



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE LOCALIZACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS ACTINA Y GELSOLINA DE LA TECA PERINUCLEAR
DEL ESPERMATOZOIDE FRESCO Y DESCONGELADO DEL
VERRACO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARIANA TRIGO CHAPOU

Asesor: María de Lourdes Juárez Mosqueda



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.

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y Adriana, de quienes nunca ha faltado su apoyo incondicional y quienes me han acompañado en todos los retos a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lourdes Juárez por su paciencia, apoyo y por siempre transmitir su amor por la biología celular.

A Lore y Silvia por su paciencia, sus conocimientos en el laboratorio y por las buenas conversaciones mientras esperábamos las muestras.

A Lia Reyes, Angélica Flores, Rodrigo Franco y Omar Chang por su genuina amistad, cariño y apoyo a lo largo de todos estos años.

A Emilio y Alicia por sus siempre oportunos consejos y cariño incomparable.

Al Dr. Noé Juárez por su paciencia y su ayuda con el análisis estadístico.

Al Dr. René Segura de la Unidad de Investigación de la FMVZ, por su apoyo con el uso de la unidad.

A Sandra Romero por su ayuda en el laboratorio.

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Revisión de la literatura	3
Generalidades	
Espermatozoide	
Sub estructura de la teca perinuclear	
Procesos fisiológicos	
Actina	
Gelsolina	
Gelsolina y actina en el espermatozoide	
Criopreservación	
Hipótesis	20
Objetivo General	21
Objetivos específicos	21
Material y métodos	22
Análisis estadístico	31
Resultados	33
Discusión	42
Conclusiones	47
Perspectivas	48
Referencias	49

RESUMEN

TRIGO CHAPOU MARIANA. Evaluación del patrón de localización de las proteínas actina y gelsolina de la teca perinuclear del espermatozoide fresco y descongelado de verraco (bajo la dirección de: MVZ, PhD María de Lourdes Juárez Mosqueda).

La criopreservación del semen es una de las biotecnologías utilizadas para la reproducción asistida. Sin embargo, los espermatozoides de verraco son altamente sensibles al proceso de congelación-descongelación. Las lesiones afectan a la teca perinuclear e involucran a varias proteínas y moléculas que cumplen funciones importantes durante la capacitación y la reacción acrosomal. El objetivo del presente estudio fue evaluar si la distribución de actina y una de sus proteínas reguladoras, la gelsolina, presentes en la teca perinuclear, se ven alteradas en los espermatozoides criopreservados de verraco sometidos a la capacitación y reacción acrosomal *in vitro*. Mediante inmunocitoquímica se evaluaron la localización de actina y de gelsolina en las subregiones de la cabeza y flagelo de espermatozoides frescos y congelados-descongelados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal. Se encontró que la actina se incrementó significativamente en la región acrosomal y en el segmento ecuatorial-postacrosomal después de la capacitación. En los espermatozoides criopreservados la actina fue significativamente mayor en la región ecuatorial-postacrosomal en comparación con los espermatozoides frescos. Por su parte, la gelsolina se translocó desde el flagelo a la región acrosomal y ecuatorial-postacrosomal después de la capacitación. No obstante, en espermatozoides criopreservados la gelsolina antes de la capacitación *in vitro* ya se encontraba en la región ecuatorial-postacrosomal. Como conclusión, el proceso de criopreservación del semen de verraco afecta el patrón de las proteínas actina y gelsolina de la tp. El cambio de localización de la actina de la teca perinuclear del espermatozoide criopreservado de verraco está relacionada con el cambio de localización de la gelsolina en los espermatozoides criopreservados.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es aquel procedimiento de reproducción asistida, cuyo fin es ingresar espermatozoides al tracto genital de la hembra a través de medios artificiales, para que los espermatozoides logren llegar al óvulo y éste sea fertilizado (Roca *et al.*, 2006).

La IA ha provisto al área de reproducción de resultados benéficos, entre algunos ejemplos se encuentran la prevención de enfermedades, el transporte de semen y como parte de programas de conservación de especies. Asimismo en la actualidad se encuentra relacionada la eficiencia de producción comercial con la inseminación artificial; gracias al nivel de fecundidad que se ha logrado a través de su empleo (Knox, 2016). La IA puede efectuarse con semen fresco o congelado/descongelado, éste último utiliza el método de la criopreservación, sin embargo en la especie porcina el semen descongelado representaba para el año 2000 menos del 1% de las inseminaciones a nivel mundial, ya que presenta una menor fertilidad a comparación del semen fresco, así como el hecho de que requiere una cantidad mayor de espermatozoides por dosis (Roca *et al.*, 2006).

Asimismo se ha reportado que los espermatozoides de verraco son especialmente susceptibles a bajas temperaturas, lo que puede generar daños inducidos por el proceso de criopreservación (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011). Algunas de esas consecuencias son la desestabilización de la membrana plasmática, pérdida de la permeabilidad selectiva, redistribución y relocalización de ciertas proteínas como la actina y la mitofusina, entre otros efectos de la criopreservación. (Yeste *et al.*, 2017).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Generalidades

La recolección del semen se puede realizar a través de los siguientes métodos: técnica manual (de la mano enguantada), uso de la vagina artificial o la electro eyaculación (Galina *et al.*, 2008). Al momento de realizar la recolección y la evaluación del semen, éste se debe proteger de la luz directa. Posterior a la recolección del eyaculado se debe realizar la evaluación correspondiente del semen obtenido. En el cuadro 1 se indican los valores promedio de los parámetros evaluados en el semen de verraco.

Cuadro 1. Valores promedio del semen fresco del verraco. Obtenido del Manual de Prácticas en Reproducción. Departamento de Reproducción. FMVZ, UNAM, 1980. Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco. UAM, 2021.

Aglutinación	Sin aglutinación	Número total de espermatozoides	10-20 mil millones
Anormalidades	<20%	Olor	Inoloro
Apariencia	Blanco lechoso, marfil, libre de contaminación (pus, sangre, material extraño).	pH	7.2-7.5
Concentración espermática/ml	200-350x10 ⁶	Viabilidad	80%
Espermatozoides con acrosoma intacto	90%	Volumen	100-500 ml
Motilidad espermática progresiva	>70%		

Espermatozoide

Se trata de una célula haploide, es el gameto masculino que se conforma por tres regiones; cabeza, cuello y flagelo o cola, ésta última presenta divisiones propias (Avilés, 2011).

La cabeza posee una apariencia piriforme, en la cual se ubica el acrosoma, la envoltura nuclear y el núcleo, éste último está rodeado por la teca perinuclear (TP) (Avilés, 2011). El acrosoma se encuentra cubriendo los dos primeros tercios de la cabeza, anterior al núcleo, entre la membrana plasmática y la teca perinuclear, es una vesícula secretora que contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina y la hialuronidasa primordiales para la lisis de la zona pelúcida, ya que posibilitan el paso del espermatozoide a través de la envoltura externa del oocito (Alberts *et al.*, 2010). Estas enzimas son liberadas al momento en que se fusionan la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, generando un proceso conocido como reacción acrosomal (RA) (Avilés, 2011). El cuello o pieza conectora es un segmento corto ubicado entre la base del núcleo y la primera mitocondria de la pieza media de la cola (Bonet *et al.*, 2013), es la porción que une la cabeza con el flagelo (Avilés, 2011).

El flagelo o cola se conforma por la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. En la primera porción (pieza media) centralmente se halla el axonema (que es el eje funcional) el cual primeramente es rodeado por las fibras densas externas y por una segunda capa de una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal (conocida como vaina mitocondrial); la pieza principal es el segmento más largo y le proporciona movilidad al espermatozoide, se conforma de axonema, fibras densas externas y más externamente la vaina fibrosa. En la última y más pequeña sección, la pieza terminal, finaliza el axonema que se encuentra en contacto directo con la membrana plasmática (Avilés, 2011). En la figura 1 se mencionan las dimensiones de cada una de las partes del espermatozoide de verraco, cuya longitud total es de 45 μm aproximadamente (Figura 1).

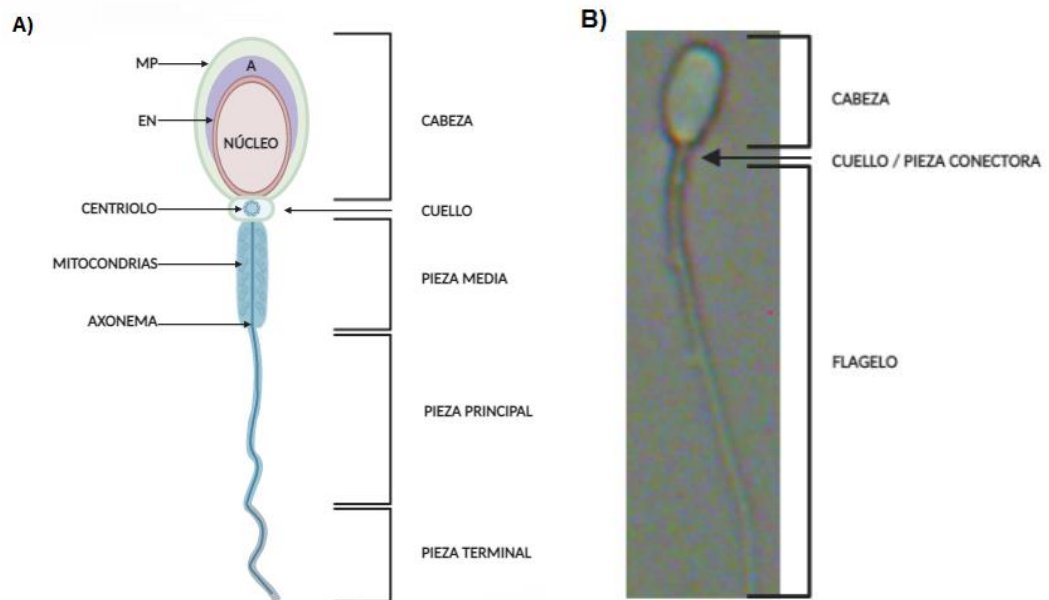


Figura 1: A) Representación de la estructura general del espermatozoide. B) Fotografía de un espermatozoide de cerdo. La cabeza presenta una longitud entre 7 y 8 μm , el cuello 0.7-1 μm ; el flagelo se divide en tres porciones: la pieza media con una longitud de 9 μm -10 μm , la pieza principal 26 μm -30 μm y la pieza terminal 2 μm -3 μm , con una longitud total aproximadamente de 45 μm . MP: Membrana plasmática; EN: Envoltura nuclear; A: Acrosoma.

Teca perinuclear (sustancia perinuclear o matriz perinuclear)

La teca perinuclear (TP) es ensamblada durante la espermiogénesis, ubicándose entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, ocupando una parte del espacio citoplasmático de la cabeza del espermatozoide (Barrientos *et al*, 2008). Durante la espermiogénesis se genera una modificación en la forma de la espermátide para dar lugar al espermatozoide; donde a excepción de las mitocondrias ninguno de los otros organelos como el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi o los centriolos se conservan en el espermatozoide maduro. Lo que hay son derivados de estos organelos, como el acrosoma el cual fue formado por el sistema RE-Golgi o los centriolos participando en la formación del axonema (Oko *et al*, 2009).

Durante la espermiogénesis la TP interviene en el ensamblaje y formación de la cabeza (Barrientos *et al*, 2008), así como en el ensamblaje del acrosoma (Sutovsky *et al.*, 2003). Asimismo entre otras finalidades de esta estructura se

encuentra la protección del núcleo para así lograr su integridad durante la maduración espermática y en su viaje a través del tracto genital de la hembra, de igual modo proporciona rigidez estructural para favorecer la penetración hacia el óvulo (Arancibia, 2007); también mantiene dominios de la membrana plasmática, participa en la descondensación del material genético y presenta factores activadores del ovocito (Barrientos *et al.*, 2008). Sutovsky y colaboradores corroboran en un estudio el rol propuesto de la TP, en especial de la PAS (PAS por sus siglas en inglés *post acrosomal sheath*), como portador del factor activador de oocitos transmitidos por el espermatozoide (SOAF por sus siglas en inglés; *sperm PT-borne, oocyte-activating factors*), que es responsable de la activación del oocito (Sutovsky *et al.*, 2003).

La TP es el principal citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos (Barrientos *et al.*, 2008), la cual forma una cápsula que circunda el núcleo del espermatozoide maduro, a excepción de la región de implantación del flagelo en la base del núcleo (Oko *et al.*, 2009). Se señala que la TP según su estructura y composición se puede dividir en tres regiones; la sub acrosomal (SAL o SAR *sub acrosomal layer/region*), el segmento ecuatorial (ES por sus siglas en inglés *equatorial segment*) y la post acrosomal (PAS)) (Sutovsky *et al.*, 2003) (Figura 2).

La primera región, la sub acrosomal, se encuentra en la porción apical de la cabeza, donde la TP está entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear (Oko *et al.*, 2009; Bonet *et al.*, 2013), la porción post acrosomal se encuentra caudalmente y está localizada entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática (Oko *et al.*, 2009). La TP del segmento ecuatorial se encuentra entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Sutovsky *et al.*, 2003). Por último la OPL (*outer periacrosomal layer*) se considera como una continuación de la SAL, tanto por su similitud proteica como por su semejanza en el ensamblaje, que se ubica en la parte externa del acrosoma en la región del segmento ecuatorial, es decir entre la membrana acrosomal externa y el plasmalema (Protopapas *et al.*, 2019). La TP se disuelve en el citoplasma del oocito durante la fertilización y se menciona que este hecho

coincide con la activación del oocito, y posterior a su desestructuración se reconstituye la envoltura nuclear (Sutovsky *et al.*, 2003).

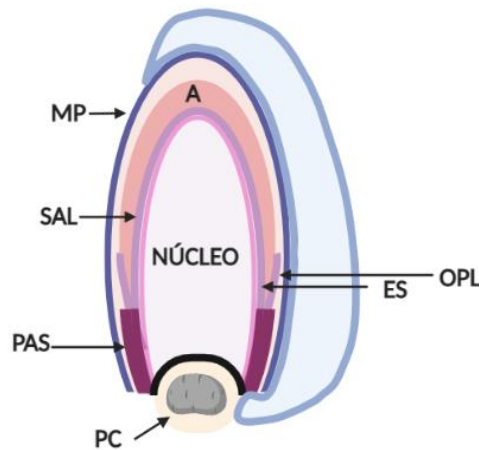


Figura 2: Representación esquemática de la teca perinuclear. A: Acrosoma, MP: Membrana plasmática, SAL: Subacrosomal layer (membrana subacrosomal), PAS: Post acrosomal sheath, PC (pieza conectora), OPL: Outer periacrosomal layer (membrana acrosomal externa), ES: Equatorial segment (segmento ecuatorial).

