



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE TREHALOSA EN ESPERMATOZOIDES
PORCINOS CRIOPRESERVADOS CON LIPOSOMAS Y SU EFECTO EN
CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONALES AL DESCONGELADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA DENISSE MENDOZA VIVEROS

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA, FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD, FQ-UNAM

DR. LUIS MEDINA TORRES, FQ-UNAM

PROFESOR INVITADO:

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ, FMVZ-UNAM



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 mi familia: Héctor, doris, liliانا, cindy y valeria.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM, con sede en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Beca 593892).

A los doctores: María Elena Trujillo Ortega, María Josefa Bernad Bernad, Luis Medina Torres y Oscar Gutiérrez Pérez, por su asesoría, consejos y paciencia.

A la Dra. Minerva Monroy Barreto, Q.F.B. Carolina Flores Ávila y Q.A. Miguel Ángel Valadez García, por su tiempo y asesoría técnica.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

LIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC), 12-15 de julio de 2022, Monterrey, Nuevo León, México, *“Respuesta mecánica al flujo del semen porcino criopreservado en presencia de liposomas cargados con trehalosa”*.

LVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 2022 (INIFAP), 9-12 de noviembre de 2022, Villahermosa, Tabasco, México, *“Comportamiento reológico del semen porcino criopreservado en presencia de liposomas cargados con trehalosa”*.

PUBLICACIONES

Claudia Denisse Mendoza-Viveros, Oscar Gutiérrez-Pérez, María Josefa Bernad-Bernad, Luis Medina-Torres, Minerva Monroy-Barreto, Miquel Gimeno y María Elena Trujillo-Ortega. “Boar semen cryopreserved with trehalose-containing liposomes: disaccharide determination and rheological behaviour”. *Zygote* (2022) 1-8.

RESUMEN

La trehalosa es un crioprotector celular no permeable eficaz en la criopreservación de espermatozoides de cerdo, no obstante, su máxima protección se obtiene al estar presente en ambos lados de la bicapa lipídica. El objetivo del presente trabajo fue la detección de trehalosa intracelular en espermatozoides porcinos criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa, evaluando su efecto en algunas características morfofuncionales y reológicas del semen al ser descongelado. La criopreservación del semen porcino se realizó empleando dos medios de congelación: un control con 300 mM de trehalosa y un medio experimental suplementado con 300 mM de trehalosa y 10% de liposomas cargados con trehalosa. Ambos grupos al ser descongelados se les determinó la integridad espermática, motilidad progresiva, respuesta reológica y cuantificación de trehalosa en lisados celulares mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de dispersión de luz evaporativa (HPLC-ELSD). Los resultados son: la viabilidad espermática y motilidad progresiva no fueron diferentes estadísticamente al comparar ambos grupos ($P > 0.05$). La respuesta viscoelástica de las muestras estuvo determinada por el medio extracelular, no por el proceso de congelación-descongelación, el cual si ocasiono perdida de las interacciones entre células y crioprotectores reflejándose en la respuesta reológica. Finalmente, en la detección de trehalosa intracelular por HPLC-ELSD no se observó diferencia significativa entre los métodos empleados de lisis espermática ($P > 0.05$). El uso de liposomas cargados con trehalosa es una opción prometedora en la criopreservación de semen porcino considerando el efecto notable sobre sus propiedades viscoelásticas. El método propuesto de HPLC-ELSD es efectivo para la cuantificación de trehalosa en muestras de células criopreservadas.

Palabras clave: semen porcino criopreservado, liposomas, reología, trehalosa, comportamiento viscoelástico.

ABSTRACT

Trehalose is a nonpermeable cellular cryoprotectant effective for the cryopreservation of boar sperm. However, its maximum protection is obtained by being present on both sides of the lipid bilayer. The aim of this study was the detection of intracellular trehalose in boar sperm that were cryopreserved with liposomes and conducts an analysis of its effects on some characteristics of thawed sperm, which include rheological properties. Boar semen samples were frozen in two freezing media: a control medium with 300 mM trehalose and an experimental medium supplemented with 300 mM trehalose and 10% trehalose-containing liposomes, both of which were thawed and then analyzed to ascertain their integrity, progressive motility, rheological response, and trehalose quantities in cell lysates via high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). Assessment of cryopreserved ejaculates showed that their viability and motility did not significantly differ between groups ($P>0.05$). The viscoelastic response of the samples was influenced by the extracellular medium, rather than by the freezing-thawing process, which resulted in a loss of interaction between the cells and cryoprotectants. Finally, intracellular trehalose levels were determined using HPLC-ELSD, with no differences observed ($P>0.05$) that were due to the lysis process. The use of liposomes with trehalose would appear to be a promising option for boar-semen cryopreservation, with a remarkable effect on their viscoelastic properties. The proposed HPLC-ELSD method is effective for measuring trehalose in cryopreserved cell samples.

Keywords: *frozen-thawed boar semen, liposomes, rheology, trehalose, viscoelastic behavior.*

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS.....	IV
PUBLICACIONES	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN PORCINO EN LA ACTUALIDAD.....	4
1.2 TREHALOSA EN LA CRIOPRESERVACIÓN CELULAR	6
1.2.1 <i>Cuantificación de trehalosa</i>	7
1.3 LIPOSOMAS	8
1.3.1 <i>Clasificación de liposomas</i>	9
1.3.2 <i>Métodos para la preparación de liposomas</i>	10
• Método de calentamiento:	12
1.3.3 <i>Los liposomas en las ciencias veterinarias</i>	12
1.3.4 <i>Liposomas cargados con trehalosa</i>	14
1.4 LA VISCOELASTICIDAD EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS (CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA)	15
1.4.1 <i>Reología del semen</i>	17
2 JUSTIFICACIÓN	19
3 HIPÓTESIS.....	19
4 OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
5 MATERIAL Y MÉTODOS	20

5.1	MATERIALES.....	20
5.2	ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS.....	21
5.3	CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA	21
5.4	EVALUACIÓN CELULAR AL DESCONGELADO.....	23
5.4.1	<i>Motilidad progresiva</i>	23
5.4.2	<i>Viabilidad celular</i>	24
5.4.3	<i>Ultraestructura espermática</i>	24
5.5	CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.....	25
5.6	DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE TREHALOSA	25
5.6.1	<i>Curva de calibración</i>	26
5.6.2	<i>Manejo de la muestra</i>	26
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1	VIABILIDAD ESPERMÁTICA Y MOTILIDAD PROGRESIVA.....	27
6.2	ULTRAESTRUCTURA ESPERMÁTICA	28
6.3	CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.....	30
6.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	35
7	CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	37
8	REFERENCIAS.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones ocasionadas por el proceso de congelación-descongelación en el espermatozoide porcino (Yeste, 2016).....	1
Figura 2. a) Estructura del ácido docosahexaenoico (DHA). b) Representación gráfica de la incorporación del DHA en la cadena sn-2 de un fosfolípido. c) Estructura de la trehalosa (Hayner et al., 2017; Stillwell y Wassall, 2003).	2
Figura 3. Métodos para la incorporación de trehalosa en células de mamíferos (Stewart y He, 2019).....	3
Figura 4. Clasificación de liposomas de acuerdo con su tamaño y laminaridad. (Elizondo et al., 2011).	10
Figura 5. Formación de vesículas en un medio acuoso (Mozafari, 2005).....	10
Figura 6. Mecanismo de crioprotección propuesto para los liposomas (Saadeldin et al., 2020).....	13
Figura 7. Tipos de fluidos (Janmey et al., 2007).	16
Figura 8. Micrografías TEM de diferentes segmentos de espermatozoides porcinos criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa.	30
Figura 9. Pruebas de flujo cortante simple en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática.	31
Figura 10. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Viscosidad compleja.	32
Figura 11. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación (G' y G'').	33
Figura 12. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Diagrama de Han.	34

Figura 13. Pruebas oscilatorias en el semen porcino criopreservado, efecto del medio de congelación en las propiedades viscoelásticas al descongelado. Espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación (G' y G''). 35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Formulación de diluyentes para congelación</i>	23
Tabla 2. <i>Efecto de liposomas en espermatozoides criopreservados</i>	28
Tabla 3. <i>Concentración promedio de trehalosa en muestras de semen descongelado (mg/mL)</i>	36

1 INTRODUCCIÓN

Las condiciones extremas a las que son sometidos los espermatozoides durante el proceso de criopreservación le ocasionan diversas alteraciones que afectan su capacidad fecundante (Waberski *et al.*, 2019; Yeste *et al.*, 2017) (**Figura 1**). Con el propósito de minimizar este daño celular se emplean diversos agentes crioprotectores en los protocolos de congelación-descongelación. La trehalosa (α - D-glucopiranosil α - D-glucopiranosido) es un disacárido utilizado como crioprotector no permeable ya que no logra cruzar la membrana plasmática y ejerce su protección a nivel extracelular (Ohtake y Wang, 2011; Yeste, 2016). Su mecanismo de acción lo lleva a cabo al formar complejos con las bio-macromoléculas de la membrana plasmática mediante puentes de hidrógeno, reemplazando a las moléculas de agua; disminuye la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos; previene la desnaturalización de proteínas y reduce los efectos ocasionados por el estrés oxidativo y nitrosativo (Crowe, 2002; Oku *et al.*, 2003; Pezo *et al.*, 2020).

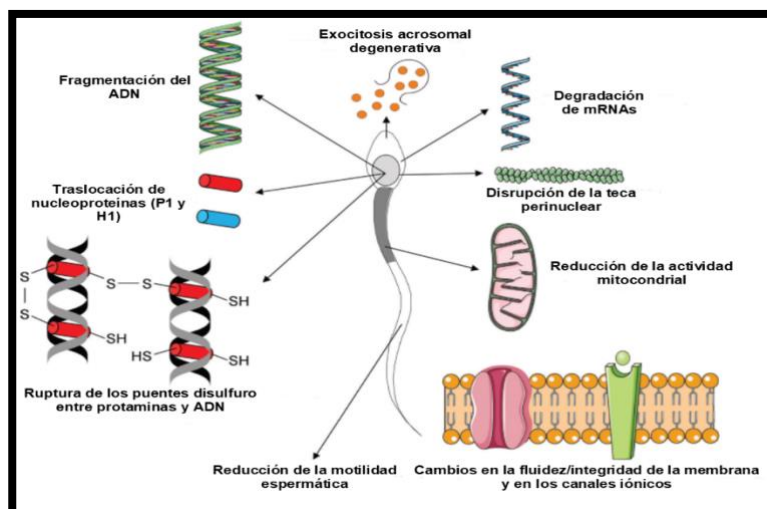


Figura 1. Alteraciones ocasionadas por el proceso de congelación-descongelación en el espermatozoide porcino (Adaptada de Yeste, 2016).

En este sentido, se ha reportado el uso de trehalosa en la criopreservación espermática en cerdos, con resultados positivos al mantener la calidad de los eyaculados al descongelado (Athurupana *et al.*, 2015; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009; Malo *et al.*, 2010; Men *et al.*, 2013). Sin embargo, se requiere la presencia de trehalosa en ambos lados de la bicapa lipídica para ejercer su crioprotección neutralizando la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008; Herdeiro *et al.*, 2006). Pese a que la anterior hipótesis ya se ha logrado confirmar en diversos tipos celulares (Eroglu *et al.*, 2000; Holovati *et al.*, 2009; Motta *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2022; Stefanic *et al.*, 2017; Uchida *et al.*, 2017), en el caso de espermatozoides no ha sido probada.

La propiedad antioxidante específica de la trehalosa se lleva a cabo mediante interacciones formadas por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (O_6-H_6 , O_2-H_2 o O_3-H_3) del disacárido y el doble enlace *cis* de los ácidos grasos insaturados (grupos CH) (Oku *et al.*, 2003). El ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) es el ácido graso más abundante en la membrana plasmática del espermatozoide porcino, el cual es especialmente susceptible a la peroxidación lipídica durante la congelación (Cerolini *et al.*, 2000). Por lo anterior, se recomienda emplear crioprotectores que minimicen las alteraciones a nivel intracelular (**Figura 2**).

