 2011); liberación de fosfolípidos (Darin-Bennett y col. 1973); pérdida de colesterol (Maldjian y col. 2005); cambios osmóticos (Fraser y col. 2014); movimiento de balsas lipídicas (Vadnais y Althouse, 2011); así como la peroxidación lipídica ocasionada por especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), aniones superoxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (OH^-), formados como producto del metabolismo normal de los organismos aerobios y cuyo exceso se produce al haber un desbalance entre su producción y desintoxicación, llevada a cabo por enzimas tales como superoxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa, presentes en el semen de mamíferos (Cerolini y col. 2000; Fraser y col. 2014).

El DNA presente en el núcleo celular es fragmentado debido a las ROS y a endonucleasas que son liberadas de la membrana plasmática del espermatozoide dañado, las cuales pueden ser activadas por cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Fraser y Strzeżek, 2007; Fraser y col. 2014). Igualmente, tras el proceso de descongelación se ha observado una desestabilización de la cromatina espermática (Corcuera y col. 2007; Hu y col. 2008; Thi Men y col. 2013).

En la mitocondria las modificaciones corresponden a una ruptura parcial de la membrana mitocondrial interna y externa, lo que conlleva a la liberación del citocromo c^{2+} que normalmente es impermeable a la membrana mitocondrial externa debido a su tamaño. El aumento en la oxidación de este citocromo c^{2+} se relaciona directamente con la liberación de citocromo c endógeno, el cual es el encargado de la activación de la maquinaria apoptótica (Schober y col. 2007).

En relación a la teca perinuclear (estructura considerada el principal elemento de citoesqueleto que se encuentra rodeando al núcleo espermático), durante la congelación existe una despolimerización de los filamentos de actina, ya que estos son sensibles a la temperatura, se pierde su subestructura y se ocasionan cambios en la localización de la actina, lo que afecta los mecanismos de señalización de capacitación espermática y reacción acrosomal (Omega y col. 2006; Barrientos-Morales y col. 2009; Gutiérrez-Pérez y col. 2011).

A su vez, la capacitación espermática consiste en una serie de eventos de señalización llevados a cabo en el tracto genital de la hembra (oviducto), mediante los cuales el espermatozoide obtiene la habilidad para fecundar al óvulo. Este mecanismo consiste en la activación de la Adenil Ciclasa por el bicarbonato y calcio, a fin de estimular la producción de AMPc el cual a su vez activa a la proteína quinasa A, induciendo cambios en la conformación de la membrana plasmática (principalmente asociados a la pérdida de colesterol) para aumentar su fluidez. Durante la congelación las alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática permiten el flujo de estos iones, desencadenando la capacitación de forma prematura (Bailey y col. 2008; Vadnais y Althouse 2011). En adición a lo anterior, este flujo de calcio también activa la reacción acrosomal, evento mediante el cual los espermatozoides capacitados liberan el contenido de su acrosoma por exocitosis, contribuyendo con esto a la baja fertilidad del semen porcino congelado-descongelado (Bailey y col. 2008).

2.3. Composición de la membrana plasmática del espermatozoide porcino y su susceptibilidad al daño por criopreservación

La membrana plasmática es una bicapa lipídica anfipática formada principalmente por fosfolípidos compuestos por una cabeza en su extremo hidrófilo y por dos colas hidrocarbonadas de ácidos grasos en el extremo hidrófobo, en la cual se encuentran inmersas proteínas de membrana. Así mismo presenta colesterol, una molécula implicada en la característica de impermeabilidad de la membrana plasmática (Alberts y col. 2008). Particularmente en los espermatozoides mamíferos, esta composición lipídica es muy importante para la maduración, viabilidad y función celular, siendo el diacilglicerol, glicerofosfatidilcolina, glicerofosfatidiletanolamina y sulfogalactosilglicerolípido, los más representativos (Svetlichnyy y col. 2014).

En el caso específico de la especie porcina, el espermatozoide contiene una alta concentración de ácidos grasos insaturados (con uno o más dobles enlaces *cis* en la región apolar de la membrana plasmática) de cadena larga, principalmente de ácido docosaheptaenoico (22:6n-3), esenciales para la fluidez de la membrana y cuya proporción se ve disminuida posterior a la descongelación, debido a la peroxidación lipídica ocasionada por el exceso de (ROS) (Cerolini y col. 2000; Maldjian y col. 2005).

Otra situación que permite explicar la susceptibilidad de los espermatozoides porcinos al choque térmico durante la criopreservación es la baja proporción de colesterol, que trae como resultado la inducción de la transición de fase a una temperatura más alta. En el caso del cerdo el radio molar de colesterol-fosfolípidos presente en la membrana plasmática es de 0.26, en tanto que el pico de la temperatura de transición de fase es a los 24 °C (Parks y Lynch, 1992). Así también la pérdida de colesterol relacionada con este proceso promueve cambios como en la capacitación espermática (criocapacitación), a diferencia de aquellas especies como el bovino que son menos sensibles a las bajas temperaturas (Bailey y col. 2008).

2.4. Crioprotectores utilizados en el semen porcino

Con el propósito de minimizar las alteraciones ocasionadas en el espermatozoide tras la descongelación, se ha tenido la necesidad de evaluar diversos protocolos que a través de agentes crioprotectores mejoren la calidad espermática. Estos pueden ser clasificados como permeables y no permeables, dependiendo de su capacidad para penetrar a la célula, siendo ejemplo de estos el glicerol y dimetilsulfóxido en el primer caso, en tanto que las proteínas presentes en la yema de huevo y leche, además de los azúcares se agrupan dentro de los no permeables (Yeste, 2016).

Al respecto uno de estos crioprotectores más utilizado es el glicerol, no obstante su aplicación puede inducir alteraciones y viscosidad del citoplasma espermático, además de una desestabilización de la membrana plasmática al alterar la organización estructural de sus fosfolípidos y proteínas (Hammerstedt y Graham, 1992). Aunado a esta situación, los metabolitos de su degradación como el metilglioxal, resultan tóxicos para la célula espermática (Riddle y Lorenz, 1973). Debido a esto en la especie porcina se han obtenido resultados variables, donde al utilizarlo en concentraciones de 2% al 4% se mejoró significativamente la motilidad y viabilidad espermática (Gutiérrez-Pérez y col. 2009), atribuyéndosele además un efecto antiapoptótico (Zeng y col. 2014), y en concentraciones del 8%-10% se mostró un incremento en la condensación de la cromatina (Corcuera y col. 2007). Al emplearlo en combinación con otros compuestos como la L-glutamina se han obtenido resultados positivos en cuanto a motilidad (Mercado y col. 2009), así también con la trehalosa, donde además se mejoraron parámetros como la sobrevivencia celular e integridad del acrosoma (Gutiérrez-Pérez y col. 2009). En cuanto a diluyentes compuestos por glicerol con lactosa, las células espermáticas mostraron una reducción en cuanto a la fragmentación del DNA (Fraser y Strzezek, 2007).

El agua de coco en polvo empleada en diluyentes preparados con lactosa y trehalosa asociada con dimetilformamida, representa otra opción para la

congelación espermática en la especie porcina ya que se han reportado mejoras significativas en la calidad espermática al descongelado (Silva y col. 2015).

La yema de huevo es otro componente de los diluyentes utilizados para la criopreservación de espermatozoides, la cual en presencia de trehalosa mejoró significativamente la motilidad, integridad acrosomal y fertilización *in vitro* al descongelado (Malo y col. 2010).

Fraser y Strzezek (2007) mencionan que al congelar el eyaculado completo, es decir, manteniendo el plasma seminal, la fragmentación del ADN es significativamente menor utilizando un diluyente compuesto por lactosa, yema de huevo de gallina o avestruz y glicerol.

Compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como el glutation, superóxido dismutasa (Orzolek y col. 2013), la catalasa, el ácido ascórbico, el α tocoferol, la L-cisteina (Zhang y col. 2012), butil hidroxitolueno (Trzcinska y col. 2015) y, recientemente, el ácido rosmarínico (Luño y col. 2014), también han sido empleados con este objetivo mejorándose la viabilidad de las células posterior al descongelado, al reducirse el estrés oxidativo causado por las ROS. La centrifugación del semen ha demostrado igualmente ser un aspecto importante, ya que a una fuerza de 2400 g durante tres minutos tiene un efecto positivo en la criosobrevivencia de los espermatozoides (Zhang y col. 2012).

En estudios recientes se ha reportado la aplicación de sistemas de liberación de colesterol como son las ciclodextrinas, esto antes de llevar a cabo la congelación (Lee y col. 2015), así como en el diluyente para el descongelado del semen (Tomás y col. 2014), mejorándose en ambos casos la viabilidad de las células.

2.5. La trehalosa como crioprotector espermático

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (figura 2), acumulado por organismos anhidrobióticos para poder sobrevivir en ambientes secos (Crowe, 2002). Su efecto funciona a dos niveles: estabilizando las membranas y el ensamblaje de lípidos durante la deshidratación y estabilizando a las proteínas, manteniéndolas en estado plegado bajo condiciones que normalmente promoverían su desnaturalización (Chen y col. 2001; Holovati y Acker, 2007; Luo y col. 2008).

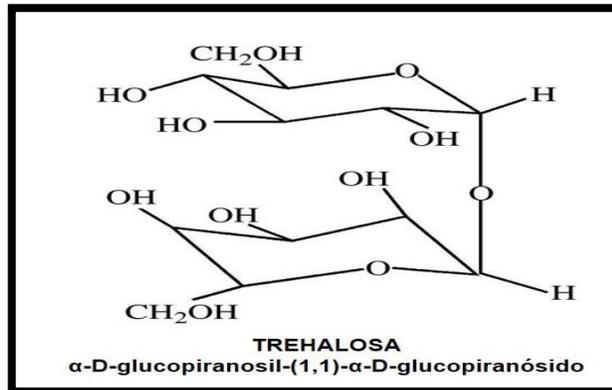


Figura 2. Molécula de trehalosa (Adaptado de Magazu y col. 2007).

El mecanismo de acción de la trehalosa sobre la membrana plasmática de las células sometidas a condiciones de estrés, se lleva a cabo formando complejos con las bio-macromoléculas y remplazando al agua, uniéndose a los residuos polares mediante puentes de hidrogeno, previniendo así la desnaturalización de proteínas y la fusión de membranas (Crowe, 2002).

Aunado a su efecto protector, en estudios recientes se ha mostrado la capacidad exclusiva de la trehalosa para neutralizar ROS conferida por el enlace α,α -1,1 de este disacárido, que al interactuar con los dobles enlaces *cis* de los ácidos grasos insaturados, reduce significativamente los niveles de oxidación (Oku y col. 2003). Para que se obtenga un efecto significativo en relación a lo antes mencionado, la trehalosa tiene que estar presente en ambos lados de la célula (Luo y col. 2008; Thi y col. 2013; Herdeiro y col. 2006; Costa Morato y col. 2008),

resultando en el desarrollo de mecanismos que permitan la incorporación exitosa de este disacárido al interior de la célula, como son proteínas formadoras de poros (α -hemolisina) en fibroblastos (Tani Chen y col. 2001) y liposomas empleados en células troncales del cordón umbilical (Rodrigues y col. 2014), así como en eritrocitos (Holvati y col. 2009), mejorándose su viabilidad tras someterlas a condiciones ambientales extremas.

Estudios realizados en espermatozoides de cerdos (Gutiérrez-Pérez y col. 2009; Malo y col. 2010; Thi Men y col. 2013), búfalos (Shiva Shankar Reddy y col. 2010), machos cabríos (Naing y col. 2010), borregos (Aisen y col. 2002; Najafi y col. 2013; Pelufo y col. 2015) y perros (Yamashiro y col. 2007) donde se utiliza la trehalosa como crioprotector a nivel extracelular, se observa una mejora en la viabilidad celular tras el descongelado, sin embargo en especies como la liebre café europea no se observó ningún efecto en concentraciones de 100 mM (Kozdrowski, 2009).

2.6. Uso de liposomas en células

Los liposomas son vesículas lipídicas artificiales de forma esférica y tamaño variable en las cuales se puede encapsular un volumen acuoso (Toh y Chiu, 2013). A estas partículas se les han atribuido diversas aplicaciones en el espermatozoide como son: protector de la función espermática tras el proceso de criopreservación; vehículo para la incorporación de material externo; regulador de eventos como la capacitación espermática, interacción de gametos, fusión de membranas y reacción acrosomal, a través de sus lípidos; y como herramienta para el estudio de los canales iónicos de la membrana mediante Patch-Clamp (Sullivan y Saez, 2013).

En lo concerniente a liposomas cargados con trehalosa (Figura 3), su capacidad para introducir el azúcar a las células ya ha sido probada en eritrocitos, utilizando partículas compuestas a base de DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), fosdatidilserina (PS) y colesterol, mejorándose la integridad de la membrana plasmática tras la exposición a bajas temperaturas (Holovati y col. 2009). De igual manera al usar liposomas preparados con fosfatidilcolina, estearilamina y colesterol en células troncales obtenidas del cordón umbilical, se mejoró significativamente la viabilidad celular al descongelado (Rodrigues y col. 2014).

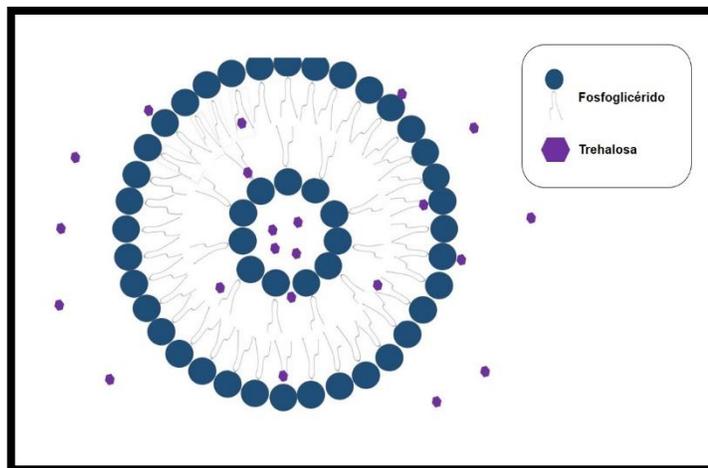


Figura 3. Modelo de liposoma cargado con trehalosa. Presencia de trehalosa en el centro acuoso y su interacción con los grupos cabeza de los fosfoglicéridos (Adaptado de Roy y col. 2016).

En cuanto a la propiedad protectora conferida a estas vesículas sobre los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, ésta ha sido atribuida al intercambio de fosfolípidos y colesterol realizado entre los liposomas y la membrana plasmática, logrando estabilizar su conformación. El efecto de los liposomas sobre células espermáticas ya ha sido demostrado en bovinos donde los liposomas compuestos por DOPC:DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina:1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-[1'-rac-glicerol]) y DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicerofosfocolina) mejoraron significativamente la motilidad y sobrevivencia celular (Röpke y col. 2011). En un estudio donde se incubaron células espermáticas y ovocitos de esta misma especie con liposomas preparados a base de fosfatidilcolina de huevo, se observó una mayor resistencia a bajas temperaturas, concluyéndose que la asociación de liposomas con membranas celulares puede alterar la temperatura de transición de fase, haciéndolas menos susceptibles al daño celular (Zeron y col. 2002). En el caso de la especie porcina, se demostró que el incubar espermatozoides con liposomas hechos de una mezcla de fosfolípidos seleccionados, mejora la motilidad y viabilidad celular en comparación a liposomas compuestos de lípidos extraídos de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide fresco (He y col. 2001). En referencia a la utilización de liposomas comerciales, se ha reportado que en búfalos se mejoró significativamente la motilidad al descongelado (Kumar y col. 2015), en tanto que garañones no se observaron diferencias significativas en comparación a los resultados obtenidos con la yema de huevo como crioprotector (Pillet y col. 2012).