Sub estructura de la teca perinuclear

Gutiérrez *et al.* mencionan que hay un marcador morfológico empleado para evaluar la integridad de la TP, que es una subestructura de la TP que se localiza en la región apical postacrosomal, siendo esta la región donde se ha reportado la presencia de actina en el espermatozoide de verraco (Gutiérrez-Pérez *et al.* 2011).

Barrientos indica que hay una relación entre la estabilidad del acrosoma con la integridad de la subestructura de la TP, donde si esta subestructura se encuentra en un estado intacto, el espermatozoide conserva su acrosoma, sin embargo si hay daño en la subestructura hay una pérdida del acrosoma (Barrientos *et al.*, 2008).

Procesos fisiológicos

Posterior a la eyaculación, los espermatozoides que han ingresado al tracto genital de la hembra deberán presentar ciertas modificaciones para poder adquirir la capacidad de fecundar al ovocito (Alberts *et al.*, 2010). La capacitación y la reacción acrosomal (RA) son dos procesos fisiológicos que el espermatozoide debe experimentar previo a la fusión con el ovocito (Barrientos *et al.*, 2008). Para que los espermatozoides puedan capacitarse, sufrir la reacción acrosomal y por consiguiente ser capaces de fecundar, es de vital importancia que las membranas de la cabeza del espermatozoide mantengan su integridad (Barrientos *et al.*, 2008).

Capacitación

La capacitación es un proceso fisiológico donde se presentan una serie de modificaciones funcionales y moleculares en el espermatozoide, cuya finalidad es que éste último adquiera la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal y fecundar al ovocito; en el caso de los porcinos se requieren de cinco a seis horas en el tracto reproductor de la hembra, siendo el tiempo variable según la especie (Avilés, 2011). La capacitación fue descrita por Min Chueh Chang y Colin Russell Austin en 1951 en conejos y ratas respectivamente, posteriormente el término “capacitación” fue propuesto por Austin en 1951 (Jin *et al.*, 2017).

Las modificaciones requeridas para la capacitación inician cuando el espermatozoide es eyaculado, continuando en el interior del tracto de la hembra. Ickowicz, *et al.* mencionan que este proceso se puede dividir en dos eventos, los rápidos y los lentos (Ickowicz, *et al.*, 2012).

Los “eventos rápidos” dependen de la activación de la proteína cinasa A (PKA), donde interviene una adenil ciclasa soluble y HCO_3^- e incluye la activación del movimiento vigoroso y asimétrico del flagelo, lo cual es también dependiente de Ca^{++} en el medio, suceso que se presenta al momento en el cual el espermatozoide abandona el epidídimo (Ickowicz, *et al.*, 2012).

El inicio de los “eventos lentos” está señalado por la remoción del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide por la albúmina, lo que genera aumento de la fluidez en la membrana (Ickowicz *et al.*, 2012). Por lo que en esta fase además de incluirse el flujo del colesterol hacia el exterior de la membrana

plasmática, incluye eventos como la hiperactivación (que es un cambio en el patrón de movimiento) y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

Independientemente del evento ciertas moléculas son de importancia sustancial ya que regulan la capacitación, entre estas moléculas se encuentran el bicarbonato (HCO_3), el calcio (Ca^{++}), la adenil ciclasa soluble (sAC), el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la proteína quinasa A (PKA) (Jin, *et al.*, 2017).

In vivo, mientras ocurre la ovulación y la capacitación de los espermatozoides, hay un incremento de la temperatura, del oxígeno y del pH que promueve que los espermatozoides se trasladen de los reservorios al sitio de fertilización en el oviducto, donde hay menor colesterol y más albúmina y bicarbonato, lo que es ideal para la capacitación (Vadnais *et al.*, 2007). El bicarbonato activa sAC para generar un aumento en la concentración intracelular de AMPc, lo que a su vez estimula a la PKA y así se genere una fosforilación de las proteínas en tirosina; reportándose que en especies como bovinos, humanos y murinos la PKA activa a la PLD (fosfolipasa D), lo que conlleva a la polimerización de la actina-F (Vadnais *et al.*, 2007) (Figura 3).

Resumiendo, durante la capacitación espermática se llevan a cabo cambios fisiológicos y bioquímicos como es la salida de colesterol de la membrana plasmática, lo que conlleva a un aumento de fluidez de ésta. De hecho, la modificación de la estructura lipídica de la membrana plasmática permite que el colesterol se ubique en la porción apical de la cabeza espermática, para ser eliminado por promotores de la capacitación como la albúmina (Avilés, 2011). Esta reducción en la proporción de colesterol:fosfolípido en la membrana es parte de los factores que contribuyen a la fluidez de la membrana y a la permeabilidad iónica (Vadnais *et al.*, 2007). El ingreso de bicarbonato (HCO_3) e iones de calcio (Ca^{++}), a través del canal cotransportador Na/HCO_3 y el CatSper, respectivamente, generan un aumento en la concentración de ambas moléculas que conducen al incremento del AMPc y del pH intracelular (pH_i) y con ello cambios en la actividad de las proteínas cinasa y por ende en la fosforilación de proteínas (Finkelstein M., *et al.*, 2013).

Asimismo durante este proceso se modifica el patrón de motilidad, pasando de ser progresiva a una motilidad hiperactivada o HAM (donde HAM corresponde a las siglas de *hyperactivated motility*) (Ickowicz, *et al.*, 2012). La motilidad hiperactivada se caracteriza por un batido flagelar asimétrico, lo cual auxilia a la célula para que tenga una mayor velocidad en su nado y genere más fuerza para penetrar las células del *cumulus oophorus* y la ZP al momento de la fertilización (Finkelstein M., *et al.*, 2013).

Las modificaciones que sobrelleva el espermatozoide durante la capacitación tienen como finalidad que pueda llevar a cabo la reacción acrosomal (Avilés, 2011).

Como se mencionó, la capacitación *in vivo* se efectúa dentro del tracto genital femenino de la hembra, sin embargo también se puede realizar *in vitro*. La capacitación *in vitro* se realiza utilizando medios definidos, bajo condiciones determinadas de temperatura, pH, humedad y CO₂, cuyo objetivo es mimetizar el ambiente oviductal. El medio de capacitación utilizado debe contener piruvato, lactato o glucosa, que son sustratos energéticos y una fuente proteica como la albúmina (Avilés, 2011).

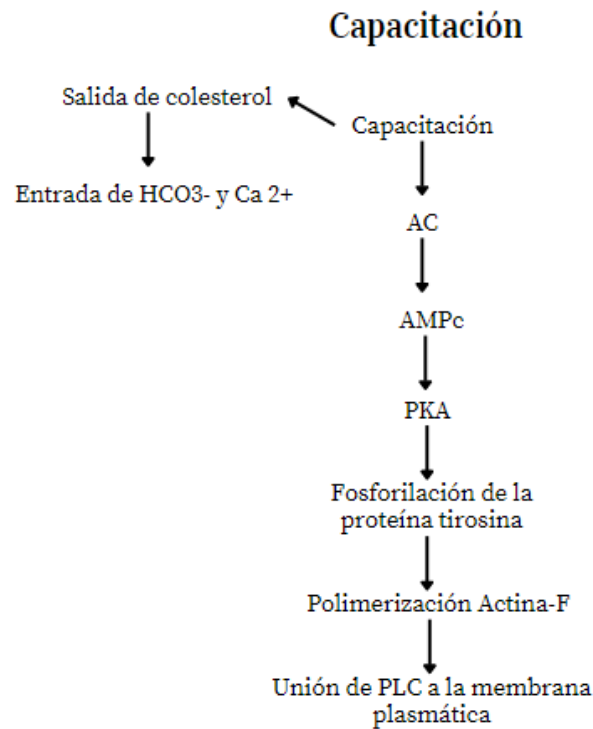


Figura 3: Diagrama representando la capacitación. La salida del colesterol desde la membrana plasmática va a incrementar la permeabilidad para HCO_3^- y Ca^{++} , lo que lleva a la activación de la adenil ciclasa (AC). Posteriormente se va producir AMPc y se va a activar PKA, lo que lleva a la fosforilación de proteínas en tirosina. Modificada de Breitbart, 2002.

Únicamente los espermatozoides capacitados presentan la habilidad de someterse a la reacción acrosomal y posterior fertilización (Jin *et al.*, 2017).

Reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es la denominación del proceso donde se fusionan en múltiples sitios la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en el área apical de la cabeza espermática (Olivera *et al.*, 2006), causando la liberación de las enzimas almacenadas en el interior de esta vesícula. La RA es imprescindible para la fecundación, ya que la liberación de las enzimas hidrolíticas favorecen el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida (Alberts *et al.*, 2010). La célula previamente capacitada posee la habilidad de penetrar el *cúmulus oophorus* del oocito para posteriormente unirse a la zona

pelúcida (ZP), lo que permite que se presente la exocitosis o reacción acrosomal (Ickowicz, *et al.*, 2012) (Figura 4).

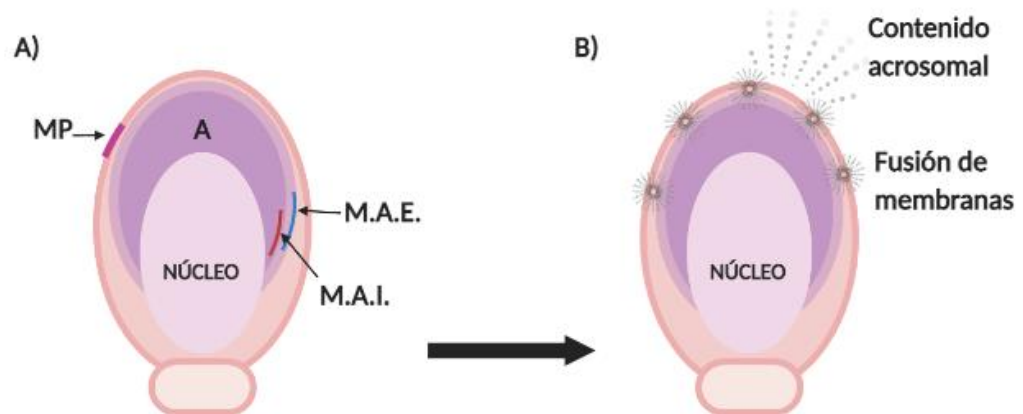


Figura 4: Diagrama de la reacción acrosomal. (A): Espermatozoide íntegro, previo a la reacción acrosomal. (B): Fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, provocando que las enzimas acrosomales salgan. A: Acrosoma; MP: Membrana plasmática; M.A.E.: Membrana acrosomal externa; M.A.I.: Membrana acrosomal interna.

Actina

La actina constituye parte de las proteínas principales que conforman el citoesqueleto, encontrándose entre las proteínas más abundantes en las células eucariotas (Pollard, 2016). Asimismo, presenta entre sus funciones fortalecer o modificar la forma de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2010).

La estructura del monómero (actina-G/actina globular) es una proteína con una hendidura medial profunda, la cual une al nucleótido ATP. La actina presenta la propiedad de transición entre un estado monomérico a un estado filamentoso (actina-F/ actina filamentosa) (Breitbart *et al.*, 2017), a esta transición se le conoce como polimerización. La polimerización de la actina es el proceso en el cual las unidades de actina globular (actina-G) se conectan entre sí para formar filamentos de actina (actina-F), bajo la regulación de proteínas accesorias (Breitbart *et al.*, 2017) (Figura 5).

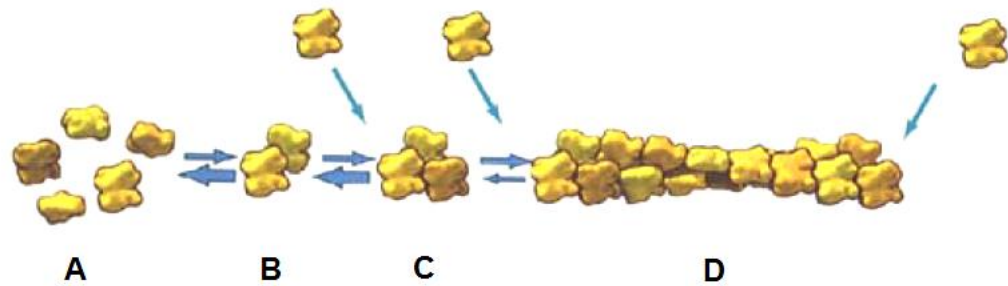


Figura 5: Proceso de polimerización de la actina: se muestra (A) monómeros de actina, (B) un dímero, (C) un trímero y (D) un filamento conformado por diversos monómeros. Modificada de Pollard T., 2016.

Cuando se encuentra polimerizada, el filamento de actina se encuentra conformado por dos protofilamentos paralelos, los cuales giran uno sobre el otro, formando una hélice con rotación hacia la derecha (Alberts *et al.*, 2010). Los filamentos de actina poseen dos extremos, el “extremo más” o “romo” que presenta un crecimiento y una disociación mayor y el “extremo menos” o “puntiagudo”; asimismo existe un evento conocido como “recambio rotatorio” o *treadmilling*, donde los monómeros del filamento de actina se añaden al extremo más del polímero y son liberados en el extremo menos (Alberts *et al.*, 2010). La polimerización de la actina se ve favorecida por la presencia de ATP, por lo que el filamento continúa con la polimerización desde sus dos extremos, siendo la punta roma la que presenta una mayor adición de monómeros durante este proceso (Dalghi *et al.*, 2005) (Figura 6).