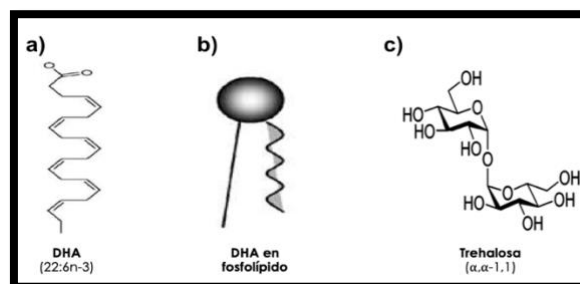


Figura 2. a) Estructura del ácido docosahexaenoico (DHA). b) Representación gráfica de la incorporación del DHA en la cadena *sn*-2 de un fosfolípido. c) Estructura de la trehalosa (Adaptadas de Hayner *et al.*, 2017; Stillwell y Wassall, 2003).

En la actualidad se han descrito diferentes mecanismos para favorecer la incorporación de trehalosa al interior de células (**Figura 3**), ejemplo de esto son los liposomas, vesículas que por su biocompatibilidad y baja toxicidad se han establecido rápidamente como un sistema eficiente para la liberación de moléculas (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Ming-Ren y Chiu, 2013). Investigaciones realizadas en eritrocitos (Holvati *et al.*, 2009) y células troncales obtenidas de sangre del cordón umbilical (Motta *et al.*, 2014) han comprobado la eficacia de los liposomas para favorecer la permeabilización de la trehalosa.

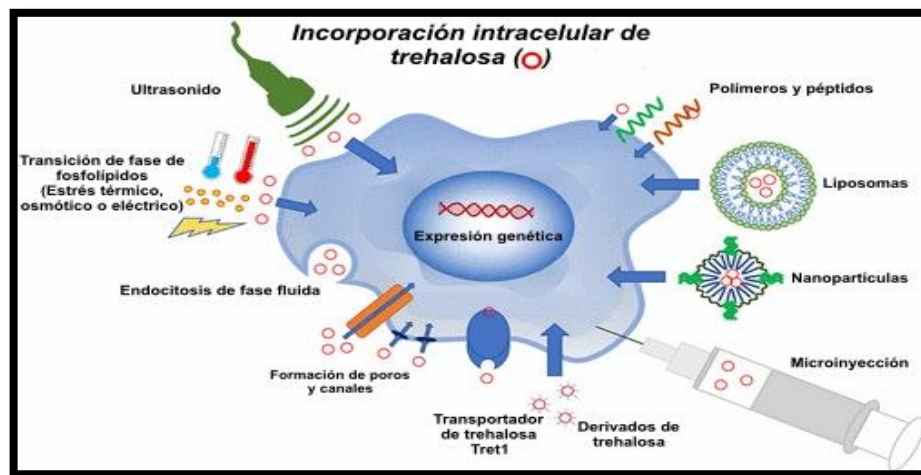


Figura 3. Métodos para la incorporación de trehalosa en células de mamíferos (Adaptada de Stewart y He, 2019).

Respecto a lo publicado por Holvati *et al.* (2009) se puede afirmar que la crioprotección de la trehalosa es dependiente de su concentración, destacándose la importancia de determinar la concentración de crioprotección específica para cada tipo celular. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas descritas para el análisis de trehalosa, la cual se puede utilizar acoplada a un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD, por sus siglas en inglés) con una alta sensibilidad (Allgeier *et al.*, 2003; Dvořáčková *et al.*, 2014). Es

preciso señalar que la trehalosa es un analito que carece de cromóforos, por lo que el detector ELSD representa una alternativa a la derivatización química, evitándose los inconvenientes que conlleva este método (Allgeier *et al.*, 2003). Adicionalmente, diversos estudios han reportado la propiedad de la trehalosa para aumentar la viscosidad del medio que la contiene (Rodríguez-Martínez y Wallgren, 2011; Sampedro y Uribe, 2004), lo que requiere mayor investigación considerando el efecto benéfico que esto implica en la conservación celular. De igual forma, el efecto crioprotector de los liposomas en protocolos de congelación espermática en cerdos ha sido poco evaluado, y más aún como vehículo para favorecer la incorporación de sustancias impermeables al interior de la célula. Lo anterior resulta en diversas líneas de investigación que aportarían al desarrollo de la técnica de criopreservación espermática en cerdos.

1.1 La criopreservación del semen porcino en la actualidad

En la criopreservación de semen porcino es fundamental la selección del agente crioprotector y su concentración específica, aunado a otros parámetros involucrados durante el proceso, como por ejemplo: el volumen del medio de congelación, empaquetado de las dosis, etc., ya que influyen en la calidad de la muestra posterior al congelado-descongelado (Pezo *et al.*, 2019). Al respecto, Shepherd y Herickhoff (2022) reportaron que la concentración de glicerol, la velocidad de enfriamiento, uso de antioxidantes y el volumen de la pajuela son los factores que más influyen en la calidad espermática al descongelado, los cuales se determinaron a partir de un diseño experimental de Plackett-Burman. Continuando con el medio de congelación, Simonik *et al.* (2022) emplearon pentaisomaltosa (PentaHibe®) como sustituto del glicerol, sin afectarse la motilidad espermática al descongelado y con efectos positivos en la actividad

mitocondrial. Por otro lado, de Brito *et al.* (2021) reportaron que la centrifugación del medio de congelación formulado a base de yema de huevo ($\times 10,000$ g por 45 min) mejora significativamente los parámetros de cinemática espermática e integridad celular de eyaculados porcinos al descongelado. La suplementación del medio de congelación con antioxidantes como la astaxantina, quercetina, riboflavina (vitamina B₂) y el resveratrol es otro factor que ha reportado efectos positivos al contrarrestar los efectos de las ROS posterior al proceso de criopreservación (Bang *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2021; He *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020). Es importante mencionar que actualmente existen medios comerciales para congelación y descongelación de semen de cerdo (Minitube Cryoguard, Androstar® CryoPlus, Minitube Cryoguard Thawing solution y Androstar® Plus), que al combinarlos han reportado un efecto significativo en la calidad del semen al descongelado (De Andrade *et al.*, 2022).

Adicionalmente, se ha observado que la conservación de los eyaculados a 17 °C durante 24 horas, antes de llevar a cabo un protocolo de criopreservación espermática, incrementa la motilidad progresiva y mantiene la integridad de la membrana plasmática y acrosomal al descongelado (Torres *et al.*, 2019). Asimismo, Horváth *et al.* (2018) investigaron el efecto de la presión hidrostática sobre la calidad del semen de cerdo criopreservado, reportando una mejora significativa en parámetros como la motilidad total, porcentaje de células con acrosoma intacto y membrana plasmática integra al aplicar una presurización (20 y 40 MPa) posterior a la dilución con el medio de congelación sin glicerol.

Investigaciones recientes se han centrado en la utilización de nanomateriales para proteger a la célula espermática de las alteraciones ocasionadas durante la congelación-descongelación. Al respecto, Soares *et al.* (2020) analizaron los efectos tóxicos de un acarreador polimérico

poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL) adicionado en el medio de congelación, sin observarse efectos negativos en la calidad espermática al descongelado. Posteriormente, este mismo grupo de investigadores emplearon nanocápsulas poliméricas cargadas con resveratrol en el medio de congelación, observando un efecto benéfico sobre los parámetros cinéticos de los espermatozoides al descongelado (Soares *et al.*, 2021).

En relación a los métodos analíticos aplicados para el desarrollo de la criopreservación espermática en la especie porcina, Fraser *et al.* (2020) determinaron ciertos transcritos (FOS, NFATC3, EAF2, etc.) como potenciales marcadores para predecir la congelabilidad del semen porcino. Así mismo, se ha demostrado que el proceso de criopreservación remodela el proteoma del espermatozoide porcino, principalmente en proteínas relacionadas con la estructura del citoesqueleto, permeabilidad de la membrana plasmática, función mitocondrial, capacitación y fusión espermatozoide-óvulo (IZUMO1 y GSTM3) (Llavanera *et al.*, 2019; Perez-Patiño *et al.*, 2019; Roca *et al.*, 2020).

1.2 Trehalosa en la criopreservación celular

La trehalosa es un disacárido catalogado como un crioprotector no permeable ya que no logra cruzar la membrana plasmática y ejerce su protección a nivel extracelular (Yeste, 2016). Su mecanismo de acción lo lleva a cabo al formar complejos con las bio-macromoléculas de la membrana plasmática mediante puentes de hidrógeno, remplazando a las moléculas de agua, previniendo la desnaturalización de proteínas y la fusión de membranas (Crowe, 2002).

Recientemente, Yoshida *et al.* (2021) desarrollaron y probaron un derivado de la trehalosa (Oleyl-Treh) en la criopreservación de hepatocitos, observándose un efecto crioprotector al mejorarse significativamente la

viabilidad y función celular posterior a la criopreservación. A nivel intracelular, Wang *et al.* (2019) utilizaron nanopartículas de apatita para favorecer la incorporación significativa de trehalosa en células musculares lisas de la aorta, mejorando la viabilidad celular al descongelado en comparación al grupo control (sin nanopartículas).

Respecto a su uso en la criopreservación de espermatozoides, Pezo *et al.* (2020) observaron que la utilización de 0.25 M de trehalosa en la criopreservación de espermatozoides de cerdo redujo significativamente la producción especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) como el peroxinitrito (ONOO⁻), lo cual impacta en la preservación de la fluidez de las membranas espermáticas y motilidad. En espermatozoides ovinos, Jia *et al.* (2021) reportaron que la trehalosa modifica el perfil proteico de los espermatozoides durante la criopreservación, lo que puede estar asociado a su efecto crioprotector, además de reducir el estrés oxidativo, participar en la glicolisis e incrementar la tolerancia espermática al estrés externo.

1.2.1 Cuantificación de trehalosa

En la actualidad se han reportado diversas técnicas para llevar a cabo la cuantificación de trehalosa; los métodos colorimétricos (método de antrona), enzimáticos (trehalasa) y cromatográficos (HPLC) son los más frecuentes. La técnica de antrona se basa en la reacción de la antrona con los carbohidratos, determinándose mediante un cambio en la coloración. En la cuantificación enzimática, la trehalosa es hidrolizada enzimáticamente (trehalasa ácida, glucosa oxidasa y peroxidasa). No obstante, a pesar de la consolidación de ambas metodologías, en la actualidad, las técnicas cromatográficas son las más utilizadas debido a su rapidez, sensibilidad y simplicidad (Dvořáčková *et al.*, 2014; Kus-Liśkiewicz *et al.*, 2014).

Dentro de los métodos cromatográficos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la que ha reportado mejores resultados cuantificando azúcares en plantas y otros materiales biológicos. La asociación de un método de separación como el HPLC con un detector de alta estabilidad y sensibilidad como el detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD, por sus siglas en inglés) le da a esta técnica validez en la caracterización y determinación de carbohidratos (Dvořáčková *et al.*, 2014).

La detección por ELSD se divide principalmente en tres procesos: la nebulización del eluyente, evaporación de la fase móvil y la medición de la luz dispersada por los analitos semi o no volátiles. En el ELSD la luz es dispersada por las partículas residuales del material no volátil, causando una oscilación de electrones y produciendo radiación. Un fotomultiplicador se encarga de la detección de fotones. Por lo tanto, la intensidad de la señal está relacionada a la masa del analito en el eluyente (Dvořáčková *et al.*, 2014).

1.3 Liposomas

Los liposomas son un sistema de liberación de moléculas que consiste en vesículas compuestas por bicapas lipídicas que se encuentran rodeando un medio acuoso, lo cual permite la encapsulación de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos (Ming-Ren y Chiu, 2013; Robson *et al.*, 2018). Estas vesículas son principalmente formuladas a base de fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina) y esteroides (colesterol), siendo su composición un aspecto esencial ya que determinará sus propiedades fisicoquímicas, como lo es la temperatura de transición de fase (Ming-Ren y Chiu, 2013). Adicionalmente, es debido a los componentes estructurales de los liposomas que se le atribuyen

características importantes como baja toxicidad, flexibilidad respecto a la sustancia que pueden encapsular y alta biocompatibilidad.