3. HIPÓTESIS

La adición de liposomas cargados con trehalosa a un diluyente utilizado para la congelación de semen porcino, mejorará los índices de viabilidad y motilidad espermática al descongelado en comparación a los obtenidos con diluyentes convencionales.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la adición de liposomas cargados con trehalosa en diluyentes para criopreservación de semen porcino, mejora los índices de viabilidad y motilidad espermática al descongelado.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparación y caracterización de liposomas a base de lecitina de soya cargados con trehalosa.
- Criopreservación de semen porcino empleando liposomas cargados con trehalosa como agente crioprotector.
- Valorar el efecto del tratamiento sobre la motilidad posterior al descongelado.
- Evaluar la integridad de la membrana plasmática posterior al descongelado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se desarrolló en dos etapas descritas a continuación, detallando posteriormente las técnicas empleadas en cada uno de los experimentos realizados.

1. Elaboración y caracterización de liposomas:

Esta etapa consistió en la preparación de liposomas utilizados para la formulación de los diluyentes experimentales (cargados en presencia de 300 mM de trehalosa y vacíos) y en la subsecuente caracterización de estos, evaluando algunas peculiaridades de las partículas como: tamaño, índice de polidispersión (PDI), potencial zeta (ζ), forma y cuantificación de fosfolípidos y trehalosa.

2. Criopreservación y valoración espermática al descongelado:

La segunda etapa correspondió en la formulación de los diluyentes para congelación (experimentales y control), toma de muestras, valoración del semen, criopreservación, descongelado y evaluación de la motilidad y viabilidad espermática.

6.1. Preparación de liposomas

La preparación de liposomas se realizó por el método de calentamiento (Linares-Alba y col. 2016) empleando L- α -fosfatidilcolina (lecitina de soya) y colesterol (Relación molar 60:40 %Moles). El colesterol se reconstituyó con un amortiguador isotónico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ + NaOH + NaCl, 0.1 M, pH 7.45) en agitación constante (500 rpm) calentándolo a 83 °C durante 15 minutos, cumplido lo cual se agregó la lecitina, trehalosa y glicerol (agente dispersante). Posteriormente se utilizó nitrógeno (N_2) para retirar el oxígeno de la solución de trabajo, previniendo así una posible peroxidación lipídica. Nuevamente la preparación se calentó a 75 °C durante 35 minutos conservando la agitación, dejándose enfriar en agitación al término del

tiempo. A continuación, bajo condiciones asépticas, se procedió a la extrusión con una unidad de filtración para jeringa millex de 0.45 μm (Millipore Co., U.S.A.). Finalmente se esterilizó usando una membrana PVDF (polifluoruro de vinilideno) hidrofílica con un poro de 0.22 μm (Durapore; Millipore Co.), colocada sobre el soporte del filtro a presión de acero inoxidable (Millipore Co., U.S.A.) usando nitrógeno (N_2). La solución estéril se colocó en un frasco de cristal estéril, manteniéndolo en congelación hasta su uso.

Los liposomas vacíos se prepararon bajo las mismas condiciones de los liposomas cargados, únicamente omitiendo el agregar trehalosa a la solución.

Tabla 1. Formulación de liposomas

Composición	Cargados	Vacíos
Colesterol (mg)	7.73	7.73
Lecitina de soya (mg)	23.3	23.3
Trehalosa 300 mM (g)	1.1348	-
Glicerol (mg)	300	300

**Volumen final de 10 mL*

6.2. Caracterización de las formulaciones de liposomas

6.2.1. Tamaño de la partícula y PDI

La determinación del tamaño promedio de la partícula y el PDI de las formulaciones liposomales se llevó a cabo por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en ingles), utilizando el Zetasizer Nano ZS analyzer ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd, U.K.). El análisis se realizó con un ángulo de detección de 173°, tomando en cuenta el promedio de tres mediciones por formulación.

A través del PDI se valoró la distribución en cuanto al tamaño de los liposomas, considerando que a mayor PDI el intervalo en el tamaño de las vesículas será mayor.

6.2.2. Potencial Zeta

El potencial Zeta de las vesículas liposomales fue determinado empleando dispersión de luz electroforética, usando el Zetasizer Nano ZS analyzer ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd, U.K.). El análisis se realizó a una temperatura de 25 °C, tomando en cuenta el promedio de tres mediciones por formulación.

Esta característica fue utilizada como un indicador de estabilidad electrostática en las dispersiones, considerándolas como estables al tener como mínimo un ζ de ± 30 mV (Müller y col. 2001).

6.2.3. Microscopia electrónica

Para la visualización por microscopia electrónica de transmisión (TEM) de los liposomas cargados con trehalosa se utilizó un microscopio electrónico marca JEOL modelo JEM-1200EX II, realizando una tinción negativa con acetato de uranilo al 2%. Las rejillas de cobre recubiertas de carbón empleadas fueron sometidas a carga eléctrica con el objetivo de volverlas hidrofílicas y fijar mejor la muestra.

6.2.4. Cuantificación colorimétrica de fosfolípidos

Esta se llevó a cabo mediante espectrometría visible, analizando el complejo formado entre los fosfolípidos y el compuesto colorimétrico (ferrotiocianato de amonio) (Stewart, 1980) utilizando un espectrofotómetro S2000, una fuente de luz de Tungsteno DT-1000CE-BT (Ocean Optics, Inc., U.S.A.) y una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 10 mm. La absorbancia se midió a una longitud de onda (λ_{\max}) de 488.22 nm.

- *Preparación del ferrotiocianato de amonio (AFR)*

Para la preparación de la solución se disolvió 2.703 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 3.04 g de tiocianato de amonio ($\text{NH}_4\text{-SCN}$) en agua destilada desionizada, aforando a 100 mL (Stewart, 1980).

- *Curva de calibración de la lecitina*

Se preparó una solución stock de 0.1 mg/mL de lecitina de soya utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente. Posteriormente fueron tomadas alícuotas del stock con diferentes concentraciones de lecitina, utilizando un rango de 0.03 a 0.1 mg/mL, aforándose a 2 mL con diclorometano. Cada una de estas muestras fue analizada, agregándosele 2 mL del compuesto AFR, llevándolas al vórtex durante 2 minutos y centrifugándolas a 2500 g durante 10 minutos, para finalmente medir la fase del diclorometano en el rango del espectro visible (400-700 nm) en un tiempo máximo de 10 minutos después de formado el complejo colorimétrico.

- *Cuantificación de fosfolípidos*

De cada preparación de liposomas (cargados y vacíos) se tomó una muestra (100 μL de liposomas cargados con trehalosa y 200 μL de liposomas vacíos), la cual fue diluida con metanol en una concentración 1:1 (v/v) y colocada en el vórtex durante 2 minutos. Posteriormente se aforo a 2 mL con diclorometano, se agregaron 2 mL de AFR llevándose nuevamente al vórtex durante 2 minutos, tras lo cual se centrifugo a 2500 g durante 10 minutos. Finalmente con una pipeta se tomó la fase orgánica y se procedió a medir la absorbancia del complejo.

La concentración de fosfolípidos de las muestras fue calculada empleando los datos obtenidos en la curva de calibración.

6.2.5. Cuantificación de trehalosa y porcentaje de encapsulación

El análisis para la determinación de trehalosa en la dispersión de liposomas cargados se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), adaptado a un detector por dispersión de luz por evaporación (ELSD, por sus siglas en inglés).

- Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo: Sistema HPLC Infinity Quaternary LC 1260, Agilent

Columna: Hipler H Agilent, 8 μm , 300 \times 7.7 mm, Agilent, PL1170-6830

Detector: ELSD, Agilent, Infinity 1290

Volumen de inyección: 1 μL de muestra

Temperatura de la columna: 65 $^{\circ}\text{C}$

Fase móvil: agua grado HPLC, filtrada en membrana de 0.22 μm , desgasada

Velocidad de flujo: 0.6 mL/min

- Curva de calibración

Se prepararon alícuotas de una solución de trehalosa disuelta en un amortiguador isotónico con diferentes concentraciones de lecitina, utilizando un intervalo de 0.1 a 10 mg/mL.

Cada muestra fue analizada por triplicado.

- Manejo de la muestra

Muestras de 500 µL de la dispersión de liposomas cargados con trehalosa fueron centrifugadas a 14,000 g durante 40 minutos, empleando un filtro para centrifuga Amicon® Ultra 0.5 mL con un peso molecular límite de 10 K (Millipore Co.) para separar la trehalosa no encapsulada (sobrenadante), Para la obtención de los liposomas se utilizó nuevamente este filtro colocándolo boca abajo en un tubo limpio, centrifugando la muestra a 14, 000 g durante 10 minutos. Finalmente se procedió a romper las vesículas utilizando diclorometano en una concentración 1:1 (v/v), llevándolo al vórtex durante 2 minutos y tomando la fase acuosa para el análisis cromatográfico por triplicado.

Con el objetivo de obtener la cuantificación de trehalosa total en la dispersión se evaluó además una muestra del lisado de liposomas completos, es decir, sin haber sido sometidos al proceso de separación por centrifugación.

- Porcentaje de encapsulación

El porcentaje de encapsulación (EE) fue calculado de acuerdo a la concentración de trehalosa cuantificada en el lisado de liposomas y a la total (por HPLC), de acuerdo a la ecuación descrita a continuación:

$$EE = \frac{\text{Trehalosa en lisado de liposomas}}{\text{Trehalosa total}} \times 100$$

6.3. Colección y evaluación de semen

Se utilizaron 4 eyaculados obtenidos de 2 sementales en etapa productiva pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (C.E.I.E.P.P.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en la localidad de Jilotepec en el Estado de México. En un principio se limpió la zona del prepucio para evitar la contaminación del eyaculado, se procedió a la colecta del eyaculado mediante la técnica de la mano enguantada, diluyéndolo posteriormente en diluyente comercial de larga conservación (Androsrtar® Plus, Minitube, Alemania) atemperado a 37 °C con una proporción 1:1 (v/v).

La motilidad progresiva y el vigor espermático (tipo de movimiento) fueron evaluados poniendo una gota de la muestra sobre un portaobjetos atemperado y colocando un cubreobjetos, otorgándosele un valor de 0 a 100% en el caso de la motilidad y de 0 a 5 para el vigor (5= movimientos progresivos y muy rápidos, 4= movimientos rápidos; 3= movimientos progresivos y sinuosos; 2= movimientos anormales y algunos progresivos; 1= sin movimiento progresivo, girando sobre si mismos; y 0= sin movimiento) a la observación en el microscopio óptico con un objetivo de 10x (Gutiérrez-Pérez y col. 2009).

La concentración espermática y el porcentaje de células anormales fueron determinados por conteo en la Cámara de Neubauer, aplicándose para la estimación del primer caso la siguiente fórmula:

$\text{Número de espermatozoides} * 21 * 10,000 * 5 = \text{Concentración espermática/mL}$

Donde:

21= Factor de dilución

10,000= Dimensión de la cámara

5= Número de cuadros contabilizados

Criterios de exclusión: Los eyaculados que mostraron una motilidad menor al 80%, un vigor espermático menor a 4, así como un porcentaje mayor al 20% de morfoanomalías fueron descartados.

6.4. Congelación espermática

La criopreservación del semen se llevó a cabo en dos tiempos denominados de refrigeración y glicerolización (Gutiérrez-Pérez y col. 2009), utilizando diluyentes experimentales preparados a partir de liposomas, y los controles basados en protocolos ya probados en esta especie. La formulación de cada uno de estos se realizó como se describe a continuación.

Tabla 2. Formulación de diluyentes para congelación

Componente	Experimentales		Control	
	Liposomas cargados	Liposomas vacíos	Trehalosa 300 mM ^a	Androstar® CryoPlus ^b
Liposomas cargados (mL)	1	-	-	-
Liposomas vacíos (mL)	-	1	-	-
Yema de huevo (mL)	1	1	2	2
Trehalosa (g)	-	-	1.135	-
Androstar® CryoPlus (g)	0.849	0.849	-	0.849
Gentamicina (µL)	-	-	10	-
Agua tridestilada (mL)	7.7	7.7	8	7.7

Volumen final= 10 mL
^a Adaptado de Gutiérrez-Pérez y col. 2009
^b La preparación se siguió de acuerdo a las especificaciones del fabricante

A partir de los diluyentes preparados, se tomaron alícuotas de 5 mL para la fase de refrigeración (A) y de 4.7 mL para la fase de glicerolización (B), adicionándole a cada uno de los 4 diluyentes 0.3 mL de glicerol.

Posterior a la formulación, se tomaron alícuotas de la muestra de semen ajustándose su concentración a 600×10^6 espermatozoides/mL, tras lo cual se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se reconstituyeron con el diluyente A. Realizado esto, las muestras se mantuvieron a 16 °C durante hora y media, seguido de una conservación a 4°C durante dos horas.

El diluyente B se introdujo en el refrigerador al mismo tiempo que las muestras con el objetivo de que se mantuvieran a la misma temperatura al momento de la adición.

En el periodo de congelación se agregó el diluyente B a 4 °C, esto de manera creciente y gradual para minimizar la toxicidad del glicerol sobre el espermatozoide. Una vez agregado el glicerol (3%), el semen se colocó en pajillas de 0.5 mL por aspiración y se sellaron con alcohol polivinílico. A continuación las pajillas selladas fueron expuestas a los vapores de nitrógeno (-130 a -150 °C) durante 15 minutos, dejando una distancia entre las pajillas y el nitrógeno de 4 cm. Finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido, previa colocación en gobelets de plástico (Gutiérrez-Pérez y col. 2009).

6.5. Descongelación

La descongelación de tres pajillas por tratamiento se realizó a los 15 días de la congelación, empleando un baño María a 37 °C durante 30 segundos, cumplido lo cual, el contenido de cada una de estas se reconstituyó en un diluyente de larga conservación (Androsrtar ® Plus, Minitube, Alemania) con una proporción 1:6 v/v, dejándolo estabilizar durante 10 minutos a una temperatura de 37 °C (Gutiérrez-Pérez y col. 2009).

6.6. Valoración espermática

La valoración de las muestras fue realizada al cumplirse los 15 minutos de estabilización y siempre llevada a cabo por la misma persona.

6.6.1. Motilidad progresiva

Se tomó una muestra de 10 μ L de cada pajilla descongelada, colocándola en un portaobjetos atemperado a 37 °C y poniéndole un cubreobjetos para su evaluación por observación directa en el microscopio óptico, utilizando para esto el objetivo de 10x. El resultado fue determinado de acuerdo al porcentaje de células móviles (0-100%) (Gutiérrez- Pérez y col. 2009).

6.6.2. Viabilidad espermática

La viabilidad espermática fue evaluada mediante la tinción de eosina-nigrosina (eosina 0.67 g, nigrosina 5 g, 40 mL de solución de glucosa al 5% y agua bidestilada c.b.p. 100 mL), valorándose la integridad de la membrana plasmática (Bamba, 1988).

Para esta técnica se procedió a diluir la muestra con la tinción en una concentración 1:8 (v/v), dejándolo incubar a 37 °C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó el frotis, el cual se mantuvo a temperatura ambiente para su secado (Gutiérrez- Pérez y col. 2009).