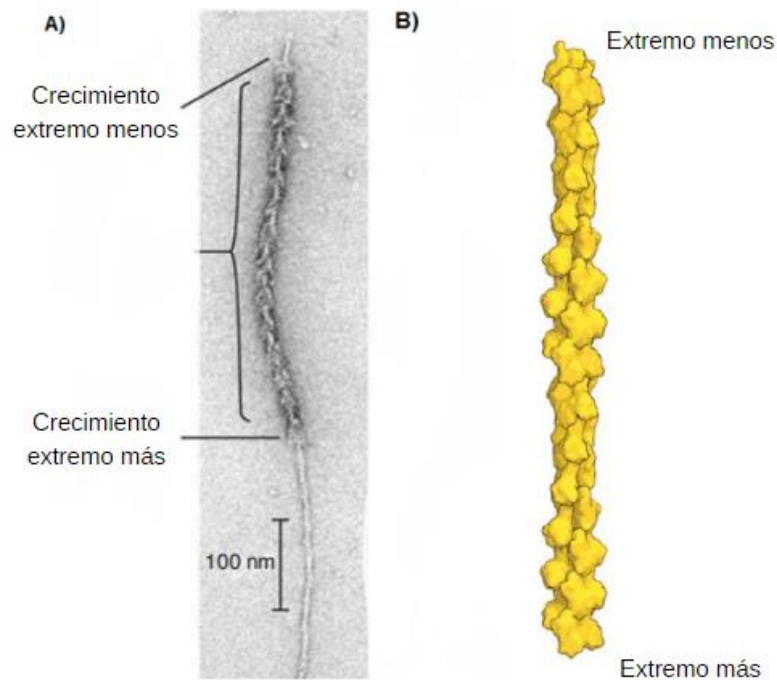


Figura 6: A) Micrografía electrónica de un filamento de actina teñido. B) Representación de un filamento de actina con sus dos extremos, el extremo menos es el superior y el extremo más el inferior. Modificada de Pollard T., 2016.

Los vertebrados expresan tres isoformas principales de actina, la isoforma- α , β y γ (Pollard, 2016); las cuales se clasifican según su patrón de expresión en cuatro musculares (α -cardíaca, α -esquelética, α -entérica y α -vascular) y dos no musculares o citoplasmáticas (β -actina y γ -actina), estas últimas se encuentran expresadas en todos los tipos celulares (Guirado *et al.*, 2002). Los monómeros de actina presentan una forma globular (actina-G) compuesta por una cadena polipeptídica cuyo peso es de 42 o 43 kDa (Dalghi *et al.*, 2005; Colás *et al.*, 2009; De las Heras *et al.*, 1997; Castellani-Ceresa *et al.*, 1992; Naresh, 2016).

La dinámica del citoesqueleto de actina es gracias a la capacidad que tiene la célula para polimerizar y despolimerizar los microfilamentos como respuesta a estímulos extracelulares. La estructura del citoesqueleto de actina es regulada por GTPasas de la familia Rho, así como las diversas estructuras de esta proteína dependen de las proteínas de unión a la actina (ABPs) (Barrientos *et al.*, 2008).

Entre las proteínas de unión a actina, encargadas de regular a ésta última, existe una familia de proteínas cortadoras (*severing proteins*), entre las cuales se encuentran la gelsolina, la villina y la escinderina, entre otras.

Gelsolina

La gelsolina (GSN) es una proteína perteneciente a la superfamilia GSN, constituida por ocho miembros, asimismo la GSN es parte de las ABPs (*ABPs: actin binding proteins* por sus siglas en inglés) o proteínas de unión a actina y es uno de los principales reguladores del esqueleto de actina, ya que actúa seccionando y cubriendo los filamentos de actina, así como secuestrando monómeros. Esta proteína está involucrada en la motilidad, la forma celular, fagocitosis y apoptosis, su actividad depende de la concentración de Ca^{++} intracelular, del pH y de reguladores como el PIP_2 (Fosfatidilinositol bifosfato) (Feldt *et al.*, 2019). Esta proteína de corte posee la capacidad de despolimerizar a la actina, regulando la longitud de los filamentos cerca de las membranas plasmáticas, colaborando así con el movimiento celular y la morfología de la membrana plasmática (Szatmári *et al.*, 2018).

Se conocen tres isoformas de esta proteína, la GSN-1 plasmática (pGSN) y las GSN-2 y GSN-3 citosólicas (cGSN), según la isoforma de la que se trate, tendrá un peso molecular de entre 82 a 84 kDa (Feldt *et al.*, 2019; De las Heras, *et al.*, 1997).

La gelsolina se conforma por dos mitades homólogas, cada mitad se constituye por tres dominios. Los tres primeros dominios de la primer mitad se denominan G1, G2 y G3, su activación es independiente de Ca^{++} , mientras que el resto de los dominios son G4, G5 y G6 y requieren de Ca^{++} para activarse. Los seis dominios se agrupan tres a tres, formando dos estructuras homólogas y que dividen a la proteína en un fragmento N (amino) y un fragmento C (carboxilo). Ambos extremos están separados entre los dominios G3 y G4 por un fragmento conector, el cual es susceptible de ser cortado por la caspasa 3 (Feldt *et al.*, 2019). La GSN posee dos sitios de unión al calcio los cuales son sustanciales para el funcionamiento de la GSN ya que la concentración de Ca^{++} determina la afinidad por la actina y sus filamentos; sin Ca^{++} la GSN se encuentra inactiva, en

Como se mencionó, para que el espermatozoide sea capaz de fertilizar al ovocito requiere capacitarse. Breitbart *et al.* (2017) mencionan que durante el proceso de capacitación los espermatozoides sufren modificaciones en el citoesqueleto de actina, la cual se polimeriza durante este proceso, pero debe de perder este

estado polimerizado previo al inicio de la RA; indicando que el aumento de polimerización de actina en la cabeza espermática es para generar una barrera física entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática adyacente, con el objetivo de prevenir una exocitosis acrosomal espontánea, permitiendo que esta exocitosis se presente únicamente en la presencia del ovocito. Hernández-González *et al.* propusieron que la despolimerización de actina-F era necesaria para que se presentará la reacción acrosomal.

Asimismo, durante la capacitación hay un aumento de la actina-F en el flagelo, lo cual es esencial para el desarrollo de la motilidad hiperactivada, por sus siglas en inglés) (Breitbart *et al.*, 2017), esta motilidad hiperactivada es un patrón de movimiento flagelar asimétrico el cual en la literatura se menciona que puede estar relacionado en la penetración de la zona pelúcida durante la fertilización (Breitbart *et al.*, 2017).

Durante la capacitación el incremento de la actina-F, es dependiente de la activación y/o inhibición de diversas proteínas; por ejemplo de la activación de la PLD (fosfolipasa D) y CaMKII (quinasa calcio calmodulina II) y la inactivación de proteínas de corte (*severing proteins*) como la gelsolina y la cofilina, lo cual deriva en la elongación de filamentos durante la capacitación espermática (Breitbart *et al.*, 2017).

En el espermatozoide, la GSN está involucrada en la regulación de la capacitación espermática y en la RA y junto con el PIP₂ también regulan la motilidad y por ende el desarrollo de HAM (Breitbart *et al.*, 2017). De hecho, durante la capacitación la GSN se encuentra inhibida por PIP₂ para que la actina se pueda polimerizar (Breitbart *et al.*, 2017).

Los niveles de PIP₂ aumentan en la cabeza del espermatozoide durante la capacitación, uniéndose a la gelsolina y causando su inactivación y fosforilación, permitiendo con ello que la forma de actina-F aumente (Breitbart *et al.*, 2017).

Breitbart *et al.*, mencionan que previo a la capacitación aquellos espermatozoides con motilidad progresiva alta, presentan a la gelsolina ubicada principalmente en la cabeza, mientras que en aquellas células con motilidad baja antes de la capacitación la GSN se localiza en la cola y se transloca hacia la

cabeza durante la capacitación (Breitbart *et al.*, 2017). Estos mismos autores refieren que la translocación de la gelsolina desde la cola hacia la cabeza puede deberse a dos razones, en la primera la gelsolina se requiere en la cabeza para que la actina-F pierda su estado polimerizado y con ello presentarse la exocitosis acrosomal, la segunda es que la exclusión de la gelsolina de la cola previene que la actina-F sea despolimerizada y así se presente la motilidad hiperactivada (Breitbart *et al.*, 2017).

Criopreservación

La criopreservación es el uso de temperaturas muy bajas, cuyo objetivo es mantener intacta la estructura de células vivas y tejidos (Pegg, 2007), ya que con bajas temperaturas el metabolismo celular disminuye, la criopreservación es el método más eficiente para el almacenamiento a largo plazo de gametos masculinos.

La criopreservación (dilución, enfriamiento y congelación/descongelación) de semen es conveniente para un almacenamiento duradero de semen procedente de animales cuyo valor genético es alto (Barrientos *et al.*, 2008). También facilita la distribución de genes deseables para la ganadería, asimismo minimiza los efectos de un brote repentino en caso de alguna enfermedad contagiosa y adicionalmente puede auxiliar en la conservación de la biodiversidad. Una virtud sobre la congelación de semen, es que bajo este procedimiento el semen se puede conservar por tiempo indefinido, resguardando así información genética de los individuos en cuestión (Barrientos *et al.*, 2008).

Aunque la criopreservación es el método más efectivo para la conservación a largo plazo de espermatozoides de mamíferos, los procedimientos de congelación-descongelación pueden afectar la función y la supervivencia de los espermatozoides y disminuir el rendimiento reproductivo (Yeste, 2016). El daño celular que ocurre durante el proceso de congelación-descongelación se debe a cambios físicos que afectan la estabilidad celular y de manera específica la integridad de la membrana plasmática, de la membrana mitocondrial, del acrosoma, del núcleo, del citoesqueleto y de otros componentes celulares importantes, como la teca perinuclear (Arancibia, 2007).

En criobiología se establece la teoría de dos factores por los que ocurren las criolesiones: 1) debido a la formación letal de hielo intracelular a alta velocidad de enfriamiento y 2) debido a la concentración de solutos / electrolitos, deshidratación celular y reducción de la fracción no congelada en el espacio extracelular en baja velocidad de enfriamiento. Al bajar la temperatura, los lípidos de la membrana sufren alteraciones en las fases físicas, esto debido a la reducción de los movimientos laterales de los fosfolípidos que se produce cuando las temperaturas son inferiores a 5°C disminuyendo la fluidez de la membrana, lo que eventualmente da como resultado una transición de la fase líquida a la fase de gel (Holt, 2000). El cambio de la fase de líquido a la fase de gel, llamado fase de transición, excluye a las proteínas de membrana de los fosfolípidos que se encuentran en fase de gel, hacia los fosfolípidos que mantienen aún una fase líquida, lo que resulta en la pérdida de la permeabilidad selectiva (Valencia *et al.*, 2013). Como consecuencia de la pérdida de la permeabilidad selectiva se presenta la entrada de iones, como Ca^{2+} y bicarbonato, desde el espacio extracelular, lo que afecta la homeostasis. Estos cambios inducidos por la congelación son conocidos como “criocapacitación” o cambios similares a la capacitación (Valencia *et al.*, 2013).

Además, la supervivencia de los espermatozoides después de la crioconservación no solo implica daños durante la congelación, sino también durante la descongelación ya que una lenta descongelación da como resultado la formación de cristales de agua, mientras que una tasa rápida de descongelación puede producir estrés osmótico (Holt, 2000).

En algunos estudios ultraestructurales se ha detectado que la actina en la teca perinuclear de espermatozoides de verraco, luego de proceso de congelación-descongelación, presenta alteraciones en su patrón de localización así como en su estado de agregación y que esto influye en los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011). De igual forma, durante la criopreservación de otros tipos celulares se ha encontrado que por efecto de la baja temperatura, los filamentos de actina del citoesqueleto se despolimerizan y se pierde el equilibrio entre la actina globular y filamentosa (Vincent *et al.*, 1990).

La criopreservación de semen de verraco sigue significando una limitación tecnológica importante para el desarrollo de la reproducción de esta especie. Por lo tanto, comprender los cambios en los procesos fisiológicos del espermatozoide de verraco que se producen por efectos de la crioconservación, como las alteraciones en la localización del citoesqueleto de actina y de aquellas proteínas que participan en su regulación, permitiría conocer y entender con mayor profundidad los cambios moleculares y bioquímicos que ocurren en los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación y con ello poder establecer mejores protocolos para obtener mejores resultados al emplear el proceso de crioconservación en los espermatozoides de verraco; biotecnología necesaria en cualquier sistema de explotación para mejorar la eficiencia reproductiva de esta especie.

HIPÓTESIS

El cambio en la distribución de la actina y la gelsolina en la teca perinuclear de los espermatozoides de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, se ve afectado en los espermatozoides criopreservados sometidos a los mismos procesos.

OBJETIVO GENERAL

Valorar en los espermatozoides criopreservados de verraco si se modifica la localización de la actina y de la gelsolina de la teca perinuclear durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la localización que presenta la proteína actina en la teca perinuclear en los espermatozoides frescos y en los criopreservados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.
2. Evaluar las localizaciones que presenta la proteína gelsolina en la teca perinuclear en los espermatozoides frescos y en los criopreservados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.
3. Valorar si en el espermatozoide fresco en los diferentes estados fisiológicos la localización de la actina se relaciona con los de la gelsolina y si ello se ve afectado en los espermatozoides criopreservados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Anticuerpos para la inmunocitoquímica:

Anticuerpos primarios: Actin (H-6) mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology. Gelsolin (C-20) Goat Polyclonal IgG, Santa Cruz.

Kit para detección empleado en inmunocitoquímica:

BIOCARE MEDICAL Starr Trek Universal HRP Detection System (Número de catálogo: STUHRP700 H, L10; conformado por: a) Trekkie Universal Link (STU700H) 1x25 ml, b) TrekAvidin-HRP (STHRP700H) 1X25 ml, c) Betazoid DAB Chromogen (BDB900C) 1x1 ml, d) Betazoid DAB Substrate Buffer (DS900H) 1x25 ml).

Reactivos medio TALP:

BSA (AMRESCO Biochemicals and Life Science), gentamicina (Tornel Laboratories. Gentomicyn super veterinary use), lactato de sodio (SIGMA), piruvato de sodio (SIGMA-ALDRICH), CaCl₂·H₂O (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.), glucosa (J.T. Baker), HEPES (SIGMA), KCL (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.), MgSO₄ (Allied Chemical General Chemical Division), NaCl (REPROQUIFIN. Reactivos y productos químicos S.A. de C.V.), NaH₂PO₄ (Técnica Química S.A), NaHCO₃ (J.T.Baker), rojo fenol (SIGMA).