1.3.1 Clasificación de liposomas

De acuerdo con sus parámetros estructurales, los liposomas se pueden clasificar en vesículas unilamelares pequeñas ($D \leq 200$ nm), vesículas unilamelares grandes ($D \geq 200$ nm) y vesículas multilamelares (**Figura 4**). En los liposomas unilamelares la vesícula tiene una sola bicapa de fosfolípidos que envuelve una solución acuosa. Al respecto de los liposomas multilamelares, las vesículas se irán formando en el interior de otra con un menor tamaño, generando una estructura multilamelar de bicapas lipídicas separadas por capas de agua (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Elizondo *et al.*, 2011).

Otros parámetros descritos para la clasificación de liposomas son el método de preparación y su aplicación. Vesículas por evaporación en fase reversa (REV, por sus siglas en inglés) y las preparadas por el método de deshidratación/rehidratación (DRV, por sus siglas en inglés) son ejemplo de liposomas de acuerdo con su método de preparación, mientras que los liposomas fusogénicos y los sensibles al pH señalan su aplicación (Choudhury *et al.*, 2020).

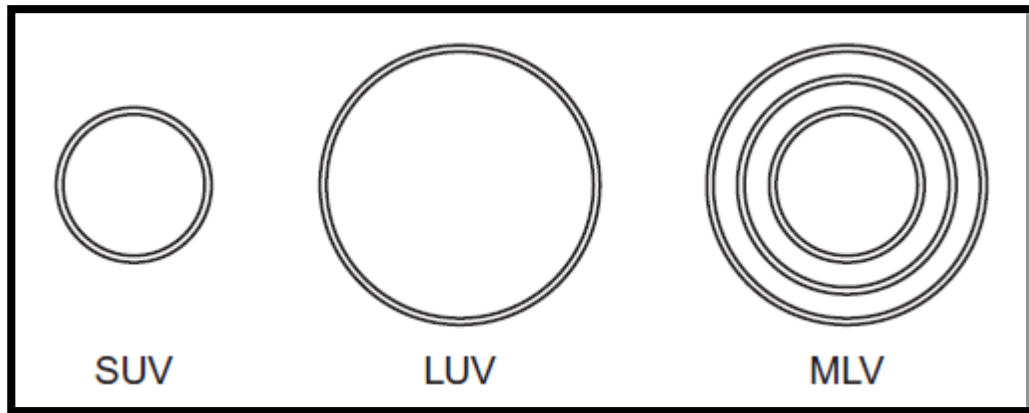


Figura 4. Clasificación de liposomas de acuerdo con su tamaño y laminaridad. SUV, vesículas unilamelares pequeñas; LUV, vesículas unilamelares grandes; MLV, vesículas multilamelares (Elizondo et al., 2011).

1.3.2 Métodos para la preparación de liposomas

La formación de liposomas, independientemente del método de preparación, se basa principalmente en las interacciones generadas entre las moléculas de lípido-lípido y lípido-agua. Lo anterior, en adición con el aporte de energía (calor, sonicación, etc.) que resulta en un arreglo de las moléculas de lípidos en la forma de vesículas lipídicas para lograr un equilibrio termodinámico en la fase acuosa (**Figura 5**) (Mozafari, 2005).

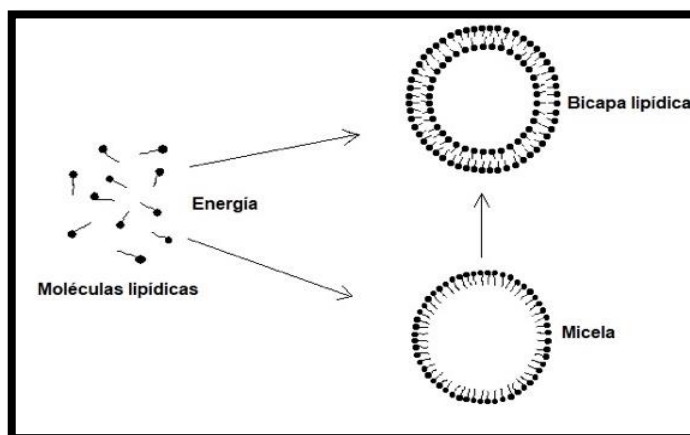


Figura 5. Formación de vesículas en un medio acuoso (Adaptado de Mozafari, 2005).

La elección de los componentes de la bicapa determinará la fluidez y la carga de la bicapa. Tipos de fosfatidilcolina insaturada obtenida de fuentes naturales como huevo o soya generan bicapas más permeables y menos estables, mientras que fosfolípidos saturados con cadenas acílicas largas (dipalmitoilfosfatidilcolina) forman bicapas con una estructura más rígida (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

Además de los fosfolípidos, la adición de colesterol en la formulación de liposomas es indispensable para modular la rigidez de la membrana, su estabilidad, reducir la fuga del fármaco y mejorar la eficiencia de encapsulación (Elizondo *et al.*, 2011).

Referente a la estructura final del liposoma, esta dependerá no solo de la geometría del fosfolípido, sino también de factores externos importantes como la temperatura, pH, método de preparación, etc. (Elizondo *et al.*, 2011).

Los métodos convencionales descritos para la preparación de liposomas se basan principalmente en cuatro etapas: solubilización de lípidos con solventes orgánicos, dispersión de lípidos en el medio acuoso, purificación de los liposomas generados y análisis del producto final. No obstante, una desventaja observada en estas técnicas es la toxicidad que pudieran ocasionar los residuos de solventes orgánicos empleados en la preparación. Derivado de lo anterior, los trabajos reportados recientemente se encuentran dirigidos al desarrollo de métodos alternativos para preparar vesículas, los cuales no involucren solventes orgánicos o detergentes (Mozafari, 2005).

- *Método de calentamiento:*

El método de calentamiento es una técnica descrita para la producción de vesículas en donde se hidratan los componentes de los liposomas en un medio acuoso, seguido por su calentamiento en presencia de glicerol (3% v/v). El glicerol actuará como agente dispersante e incrementará la estabilidad de los liposomas, además de que no se requiere su eliminación del producto final (Mozafari, 2005).

En referencia al calentamiento al que deben ser sometidos los componentes de las vesículas, la temperatura no debe ser menor a la temperatura de transición de fase (T_c). Lo anterior se debe a que en temperaturas por debajo de la T_c los lípidos se encuentran en un estado de gel y por lo tanto no se pueden formar las estructuras de bicapas cerradas (Mozafari, 2005).

1.3.3 Los liposomas en las ciencias veterinarias

Las aplicaciones de los liposomas son muy amplias, destacándose su uso en la liberación controlada de fármacos (acarreadores), adyuvantes en vacunas y mejorando el potencial reproductivo de los animales (Ghorbanpour *et al.*, 2020). En relación a este último punto, los liposomas han sido empleados en el estudio de la fisiología reproductiva de mamíferos machos, describiéndose principalmente su uso como protector de la función espermática posterior a la criopreservación (**Figura 6**), y como regulador de la función espermática a través de lípidos (Saadeldin *et al.*, 2020; Sullivan y Saez, 2013).

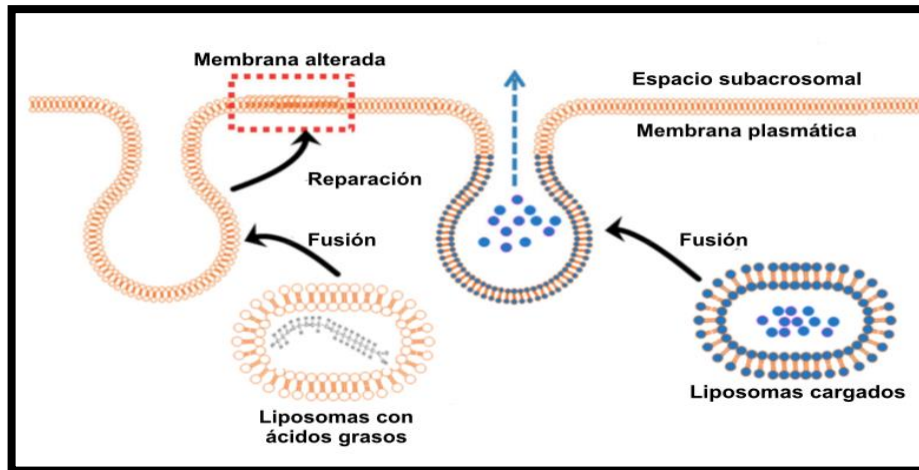


Figura 6. Mecanismo de crioprotección propuesto para los liposomas. Los liposomas con su contenido de ácidos grasos pueden reparar la membrana plasmática alterada por el congelado-descongelado. Adicionalmente, cuando los liposomas son cargados artificialmente con ciertas sustancias se pueden fusionar y transferir su contenido dentro del espacio subacrosomal y al interior de espermatozoide (Adaptada de Saadeldin *et al.*, 2020).

La eficacia de los liposomas en la criopreservación espermática se ha reportado en la especie bovina, observándose un mayor porcentaje de células con membrana plasmática íntegra y acrosoma intacto en comparación a los resultados obtenidos con un medio de congelación a base de yema de huevo (Miguel-Jimenez *et al.*, 2020). Como acarreador de 2.5 mM de glutatión reducido, los liposomas mejoraron la motilidad progresiva, viabilidad espermática y funcionalidad de la membrana plasmática al descongelado, en comparación a los demás grupos analizados (Nadri *et al.*, 2022).

Continuando con los bovinos, los liposomas también se han empleado en combinación con la transgénesis mediada por espermatozoides (SMGT, por sus siglas en inglés), con tiempos de incubación de tres horas sin afectar la motilidad espermática y utilizando microscopía con interferencia de luz espacial (SLIM, por sus siglas en inglés) para visualizar los liposomas fusionados con los espermatozoides sin necesidad de colorantes o marcadores (Rubessa *et al.*, 2019). En el caso de caprinos, Nadri *et al.* (2019)

reportaron el uso de liposomas a base de lecitina de soya en la criopreservación espermática, observando un efecto significativo sobre la motilidad, viabilidad y apoptosis en concentraciones del 2%. Finalmente, los liposomas también se han empleado eficazmente en la criopreservación de semen ovino, manteniendo la integridad de la membrana plasmática al descongelado (Luna-Orozco *et al.*, 2019).

1.3.4 Liposomas cargados con trehalosa

Recientemente, las investigaciones reportadas en la literatura se han centrado en el efecto terapéutico de los liposomas cargados con trehalosa. Emanuele *et al.* (2014) reportaron una reducción significativa en el daño molecular al ADN y proteínas inducido por la radiación UV-B sobre queratinocitos inmortalizados humanos al utilizar formulaciones tópicas a base de liposomas cargados con trehalosa. Por otro lado, estudios en leucemia linfoblástica y cáncer de mama demuestran la propiedad de estos liposomas para inducir la apoptosis mediante la activación de caspasas y al ocasionar la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial (Ichihara *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 2016).

Respecto al uso de liposomas cargados con trehalosa en la criopreservación celular, estudios recientes corroboran el efecto significativo de la trehalosa intracelular y extracelular sobre la integridad de la membrana plasmática de células troncales hematopoyéticas al descongelado, sin embargo, continúan las reservas sobre la eficacia de los liposomas como vehículo para favorecer la liberación de trehalosa al interior de las células, considerando que es una estrategia de bajo costo y fácil implementación (Scott *et al.*, 2022). En espermatozoides, Medina-León *et al.* (2019) emplearon liposomas cargados con trehalosa en la criopreservación

de semen equino, reportando un efecto sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados sin reacción acrosomal al descongelado.