Los espermatozoides con membrana plasmática alterada permitieron la entrada del colorante y se tiñeron. La membrana plasmática funcional excluye el colorante y por lo tanto los espermatozoides intactos no presentaron coloración (Gutiérrez- Pérez y col. 2009). La evaluación se realizó en un microscopio óptico con un objetivo de 100X, contando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

6.7. Análisis estadístico

Para llevar a cabo los análisis correspondientes a las curvas de calibración (regresión lineal simple) y de los resultados obtenidos al descongelado se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS versión 20, aplicándose en principio las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, para probar los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad respectivamente. En el caso de las variables que cumplieron con estas condiciones se realizó un análisis de varianza, determinando la diferencia de medias mediante la prueba de comparaciones múltiples denominada Prueba de Tukey. Por el contrario, en variables que no se distribuyeron de manera normal, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis empleando el programa estadístico R versión 3.1.0, para determinar la diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de las formulaciones de liposomas

7.1.1. Caracterización física de liposomas

Como se muestra en la tabla 3, el tamaño de los liposomas cargados con trehalosa fue mayor en comparación con el otro preparado. Así también se observó que el PDI fue mayor, lo que significa un intervalo más amplio en el tamaño de las partículas. De acuerdo a la evaluación del ζ , en ambas soluciones el resultado fue negativo, mostrando una tendencia a la aglomeración, lo que resulta en dispersiones inestables (<-30 mV).

Tabla 3. Caracterización física de liposomas

Preparado	Tamaño (nm)	PDI	ζ (mV)
Cargados (300 mM de Trehalosa)	357 ± 23.22	0.434 ± 0.009	-18.13 ± 0.466
Vacíos	256 ± 6.302	0.326 ± 0.028	-17.9 ± 0.251

**Los valores representan los promedios ± error estándar de mediciones por triplicado.*

Las imágenes de las partículas cargadas con trehalosa se muestran en la figura 4, donde se demuestra la presencia de estructuras esféricas electrolúcidas rodeadas por un borde electrodensó y con un tamaño promedio de 325 nm, datos que coinciden con la información obtenida por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés).

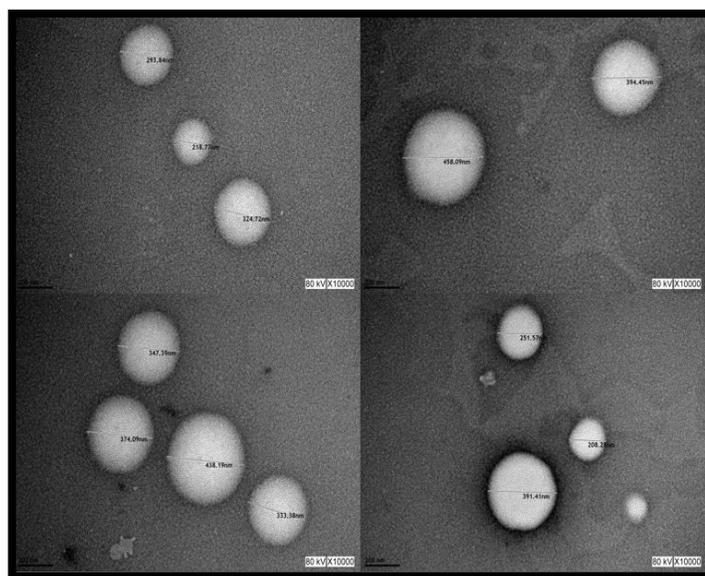


Figura 4. Liposomas esféricos visualizados por TEM

7.1.2. Cuantificación colorimétrica de fosfolípidos

Los resultados de la curva de calibración mostraron que la absorbancia se incrementa en promedio 5.377 unidades por mg de lecitina de soya, mientras que la absorbancia promedio de la muestra sin lecitina de soya es de 0.037 unidades, con una R^2 de 0.992.

La cuantificación se llevó a cabo tomando en cuenta el promedio de tres mediciones aplicadas a las muestras de cada una de las dispersiones, resultando en un mayor rendimiento en el caso de los liposomas cargados con trehalosa (61%).

En la tabla número 4 se pueden observar los datos obtenidos respecto a la concentración promedio de fosfolípidos de las muestras de liposomas cargados con trehalosa y vacíos.

Tabla 4. Cuantificación final de fosfolípidos

Medición	Concentración de fosfolípidos (mg/mL)	Coefficiente de variación	Rendimiento
Cargados	1.42933 ± 0.148	18%	61%
Vacíos	0.92067 ± 0.092	17.5%	39%

*Los valores representan los promedios ± error estándar de mediciones por triplicado.

7.1.3. Cuantificación de trehalosa y porcentaje de encapsulación

Los resultados obtenidos tras la curva de calibración (gráfico 1) mostraron un tiempo de retención promedio de la trehalosa de 8.4048 minutos. La ecuación obtenida tras el análisis de regresión lineal simple fue:

$$ABC = 585113.380 (T) - 518205.022, \text{ con una } R^2 = 0.993.$$

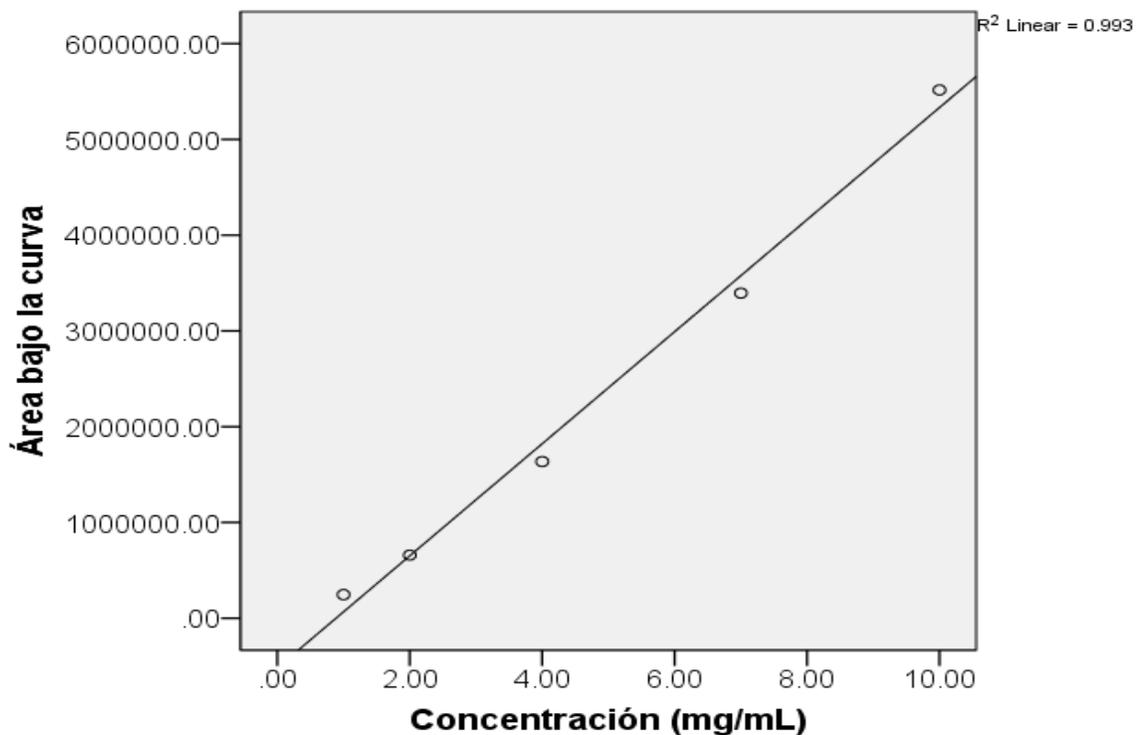


Gráfico 1. Diagrama de dispersión. Se muestra una asociación con pendiente positiva entre la concentración de trehalosa y el área bajo la curva (ABC).