Otros reactivos:

DPBS (1X) (GIBCO), Ficoll (SIGMA), filtros para medio (Millex-GV Filter Unit Low protein binding durapore PVDF), glicerol, hematoxilina (0.5%), ionóforo de calcio A23187 (SIGMA), diluyente (KUBUS, Androhep®, BTS), trehalosa (SIGMA), tritón x-100 (SIGMA), tween 20 (Merck-schuchardt), xilol absoluto (Reactivos Química Mayer).

Otros materiales:

Pajillas (IMV-technologies 0.5 ml).

Equipo:

Agitador (Sky Line ELMI A20mm Orbital Shaker), baño María (Termo-Baño Felisa), cámara de Neubauer (Improved Brightline Optik Labor, 0.100 mm, depth 0.0025 mm²), cámara para fotografías, centrífuga (HERMLE Z326K), centrífuga atemperada (PRISMR), incubadora (Thermo Electron Corporation Forma Series II), micro centrífuga (XK-400 PALM SERIES CENTRIFUGE), micro incubadora (Thermo Scientific Hera Therm), microscopio óptico (Leica DLMS, con objetivos 5X, 10X, 40X, 100X), platina térmica (Wiggen Hauser MSC 400), refrigerador (Whirlpool), potenciómetro (HI 2211 pH/ORP Meter Hanna Instruments), tanques de nitrógeno (GENEX), vortex (Velp Scientifica y XK-400 PALM" series centrifuge).

Material Biológico

Para la obtención de muestra se recolectaron tres eyaculados de cerdos pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Jilotepec, Estado de México. El semen se obtuvo de tres verracos sexualmente maduros de las razas: York/Landrace (línea materna), Pietrain puro (línea terminal) y Landrace/York (línea materna). Los cerdos de quienes se obtuvieron las muestras eran fértiles, ya que se empleaban para la realización de inseminaciones en el centro.

La obtención de semen fue a través de la técnica de la mano enguantada, donde únicamente se adquirió la fracción rica en espermatozoides la cual se resuspendió para su transporte en un volumen 1:1 en el diluyente Androhep®. La muestra se transportó el mismo día de su recolección en una caja de poliuretano atemperada a 20°C y libre de los rayos directos del sol, desde las instalaciones de obtención hasta el laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia donde se procesó.

Evaluación seminal

Posterior a la llegada de la muestra al laboratorio, se realizó la valoración del eyaculado, la cual comprendió:

- Motilidad.
- Conteo espermático.

- Viabilidad.
- Integridad del acrosoma.

La evaluación de la motilidad progresiva se realizó colocando 20 µl de muestra sobre un portaobjetos que se atemperó previamente a 37°C, posteriormente se observó al microscopio de luz con el objetivo de 40X; para la valoración del movimiento rectilíneo uniforme se utilizó una escala de 0% (nula) a 100% (muy móviles).

La evaluación de la motilidad en masa se realizó colocando 20 µl de muestra sobre un portaobjetos, posteriormente se observó al microscopio de luz con el objetivo de 10x; para su valoración se utilizó una escala de 0% (nula) a 100% (muy móviles).

Para el conteo espermático se tomaron 25 µl de muestra, se diluyeron en 500 µl de Tritón X-100, 0.1% en PBS (*phosphate buffered saline*), se homogeneizó y se tomaron 10 µl de la dilución para cada cuadrante de la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de ambos cuadrantes de la cámara con el objetivo de 40X, obteniendo así un promedio. Para obtener la concentración final se utilizó la siguiente fórmula:

Concentración espermática:

$$\# \text{ espermatozoides } \times 21 \times 10,000 \times 5 = \text{espermatozoides /ml}$$

Donde el número de espermatozoides es el promedio del conteo de ambas cámaras de Neubauer, 21 es el factor de dilución (25 µl de semen diluido en 500 µl de Tritón X-100, 0.1% diluido en PBS), 10,000 representa la dimensión de la cámara y cinco es el valor de cuadros contados.

Para evaluar la viabilidad y morfología se utilizó la tinción eosina-nigrosina. Se tomaron 20 µl de muestra y se añadieron 10 µl del colorante eosina-nigrosina (eosina, citrato de sodio dihidratado, nigrosina soluble, agua destilada) en una proporción 1:2, se incubó durante cinco minutos en baño maría a 37°C, posteriormente se realizaron frotis (tomando 10 µl de muestra) sobre portaobjetos previamente lavado y desengrasado y se dejaron secar al aire. Para

la evaluación se realizó el conteo de 100 células al microscopio óptico con el objetivo de 40X, donde las células que presentaron tinción en el interior se les consideró como muertas, mientras que aquellas que no mostraron colorante en su interior se les consideró como vivas. Asimismo la eosina-nigrosina se empleó para evaluar la morfología celular, utilizándose sólo aquellas muestras que no presentaron más del 20% de alteraciones morfológicas.

Para evaluar la integridad acrosomal se empleó la tinción azul de Coomassie, para ello la muestra a una concentración de 35×10^6 células/ml se centrifugó (3,500 rpm, cuatro minutos) y la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído al 4% en PBS, durante 10 minutos; se lavó nuevamente con PBS (2,500 rpm, tres minutos) y se resuspendió en 100 μ l de cloruro de amonio (0.05 M, en DPBS). Posteriormente se realizaron frotis (tomando 20 μ l de muestra) en portaobjetos previamente lavado y desengrasado y se dejó secar al aire, a continuación las laminillas se sumergieron en la tinción azul de Coomassie (azul de Coomassie 0.22%, metanol 50%, ácido acético 2.5 ml 10%, agua bidestilada) durante 10 minutos, se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar; para su evaluación al microscopio óptico se contaron 100 células empleando el objetivo de 40X. Aquellas células cuyo acrosoma se hallaba teñido de azul fuerte se clasificaron en “espermatozoides con acrosoma íntegro”, mientras que aquellos espermatozoides cuyo acrosoma no estaba teñido se catalogaron como “espermatozoides con acrosoma no íntegro”.

Gradiente de Ficoll

Para el gradiente se utilizó Ficoll al 20% en BTS, un ml de muestra a una concentración de 25×10^6 / ml fue colocada sobre un colchón de dos ml de Ficoll al 20%, se centrifugaron (2,500 rpm, seis minutos), recuperando aquellos espermatozoides que se encontraban al fondo del tubo.

Método de congelación

Se realizó el protocolo a dos tiempos (refrigeración y glicerolización) empleando trehalosa (Gutierrez, 2009).

Para la congelación se utilizaron dos diluyentes, el A (libre de glicerol) y el B (conteniendo glicerol y trehalosa). En los cuadros 2 y 3 se indica la composición de los diluyentes utilizados.

Cuadro 2 y 3. Componentes de diluyentes A (sin glicerol) y B (glicerol y trehalosa) para elaborar 20 ml.

Diluyente A (sin glicerol)

Materiales	10 ml
Trehalosa (250 mM)	0.945 gr
Gentamicina	100 µg/ml
Yema de huevo 20%	2 ml
Agua desionizada	cbp

Diluyente B (con glicerol)

Materiales	10 ml
Trehalosa (250 mM)	0.945 gr
Gentamicina	100 µg/ml
Glicerol 1%	200 µl
Yema de huevo 20%	2 ml
Agua desionizada	cbp

Preparación de los diluyentes para congelar. (Gutiérrez, 2009)

Diluyente A: En un matraz se añaden, trehalosa, gentamicina, yema de huevo de gallina (extraída el mismo día de su preparación) y cuanto baste para de agua desionizada, posteriormente se homogeneizan y se centrifugan (1,500 rpm, 10 minutos). La pastilla se desecha y el sobrenadante restante se ajusta a un pH (HANNA instruments HI 2211 pH/ORP Meter) entre 6.8-7.2, en caso de ser necesario se añadirá nuevamente cuanto baste para de agua bidestilada para obtener nuestro volumen final. Esta fracción del diluyente se mantiene a temperatura ambiente mientras se emplea.

Diluyente B: En un matraz se añaden trehalosa, gentamicina, glicerol, yema de huevo de gallina (extraída el mismo día de su preparación) y cuanto baste para de agua bidestilada, posteriormente se homogeneizan y se centrifugan (1,500 rpm, 10 minutos). La pastilla se desecha y el sobrenadante restante se ajusta a un pH de 7 (con un rango de 6.8.-7.2), en caso de ser necesario se añadirá nuevamente cuanto baste para de agua bidestilada para obtener nuestro volumen final, se mantiene a 4°C hasta su uso.

Las muestras de semen fueron centrifugadas (1,500 rpm, 10 minutos) para retirar el diluyente de transporte, la pastilla obtenida se reconstituyó con el “diluyente A” a una concentración de 300 millones de espermatozoides que se encontraba a temperatura ambiente (20°C), a continuación se equilibraron las células a una temperatura de 16°C durante 90 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de estabilización, la muestra se mantuvo a 4°C durante dos horas, a

continuación se añadió el diluyente B para obtener una concentración final de 150 millones de espermatozoides, la incorporación del diluyente B se realizó de modo gradual (5%, 10%, 15%, 20% y 50%), con intervalos de 10 minutos entre cada adición y homogeneizando la muestra suavemente a una temperatura de 4°C, se mantuvo a esta temperatura durante 60 minutos mientras se incorporaba el diluyente B. Las muestras fueron empajilladas en pajillas de 0.5 ml a una concentración de 150 millones, se sellaron con alcohol polivinílico y se expusieron a los vapores de nitrógeno (-130°C a -150°C) durante 20 minutos, transcurrido este tiempo se colocaron las pajillas directamente en el nitrógeno y se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C durante un periodo de mínimo 15 días.

Método de descongelación.

Transcurrido un mínimo de 15 días desde que las pajillas estuvieron almacenadas en nitrógeno líquido, éstas se descongelaron en un baño María a 42°C, las pajillas fueron incubadas durante 12 segundos. Posteriormente el contenido de las pajillas se colocó en diluyente BTS (a 37°C) en un volumen 1:6 y se mantuvieron durante diez minutos a una temperatura de 37°C (Gutiérrez, 2009), a continuación se centrifugó la muestra (3,000 rpm, tres minutos) tres veces, en cada ocasión se reconstituyó en BTS en volumen 1:6, ulteriormente se reconstituyó en un ml de BTS para ser pasados en el gradiente de Ficoll.

Capacitación y reacción acrosomal *in vitro*.

Se utilizó el medio TALP (*Tyrode Albumin Lactate Pyruvate*) modificado (Barrientos, 2008) (ver cuadro 4), en ambos espermatozoides frescos y descongelados. Se prepararon 50 ml, empleando agua desionizada cpb dicha cantidad y se congela hasta su uso en alícuotas de 10ml.

Cuadro 4. Medio TALP modificado para capacitación y reacción acrosomal espontánea, pH 7.4.

Reactivo	Concentración	P.M.	g / 50 ml
NaCl	116.00	58.44	0.339
KCL	3.10	74.55	0.012
NaHCO ₃	15.00	84.02	0.063
MgSO ₄	0.40	120.37	0.002
NaH ₂ PO ₄	0.30	141.96	0.002
Glucosa	5.00	180.02	0.045
Rojó Fenol	20 µg/ml	354.4	0.001
HEPES	20.00	238.81	0.239
CaCl ₂ -H ₂ O	4.50	110.99	0.025
*Lactato de sodio	21.70	90.08	19.5 µl
*Piruvato de sodio	1.00	110.04	0.0011
*Gentamicina	100 µg/ml		100 µl
*BSA	3 mg/ml		0.030

HEPES se adiciona a 20°C, a un pH de 7.6, el CaCl₂-H₂O se incorpora al final. *Estos componentes se añaden un día previo a meter a incubar, se usan en 10 ml. BSA se adiciona a un pH de 7.4.

El CaCl₂-H₂O se adicionó al final, el HEPES se añadió a un pH de 7.6, posterior a la mezcla y homogeneización de estos reactivos, la alícuota de 50 ml se congeló (-18°C) y se almacenó hasta el día de su uso. Antes de su uso se esterizaron por filtración con filtros de 0.22 µm.

* Estos reactivos se adicionaron previo a ingresar el medio a la incubadora, la BSA (albúmina de suero bovino o *bovine serum albumin* en inglés) se añade a un pH de 7.4.

Un día previo al uso del medio de capacitación, se descongeló la alícuota y por cada 10 ml del medio descongelado se añadió la cantidad indicada de lactato de sodio, piruvato de sodio, Gentamicina, BSA y se equilibró el medio a 38°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂ (sin cerrar la tapa por completo) durante toda la noche.

Los espermatozoides fueron pasados por un gradiente de Ficoll 20% y se dividieron en tres grupos. El primero correspondió a espermatozoides no capacitados y los dos restantes fueron utilizados para su incubación *in vitro* y así

obtener los espermatozoides capacitados (grupo dos) y capacitados con reacción acrosomal (grupo tres). Estos dos últimos grupos fueron resuspendidos en medio TALP modificado a una concentración de 25×10^6 células/ ml, en seguida se colocaron las muestras dentro de la incubadora (38°C , 5% de CO_2) durante dos horas para su capacitación, posterior a este tiempo se añadió ionóforo A23187 a una concentración de $1.3 \mu\text{M}$ para la reacción acrosomal y se incubaron dos horas más.

Inmunocitoquímica

De cada subgrupo: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal (tres testigos y tres experimentales) se realizaron frotis, previamente fijados en paraformaldehído al 4% en PBS.