1.4 La viscoelasticidad en los sistemas biológicos (caracterización reológica)

La reología se define como la ciencia que estudia el flujo y la deformación de los materiales (Barnes, 2000). En sistemas biológicos, la reología permite un mejor entendimiento de como las células interactúan con su entorno basándose principalmente en dos conceptos, viscosidad y elasticidad (Janmey *et al.*, 2007). Al respecto, la viscosidad es una medida que predice que tan rápido fluirá un líquido al aplicarse un esfuerzo, manteniéndose un flujo constante hasta que el esfuerzo sea suspendido, en tanto la elasticidad es la respuesta mecánica atribuida a los sólidos, que se deforman al aplicarse una fuerza y regresan a su forma original cuando esta se elimina (Barnes, 2000; Janmey *et al.*, 2007). Los conceptos referidos anteriormente describen los materiales en su forma "ideal"; no obstante, en la realidad los materiales exhiben ambas respuestas reológicas (viscosa y elástica), denominándose materiales viscoelásticos (Janmey *et al.*, 2007).

Los fluidos se pueden clasificar, desde el punto de vista reológico, en newtonianos; aquellos cuya viscosidad permanece constante y no presentan propiedades elásticas; y no newtonianos, en los que su viscosidad si varia al aplicarse un esfuerzo de corte (**Figura 7**) (Barnes, 2000; Janmey *et al.*, 2007). Asimismo, los fluidos no newtonianos se dividen a su vez en adelgazantes al flujo (shear thinning, $n < 1$), en los que su viscosidad (η) disminuye al incrementarse la velocidad de deformación o shear rate $[(\dot{\gamma})]$ y engrosantes al flujo (shear thickening, $n > 1$), en los que, al contrario, su $\eta(\dot{\gamma})$ se incrementa al aumentarse $\dot{\gamma}$.

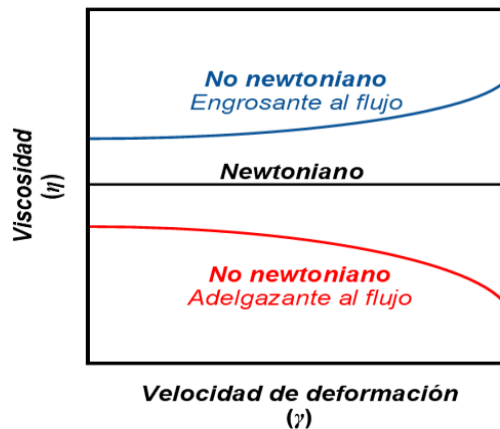


Figura 7. Tipos de fluidos (Adaptado de Janmey et al., 2007).

La caracterización reológica de los fluidos biológicos se realiza principalmente a través de pruebas de flujo a la cizalla simple y pruebas de flujo a la cizalla oscilatoria. En el primer caso se trata de una prueba destructiva que permite determinar las propiedades viscosas de las muestras con base a lo mencionado en el párrafo anterior, en tanto que las pruebas oscilatorias (método no destructivo) llevan a cabo un estudio estructural en sistemas de reología compleja donde se analiza la viscosidad compleja (η^*), así como los módulos dinámicos elástico (G') y viscoso (G'') que reflejan el comportamiento tipo sólido y líquido de las muestras respectivamente (Barnes, 2000). Continuando con las pruebas oscilatorias, G' hace referencia a la capacidad de almacenar la energía de deformación elástica de un material y G'' mide la energía perdida de una deformación irreversible en un material. En los materiales viscoelásticos G' y G'' dependen de un corte de frecuencia angular (ω), la cual es inversamente proporcional al tiempo en el que se lleva a cabo un ciclo sinusoidal dentro de la zona viscoelástica lineal (SAOS). De lo anterior se desprende que las altas frecuencias de deformación son tiempos cortos y por el contrario, bajas frecuencias de deformación son tiempos largos de observación de la respuesta de un material (Barnes, 2000; Janmey et al., 2007).

1.4.1 Reología del semen

La conservación de los eyaculados de cerdo involucra su dilución en medios comerciales con viscosidades cercanas a la presentada por el agua (1 Cps) y por lo tanto más bajas que la observada en el fluido oviductal (Coy *et al.*, 2009). No obstante, es importante considerar la viscosidad del medio donde se encuentran suspendidas las células por el efecto benéfico de esta propiedad en la conservación celular. Se sugiere que al estar en un medio viscoso las células reducen su demanda metabólica; no sedimentan, distribuyéndose de manera uniforme y se previenen fluctuaciones de pH (Corcini *et al.*, 2011; López-Gatius *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2002). Estudios reológicos previos reportaron un comportamiento adelgazante al flujo del semen humano ($n < 1$), el cual puede estar asociado con la presencia de moléculas estructuralmente complejas (Mendeluk *et al.*, 2000). Por otro lado, Hyakutake *et al.* (2015) determinaron que las características de movimiento de los espermatozoides bovinos son afectadas significativamente por las propiedades reológicas del fluido que los rodea. Adicionalmente, Tung *et al.* (2017) reportó que el componente elástico del medio extracelular (G') indujo patrones de nado colectivo en espermatozoides de bovino, facilitando la interacción espermatozoide-fluido, la migración espermática y, finalmente, la fertilización. Por esta razón, la elasticidad del fluido extracelular (G') es un parámetro importante relacionado con su implicación biológica.

En el caso de eyaculados porcinos, Coy *et al.* (2009) reportó que resuspender los espermatozoides en un medio viscoso antes de la inseminación artificial (IA) mejora la estabilidad de la membrana plasmática, así como su habilidad para moverse y penetrar al óvulo. Así mismo, Gil *et al.* (2014) señala que al diluir el semen en un medio viscoso de larga conservación (Zoosperm ND-5 3D®) se observó un menor porcentaje

de espermatozoides con membrana plasmática inestable. Finalmente, González-Abreu *et al.* (2017) reportó un efecto benéfico en los parámetros espermáticos de movimiento al aumentar la viscosidad del medio con metilcelulosa (0.5 y 1 % p/v). Por lo anterior, es importante considerar el comportamiento reológico a nivel macroestructural que exhiben los espermatozoides en los diferentes medios de conservación y a diferentes condiciones, ya que nos aporta información para el desarrollo de la inseminación artificial con semen porcino criopreservado, con posibles implicaciones para la industria.

2 JUSTIFICACIÓN

- La criopreservación espermática es una tecnología que facilita el comercio internacional de dosis de semen porcino con alto valor genético y libre de patógenos.
- Los espermatozoides porcinos son especialmente susceptibles a la peroxidación lipídica durante la criopreservación celular. Se sugiere emplear crioprotectores a nivel intracelular que minimicen los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Dado que el efecto antioxidante de la trehalosa implica la presencia del azúcar en ambos lados de la bicapa lipídica, es necesario el desarrollo de mecanismos que permitan su liberación intracelular, detección y cuantificación.
- Uno de los mecanismos de protección celular mediado por la trehalosa se lleva a cabo incrementando la viscosidad del medio. Por lo anterior, es fundamental analizar las propiedades reológicas de los eyaculados porcinos durante el proceso de criopreservación.

3 HIPÓTESIS

La utilización de un medio de congelación formulado a base de liposomas cargados con trehalosa permitirá la incorporación intracelular del disacárido en bajas concentraciones modificando las características morfofuncionales y reológicas de los eyaculados porcinos criopreservados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la concentración de trehalosa intracelular en espermatozoides porcinos criopreservados en presencia de liposomas cargados con

trehalosa, evaluando además el efecto del disacárido en las características morfofuncionales y reológicas de los eyaculados porcinos.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la efectividad de la sonicación, así como del metanol más ciclos repetidos de congelación-descongelación en la lisis del espermatozoide porcino.
- Determinar la concentración intracelular de trehalosa en espermatozoides porcinos criopreservados, utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de dispersión de luz por evaporación (HPLC-ELSD).
- Evaluar el efecto de los medios de congelación en las características morfofuncionales (viabilidad, motilidad progresiva y ultraestructura) de los espermatozoides porcinos criopreservados.
- Caracterizar las propiedades reológicas de los eyaculados porcinos criopreservados (respuesta viscosa y viscoelástica), además de evaluar el efecto de los liposomas y trehalosa en las propiedades reológicas.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Los reactivos empleados para la preparación de liposomas y criopreservación espermática: lecitina de soya, colesterol y trehalosa, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), en tanto que el glicerol y los componentes de la solución salina de fosfatos (PBS) fueron obtenidos de JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Para las evaluaciones realizadas durante el proyecto se utilizó diclorometano, acetonitrilo y metanol adquiridos de JT Baker. El ácido tricloroacético se obtuvo de Mallinckrodt AR (Paris, KY, USA).

El agua ultra pura utilizada (18.2 MÜ) se obtuvo de un equipo Barnstead nanopure diamond system.

5.2 Elaboración de liposomas

Los liposomas se prepararon siguiendo el método de calentamiento estandarizado previamente (Mendoza-Viveros, 2016), utilizando para su formulación: lecitina de soya (3 mM); colesterol (2 mM), con una relación molar de 6:4, trehalosa (300 mM) y glicerol (3% v/v) en una solución salina de fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, NaCl y NaOH; 0.1 M, pH 7.45). El colesterol diluido en PBS se calentó a 83 °C en agitación (750 rpm) durante 15 min. Posteriormente se agregó el resto de la formulación, ajustándose el volumen final con PBS y se aplicó N_2 . La disolución se calentó a 75 °C en agitación (750 rpm) durante 35 minutos, tras lo cual se mantuvo a temperatura ambiente por 60 minutos.

La extrusión y la sucesiva esterilización se realizaron bajo condiciones asépticas empleando filtros de jeringa de 0.45 y 0.22 μm (Millex, PVDF; Millipore) respectivamente. Los liposomas se conservaron en refrigeración hasta su uso.

5.3 Criopreservación espermática

Se utilizaron 15 eyaculados obtenidos de 4 sementales pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (C.E.I.E.P.P.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las muestras fueron evaluadas (evaluación macro y microscópica) y posteriormente diluidas (1:1 v/v) en un medio de larga conservación para semen de cerdo (Androstar® Plus, Minitube, GmbH), dejándolas estabilizar durante 24 horas a 17 °C. Únicamente fueron aceptados eyaculados con

una motilidad progresiva mayor al 85% y con un porcentaje menor al 20% de morfoanomalías.

A continuación, se llevó a cabo la preparación de los diluyentes para congelación (**Tabla 1**), control y experimental, los cuales fueron utilizados en dos fracciones: la fracción A sin glicerol y la fracción B con glicerol.

Una vez estabilizadas las muestras de semen se procedió a centrifugarlas (800 g durante 10 minutos), retirar el sobrenadante y reconstituirlas con la fracción A de los diluyentes para congelación (600×10^6 cel/mL).

Tabla 1. Formulación de diluyentes para congelación

Componente	Control	Experimental
Liposomas cargados (%)	-	10
Yema de huevo (%)	20	10
Trehalosa (mM)	300	300
Glicerol (%)	3	3

Posteriormente, se procedió a la congelación de las muestras sometiéndolas a una disminución progresiva de temperatura, comenzando con una estabilización a temperatura ambiente durante 90 minutos, 16 °C durante otros 90 minutos y 4 °C por 120 minutos, tras lo cual se adiciono gradualmente la fraccion B del diluyente en un lapso de 30 minutos.

Las muestras de semen fueron colocadas en pajuelas de 0.5 mL, selladas con alcohol polivinilico y expuestas a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150 °C) durante 20 minutos. Por último, los eyaculados se conservaron en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su evaluación.

El descongelado de tres pajuelas por tratamiento se realizó 15 días despues de la criopreservación, empleandose un baño maría a 36 °C durante 30 segundos. El contenido de las pajuelas se reconstituyó inmediatamente en un medio comercial de larga conservación para eyaculados de cerdo con una proporción de 1:4 v/v (Androstar® Plus, Minitube, GmbH).

5.4 Evaluación celular al descongelado

5.4.1 Motilidad progresiva

Se tomó una muestra de 10 µL de cada pajilla descongelada, colocándola en un portaobjetos atemperado a 37 °C y poniéndole un

cubreobjetos para su evaluación por observación directa en el microscopio óptico (10x). El resultado fue estimado de acuerdo con el porcentaje de células móviles (0-100%) (Gutiérrez- Pérez y col. 2009).