En referencia a los resultados generados de las muestras separadas y a la concentración total de trehalosa, estos se muestran en la tabla 5, observándose que la concentración de trehalosa encapsulada dentro de los liposomas fue de 69.375 mg/mL, con un porcentaje de encapsulación del 73%. El cromatograma obtenido del análisis cuantitativo por HPLC de una de las muestras de lisado de liposomas se ilustra en el gráfico 2.

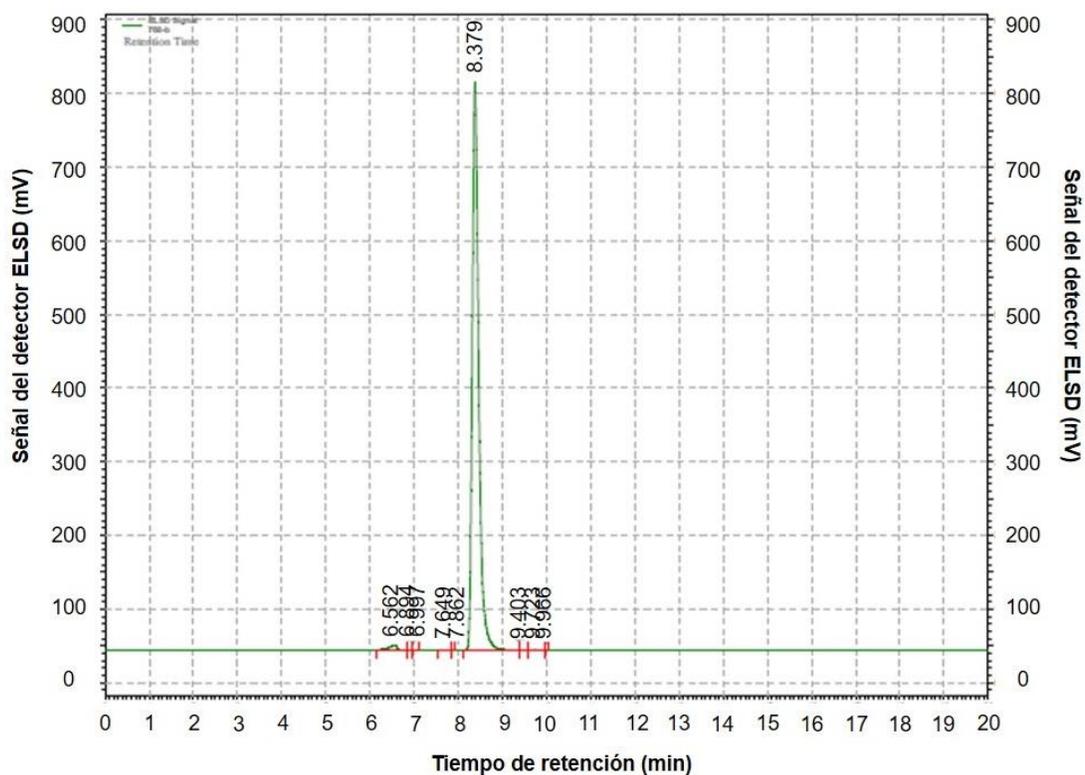


Gráfico 2. Cromatograma de HPLC con detección por ELSD de una muestra de lisado de liposomas.

Tabla 5. Análisis cromatográfico de liposomas cargados

Medición	Tiempo de retención (min)	Concentración de trehalosa (mg/mL)
Lisado	8.379	69.375 ± 3.7676
Liposomas completos	8.388	94.648 ± 0.5099

*Los valores representan los promedios ± error estándar de mediciones por triplicado.

7.2. Valoración espermática al descongelado

Los resultados de la evaluación de los eyaculados diluidos antes de llevar a cabo la congelación se muestran en la tabla 6, observándose que únicamente fueron utilizados los eyaculados que cumplieron los criterios establecidos en la metodología.

Tabla 6. Valoración del estado de los eyaculados en fresco

Motilidad (%)	Vigor espermático	Viabilidad (%)
81.2 ± 0.30	4	85.5 ± 0.38

**Los valores representan la media ± error estándar; n=4*

En los resultados al descongelado respecto a la motilidad espermática (Tabla 7) se observó una diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tratamientos experimentales, que consisten en el diluyente comercial con la adición de liposomas cargados con trehalosa y vacíos, y el Androstar® Cryoplus, siendo este último el diluyente con el mayor porcentaje de células motiles.

A diferencia de lo anterior, la viabilidad espermática no mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) al compararla entre los tratamientos utilizados para la congelación. Sin embargo la tendencia numérica presentada por los liposomas cargados fue menor.

Tabla 7. Efecto de liposomas sobre la motilidad y viabilidad al descongelado

Diluyente	Motilidad (%)	Viabilidad (%)
Trehalosa (300 mM)	21.9 ± 1.34	26.9 ± 1.70
Androstar® Cryoplus	23.3 ± 1.66 ^a	23.2 ± 1.85
Liposomas cargados	14.8 ± 1.70 ^b	19.7 ± 2.95
Liposomas vacíos	16.1 ± 3.34 ^b	21.6 ± 3.65

*Los valores representan la media ± error estándar: n=12

^a Literales diferentes por columna indican diferencia (P<0.05).

* Variable motilidad = Kruskal Wallis; * Variable viabilidad = Tukey.

En la figura número 5 se ilustra el parámetro antes referido mostrándose espermatozoides vivos, que no presentan coloración alguna ya que mantuvieron íntegra su membrana plasmática y espermatozoides muertos que tras el proceso de congelación-descongelación sufrieron alteraciones en la membrana plasmática, las cuales permitieron la penetración del colorante.

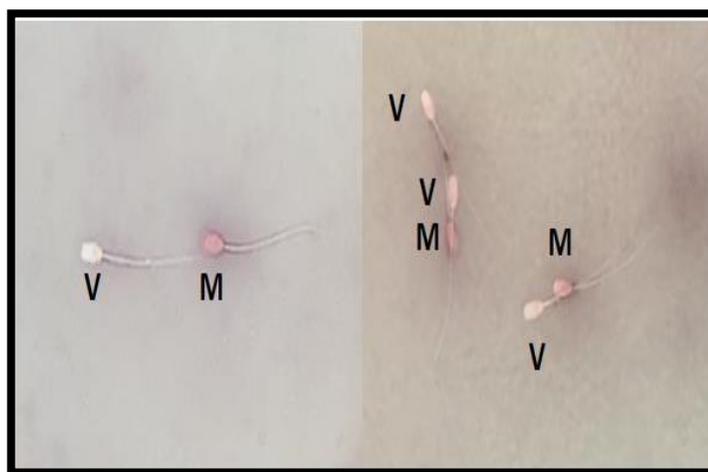


Figura 5. Tinción de Eosina-Nigrosina de espermatozoides descongelados de cerdo. La letra V señala espermatozoides vivos criopreservados con un diluyente a base de liposomas cargados con trehalosa, mientras que la letra M indica los espermatozoides muertos.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La utilización de dispersiones coloidales que permitan la liberación de fármacos ha sido empleada desde hace ya varios años. Un ejemplo de estos sistemas son los liposomas, vesículas que por su anfipaticidad permiten la incorporación en su centro acuoso de material impermeable para la célula como la trehalosa. En el presente trabajo fueron utilizadas estas partículas llevando a cabo su preparación y caracterización, siendo esto último un aspecto de especial relevancia para obtener un panorama completo de su comportamiento en los espermatozoides. En virtud de lo expuesto, es importante mencionar que gran parte del tiempo dedicado al desarrollo de esta investigación fue empleado en la estandarización de los procesos de caracterización, principalmente los dirigidos a la cuantificación de fosfolípidos y trehalosa.