Con pases rápidos a cada muestra se le añadió alcohol etílico en concentraciones descendentes (100%, 96%, 90%, 80% y 70%) y agua bidestilada, posteriormente se añadió solución para permeabilizar (Tritón X-100 al 0.2% en PBS y Tween 20 al 0.1% en PBS) y se mantuvieron en agitación durante 20 minutos, transcurrido ese tiempo se lavaron con pases rápidos con PBS, PBS tween-20 (PBS y Tween-20 al 0.1%) y PBS nuevamente, el proceso se repitió pero con una modificación de tiempo de 10 minutos. Posterior al lavado se incubaron durante 10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% (en agua destilada) y se mantuvieron en agitación, esto se realizó tres veces, entre cada incubación se realizaron lavados con pases rápidos con PBS, PBS tween-20 y PBS, después del último lavado se añadieron 50 μl por laminilla de Background sniper (caseína purificada en PBS modificado) (*BioCare Medical*) y se dejó incubar durante 10 minutos en agitación. Este proceso se repitió tres veces, entre cada adición se realizaron lavados con PBS, PBS tween-20 y PBS, posterior al último lavado se añadió nuevamente 50 μl por laminilla de Background sniper, dejándolo incubar durante 30 minutos en reposo. Posteriormente a cada laminilla se le adicionó el anticuerpo primario correspondiente (50 μl por laminilla de *Actin (H6) mouse monoclonal IgG*, *Santa Cruz Biotechnology* para la detección de la actina y 50 μl por laminilla de *Gelsolin (C-20) goat polyclonal IgG*, *Santa Cruz Biotechnology* para la detección de la gelsolina) y se incubó durante toda la

noche a 4°C en reposo. Las laminillas fueron lavadas con PBS, PBS tween-20, TBS y PBS, se añadió peróxido de hidrógeno al 3% (50 µl) durante 10 minutos en reposo, nuevamente se lavó con PBS, PBS tween-20, TBS y PBS. Posteriormente se incubó durante 30 minutos con Trekkie Universal Link (anticuerpo secundario apropiado biotinilado) (BioCare Medical). Se lavó con PBS, PBS tween-20, TBS y PBS y 20 minutos con Trek Avidin-HRP label (BioCare Medical), ambos en reposo. Después de ser lavadas las muestras con PBS, PBS tween-20, TBS y PBS, se añadieron 50 µl por laminilla de una mezcla (previamente elaborada según lo indica el kit comercial) de una gota de *Betazoid DAB chromogen* y un ml de *Betazoid DAB substrate Buffer* durante diez minutos, se enjuagó cada laminilla con agua y se le añadió a cada una 50 µl de hematoxilina (a una concentración de 0.5%) durante 45 segundos en reposo, posteriormente se enjuagó cada laminilla con agua y se deshidrataron las muestras con pases rápidos de alcohol etílico de menor a mayor concentración (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), después se sumergieron las laminillas en Xilol. Por último se montaron las laminillas con cubreobjetos y con resina; se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 100X y con ayuda de la cámara se contaron cien células y su localización correspondiente. Las regiones de las células que presenten una coloración café, son aquellas donde la marca es positiva para la proteína en cuestión. Los resultados obtenidos representan el promedio numérico y no por porcentaje.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto del factor estado fisiológico de los espermatozoides frescos y congelados-descongelados en las variables respuesta: localización de actina y gelsolina en las diferentes regiones de la cabeza y el flagelo, se aplicó un diseño de un factor completamente aleatorizado como se describe en el

Estado fisiológico de los espermatozoides y de conservación					
Frescos No capacitados	Frescos Capacitados	Frescos capacitados con RA	Descongelados No capacitados	Descongelados Capacitados	Descongelados Capacitados con RA
3 Réplicas	3 Réplicas	3 Réplicas	3 Réplicas	3 Réplicas	3 Réplicas

siguiente arreglo:

Por cada estado fisiológico se contaron cien células, identificando el sitio de localización de la proteína en cuestión. Evaluándose tres laminillas para cada una de las proteínas en estudio por estado fisiológico y de conservación, para dar un total de 36 lecturas, más 12 de las muestras control.

Para la interpretación de los datos obtenidos a través de la lectura de la inmunocitoquímica se utilizó un análisis de varianza (*Analysis of variance*, ANOVA) donde el valor de $\alpha = p < 0.05$. Asimismo se realizó el Test de Levene, el cual se utilizó para comprobar los supuestos.

El modelo estadístico se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : es la variable respuesta, que fue el conteo de espermatozoides;

μ : es la media general;

Φ_j : es el efecto fijo del j-ésimo grupo (j = Frescos No capacitados, Frescos Capacitados, Frescos Capacitados con RA, Descongelados No capacitados, Descongelados Capacitados, Descongelados Capacitados con RA);

ε_{ij} : es el error aleatorio que se distribuye como una $N \sim (0,1)$.

La unidad experimental fue la laminilla.

Para el análisis se utilizó el software estadístico R 3.6.2. (R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (URL <https://www.R-project.org/>.)

Mientras que el análisis del modelo se realizó con la librería ez 4.4-0 (Analysis and Visualization of Factorial Experiments) del software estadístico R 3.6.2.

RESULTADOS

Viabilidad espermática e integridad acrosomal.

La viabilidad espermática se evaluó utilizando la tinción de eosina-nigrosina, mientras que para la integridad acrosomal se empleó la tinción azul de coomassie.

En los cuadros 5 y 6 se presentan los valores obtenidos para la viabilidad y para la presencia o ausencia del acrosoma respectivamente (media $\pm$ D.E) en los espermatozoides frescos y criopreservados en los diferentes estados fisiológicos (no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal).

Cuadro 5. Número promedio ($\pm$ D.E) de espermatozoides vivos y muertos en muestras frescas (F) y descongeladas (D) de verraco en sus tres estados fisiológicos: no capacitados (NC), capacitados (C) y con reacción acrosomal (RA).

	Estado fisiológico					
	FNC	DNC	FC	DC	FRA	DRA
	$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$	
Vivos	79.86 $\pm$ 6.21 ^a	51.38 $\pm$ 5.25 ^b	66.96 $\pm$ 12.37 ^a	52.10 $\pm$ 4.75 ^b	58.46 $\pm$ 5.47 ^a	52.01 $\pm$ 1.47 ^a
Muertos	20.13 $\pm$ 6.21 ^a	48.61 $\pm$ 5.25 ^b	33.03 $\pm$ 12.37 ^a	47.89 $\pm$ 4.75 ^b	41.53 $\pm$ 5.47 ^a	47.98 $\pm$ 1.47 ^a

Se observa el promedio $\pm$ Desviación estandar. Promedios que entre columnas no comparten literal entre el mismo estado fisiológico, son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD. Donde FNC: corresponde a Fresco No Capacitado, DNC: Descongelado No Capacitado, FC: Fresco Capacitado, DC: Descongelado Capacitado, FRA: Fresco Reacción Acrosomal, DRA: Descongelado Reacción Acrosomal.

En lo que corresponde a la viabilidad espermática, se observa como en dos de los tres estados fisiológicos hay una diferencia significativa entre medias ($p < 0.05$), esto en los estados fisiológicos no capacitado y capacitado, entre los espermatozoides frescos y los descongelados. Donde los espermatozoides vivos del mismo estado fisiológico decrecen en cantidad en los descongelados (FNC: 79.86 vs DNC: 51.38; FC: 66.96 vs DC: 52.10), lo que coincide con el aumento proporcional, del número de espermatozoides muertos en las muestras descongeladas, es decir aumenta la cantidad de espermatozoides muertos en el semen criopreservado.

En relación a la integridad acrosomal de los espermatozoides, se presentaron diferencias estadísticas entre medias ($p < 0.05$) entre los dos estados de

conservación en los tres estados fisiológicos. En el cuadro 6 al comparar ambos tipos de muestras (frescas y criopreservadas) se puede observar que los espermatozoides sufren un daño durante la criopreservación, ya que se aprecia un aumento en la cantidad de espermatozoides sin acrosoma en todos los estados fisiológicos de los espermatozoides descongelados.

Cuadro 6. Número promedio ($\pm$ D.E) de espermatozoides con acrosoma y sin acrosoma en muestras frescas (F) y descongeladas (D) de verraco en sus tres estados fisiológicos: no capacitados (NC), capacitados (C) y con reacción acrosomal (RA).

	Estado fisiológico					
	FNC	DNC	FC	DC	FRA	DRA
Acrosoma	$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$	
Con acrosoma	99.67 $\pm$ 0.56 ^a	42.94 $\pm$ 11.57 ^b	92.70 $\pm$ 7.05 ^a	37.83 $\pm$ 16.29 ^b	51.20 $\pm$ 26.58 ^a	23.19 $\pm$ 6.38 ^b
Sin acrosoma	0.32 $\pm$ 0.56 ^a	57.05 $\pm$ 11.57 ^b	7.29 $\pm$ 7.05 ^a	62.16 $\pm$ 16.29 ^b	48.79 $\pm$ 26.58 ^a	76.80 $\pm$ 6.38 ^b

Se observa el promedio $\pm$ Desviación estandar. Promedios que entre columnas no comparten literal entre el mismo estado fisiológico, son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD. Donde FNC: corresponde a Fresco No Capacitado, DNC: Descongelado No Capacitado, FC: Fresco Capacitado, DC: Descongelado Capacitado, FRA: Fresco Reacción Acrosomal, DRA: Descongelado Reacción Acrosomal.

Sitios de localización de la actina y la gelsolina en los espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.

Por medio del método de inmunocitoquímica fue posible observar cinco sitios de localización para la actina y cuatro para la gelsolina. Estos sitios de localización se presentaron en los distintos estados fisiológicos de los espermatozoides (no capacitado, capacitado, capacitado con reacción acrosomal) y en los dos estados de conservación (frescos y descongelados); siendo variable la cuantificación de cada sitio dependiendo del estado fisiológico y de conservación.

En las figuras 8 y 9 se indica con flechas la localización dónde se identificó a la actina y a la gelsolina, respectivamente. Para la actina los cinco patrones encontrados fueron: “flagelo”, “ecuatorial-postacrosomal-flagelo”, “acrosoma-postacrosomal-flagelo”, “acrosomal-flagelo” y “acrosoma liberándose”. Si bien,

los sitios de localización “flagelo” y “acrosomal”, no son parte de la TP, se añadieron dentro de los patrones ya que a la observación de las células se presentaba una modificación de los mismos entre los estados de conservación. El sitio “acrosomal-postacrosomal-flagelo” fue exclusivo de la actina (Figura 8). Para la gelsolina los patrones fueron: “flagelo”, “ecuatorial-postacrosomal-flagelo”, “acrosoma-flagelo” y “acrosoma liberándose-flagelo” (Figura 9).

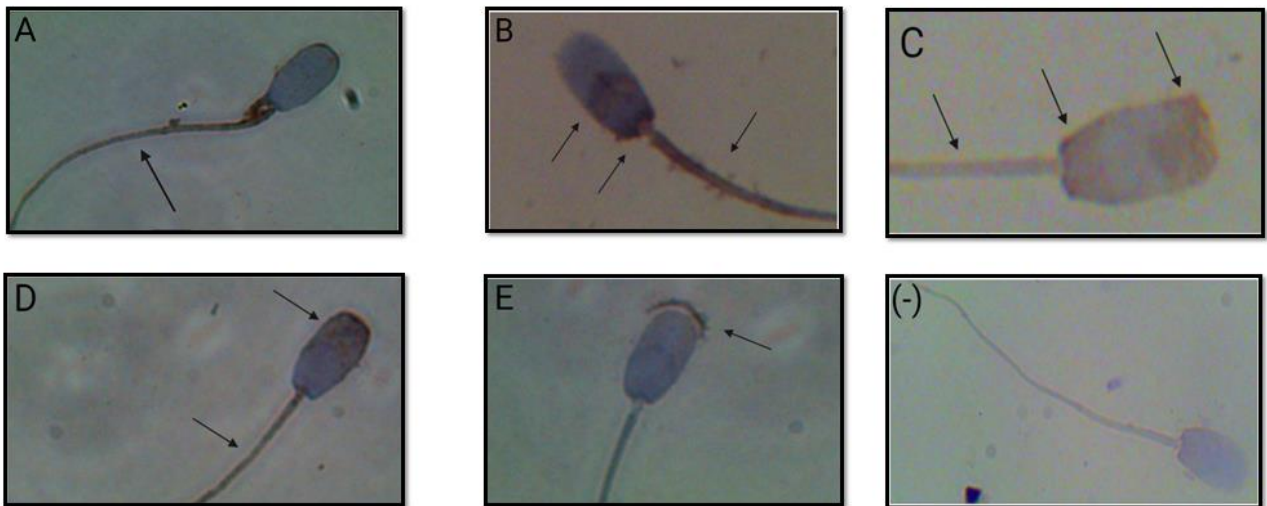


Figura 8. Imágenes de espermatozoides de verraco procesados por la técnica de inmunocitoquímica, mostrando los sitios de localización para actina, empleando un aumento de 1000X para todas las lecturas. Sitios de localización: (A) solo flagelo, (B) ecuatorial-postacrosomal-flagelo, (C) acrosomal-postacrosomal-flagelo, (D) acrosomal-flagelo, (E) acrosoma liberándose, (-) control negativo.

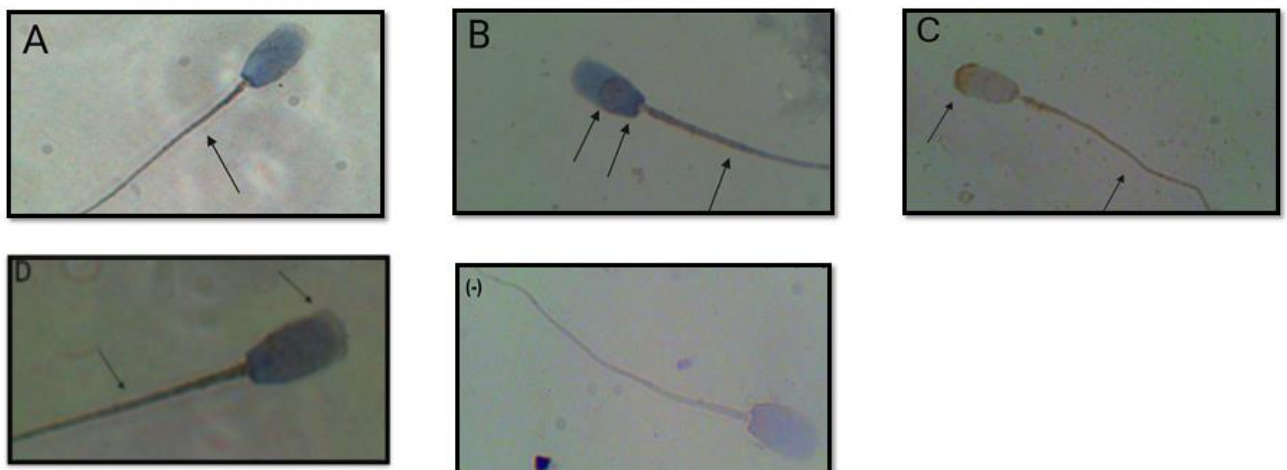


Figura 9. Imágenes de espermatozoides de verraco procesados por la técnica de inmunocitoquímica, mostrando los sitios de localización para gelsolina, empleando un objetivo de 1000X para todas las lecturas. Sitios de localización: (A) solo flagelo, (B) ecuatorial-postacrosomal-flagelo, (C) acrosomal-flagelo, (D) acrosoma liberándose-flagelo, (-) control negativo.