5.4.2 Viabilidad celular

El porcentaje de células viables se evaluó mediante la tinción de eosina-nigrosina, analizándose tres pajillas de cada uno de los eyaculados criopreservados.

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

Los espermatozoides con membrana plasmática alterada permitieron la entrada del colorante y se tiñeron, mientras que los espermatozoides intactos no presentaron coloración (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009). La evaluación se realizó en un microscopio óptico con un objetivo de 100X, contando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

5.4.3 Ultraestructura espermática

La ultraestructura de los espermatozoides criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa fue evaluada por microscopía electrónica de transmisión (TEM), fijándose la muestra con glutaraldehído al 3%. La post-fijación se realizó con tetraóxido de osmio (OSO₄) al 1%. Posteriormente se realizó la deshidratación de la muestra con concentraciones crecientes de etanol (30 al 100%). Se utilizó acetonitrilo entre la deshidratación y la inclusión en resina EPON. Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 2%. La

observación se realizó en un microscopio electrónico marca JEOL modelo JEM-1200EX II.

5.5 Caracterización reológica

La caracterización de las propiedades reológicas se realizó evaluando dos eyaculados obtenidos de diferentes machos para asegurar la repetibilidad de la prueba. Se analizaron muestras de semen a distintas condiciones correspondientes al protocolo de criopreservación (fresco, diluido en diluyente comercial, diluido en medio de congelación, descongelado y descongelado diluido en diluyente comercial), utilizando un reómetro de esfuerzos controlados modelo TA Instruments Discovery HR3® con una geometría de cilindros concéntricos. Las pruebas de flujo a la cizalla simple (viscosidad, $\eta(\dot{\gamma})$) se llevaron a cabo en un intervalo de 1 a 100 s⁻¹, mientras que las pruebas de flujo a la cizalla oscilatoria (viscosidad compleja, G' y G'') se examinaron dentro de la región viscoelástica lineal ($\gamma=30\%$) a 37°C, en una ventana de observación de 0.1 a 300 rad/s. Todas las muestras fueron analizadas al menos por duplicado.

5.6 Determinación intracelular de trehalosa

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

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- Cromatógrafo: Sistema HPLC Infinity Quaternary LC 1260, Agilent
- Columna: Unison UK-Amino, 250×4.6 mm, Imtakt

- Detector: ELSD, Polymer Laboratories, PL-ELS 1000
- Volumen de inyección: 0.5 µl de muestra
- Temperatura de la columna: 60 °C
- Fase móvil: Acetonitrilo y agua grado HPLC (70:30)
- Velocidad de flujo: 0.7 ml/min

5.6.1 Curva de calibración

Para la elaboración de las curvas de calibración se analizaron alícuotas con diferentes concentraciones conocidas de trehalosa disuelta en agua ultrapura (5 a 25 mg/mL).

5.6.2 Manejo de la muestra

Para la detección y cuantificación de trehalosa en el interior de las células se analizaron muestras de 4 eyaculados criopreservados en presencia de liposomas cargados con 300 mM del azúcar. Se tomaron 4 mL de semen descongelado, centrifugándose a 800 g durante 10 minutos y retirándose el sobrenadante.

La lisis celular se llevó a cabo evaluando la efectividad de dos protocolos: el primero (P1) consistió en reconstituir la pastilla celular con 450 µL de agua ultrapura y se llevó al vórtex durante 2 minutos. Posteriormente las muestras fueron sonicadas (VCX 500 Ultrasonic Processors) durante 30 minutos a una amplitud del 30%. A continuación se agregaron 50 µL de ácido tricloroacético, centrifugándose a 14000 g durante 15 minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm (Millipore Co.) y se realizó el análisis.

El segundo protocolo de lisis celular (P2) estuvo basado en el método reportado por (Kralikova *et al.*, 2017). En este caso la pastilla celular fue

reconstituida con 450 μ L de metanol al 80%, dejándola incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se llevaron a cabo 5 procesos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación ultrasónica a 36°C, tras lo cual se adicionaron 50 μ L de ácido tricloroacético. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 14000 g durante 15 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante, se filtró utilizando una membrana de nylon de 0.45 μ m (Millipore Co.) y se procedió al análisis.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico estuvo basado en un diseño experimental de un solo factor completamente aleatorizado ($Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$), comprobándose en principio los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Shapiro-Wilk y Levene respectivamente). El paquete estadístico utilizado para el análisis mencionado anteriormente, así como para el análisis de varianza y la comparación múltiple de medias (método de Tukey) fue el IBM SPSS versión 20.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Viabilidad espermática y motilidad progresiva

Los resultados correspondientes a la calidad seminal al descongelado se muestran en la **Tabla 2**, observándose que la viabilidad y motilidad progresiva se mantuvieron sin diferencias significativas ($P > 0.05$) al comparar los porcentajes promedio obtenidos de los medios de congelación.

Aun cuando no se encontraron diferencias significativas en las variables estudiadas, el mayor porcentaje de espermatozoides viables se obtuvo en los eyaculados criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa (28%), por el contrario, el porcentaje de espermatozoides con

movimiento progresivo fue menor en el grupo experimental en comparación al grupo control.

Se sugiere que los hallazgos descritos anteriormente pueden estar influenciados por las condiciones de incubación utilizadas en este trabajo (Holovati *et al.*, 2008; Röpke *et al.*, 2011), aunado a la concentración de lecitina de soya empleada en la dispersión de liposomas (Pearodwong *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2009). Es necesario destacar que, hasta donde sabemos, no hay reportes prevos en la literatura sobre el uso de liposomas a base de lecitina de soya en la criopreservación de semen de cerdo. Lo anterior, abre la puerta para continuar la investigación y se contribuya al desarrollo de la técnica de congelación espermática en cerdos, la cual va cobrando relevancia principalmente como medida de bioseguridad.

En adición a lo anterior, He *et al.* (2001) reportaron el uso de liposomas elaborados a partir de una selección de fosfolípidos en la criopreservación de eyaculados de cerdo, observándose resultados consistentes a los nuestros respecto al efecto de los liposomas en la viabilidad espermática y motilidad progresiva al descongelado, además de su uso en conjunto con la yema de huevo en la formulación del medio de congelación.

Tabla 2. Efecto de liposomas en espermatozoides criopreservados

Tratamiento	Viabilidad espermática (%)	Motilidad progresiva (%)
Control	27.285 ± 3.272	21.058 ± 3.760
Experimental	28.218 ± 2.718	18.918 ± 1.407

Los valores representan la media ± error estándar. n=15
No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

6.2 Ultraestructura espermática

Las imágenes obtenidas por TEM muestran espermatozoides criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa que mantuvieron su

integridad estructural (**Figura 8 a**), así como células con alteraciones propias del proceso de congelación-descongelación, destacándose la distensión y pérdida de la membrana plasmática (**Figura 8 a**). Adicionalmente, se identificaron vesículas en la región acrosomal, lo que sugiere la activación prematura de la reacción acrosomal ocasionada por el proceso de congelación-descongelación (Leahy y Gadella, 2011). Otro tipo de vesículas, con apariencia similar a la observada en la caracterización previa de los liposomas (Mendoza Viveros, 2016), fueron identificadas interactuando con la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos criopreservados (**Figura 8 b**).

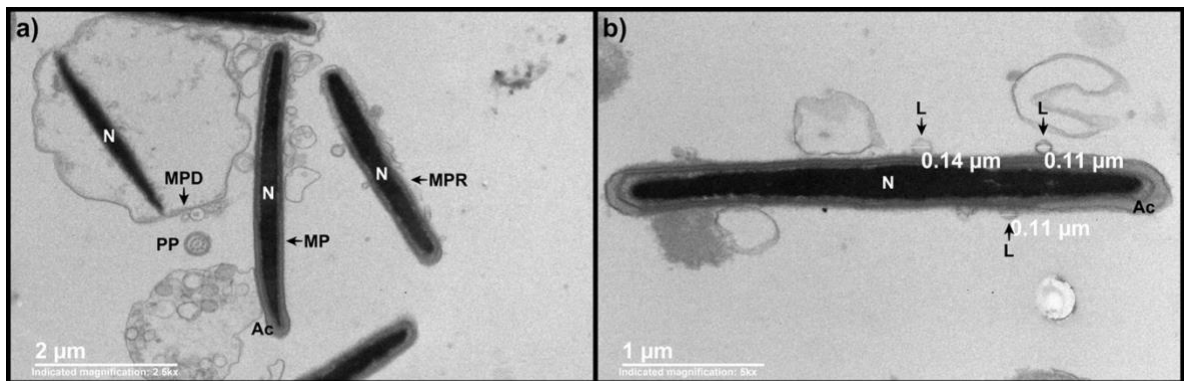


Figura 8. Micrografías TEM de diferentes segmentos de espermatozoides porcinos criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa. a) Células espermáticas con membrana plasmática intacta (MP), distendida (MPD) y rota (MPR). Ac, acrosoma (protuberancia acrosomal); N, núcleo; PP, pieza principal. b) Corte transversal de la cabeza espermática donde se observan liposomas (L) cerca de la membrana plasmática del espermatozoide. Ac, acrosoma (protuberancia acrosomal); N, núcleo (N).

6.3 Caracterización reológica

Se realizó la caracterización reológica del semen porcino a fin de evaluar el efecto de los liposomas cargados con trehalosa en sus propiedades viscoelásticas (G' y G'') y viscosas al flujo $\eta(\dot{\gamma})$, así como analizar las interacciones espermatozoide-medio extracelular y espermatozoide-espermatozoide antes y después del proceso de criopreservación.

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de flujo a la cizalla simple $\eta(\dot{\gamma})$ se muestran en la **Figura 9**, observando un comportamiento reológico no newtoniano de tipo adelgazante al flujo ($n < 1$) del semen porcino. Asimismo, se pudo observar una mayor viscosidad en las muestras de semen reconstituidas en el medio de congelación experimental, la cual se mantuvo incluso después de su congelación-descongelación, no obstante, el daño oxidativo ocasionado durante el proceso de criopreservación (Aydemir *et al.*, 2008). Este comportamiento podría ser atribuido a la presencia de los crioprotectores, cuyo mecanismo de acción se ve reflejado en un incremento de la viscosidad del medio que los

contiene (Morris *et al.*, 2006; Rodriguez-Martinez y Wallgren, 2011; Sampedro y Uribe, 2004).

Contrario a lo anterior, la dilución de las muestras en un medio de conservación comercial implicó la disminución de su viscosidad en un orden de magnitud, sin embargo se conservó su comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo. Lo anterior es relevante si se considera el efecto protector que implica el mantener las células en un medio viscoso (Corcini *et al.*, 2011; López-Gatius *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2002).

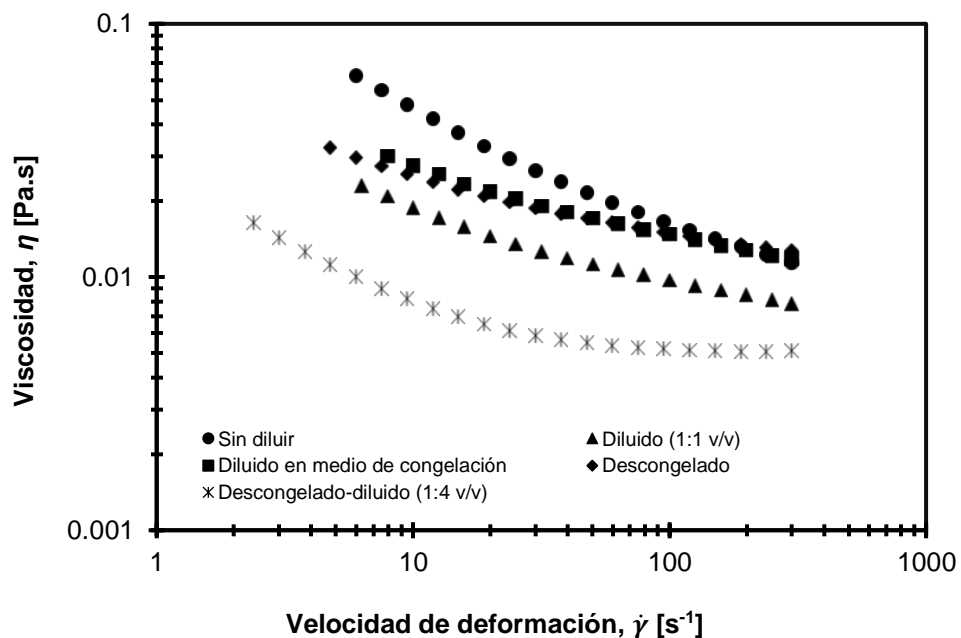


Figura 9. Pruebas de flujo cortante simple en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Viscosidad a la cizalla simple η ($\dot{\gamma}$) en función de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$).