Al considerar el *tamaño* de los liposomas, se conoce que partículas pequeñas poseerán una mayor área superficial en las células a comparación de partículas grandes en un mismo volumen (Sinko, 2006). Nuestros liposomas cargados tuvieron un tamaño de 357 nm y los vacíos de 256 nm, asumiendo que esa diferencia es debido a la trehalosa encapsulada ya que Linares y col. (2016) obtuvieron liposomas cargados con sirolimus con un mayor tamaño que los vacíos, al utilizar la misma técnica de manufactura que la que utilizada en este proyecto (calentamiento). Por otra parte Holovati y Acker (2007) fabricaron liposomas cargados con trehalosa de mayor tamaño que los nuestros (401 nm), debido a la extrusión repetida realizada a través de un poro con un tamaño de 400 nm. Corroborando lo anterior, Roy y col. (2016) mencionan que el tamaño de una vesícula se incrementa en presencia de trehalosa, ocasionado por las interacciones del azúcar con los grupos cabeza de los glicerofosfolípidos que componen la membrana.

Durante la fabricación de los liposomas se pueden formar agregados que tienden a generar partículas de mayor tamaño aumentándose el *índice de polidispersión (PDI)*, de ahí que en este proyecto se utilizó dicho índice para

determinar si nuestras partículas se encontraron de manera homogénea en el intervalo del tamaño esperado o si se habían formado agregados que aumentarían la proporción de partículas con un tamaño superior (Müller y col. 2001). El PDI obtenido en los liposomas cargados fue de 0.434, sin embargo la dispersión más homogénea respecto al tamaño de las partículas fue la de liposomas vacíos al tener un PDI más bajo (0.326), lo cual concuerda con lo descrito por Linares y col. (2016) que como se hizo referencia, al cargar sus liposomas con sirolimus también encontraron un PDI mayor que en el caso de los liposomas vacíos usados como control. En nuestro proyecto el PDI mayor de los liposomas cargados puede ser atribuido a la presencia del azúcar.

En adición a lo antes descrito, se determinó el *potencial* ζ , tomado como una medida para determinar si los liposomas se encuentran aglomerados o dispersos en el medio. En nuestro caso el potencial ζ , mostró la inestabilidad de la formulación de liposomas cargados con trehalosa al no ser lo suficientemente bajo (-18.13 mV.) De acuerdo con Müller y col. (2001), una solución con un potencial $\zeta > -30$ mV es inestable por la poca fuerza de repulsión existente entre las partículas cargadas, es decir las partículas se encuentran más cercanas unas a otras, lo que da como resultado su aglomeración. Una vez más, los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los obtenidos por Linares y col. (2016) debido a la utilización de la misma composición de fosfolípidos en los liposomas y del medio isotónico, ya que esto influye sobre el potencial ζ .

La visualización por *TEM* confirmó la presencia de vesículas de forma esférica y con un tamaño nanométrico variable, obtenidos tras un proceso de extrusión. Holovati y Acker (2007) lograron demostrar de igual manera la formación de liposomas cargados con trehalosa generados a partir de extrusión repetida, con un tamaño aproximado de 400 nm y asumiendo que el grosor de la capa fue de 5 nm.

A través de la *cuantificación de fosfolípidos* se pudo determinar que el rendimiento de fosfolípidos en relación a la cantidad inicial agregada, fue mayor en

los liposomas cargados con trehalosa al compararlo con la dispersión de liposomas vacíos (61% y 39% respectivamente), no obstante en ambos casos hubo pérdidas durante el proceso de filtración, lo cual cobra especial relevancia al tomar en cuenta el costo de producción.

El porcentaje de encapsulación de la trehalosa fue del 73%, siendo menor al obtenido por Hlovati y Acker (2007), lo que se puede explicar por la pérdida de trehalosa observada durante el proceso de elaboración y en la separación por centrifugación realizada para la cuantificación.

Para valorar el efecto de los liposomas cargados y vacíos sobre los espermatozoides de cerdo al descongelado, fueron empleados en una concentración del 10% (v/v) en el diluyente para congelación, adicional al 10% de yema de huevo usada como fuente de fosfolípidos. Al respecto los resultados obtenidos referentes a la *motilidad* al descongelado, muestran que el porcentaje más bajo de células motiles fue del 15%, presentado por los eyaculados congelados con el diluyente de liposomas cargados con trehalosa, seguido por el 16% que corresponde a la formulación con liposomas vacíos, en contraste, el semen criopreservado con Androstar® CryoPlus fue el que presentó el porcentaje de motilidad más alto al descongelado (23%). Se infiere que lo anterior puede estar relacionado con la concentración del disacárido empleada en el diluyente para congelación. Por lo cual se requieren la realización de pruebas que permitan afirmar esta hipótesis.

Lo anterior concuerda con los resultados publicados por He y col. (2001), donde al incubar espermatozoides porcinos con liposomas compuestos por una mezcla de fosfolípidos seleccionados, así como de liposomas a base de lípidos extraídos de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide porcino, el porcentaje de motilidad obtenido fue menor en comparación al diluyente compuesto por yema de huevo.

En equinos los resultados también han sido similares, Pillet y col. (2009), obtuvieron una motilidad significativamente más alta con yema de huevo como crioprotector, que al emplear liposomas preparados con lecitina de yema de huevo comercial, considerando que la concentración óptima de estos liposomas fue del 4%.

En el caso de la especie bovina, al congelar eyaculados en presencia de liposomas preparados con 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfosocolina (DOPC) los resultados son similares al nuestro, obteniéndose un porcentaje de motilidad menor (43%) en comparación al diluyente estándar preparado con yema de huevo, sin embargo variando la formulación con base a DOPC:DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)) se incrementó este parámetro (52%), lo que puede ser atribuido a un aumento en la interacción entre los grupos cargados fosfatidilglicerol de los liposomas y las regiones cargadas en la membrana espermática (Röpke y col. 2011). También en el caso de lo publicado por Kumar y col (2015) se demostró que en el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) la motilidad al descongelado fue significativamente más alta al utilizar un diluyente comercial a base de liposomas (Optixcell®) en comparación a la yema de huevo y lecitina de soya.

Estos dos últimos reportes abren la incógnita de si los resultados observados en rumiantes se deben a las características de resistencia conferidas por la conformación de la membrana espermática diferente a la de los suinos.

En lo correspondiente a la *viabilidad celular* obtenida al descongelado, se corroboró que la adición de liposomas cargados con trehalosa o liposomas vacíos en el diluyente Androstar® CryoPlus permite mantener la sobrevivencia celular, al compararlos con los diluyentes que fueron utilizados como controles. El diluyente que presentó el mayor porcentaje de células vivas fue el diseñado a partir del reportado por Gutiérrez-Pérez y col. (2009), en el cual 300 mM de trehalosa fue empleada como crioprotector, quedándose en el medio extracelular. Por el contrario, los valores más bajos lo presentaron los eyaculados congelados con el diluyente a base de liposomas cargados con trehalosa (19.7%). De igual forma que

lo señalado en el parámetro de motilidad, se sugiere que el porcentaje de viabilidad presentado por los eyaculados criopreservados con liposomas cargados con trehalosa puede estar relacionado con la concentración (10%) utilizada en esta investigación.

Por otra parte los resultados de viabilidad obtenidos en este trabajo son consistentes con lo publicado por He y col. (2001), donde el porcentaje de viabilidad al descongelado presentada por los eyaculados conservados con diluyentes a base de yema de huevo fue mejor en comparación a liposomas. En garrñones, la integridad de la membrana plasmática presentada al descongelado no mostró diferencias significativas entre la yema de huevo y liposomas (Pillet y col. 2012). En criopreservación de eyaculados de bovinos, los diluyentes a base de liposomas compuestos de DOPC mostraron la mejor criosobrevivencia al descongelado en comparación a las otras formulaciones empleadas (Röpke y col. 2011).