En los cuadros 7 y 8 y las figuras 10 y 12 se presentan los valores obtenidos para actina y gelsolina, respectivamente (media $\pm$ D.E) para cada uno de los sitios de localización en los espermatozoides frescos y criopreservados de verraco en los diferentes estados fisiológicos.

En el caso de actina (cuadro 7 y figura 10) se observó una diferencia significativa entre medias ($p < 0.05$) en el sitio de localización “flagelo”, donde se presentó una disminución en el número de espermatozoides con marca en este sitio en las muestras descongelados no capacitados (DNC) en comparación con los frescos no capacitados (FNC) (14.00 vs 76.00). Contrariamente, en las muestras descongeladas en los tres estados fisiológicos el sitio de localización “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” presentó un aumento en el número de espermatozoides con marca en este sitio, en comparación con los espermatozoides frescos. Para el sitio de localización “acrosomal-flagelo” hubo una media menor en los espermatozoides descongelados en comparación con los frescos, siendo los valores significativos en los DCA y DRA en comparación con FCA y FRA ($p < 0.05$). Para el sitio “acrosoma-liberándose” no se presentó diferencia significativa entre las medias de los distintos estados fisiológicos entre espermatozoides frescos y descongelados.

Cuadro 7. Número promedio ($\pm$ D.E) de los sitios de localización para actina en los espermatozoides frescos (F) y descongelados (D) de verraco en sus tres estados fisiológicos: no capacitados (NC), capacitados (C) y con reacción acrosomal (RA).

Sitio de localización	Estado fisiológico					
	FNC	DNC	FC	DC	FRA	DRA
	$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$		$\bar{X} \pm D.E$	
Flagelo	76.00 $\pm$ 16.46 ^a	14.00 $\pm$ 7.81 ^b	18.00 $\pm$ 9.53 ^a	21.33 $\pm$ 21.22 ^a	15.66 $\pm$ 19.34 ^a	19.33 $\pm$ 9.01 ^a
Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo	14.66 $\pm$ 22.03 ^a	77.66 $\pm$ 4.50 ^b	31.00 $\pm$ 8.71 ^a	64.00 $\pm$ 13.45 ^b	32.33 $\pm$ 7.09 ^a	55.33 $\pm$ 5.68 ^b
Acrosomal-Postacrosomal-Flagelo	2.33 $\pm$ 2.51 ^a	4.66 $\pm$ 1.52 ^a	17.00 $\pm$ 12.28 ^a	7.66 $\pm$ 13.27 ^a	7.00 $\pm$ 7.00 ^a	10.33 $\pm$ 3.51 ^a
Acrosomal-Flagelo	7.00 $\pm$ 3.60 ^a	0.33 $\pm$ 0.57 ^a	32.33 $\pm$ 10.69 ^a	6.00 $\pm$ 1.00 ^b	37.33 $\pm$ 22.74 ^a	8.33 $\pm$ 1.52 ^b
Acrosoma liberándose	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	3.33 $\pm$ 4.16 ^a	1.66 $\pm$ 1.52 ^a	1.00 $\pm$ 1.73 ^a	7.66 $\pm$ 3.21 ^a	6.66 $\pm$ 5.50 ^a

Se observa el Promedio $\pm$ Desviación estándar. Promedios que entre filas no comparten literal, son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \geq$ a FLSD. La comparación se realizó entre los pares que corresponden al mismo estado fisiológico. Donde FNC corresponde a Fresco No Capacitado; DNC corresponde a Descongelado No Capacitado; FC corresponde a Fresco Capacitado, DC corresponde a Descongelado Capacitado; FRA corresponde a Fresco Reacción Acrosomal y DRA corresponde a Descongelado Reacción Acrosomal.

Actina

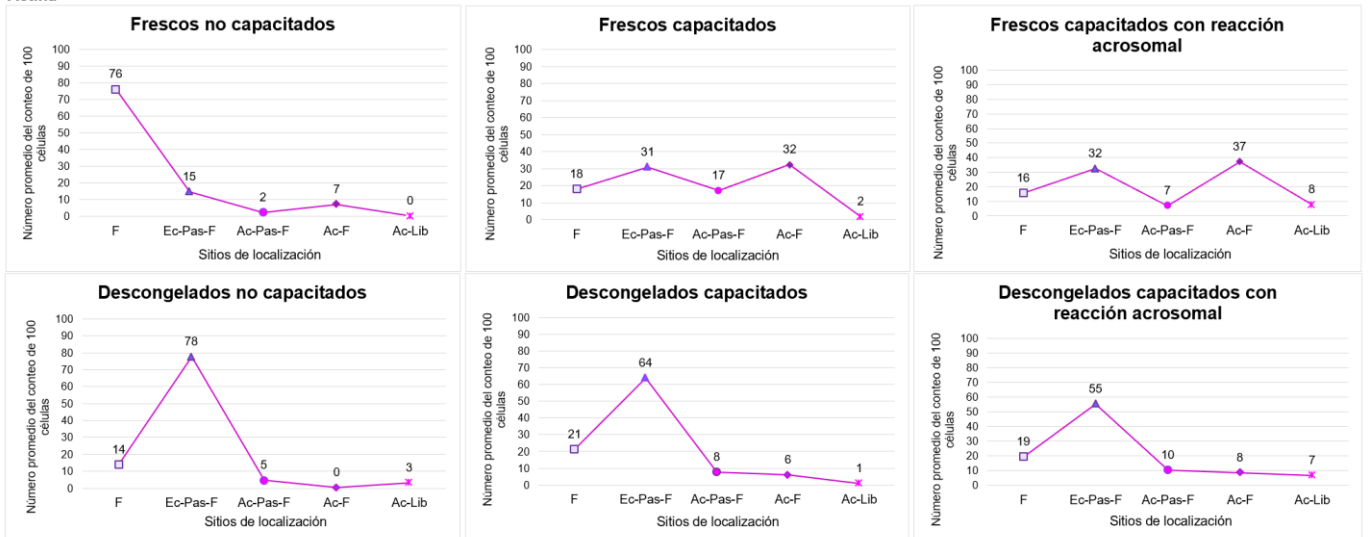


Figura 10: Representación gráfica de los patrones presentados por la actina (sitio de localización de acuerdo al estado fisiológico y estado de conservación de los espermatozoides). Donde: □ F corresponde a Flagelo; ▲ Ec-Pas-F corresponde a Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo; ● Ac-Pas-F corresponde a Acrosomal-Postacrosomal-Flagelo; ◆ Ac-F corresponde a Acrosomal-Flagelo y * Ac-Lib corresponde a Acrosomal liberándose.

Para gelsolina (cuadro 8 y figura 11) aquellos sitios de localización, entre muestras frescas y descongeladas, que presentaron una diferencia significativa en sus medias fueron el “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” y el “acrosomal-flagelo”. Específicamente, la localización “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” fue mayor en los espermatozoides descongelados no capacitados y en los capacitados. En el caso del sitio de localización “acrosomal-flagelo” se observó que los espermatozoides descongelados capacitados, al igual que los de reacción acrosomal fueron los que presentaron un número menor en la marca en comparación con los frescos.

Cuadro 8. Número promedio ($\pm$ D.E) de los sitios de localización para gelsolina en los espermatozoides frescos (F) y descongelados (D) de verraco en sus tres estados fisiológicos: no capacitados (NC), capacitados (C) y con reacción acrosomal (RA).

Sitio de localización	Estado fisiológico					
	FNC	DNC	FC	DC	FRA	DRA
Sitio de localización	$\bar{x} \pm D.E$		$\bar{x} \pm D.E$		$\bar{x} \pm D.E$	
Flagelo	65.66 $\pm$ 21.73 ^a	33.00 $\pm$ 8.88 ^a	16.66 $\pm$ 6.02 ^a	32.00 $\pm$ 29.71 ^a	43.66 $\pm$ 28.91 ^a	37.66 $\pm$ 9.60 ^a
Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo	13.66 $\pm$ 11.93 ^a	47.33 $\pm$ 12.66 ^b	10.00 $\pm$ 13.00 ^a	58.33 $\pm$ 26.31 ^b	35.00 $\pm$ 22.11 ^a	54.00 $\pm$ 7.00 ^a
Acrosomal-Flagelo	18.33 $\pm$ 5.85 ^a	14.66 $\pm$ 7.09 ^a	69.00 $\pm$ 7.21 ^a	7.33 $\pm$ 7.09 ^b	18.66 $\pm$ 4.72 ^a	5.00 $\pm$ 1.73 ^b
Acrosoma liberándose-flagelo	2.33 $\pm$ 4.04 ^a	5.00 $\pm$ 4.58 ^a	4.33 $\pm$ 2.30 ^a	2.33 $\pm$ 2.51 ^a	2.66 $\pm$ 3.05 ^a	3.33 $\pm$ 3.51 ^a

Se observa el Promedio $\pm$ Desviación estandar. Promedios que entre filas no comparten literal son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD. La comparación se realizó entre los pares que corresponden al mismo estado fisiológico. Donde FNC: corresponde a Fresco No Capacitado, DNC: Descongelado No Capacitado, FC: Fresco Capacitado, DC: Descongelado Capacitado, FRA: Fresco Reacción Acrosomal, DRA: Descongelado Reacción Acrosomal.

Gelsolina

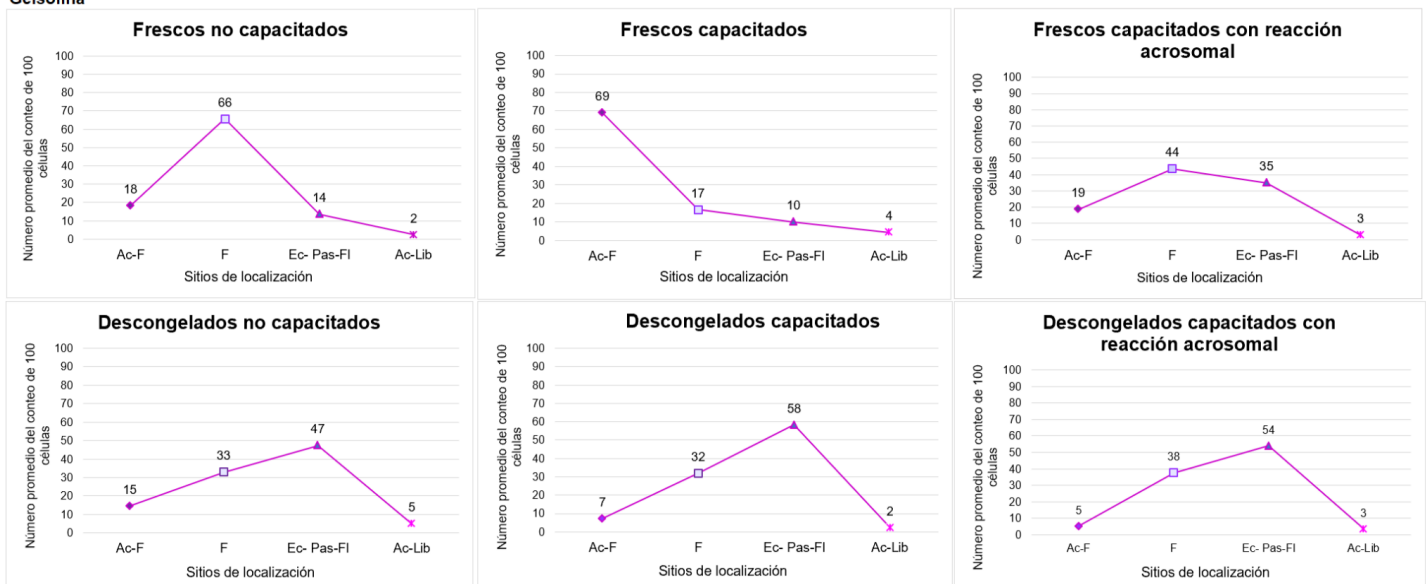


Figura 11: Representación gráfica de los patrones presentados por la gelsolina (sitio de localización de acuerdo al estado fisiológico y estado de conservación de los espermatozoides). Donde: ♦ Ac-F corresponde a Acrosomal-Flagelo; □ F corresponde a Flagelo; ▲ Ec-Pas-F corresponde a Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo y * Ac-Lib corresponde a Acrosoma liberándose.

En los cuadros 9 y 10 se muestran los valores de *P value* de acuerdo al sitio de localización para actina y gelsolina, respectivamente, entre espermatozoides frescos y descongelados; empleando para ello el análisis de varianza para un solo factor. Aquellas variables donde el *p value* presentó un valor menor o igual a $\alpha=0.05$, son consideradas estadísticamente significativos, por lo que se rechazó la hipótesis nula ($H_0: \bar{x}_{\text{frescos}} = \bar{x}_{\text{descongelados}}$).

En el caso de actina se observó que los sitios de localización que tuvieron valores estadísticamente significativos entre muestras fueron “flagelo”, “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” y “acrosomal-flagelo” (cuadro 9), y para la gelsolina los sitios de localización con valores significativos fueron “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” y “acrosomal-flagelo” (cuadro 10).

Cuadro 9. Valores de *p value* de acuerdo al sitio de localización para la proteína actina en

Actina	
Sitio de localización	<i>P value</i>
Flagelo	≤ 0.05
Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo	≤ 0.05
Acrosomal-Postacrosomal-Flagelo	0.37
Acrosomal-Flagelo	≤ 0.05
Acrosoma liberándose	0.07

P-value ≤ 0.05 , existe evidencia estadística para concluir que al menos un tratamiento es diferente.