Respecto a las pruebas de flujo a la cizalla oscilatoria (viscoelasticidad lineal), la **Figura 10** muestra la viscosidad compleja (η^*) presentada por el semen, observándose que cumple la regla de Cox-Merz, donde, la curva de viscosidad compleja y la viscosidad a la cizalla simple se empatan en una sola, es decir, son sistemas mecánicamente estables al flujo. Se destaca que el valor de la viscosidad a la cizalla simple ($\eta(\dot{\gamma})$) es menor al de la viscosidad

compleja, lo que se relaciona con la naturaleza destructiva de la prueba de flujo a la cizalla simple (Li *et al.*, 2005).

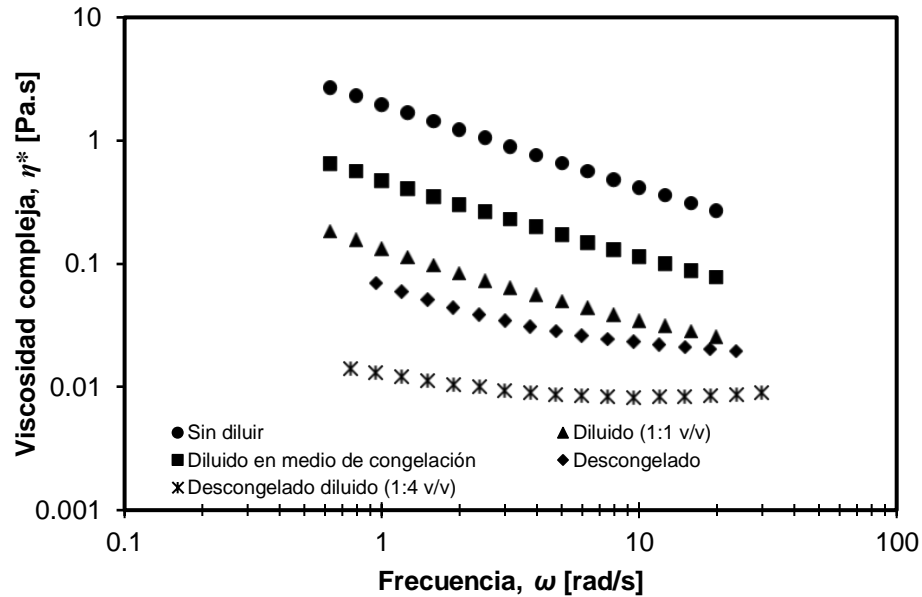


Figura 10. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Viscosidad compleja (η^*) como función de la frecuencia angular (ω) en escala logarítmica.

Además, las pruebas de cizalla oscilatoria (**Figura 11**) presentan una respuesta viscoelástica (G' y G'') significativa, con un predominio del componente elástico (G') sobre el viscoso (G'') en los eyaculados de cerdo fresco ($G' > G''$) en la ventana de observación, mientras que en las muestras diluidas (diluyente comercial y medio de congelación experimental) el módulo viscoso predominó sobre el módulo elástico ($G'' > G'$), es decir, cambio su estructura de un material sólido viscoelástico ($G' > G''$) a un líquido viscoelástico ($G'' > G'$). Lo anterior es relevante por el efecto de las propiedades elásticas del medio en los mecanismos de navegación y migración espermática reportados previamente en la literatura (Tung *et al.*, 2017; Zaferani *et al.*, 2021).

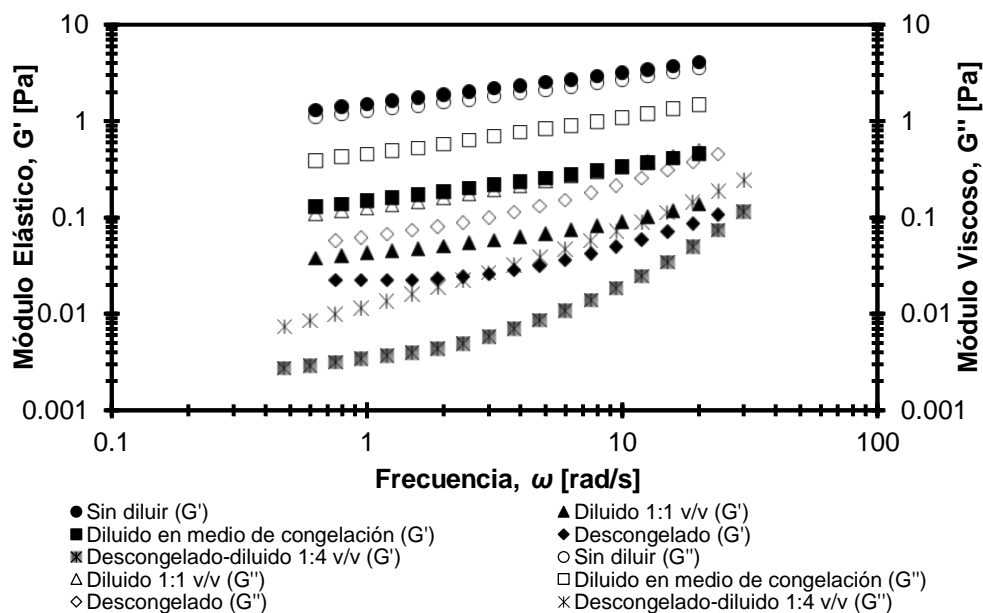


Figura 11. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación (símbolos llenos son G' : módulo elástico y símbolos vacíos son G'' : módulo viscoso) como función de la frecuencia angular (ω) en escala logarítmica.

Adicionalmente, el proceso de congelación-descongelación también ocasiona la pérdida de la estructura elástica de las muestras (módulo elástico, G'), lo que se hace más evidente a tiempos cortos de observación (frecuencias altas). Este cambio en el comportamiento viscoelástico de las muestras se debe a la pérdida de las interacciones célula-célula y célula-medio, lo cual se explica por el daño en la membrana plasmática de las células ocasionado durante el proceso térmico (Barnes, 2000; Medina-Torres *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2018). Otro hallazgo importante es un comportamiento “pseudo-solid like” en las muestras de semen descongelado, relacionado con una interacción más fuerte entre los espermatozoides y crioprotectores (liposomas y trehalosa) a tiempos largos y bajas frecuencias de deformación (Medina-Torres *et al.*, 2019).

Lo mencionado en el párrafo anterior se ilustra de manera gráfica mediante el diagrama de Han (**Figura 12**), el cual nos permite comparar

estas diferencias en la estructura de las muestras antes y después de la criopreservación, donde, la línea diagonal (donde $G'=G''$) determina la transición entre el comportamiento viscoso ($G'<G''$) y el elástico ($G'>G''$), de modo que los sistemas que se encuentren por encima de la línea diagonal, como en el caso del semen fresco, tienen un comportamiento predominantemente de un sólido viscoelástico, por otro lado, las muestras diluidas que se encuentran debajo de la línea diagonal tienen un comportamiento predominantemente de un líquido viscoelástico (Cai *et al.*, 2017). Es importante destacar que, en las muestras de semen diluidas, los datos correspondientes al medio de congelación experimental se acercaron más a la línea diagonal, lo que indica una mayor interacción entre los componentes del sistema.

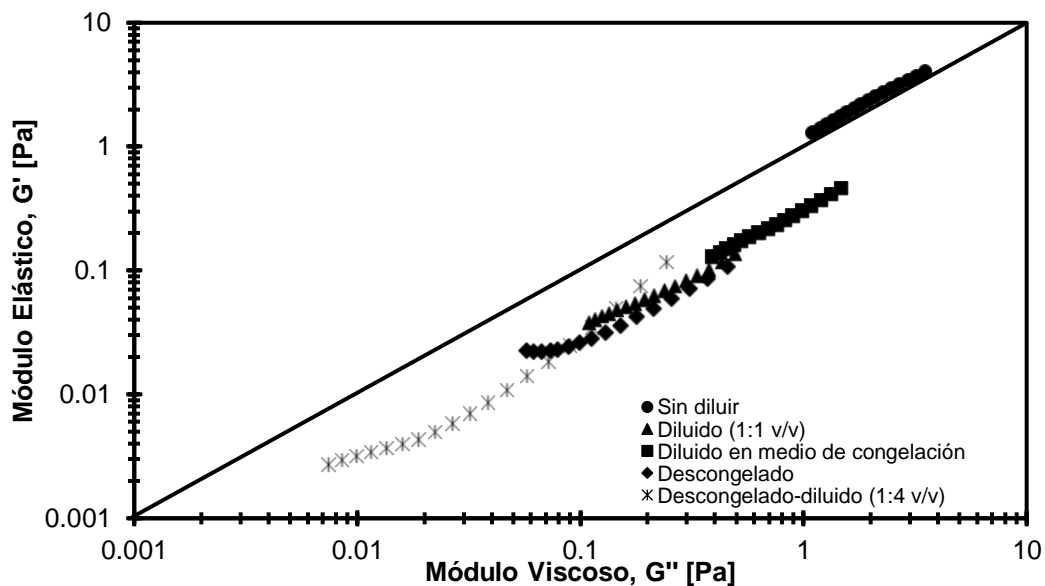


Figura 12. Pruebas oscilatorias en el semen porcino antes y después de la criopreservación espermática. Diagrama de Han.

Finalmente, es necesario mencionar que también se realizó un análisis reológico de las muestras de semen criopreservado con el medio de congelación control (sin liposomas), sin observarse diferencias en su

viscosidad en comparación con el medio experimental, esto debido a la presencia de trehalosa libre (resultados no presentados). Sin embargo, la presencia de liposomas cargados con trehalosa influyó ligeramente en las propiedades viscoelásticas (G') de las muestras de semen descongelado (Figura 13).

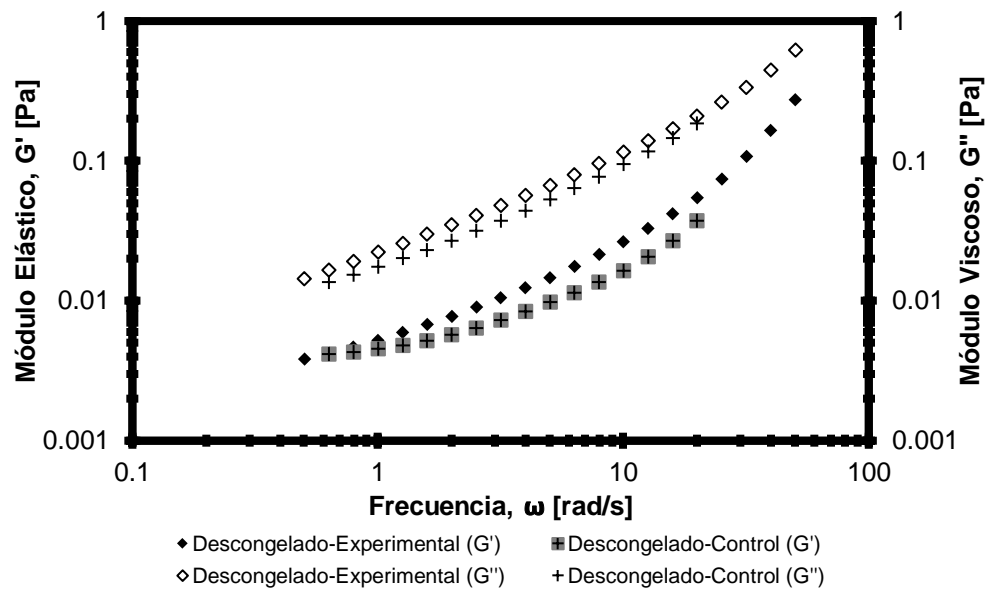


Figura 13. Pruebas oscilatorias en el semen porcino criopreservado, efecto del medio de congelación en las propiedades viscoelásticas al descongelado. Espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación (símbolos llenos son G' : módulo elástico y símbolos vacíos son G'' : módulo viscoso) como función de la frecuencia angular (ω) en escala logarítmica.