En conclusión se logró la preparación exitosa de liposomas cargados con trehalosa, los cuales fueron adicionados al diluyente de congelación para la incorporación intracelular de trehalosa en el espermatozoide porcino. Los resultados reportados en esta investigación demostraron que los liposomas cargados con trehalosa permitieron mantener los valores de viabilidad espermática, de acuerdo a los porcentajes obtenidos con diluyentes cuyo efecto ya han sido probados en el cerdo, por el contrario, la motilidad espermática disminuyó significativamente al ser comparada con estos últimos. Sin embargo el uso de liposomas cargados con trehalosa representa una opción prometedora para liberar la trehalosa al interior del espermatozoide, potencializando su efecto crioprotector de acuerdo a los reportes obtenidos en otros tipos celulares.

En virtud de lo señalado, se continuará optimizando la formulación de los liposomas con el objetivo de mejorar su interacción con los espermatozoides, se determinará la concentración óptima de liposomas cargados con trehalosa que debe estar presente en el diluyente para congelación de semen porcino, además de llevar a cabo la cuantificación de trehalosa por HPLC en el espermatozoide.

10. REFERENCIAS

1. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002; 57: 1801-1808.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, 2008.
3. Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Bréque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 2008; 70: 1251-1259.
4. Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29 (6): 1245-1251.
5. Barrientos-Morales M, Arancibia-Salinas K, Trujillo OME, Muñoz-Gotera RJ, Montiel-Palacios F, Juárez-Mosqueda ML. Is there a relationship between the PT-Substructure status and acrosome loss of boar spermatozoa following freezing-thawing or acrosomal reaction?. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 8 Suppl 1: 155-164.
6. Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology* 2001; 22 (6): 961-969.
7. Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science* 2000; 58: 99-111.
8. Chen T, Acker JP, Eroglu A, Cheley S, Bayley H, Fowler A, Toner M. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology* 2001; 43: 168-181.
9. Corcuera BD, Marigorta P, Sagüés A, Saiz-Cidoncha F, Pérez-Gutiérrez JF. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin

condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67: 1150-1157.

10. Costa Morato D, Gomes C, Mariani D, Neves P, Dias M, Dolly A, Araújo EC. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1780: 1408-1411.
11. Crowe LM. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative biochemistry part A* 2002; 131: 505-513.
12. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction* 2000; 5: 46-52.
13. Darin-Bennett A, Poulos A, White IG. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Australian journal of biological sciences* 1973; 26: 1409-1420.
14. Eddy EM, O'Brien D. The Spermatozoon. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* 2006; 1: 3-54.
15. Fraser L, Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science* 2007; 99: 317-329.
16. Fraser L, Strzeżek J, Kordan W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal reproduction science* 2014; 147: 119-127.
17. Gläufke C, Akhoondi M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Cryopreservation of platelets using trehalose: the role of membrane phase behavior during freezing. *Biotechnology progress* 2012; 28 Suppl 5: 1347-1354.
18. Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda M, Carvajal SU, Trujillo ME. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 2009; 58: 287-292.
19. Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Mota D, Trujillo ME. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology* 2011; 62: 32-39.

20. Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29: 26-38.
21. He L, Bailey JL, Buhr MM. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biology of reproduction* 2001; 64: 69-79.
22. Holovati JL, Acker JP. Spectrophotometric measurement of intraliposomal trehalose. *Cryobiology* 2007; 55: 98-107.
23. Holovati JL, Gyongyossy-Issa MIC, Acker JP. Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality. *Cryobiology* 2009; 58: 75-83.
24. Hu J, Li Q, Jiang Z, Li W. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology* 2008; 57: 257-262.
25. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 143-172.
26. Kozdrowski R. The effect of trehalose on post-thaw viability and fertility of european brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2009; 116: 326-334.
27. Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, *et al.* Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 2015; 159: 38-45.
28. Lee Y, Lee S, Lee S, Yang B, Park C. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2015; 159: 124-130.
29. Linares-Alba MA, Gómez-Guajardo MB, Furtado J, Brooks DE, García-Sánchez GA, Bernad-Bernad MJ. Preformulation studies of a liposomal formulation containing sirolimus for the treatment of dry eye disease. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 2016; 32 (1): 11-22.

30. Luño V, Gil L, Olaciregui M, González N, Jerez RA, Blas I. Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology* 2014; 69: 157-162.
31. Luo Y, Li WM, Wang W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. *Environmental and Experimental Botany* 2008; 63: 378-384.
32. Magazu S, Migliardo F, Ramirez-Cuesta AJ. Concentration dependence of vibrational properties of bioprotectant/water mixtures by inelastic neutron scattering. *Journal of the royal society interface* 2007; 4 Suppl 12: 167-173.
33. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005; 63: 411-421.
34. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinoza E. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* 2010; 61: 17-21.
35. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology* 2002; 57:327-344.
36. Mercado E, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez JM, *et al.* Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2009; 115: 149-157.
37. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 47: 3-19.
38. Naing SW, Wahid H, Mohd KA, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, *et al.* Effect of sugars on characteristics of boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2010; 122: 23-28.
39. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology* 2013; 66: 275-282.

40. Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, et al. NMR and quantum chemical study on the OH1/4pi and CH1/4O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *Journal of the American Chemical Society* 2003; 125: 12739-12748.
41. Omega C, Juárez- Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006; 66: 1969-1975.
42. Orzolek A, Wysocki P, Strzezek J, Kordan W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16°C) in different extenders. *Reproductive Biology* 2013; 13: 34-40.
43. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29: 255-266.
44. Pelufo V, López Armengol MF, Malcotti V, Venturino A, Aisen EG. Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. *Theriogenology* 2015; 83: 144-151.
45. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, et al. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 2012; 77: 268-279.
46. Riddle VM, Lorenz FW. Nonenzymic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in ringer's phosphate suspensions of avian spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1973; 50 Suppl 1: 27-34.
47. Rodrigues MJP, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology* 2014; 68: 343-348.

48. Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers WF. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 2011; 76: 1465-1472.
49. Roy A, Dutta R, Kundu N, Banik D, Sarkar N. A comparative study of the influence of sugar sucrose, trehalose, and maltose on the hydration and diffusion of DMPC lipid bilayer at complete hydration: Investigation of structural and spectroscopic aspect of lipid-sugar interaction. *Langmuir* 2016; 32: 5124-5134.
50. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 68: 745-754.
51. Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus Bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2010; 119: 183-190.
52. Sinko PJ. *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*. 6^a ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins, 2006.
53. Stewart JM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical biochemistry* 1980; 104: 10-14.
54. Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 2013; 146: 21-35.
55. Svetlichnyy V, Müller P, Pomorski TG, Schulze M, Schiller J, Müller K. Metabolic incorporation of unsaturated fatty acids into boar spermatozoa lipids and de novo formation of diacylglycerols. *Chemistry and Physics of lipids* 2014; 177: 41-50.
56. Thi Men N, Kikuchi K, Nakai M, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, *et al.* Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2013; 80: 1033-1044.

57. Toh M, Chiu GN. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian journal of pharmaceutical sciences* 2013; 8: 88-95.
58. Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Moce E, Mercado E. Addition of cholesterol-loaded cyclodextrins to the thawing extender: effects on boar sperm quality. *Reproduction in domestic animals* 2014; 49: 427-432.
59. Trzcinska M, Bryla M, Gajda B, Gogol P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology* 2015; 83: 307-313.
60. Vadnais ML, Althouse GC. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 2011; 76: 1508-1516.
61. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 60-61:481-492.
62. Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology* 1996; 33: 320-329.
63. Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Han Y, Sugawara A, Morohaku K, *et al.* Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). *Animal Reproduction Science* 2007; 102: 165-171.
64. Yeste M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 2016; 85: 47-64.
65. Zeng C, Tang K, He L, Peng W, Ding L, Fang D, *et al.* Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 2014; 68: 395-404.
66. Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: Implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 2002; 45: 143-152.

67. Zhang W, Yi K, Chen C, Hou X, Zhou X. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2012; 132: 123-128.