Cuadro 10. Valores de *p value* de acuerdo al sitio de localización para la proteína gelsolina en

Gelsolina	
Sitio de localización	<i>P value</i>
Flagelo	0.16
Ecuatorial-Postacrosomal-Flagelo	≤ 0.05
Acrosomal-Flagelo	≤ 0.05
Acrosoma liberándose-Flagelo	0.89

P-value ≤ 0.05 , existe evidencia estadística para concluir que al menos un tratamiento es diferente.

En cuanto a la relación de la localización de actina con la de gelsolina, en los espermatozoides frescos se observó que en las células no capacitadas en ambas proteínas se encontraron presentes principalmente en el “flagelo” (76.00 ± 16.46 vs 65.66 ± 21.73 , respectivamente; ver cuadros 7 y 8). En el caso de los espermatozoides frescos capacitados, aunque la marca para ambas proteínas fue mayormente “acrosomal-flagelo”, esta fue muy superior para la gelsolina (32.33 ± 10.69 vs 69.00 ± 7.21 , respectivamente), sin embargo en este mismo tipo de células el sitio de localización “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” la marca para actina fue mayor que la de gelsolina (31.00 ± 5.71 vs 10.00 ± 13.00 , respectivamente). En los espermatozoides frescos con RA en el sitio de localización “acrosomal-flagelo” la marca para actina fue superior a la de gelsolina (37.33 ± 22.74 vs 18.66 ± 4.72 , respectivamente) mientras que para la localización “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” fue muy semejante entre ambas proteínas (32.33 ± 7.09 vs 35.00 ± 22.11). En los espermatozoides criopreservados el sitio “ecuatorial-postacrosomal-flagelo” presentó el mayor número de espermatozoides con marca en los tres estados fisiológicos, sin embargo de manera notoria el número de espermatozoides no capacitados presentaron mayor marca para actina que para gelsolina (77.66 ± 13.27 vs 47.33 ± 12.00 ,

respectivamente), disminuyendo dicha marca en los espermatozoides capacitados (64.00 ± 13.45 vs 58.33 ± 26.31 , respectivamente) y en los espermatozoides con RA (55.33 ± 5.68 vs 54.00 ± 7.00 ; respectivamente).

En las figuras 12 y 13 se muestra la representación gráfica donde se comparan los patrones de localización para actina y gelsolina respectivamente, entre los diferentes estados de conservación y estados fisiológicos.

En el caso de actina, se observa que en los espermatozoides frescos se presentan cambios en los sitios de localización conforme las células pasan por los diversos estados fisiológicos (figura 12). Sin embargo, en las gráficas de los espermatozoides descongelados se puede observar como el grupo de no capacitados tiene una similitud, para los dos primeros sitios de localización (flagelo y ecuatorial-postacrosomal-flagelo), con los estados fisiológicos capacitado y reacción acrosomal de la muestra fresca. Por otra parte, aunque se puede apreciar que existen ligeros cambios en algunos valores de ciertos sitios de localización, el patrón o la forma de la gráfica de los espermatozoides descongelados se mantiene en los tres estados fisiológicos (DNC, DC, DRA) (figura 13).

Para la gelsolina en los espermatozoides frescos también se presentan cambios en los sitios de localización según su estado fisiológico. Pero, al igual que en el caso de actina, en las muestras descongeladas el patrón correspondiente al grupo de espermatozoides descongelados no capacitados se asemeja al grupo de espermatozoides frescos con reacción acrosomal; además en los tres estados fisiológicos de los espermatozoides descongelados la imagen gráfica que se presenta se mantiene constante.

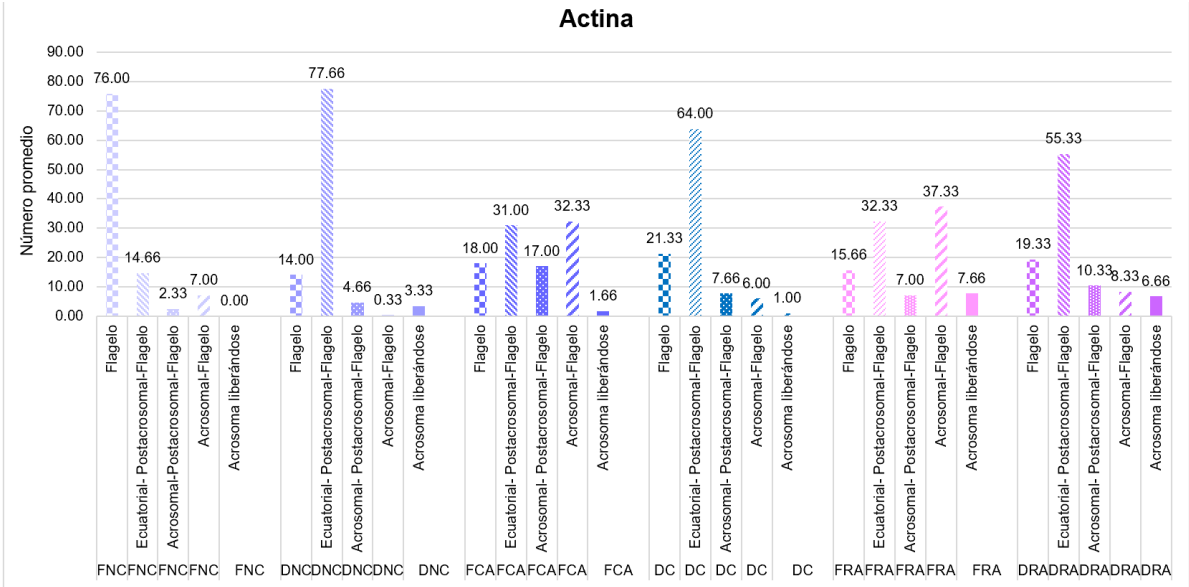


Figura 12. Gráfico de barras de los patrones presentados por la actina (sitio de localización de acuerdo al estado fisiológico y estado de conservación de los espermatozoides).

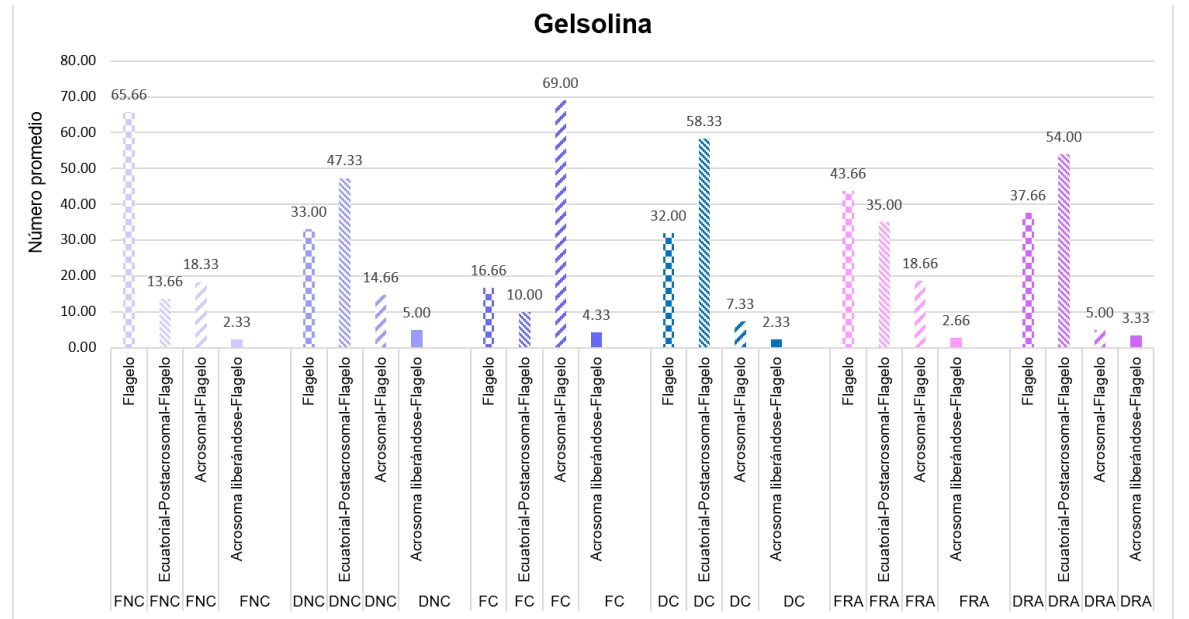


Figura 13. Gráfico de barras de los patrones presentados por la gelsolina (sitio de localización de acuerdo al estado fisiológico y estado de conservación de los espermatozoides).

DISCUSIÓN

Yeste (2016) refiere que la criopreservación del espermatozoide de verraco modifica la estabilización de la actina-F lo que genera alteraciones en la TP. Asimismo Gutiérrez-Pérez *et al.*, mencionan que la disminución en la viabilidad del semen criopreservado puede estar en parte atribuido al deterioro del citoesqueleto de la cabeza espermática (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011). Apoyados en estos antecedentes, en este estudio se buscó dilucidar una relación entre la desestabilización de la actina de la teca perinuclear y el cambio de localización de gelsolina, proteínas que regulan su dinámica, en los espermatozoides criopreservados.

Localización de la actina

En este estudio encontramos que la mayor cantidad de espermatozoides frescos no capacitados presentaron marca para actina en el flagelo, coincidente con la localización reportada para esta proteína en el espermatozoide de verraco, donde ha sido identificada en la pieza principal del flagelo (Talbot y Kleve, 1978; Clarke G. y Wilson S., 1982), al igual que en el flagelo de espermatozoides de humano (Finkelstein *et al.*, 2013). Esta proteína se ha detectado en espermatozoides de diversos mamíferos, sin embargo, su distribución es variable (Colás *et al.*, 2009). En espermatozoides frescos, se ha reportado a la actina en regiones como la acrosomal, ecuatorial y postacrosomal de la cabeza, así como en el flagelo (Finkelstein *et al.*, 2013). Colás *et al.*, mencionan que esta variación puede ser por la especificidad de especies o como consecuencia de las condiciones experimentales, principalmente por los anticuerpos anti actina que se emplean (Colás *et al.*, 2009). Siendo otro factor de esta variación, el atribuido al proceso que se empleó para fijar la muestra (De las Heras *et al.*, 1997).

Se ha señalado que la actina exhibe diversos cambios en su conformación a través de los diferentes estados fisiológicos que experimenta el espermatozoide, los que inician desde el momento que es eyaculado, hasta llegar al sitio de fertilización donde se encontrará con el ovocito. Saxena *et al.*, 1986), empleando la capacitación *in vitro* de espermatozoides de cerdo, pudieron apreciar una gran

cantidad de marca para actina en el flagelo y región postacrosomal mediante la técnica de inmunofluorescencia (Saxena *et al.*, 1986). En este trabajo, empleando la técnica de inmunocitoquímica, el sitio de localización para los espermatozoides frescos capacitados coincide con lo reportado por los autores antes mencionados para el sitio de localización ecuatorial-postacrosomal-flagelo, pero también para acrosomal-flagelo. Además, nuestros resultados mostraron un decremento del sitio de localización flagelo en los espermatozoides frescos capacitados (FNC: 76.00 vs FC: 18.00) coincidente con el aumento de las marcas antes mencionadas (FNC: 14.00 vs FC: 31.00), lo cual puede ser atribuido a una translocación de la proteína (Breitbart *et al.*, 2017). Se considera que esta remodelación dinámica de la actina durante la capacitación espermática, que conlleva a su incremento en la cabeza, tiene como función generar una barrera entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, impidiendo que se presente una exocitosis acrosomal espontánea (Breitbart *et al.*, 2017). Asimismo durante esta etapa fisiológica autores como Breitbart y Finkelstein (Breitbart *et al.*, 2017), mencionan que la actina se encuentra en su forma filamentosa; e igualmente la que permanece en el flagelo para que se presente la motilidad hiperactivada. Otros autores hacen referencia a que la actina polimerizada se encuentra ausente en los espermatozoides recién eyaculados, pero que posteriormente es identificada en los espermatozoides capacitados (Saxena *et al.*, 1986; Breitbart *et al.*, 2015).

Autores como Castellani-Ceresa (Castellani-Ceresa *et al.*, 1992) mostraron la presencia de actina filamentosa en localización ecuatorial-postacrosomal-flagelo en los espermatozoides con reacción acrosomal, lo cual coinciden en cuanto al sitio de localización de la proteína observada en este trabajo. Se ha señalado que previo a que se presente la reacción acrosomal, para que se fusionen la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática, la actina-F debe de sufrir una despolimerización y así pueda presentarse la reacción acrosomal (Ickowicz *et al.*, 2012; Breitbart *et al.*, 2015).

Por otra parte, experimentos relacionados a la congelación del semen han demostrado que algunas proteínas llegan a sufrir una redistribución como respuesta a la criopreservación (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2011). En la presente

investigación, la localización de la actina ecuatorial-postacrosomal-flagelo se vio aumentada marcadamente en los espermatozoides descongelados no capacitados, mientras que el sitio de localización flagelo disminuyó drásticamente. Diversas investigaciones mencionan que aquellos espermatozoides que son sometidos al proceso de congelación/descongelación presentan cambios similares a los que sufren los espermatozoides durante la capacitación (Naresh, 2016), evento que se conoce con el nombre de “criocapitación”. Autores como Flores y Fernández (2010), al evaluar la marca de actina en los espermatozoides criopreservados no capacitados de verraco la localizan en la región postacrosomal (Flores *et al.*, 2010), lo que coincide con lo observado en este estudio; los investigadores proponen que esta reorganización inducida de la actina, en respuesta a la criopreservación, puede ser una de las causas de los cambios similares a la capacitación.

Por otra parte Holt y colaboradores (Holt *et al.*, 1991) mencionan que la actina en la región postacrosomal se puede encontrar enmascarada, por lo que el acceso que tienen los anticuerpos a la proteína se puede dar posterior a un daño de la célula (Holt *et al.*, 1991). Bajo esta propuesta, eso coincidiría con nuestros datos para el sitio de localización ecuatorial-postacrosomal-flagelo, donde se observó un aumento en la media en los espermatozoides descongelados. Específicamente como se ha mencionado (Holt *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2000), el congelar y descongelar a los espermatozoides ocasiona daño en la teca perinuclear, lo que posiblemente podría permitir que la actina se encuentre más accesible y así sea más fácil de detectar a través de la inmunocitoquímica en este tipo de células (Holt *et al.*, 1991).