6.4 Análisis cromatográfico

El resultado obtenido de la curva de calibración demostró una relación lineal entre la concentración de trehalosa (5-25 mM) y el área de la señal detectada por el equipo, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.999.

Respecto al análisis de las muestras de semen porcino, se probaron dos protocolos para llevar a cabo la extracción de trehalosa. En el primer protocolo (P1) se utilizó la sonicación para provocar la lisis espermática,

entre tanto, el protocolo número 2 (P2) se basó en el uso de metanol y ciclos repetidos de congelación-descongelación ultrasónica. La **Tabla 3** presenta las concentraciones promedio de trehalosa, destacándose que la mayor concentración detectada en el grupo experimental se obtuvo mediante P2 (2.86 ± 0.39); sin embargo, no se observó diferencia significativa al comparar ambos métodos utilizados en el tratamiento de las muestras ($P>0.05$).

Tabla 3. Concentración promedio de trehalosa en muestras de semen descongelado (mg/mL)

Protocolo	Control	Experimental
P1	2.262 ± 0.619	2.809 ± 0.974
P2	3.238 ± 1.240	2.857 ± 0.393
Promedio	2.750 ± 0.657	2.833 ± 0.470

Los valores representan la media \pm error estándar. n=4
No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Respecto a los espermatozoides criopreservados del grupo control, se logró detectar una concentración de trehalosa similar a la observada en el grupo experimental para ambos protocolos de preparación de muestra ($P>0.05$), no obstante que la formulación del medio de congelación no incluyó liposomas cargados con trehalosa.

La incorporación de trehalosa al interior de células durante la congelación se ha reportado en células endocrinas de islotes pancreáticos (Beattie *et al.*, 1997), plaquetas (Gläfke *et al.*, 2012), fibroblastos (Zhang *et al.*, 2016) y espermatozoides de equino (Oldenhof *et al.*, 2017). Se sugiere que la transición de fase producida durante la congelación ocasiona un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática que permite la permeabilización de la trehalosa (Stewart y He, 2019). Por otro lado, la participación de los liposomas en la incorporación de trehalosa al interior de los espermatozoides criopreservados demostró ser mínima (**Tabla 3**). Lo

anterior coincide con Hlovati *et al.* (2009), quienes reportaron una baja concentración de trehalosa intracelular (15 mM) al utilizar liposomas en la criopreservación de eritrocitos humanos. Pese a los mínimos efectos adversos de los liposomas en comparación a otros métodos utilizados para la liberación intracelular de trehalosa, los resultados obtenidos a la fecha respecto a las concentraciones liberadas del azúcar son bajas y en algunos casos insuficientes para la crioprotección.

7 CONCLUSIONES y TRABAJOS FUTUROS

- Se logró la cuantificación de trehalosa intracelular mediante HPLC-ELSD en lisados de espermatozoides porcinos criopreservados en presencia de liposomas cargados con trehalosa.
- No se observó diferencia significativa entre las concentraciones de trehalosa intracelular obtenidas mediante dos protocolos diferentes de lisis espermática.
- La presencia de trehalosa a nivel intracelular (2.8 mg/mL) en espermatozoides porcinos no modifica significativamente los parámetros de viabilidad y motilidad progresiva al descongelado.
- El proceso de congelación-descongelación no alteró la viscosidad a la cizalla simple $\eta(\dot{\gamma})$ del semen porcino debido a la presencia de crioprotectores como trehalosa en el medio de congelación. Por el contrario, la criopreservación espermática si modificó la estructura (módulo elástico, G') del semen.
- Se sugiere continuar con las investigaciones empleando liposomas a base de lecitina de soya y trehalosa en los protocolos de congelación-descongelación de espermatozoides porcinos, con el fin de determinar las concentraciones requeridas para una máxima crioprotección.

8 REFERENCIAS

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Allgeier, M.C., Nussbaum, M.A., Risley, D.S., 2003. Comparison of an evaporative light-scattering detector and a chemiluminescent nitrogen detector for analyzing compounds lacking a sufficient UV chromophore. *LC-GC North Am.* 21, 376–381.
- Anaya, M.C.G., Barón, F.J., Guerrero, J.M., García-Marín, L.J., Gil, J., 2014. Increasing Extender Viscosity Improves the Quality of Cooled Boar Semen. *J. Agric. Sci.* 6, 12–22. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n3p12>
- Athurupana, R., Takahashi, D., Ioki, S., Funahashi, H., 2015. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 61, 205–210. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-152>
- Aydemir, B., Onaran, I., Kiziler, A.R., Alici, B., Akyolcu, M.C., 2008. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *J. Androl.* 29, 41–46. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003046>
- Bang, S., Tanga, B.M., Fang, X., Seong, G., Saadeldin, I.M., Qamar, A.Y., Lee, S., Kim, K., Park, Y., Hamad, A., Nabeel, T., Yu, I., Cooray, A., Lee, K.P., Cho, J., 2022. Cryopreservation of Pig Semen Using a Quercetin-Supplemented Freezing Extender. *Life* 12, 1155. <https://doi.org/10.3390/life12081155>
- Barnes, H.A., 2000. *A Handbook of Elementary Rheology*. University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth.
- Beattie, G.M., Crowe, J.H., Lopez, A.D., Cirulli, V., Ricordi, C., Hayek, A., 1997. Trehalose: A Cryoprotectant That Enhances Recovery and Preserves

- Function of Human Pancreatic Islets After Long-Term Storage. *Diabetes* 46, 519–523. <https://doi.org/10.2337/diab.46.3.519>
- Cai, J., Wirasaputra, A., Zhu, Y., Liu, S., Zhou, Y., Zhang, C., Zhao, J., 2017. The flame retardancy and rheological properties of PA6/MCA modified by DOPO-based chain extender. *RSC Adv.* 7, 19593–19603. <https://doi.org/10.1039/C6RA28293H>
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R., 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)
- Choudhury, A., Sonowal, K., Laskar, R.E., Deka, D., Dey, B.K., 2020. Liposome: a carrier for effective drug delivery. *J. Appl. Pharm. Res.* 8, 22–28. <https://doi.org/10.18231/j.joapr.2019.v.8.i.1.003>
- Corcini, C.D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, A.S., Torres, N.U., Lucia, T., 2011. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livest. Sci.* 138, 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.11.019>
- Coy, P., Gadea, J., Rath, D., Hunter, R.H.F., 2009. Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* 72, 1171–1179. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.011>
- Crowe, L.M., 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 131, 505–513. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00503-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00503-7)
- da Costa Morato Nery, D., da Silva, C.G., Mariani, D., Fernandes, P.N., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2008. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 1408–1411.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.05.011>

De Andrade, A.F.C., Grossfeld, R., Knox, R. V., 2022. In vitro effects of two different commercial freezing and thawing extenders on boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 236, 106906.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106906>

de Brito, C.R.C., Varela Junior, A.S., Gheller, S.M.M., Acosta, I.B., Ancuti, A.N., Gatti, N.L.S., Silva, E.A., Knabah, N.W., Corcini, C.D., 2021. High-speed centrifugation of extender of freeze-thaw boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 56, 821–825. <https://doi.org/10.1111/rda.13915>

Dong, R., Luo, L., Liu, X., Yu, G., 2022. Effects of riboflavin on boar sperm motility, sperm quality, enzyme activity and antioxidant status during cryopreservation. *Vet. Med. Sci.* 1–10. <https://doi.org/10.1002/vms3.833>

Dvořáčková, E., Šnóbllová, M., Hrdlička, P., 2014. Carbohydrate analysis: From sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *J. Sep. Sci.* 37, 323–337.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201301089>

Elizondo, E., Moreno, E., Cabrera, I., Córdoba, A., Sala, S., Veciana, J., Ventosa, N., 2011. Liposomes and Other Vesicular Systems, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. pp. 1–52.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00001-2>

Emanuele, E., Bertona, M., Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H., Lucia, A., 2014. Protective effect of trehalose-loaded liposomes against UVB-induced photodamage in human keratinocytes. *Biomed. Reports* 2, 755–759. <https://doi.org/10.3892/br.2014.310>

Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., Toner, M., 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 163–167.

<https://doi.org/10.1038/72608>

Fraser, L., Brym, P., Pareek, C.S., Mogielnicka-Brzozowska, M., Paukszto,

- Jastrzębski, J.P., Wasilewska-Sakowska, K., Mańkowska, A., Sobiech, P., Żukowski, K., 2020. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq. *Theriogenology* 142, 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.001>
- Ghorbanpour, M., Bhargava, P., Varma, A., Choudhary, D.K., 2020. Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems. Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2985-6>
- Gläufke, C., Akhoondi, M., Oldenhof, H., Sieme, H., Wolkers, W.F., 2012. Cryopreservation of platelets using trehalose: The role of membrane phase behavior during freezing. *Biotechnol. Prog.* 28, 1347–1354. <https://doi.org/10.1002/btpr.1600>
- González-Abreu, D., García-Martínez, S., Fernández-Espín, V., Romar, R., Gadea, J., 2017. Incubation of boar spermatozoa in viscous media by addition of methylcellulose improves sperm quality and penetration rates during in vitro fertilization. *Theriogenology* 92, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.016>
- Guo, H. tao, Wang, J. ran, Sun, L. zhen, Jin, X. hu, Shi, X. ying, Lin, J. yi, Yue, S. li, Zhou, J. bo, 2021. Effects of astaxanthin on plasma membrane function and fertility of boar sperm during cryopreservation. *Theriogenology* 164, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.007>
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, M. de L., Carvajal, S.U., Ortega, M.E.T., 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.02.003>
- Hayner, G.A., Khetan, S., Paulick, M.G., 2017. Quantification of the disaccharide trehalose from biological samples: a comparison of analytical methods. *ACS Omega* 2, 5813–5823. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01158>
- He, L., Bailey, J.L., Buhr, M.M., 2001. Incorporating Lipids into Boar Sperm

- Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential1. *Biol. Reprod.* 64, 69–79. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.69>
- He, W. hua, Zhai, X. hu, Duan, X. jun, Di, H. shuang, 2020. Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 21, 485–494. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900520>
- Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.01.010>
- Holovati, J.L., Gyongyossy-Issa, M.I.C., Acker, J.P., 2009. Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality. *Cryobiology* 58, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.002>
- Holovati, J.L., Gyongyossy-Issa, M.I.C., Acker, J.P., 2008. Effect of Liposome Charge and Composition on the Delivery of Trehalose into Red Blood Cells. *Cell Preserv. Technol.* 6, 207–218. <https://doi.org/10.1089/cpt.2008.0008>
- Horváth, A., Harnos, A., Szenci, O., Pribenszky, C., 2018. Investigation of hydrostatic pressure-induced stress preconditioning of boar semen using modified cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 1589–1593. <https://doi.org/10.1111/rda.13282>
- Hyakutake, T., Suzuki, H., Yamamoto, S., 2015. Effect of non-Newtonian fluid properties on bovine sperm motility. *J. Biomech.* 48, 2941–2947. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.08.005>
- Ichihara, H., Kuwabara, K., Matsumoto, Y., 2020. Trehalose liposomes induce apoptosis of breast tumor cells in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 532, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.037>
- Janmey, P.A., Georges, P.C., Hvidt, S., 2007. *Basic Rheology for Biologists.*