Localización de la gelsolina

Cabello-Agüeros *et al.*, a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, encontraron que en los espermatozoides frescos no capacitados de cobayo, la gelsolina se observa en la región postacrosomal y a lo largo de todo el flagelo, principalmente en la pieza media (Cabello-Agüeros *et al.*, 2003); en nuestro estudio el número de células que presentaron esta localización fue bajo. Sin embargo Finkelstein *et al.* (2010) han reportado que previo a la capacitación esta proteína se localiza únicamente en el flagelo, lo cual coincide con el presente

trabajo ya que el sitio de localización únicamente flagelo fue el que más predominó en espermatozoides frescos no capacitados.

Se reporta que durante la capacitación la gelsolina presenta una translocación desde el flagelo hacia la cabeza (Finkelstein *et al.*, 2010), lo que posiblemente explica el aumento observado en este estudio de la proteína para la región acrosomal-flagelo en los espermatozoides frescos capacitados; además los autores mencionan que en esta etapa la gelsolina se encuentra inactiva y con ello permitir que la actina pueda polimerizarse (Breitbart *et al.*, 2017).

Finkelstein *et al.* (2010) menciona que la gelsolina se requiere en la cabeza del espermatozoide para despolimerizar a la actina-F y con ello permitir que se presente la reacción acrosomal; mostrando que antes de la capacitación la gelsolina se colocaliza en la cabeza del espermatozoide con la fracción de actina-G y que casi no hay actina-F (ya que la mayor parte se localiza en la pieza media de la cola), mientras que después de la capacitación aumenta la gelsolina en la cabeza y se colocaliza con la fracción de actina-F donde favorece su despolimerización (Breitbart y Finkelstein, 2015). Los datos de nuestra investigación están de acuerdo con estos estudios previos; en los espermatozoides frescos de verraco, antes de la capacitación la gelsolina se localizó principalmente en el flagelo y en menor proporción en la región acrosomal, segmento ecuatorial y región postacrosomal, mientras que después de la capacitación incrementó significativamente en la región acrosomal de la cabeza y disminuyó en el flagelo. Así, en su forma activa el que la gelsolina ocupe sitios estratégicos, como el observado en este estudio (acrosomal-flagelo) permitiría fragmentar el citoesqueleto de actina entre las membranas plasmática y acrosomal externa para permitir con ello la RA. El que la gelsolina sea excluida del flagelo durante la capacitación, previene la despolimerización de la actina-F, para que así pueda presentarse el movimiento hiperactivado del espermatozoide (Breitbart *et al.*, 2015).

Sin embargo, en espermatozoides congelados-descongelados de verraco no se evidenció dicha translocación de la gelsolina hacia la región acrosomal, al contrario, en espermatozoides criopreservados observamos que el principal sitio de localización de gelsolina fue segmento ecuatorial la región postacrosomal y

el flagelo. Cabello-Agüeros *et al.* (2003) en espermatozoides frescos capacitados de cobayo observaron gelsolina en la región postacrosomal, flagelo y parte apical del acrosoma (Cabello-Agüeros *et al.*, 2003); coincidiendo los dos últimos sitios con la localización acrosomal-flagelo observada en el presente estudio para los espermatozoides capacitados, sin embargo, en nuestro caso una mayor marca para la localización ecuatorial-postacrosomal-flagelo se presentó en los espermatozoides descongelados. En la literatura también reportan un aumento en el sitio de localización ecuatorial postacrosomal flagelo para gelsolina en espermatozoides de bovino criopreservados (Sánchez *et.al.*, 2021).

Por consiguiente, con base a estos resultados, consideramos que la translocación de la gelsolina en los espermatozoides descongelados fue ineficiente. Es probable que estos espermatozoides hayan experimentado una criocapacitación prematura durante la congelación acompañado de las alteraciones en el citoesqueleto de actina de la TP, lo que conduciría a este cambio prematuro de la localización de gelsolina únicamente hacia regiones posteriores del espermatozoide. El bajo porcentaje de gelsolina en la región acrosomal también podría indicar una disminución de la integridad acrosomal de los espermatozoides ya que esta proteína podría haberse liberado durante una reacción acrosomal espontánea.

La criocapacitación es uno de los factores asociados a longevidad reducida y poca supervivencia en espermatozoides criopreservados, lo que resulta en fertilidad reducida en células que fueron congeladas-descongeladas (Talukdar *et al.*, 2016). En este estudio mostramos la afectación de dos proteínas de la teca perinuclear por este proceso (actina y gelsolina), por lo que estos cambios en los sitios de localización de estas proteínas pueden ser parte de los motivos por los cuales los espermatozoides de cerdo no presentan una calidad adecuada para ser empleados como semen descongelado para inseminar.

CONCLUSIONES

Demostramos que hay un claro efecto del estado fisiológico del espermatozoide para el cambio de localización de actina y de la gelsolina.

El sitio de localización “acrosomal-postacrosomal-flagelo” se presentó únicamente en el caso de la actina, mientras que compartió con la gelsolina cuatro patrones (“flagelo”, “ecuatorial-postacrosomal-flagelo”, “acrosoma-flagelo” y “acrosoma liberándose-flagelo”).

En espermatozoides frescos de verraco confirmamos que la actina y gelsolina antes de la capacitación se localiza principalmente en el flagelo y que ambas aumentan en la cabeza del espermatozoide después de la capacitación. En contraste, la detección de ambas proteínas en los espermatozoides congelados-descongelados es principalmente en la región acrosomal, lo que estaría relacionado con los efectos de la crioconservación que involucran la pérdida de la integridad acrosomal y las alteraciones de la teca perinuclear.

El cambio de localización de la actina de la teca perinuclear del espermatozoide criopreservado de verraco está relacionada con el cambio de localización de la gelsolina en los espermatozoides criopreservados.

PERSPECTIVAS

Valorar la interacción entre actina y gelsolina, así como el tipo de actina presente (F o G) en los espermatozoides descongelados, en los diferentes estados fisiológicos.

Evaluar en la inmunocitoquímica la intensidad de marca de las proteínas (actina y gelsolina) en los diferentes estados fisiológicos.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson A., Lewis J. (2010) Citoesqueleto. En: Biología molecular de la célula. España 5ª Ed.: Ediciones Omega, pp. 965- 1053.
2. Arancibia K.S. (2007) *Valoración de la integridad de la teca perinuclear de los espermatozoides criopreservados de cerdo*. Tesis doctoral. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Avilés, L. (2011) *Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina*. Tesis doctoral. Murcia: Universidad de Murcia.
4. Barrientos, M. (2008) *Alteración de la capacidad fusogénica del espermatozoide criopreservado de cerdo por daños en la teca perinuclear*. Tesis doctoral. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
5. Barrientos, M., Juárez M.L., Montiel F., Trujillo M., (2009) Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zootecnia Tropical*, 27(1), pp. 17–24.
6. Bonet S., Casas I., Holt W., Yeste M. (2013) The Boar Spermatozoon. En: *Boar reproduction*. Ed. por Dolors M., Fábrega A. London: Springer, pp. 3-48.
7. Breitbart, H. (2002) Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187, pp. 139–144.
8. Breitbart H., Finkelstein M. (2015) Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP2 and Actin Modulation. *Asian Journal of Andrology*, 17, pp. 597–600.
9. Breitbart, H., Finkelstein, M. (2017) Actin cytoskeleton and sperm function, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506 (2), pp. 372–377.

10. Cabello-Agüeros J., Hernández-González E., Mújica A. (2003) The Role of F-Actin Cytoskeleton-Associated Gelsolin in the Guinea Pig Capacitation and Acrosome Reaction, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 108 (56), pp. 94-108.
11. Castellani-Ceresa L., Brivio M., Radaelli G. (1992) F-Actin in Acrosome-Reacted Boar Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 33, pp. 99–107.
12. Colás C., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J. (2009) Changes in actin distribution of Ram spermatozoa under different experimental conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2), pp.221-227.
13. Dalghi, M., Ferreira-Gomes, M., Rossi, J. P. (2005) Regulación de la calcio atpasa de membrana plasmática por el citoesqueleto de actina, *Revista Farmacéutica*, 159 (2:3), pp. 3–15.
14. De las Heras M.A., Valcarcel A., Perez L., Moses, D. (1997) Actin localization in ram spermatozoa: Effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. *Tissue & Cell*, 29(1), pp.47–53.
15. Feldt, J., Schicht, M., Garreis, F., Welss, J., Schneider, U., Paulsen, F. (2019) Structure, regulation and related diseases of the actin-binding protein gelsolin, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 20, pp. 1–10.
16. Finkelstein, M., Etkovitz, N., Breitbart, H. (2010) Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization, *Journal of Biological Chemistry*, 285 (51), pp.39702–39709.
17. Finkelstein M., Megnagi B., Ickowicz D., Breitbart H. (2013) Regulation of sperm motility by PIP2(4,5) and actin polymerization. *Developmental Biology*, 381(1), pp.62–72.
18. Flores E., Fernández-Novell J., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J. (2010) Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial

function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network, *Theriogenology*, 74(3), pp.354–63.

19. Galina C., Valencia J., (2008) Cerdos. En: Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. por Becerril J., Trujillo M. México: Limusa, pp. 435-457.
20. Guimarães, D., Barros, T., Van Tilburg, M., Martins, J., Moura, A., Moreno, F., Monteiro-Moreira A., Moreira A., Tonioli (2017) Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 183 (Junio), pp.27-38.
21. Guillen, A., (2018) Estudio de las proteínas haptoglobina y lactadherina en el oviducto porcino y su participación en los eventos reproductivos. Tesis doctoral. España: Universidad de Murcia.
22. Guirado, O., Solanas, M., Costa, I., Escrich E. (2002) El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(2), pp. 115-122.
23. Gutiérrez-Pérez, O. (2009) Valoración in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol. Tesis doctoral. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
24. Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda M.L., Mota D., Trujillo M. (2011). The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology*, 62(1), pp.32–39.
25. Holt, W., North, R. (1991) Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa, *Journals of Reproduction & Fertility Ltd*, 91, pp. 451–461.
26. Holt, W., (2000) Basic aspects of frozen storage of semen, *Animal Reproduction Science*, 62, pp.3-22.

27. Holt W., Medrano, A., Thurston, L., Watson, P. (2005) The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation : insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63, pp.370–382.
28. Ickowicz, D., Finkelstein, M. and Breitbart, H. (2012) Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases, *Asian Journal of Andrology*, 14(6), pp.816–821.
29. Iglesias A., Juárez M.L., Segura M.J., Guevara J., Gutiérrez O., García A., De Loera Y. (2021) *Manual de obtención, evaluación y almacenamiento de semen de verraco*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
30. Jin, S., Yang, W. (2017) Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?, 8(2), pp.3600–3627.
31. Johnson L., Weitze K., Fiser P., Maxwell W. (2000) Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), pp.143–172.
32. Knox, R. V. (2016) Artificial insemination in pigs today, *Theriogenology*, 85 (1), pp. 83–93.
33. Naresh S. (2016) Cryobiology Effect of cooling (4°C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. *Cryobiology*, 72(1), pp.7–13.
34. Oko, R., Sutovsky, P. (2009) Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization, *Journal of Reproductive Immunology*, 83, pp. 2–7.
35. Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., Giraldo C., (2006) El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 19(4), pp. 426-436.
36. Pegg, D. (2007) Principles of Cryopreservation, *Methods in Molecular Biology*, 368, pp. 39–57.
37. Pollard, T. (2016) Actin and actin-binding proteins, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), pp.1–18.

38. Protopapas, N., Hamilton L., Warkentin R., Xu W., Sutovsky P., Oko R. (2019) The perforatorium and postacrosomal sheath of rat spermatozoa share common developmental origins and protein constituents, *Biology of Reproduction*, 100 (April), pp.1461–1472.
39. Roca, J., Vázquez JM., Gil, MA., Cuello, C., Parrilla, I., Martínez, EA. (2006) Challenges in pig artificial insemination, *Reproduction in Domestic Animals*, 41(Suppl. 2), pp.43-53.
40. Rodríguez-Martínez, H. (2005) Evaluación de la calidad seminal en el verraco, *Avances de la tecnología porcina*, 7, pp.43-53.
41. Sánchez L. (2021) Efecto de la desestabilización de la actina del espermatozoide criopreservado de bovino sobre la estabilidad de la PLC- ζ y de gelsolina. Tesis. México: Universidad Nacional de México, México.
42. Saxena, N., Peterson, R., Saxena N.K. (1986) Microfilaments appear in boar spermatozoa during capacitation in vitro, *The Journal of Experimental Zoology*, 239 (3), pp.423–427.
43. Sutovsky, P. Manandhar, G., Wu, A., Oko, R., (2003) Interactions of Sperm Perinuclear Theca With the Oocyte: Implications for Oocyte Activation, Anti-Polyspermy Defense, and Assisted Reproduction, *Microscopy Research and Technique*, 61, pp.362–378.
44. Szatmári, D. Szatmári, D., Xue, B., Kannan, B., Burtnick, L., Bugyi, B., Nyitrai, M., Robinson, R. (2018) ATP competes with PIP2 for binding to gelsolin, *PLOS ONE*, 13(8), pp.1–17.
45. Talukdar, D., Ahmed, K., Deka, B., Sinha, S., Deori, S., Das, G. (2016) Cryo-capacitation changes during cryopreservation of swamp buffalo spermatozoa. *Indian Journal of Animal Sciences*, 86 (4), pp. 397-400.
46. Vadnais, M., Galantino-Homer H., Althouse, G. (2007) Current Concepts of Molecular Events During Bovine and Porcine Spermatozoa Capacitation, *Archives of Andrology: Journal of Reproduction Systems*, 53, pp.109–123.

47. Valencia, J., Henao, J. (2013) Biological Signals of Sperm Membrane Resistance to Cryoinjury in Boars', *Intech*, 32 (July), pp.137–144.
48. Watson, P. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Animal Reproduction Science*, 60–61, pp.481–492.
49. Yeste M. (2016) Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), pp. 47–64.
50. Yeste, M., Rodríguez-Gil, J. E. and Bonet, S. (2017) Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm, *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), pp.802–813.