- Methods Cell Biol. 83, 1–27.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83001-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83001-9)
- Jia, B., Memon, S., Liang, J., Lv, C., Hong, Q., Wu, G., Quan, G., 2021. Trehalose modifies the protein profile of ram spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* 171, 21–29.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.004>
- Kralikova, M., Crha, I., Huser, M., Melounova, J., Zakova, J., Matejovicova, M., Ventruba, P., 2017. The intracellular concentration of homocysteine and related thiols is negatively correlated to sperm quality after highly effective method of sperm lysis. *Andrologia* 49, e12702.
<https://doi.org/10.1111/and.12702>
- Kus-Liśkiewicz, M., Górká, A., Gonchar, M., 2014. Simple assay of trehalose in industrial yeast. *Food Chem.* 158, 335–339.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.067>
- Leahy, T., Gadella, B.M., 2011. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 7–13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01799.x>
- Li, S.P., Zhao, G., Chen, H.Y., 2005. The relationship between steady shear viscosity and complex viscosity. *J. Dispers. Sci. Technol.* 26, 415–419.
<https://doi.org/10.1081/DIS-200054555>
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Fernandez-Fuertes, B., Recuero, S., Mateo, Y., Bonet, S., Barranco, I., Yeste, M., 2019. GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0370-5>
- López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yániz, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Núñez, J., Soler, C., 2005. Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 64, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.015>
- Luna-Orozco, J.R., González-Ramos, M.A., Calderón-Leyva, G., Gaytán-

- Alemán, L.R., Arellano-Rodríguez, F., Ángel-García, O., Véliz-Deras, F.G., 2019. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. *Iran. J. Vet. Res.* 20, 126–130.
- Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Cano, R., de Blas, I., Espinosa, E., 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* 61, 17–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.03.008>
- Matsumoto, Y., Kuwabara, K., Ichihara, H., Kuwano, M., 2016. Therapeutic effects of trehalose liposomes against lymphoblastic leukemia leading to apoptosis in vitro and in vivo. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26, 301–305.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.025>
- Medina-León, A.Z., Domínguez-Mancera, B., Cazalez-Penino, N., Cervantes-Acosta, P., Jácome-Sosa, E., Romero-Salas, D., Barrientos-Morales, M., 2019. Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Austral J. Vet. Sci.* 51, 119–123.
<https://doi.org/10.4067/s0719-81322019000300119>
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sanchez, B., Katthain, R., 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocoll.* 14, 417–424.
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00015-1)
- Medina-Torres, L., Núñez-Ramírez, D.M., Calderas, F., González-Laredo, R.F., Minjares-Fuentes, R., Valadez-García, M.A., Bernad-Bernad, M.J., Manero, O., 2019. Microencapsulation of gallic acid by spray drying with aloe vera mucilage (*aloe barbadensis miller*) as wall material. *Ind. Crops Prod.* 138, 111461. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.06.024>
- Men, N.T., Kikuchi, K., Nakai, M., Fukuda, A., Tanihara, F., Noguchi, J., Kaneko, H., Linh, N.V., Nguyen, B.X., Nagai, T., Tajima, A., 2013. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo

- development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 80, 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.001>
- Mendeluk, G., González Flecha, F.L., Castello, P.R., Bregni, C., 2000. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. *J. Androl.* 21, 262–267. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02104.x>
- Mendoza Viveros, C.D., 2016. La utilización de liposomas para la liberación intracelular de trehalosa y su efecto sobre la integridad y funcionalidad espermática de semen porcino criopreservado. Tesis Maest. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miguel-Jimenez, S., Rivera del Alamo, M.M., Álvarez-Rodríguez, M., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., Muiño, R., Rodríguez-Gil, J.E., Mogas, T., 2020. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 215, 106315. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>
- Ming-Ren, T., Chiu, G.N.C., 2013. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.011>
- Morris, G.J., Goodrich, M., Acton, E., Fonseca, F., 2006. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 52, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.01.003>
- Motta, J.P.R., Paraguassú-Braga, F.H., Bouzas, L.F., Porto, L.C., 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology* 68, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.007>
- Mozafari., M.R., 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 711–719.
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R.,

- Tar, M., Mohammadi Sangcheshmeh, A., 2019. Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology* 133, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.024>
- Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Riazi, G., Sharafi, M., Zhandi, M., Kastelic, J., Gholami, D., 2022. Supplementation of freezing medium with encapsulated or free glutathione during cryopreservation of bull sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 57, 515–523. <https://doi.org/10.1111/rda.14088>
- Nagy, S., Sinkovics, G., Kovács, A., 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Anim. Reprod. Sci.* 70, 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00189-0)
- Ohtake, S., Wang, Y.J., 2011. Trehalose: Current use and future applications. *J. Pharm. Sci.* 100, 2020–2053. <https://doi.org/10.1002/jps.22458>
- Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y., Sakurai, M., 2003. NMR and quantum chemical study on the OH... π and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12739–12748. <https://doi.org/10.1021/ja034777e>
- Oldenhof, H., Zhang, M., Narten, K., Bigalk, J., Sydykov, B., Wolkers, W.F., Sieme, H., 2017. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging. *Biol. Reprod.* 97, 892–901. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox142>
- Pearodwong, P., Suwimonteerabutr, J., Rungruangsak, J., Tummaruk, P., 2019. Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar semen. *Vet. Stanica* 50, 531–540.

- Perez-Patiño, C., Barranco, I., Li, J., Padilla, L., Martínez, E.A., Rodríguez-Martínez, H., Roca, J., Parrilla, I., 2019. Cryopreservation differentially alters the proteome of epididymal and ejaculated pig spermatozoa. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071791>
- Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F., Sánchez, R.S., 2019. Preservation of boar semen: An update. *Reprod. Domest. Anim.* 54, 423–434. <https://doi.org/10.1111/rda.13389>
- Pezo, F., Zambrano, F., Uribe, P., Risopatrón, J., Moya, C., Cesar de Andrade, A.F., Burgos, R.A., Yeste, M., Sánchez, R., 2020. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: Effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. *Cryobiology* 97, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.015>
- Robson, A.L., Dastoor, P.C., Flynn, J., Palmer, W., Martin, A., Smith, D.W., Woldu, A., Hua, S., 2018. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Front. Pharmacol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00080>
- Roca, J., Perez-Patiño, C., Barranco, I., Padilla, L.C., Martínez, E.A., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., 2020. Proteomics in fresh and preserved pig semen: Recent achievements and future challenges. *Theriogenology* 150, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.066>
- Rodríguez-Martínez, H., Wallgren, M., 2011. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet. Med. Int.* 2011, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/396181>
- Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., Wolkers, W.F., 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 76, 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.015>
- Rubessa, M., Lotti, S.N., Kandel, M.E., Popescu, G., Wheeler, M.B., 2019. SLIM microscopy allows for visualization of DNA-containing liposomes designed for sperm-mediated gene transfer in cattle. *Mol. Biol. Rep.* 46,

695–703. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4525-9>

Saadeldin, I.M., Khalil, W.A., Alharbi, M.G., Lee, S.H., 2020. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals* 10, 2281. <https://doi.org/10.3390/ani10122281>

Sampedro, J.G., Uribe, S., 2004. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition . The role of viscosity. *Mol. Cell. Biochem.* 256, 319–327.

<https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009878.21929.eb>

Scott, K.L., William, N., Acker, J.P., 2022. The response of a human haematopoietic cell line to trehalose-loaded liposomes and their effect on post-thaw membrane integrity. *Cryobiology* 106, 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.03.005>

Shepherd, M.J., Herickhoff, L.A., 2022. A novel experimental design for boar sperm cryopreservation. *J. Anim. Sci.* skac169.

<https://doi.org/10.1093/jas/skac169>

Simonik, O., Bubenickova, F., Tumova, L., Frolikova, M., Sur, V.P., Beran, J., Havlikova, K., Hackerova, L., Spevakova, D., Komrskova, K., Postlerova, P., 2022. Boar sperm cryopreservation improvement using semen extender modification by dextran and pentaisomaltose. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12070868>

Soares, S.L., Ancuti, A.N., Dias, L., Corcini, C.D., Varela, A.S., Komninou, E.R., Tebaldi, M.L., Marques, M.G., Fonseca, F.N., Lucia, T., 2020. Safety assessment of poly(N-vinylcaprolactam) as a potential drug carrier in extenders for boar sperm cryopreservation. *Toxicol. Vitr.* 65, 104766. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104766>

Soares, S.L., Brito, C.R.C., Ancuti, A.N., Gatti, N.C., Corcini, C.D., Varela, A.S., Marques, M.G., Fonseca, F.N., Komninou, E.R., Lucia, T., 2021. Nanocarried antioxidants in freezing extenders for boar spermatozoa. *Andrologia* 53, 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.14199>

- Song, Y.S., Kang, C., Jeong, J., Kim, K.-O., Lim, E., 2018. Rheological Analysis of Live and Dead Microalgae Suspensions. *J. Korean Phys. Soc.* 72, 858–862. <https://doi.org/10.3938/jkps.72.858>
- Stefanic, M., Ward, K., Tawfik, H., Seemann, R., Baulin, V., Guo, Y., Fleury, J., Drouet, C., 2017. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials* 140, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.06.018>
- Stewart, S., He, X., 2019. Intracellular Delivery of Trehalose for Cell Banking. *Langmuir* 35, 7414–7422. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02015>
- Stillwell, W., Wassall, S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids* 126, 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4)
- Sullivan, R., Saez, F., 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 146, R21–R35. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0058>
- Sun, L., Fan, X., Zeng, Y., Wang, L., Zhu, Z., Li, R., Tian, X., Wang, Y., Lin, Y., Wu, D., Zeng, W., 2020. Resveratrol protects boar sperm in vitro via its antioxidant capacity. *Zygote* 28, 417–424. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000271>
- Torres, M.A., Monteiro, M.S., Passarelli, M.S., Papa, F.O., Dell'Aqua, J.A., Alvarenga, M.A., Martins, S.M.M.K., de Andrade, A.F.C., 2019. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology* 86, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.004>
- Tung, C.K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A.G., Ardon, F., Wu, M., Suarez, S.S., 2017. Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Sci. Rep.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03341-4>
- Uchida, T., Furukawa, M., Kikawada, T., Yamazaki, K., Gohara, K., 2017.

- Intracellular trehalose via transporter TRET1 as a method to cryoprotect CHO-K1 cells. *Cryobiology* 77, 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.05.008>
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K.F., Johnson, L., 2019. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology* 137, 2–7.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>
- Wang, B., Liu, G., Balamurugan, V., Sui, Y., Wang, G., Song, Y., Chang, Q., 2019. Apatite nanoparticles mediate intracellular delivery of trehalose and increase survival of cryopreserved cells. *Cryobiology* 86, 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.11.002>
- Yeste, M., 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85, 47–64.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Yeste, M., Rodríguez-Gil, J.E., Bonet, S., 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 802–813.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22840>
- Yoshida, K., Ono, F., Chouno, T., Nakada, S., Ikegami, Y., Shirakigawa, N., Sakai, Y., Ijima, H., 2021. Creation of a novel lipid-trehalose derivative showing positive interaction with the cell membrane and verification of its cytoprotective effect during cryopreservation. *J. Biosci. Bioeng.* 132, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.010>
- Zaferani, M., Javi, F., Mokhtare, A., Li, P., Abbaspourrad, A., 2021. Rolling controls sperm navigation in response to the dynamic rheological properties of the environment. *Elife* 10, 1–34.
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.68693>
- Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H., Wolkers, W.F., 2016. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 1400–1409.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.020>

Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z., 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African J. Biotechnol.* 8, 6476–6480.

<https://doi.org/10.5897/AJB09.1070>

RESPUESTA MECANICA AL FLUJO DEL SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS CARGADOS CON TREHALOSA

Mendoza C¹, Medina L², Gutiérrez O³, Bernad M², Trujillo M¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM, ²Facultad de Química – UNAM

Correspondencia con autor: denisse_mendez@hotmail.com

Palabras claves: espermatozoide porcino, criopreservación, reología, viscosidad, viscoelasticidad

Introducción

La conservación de los eyaculados porcinos involucra su dilución previa en medios comerciales y su almacenamiento hasta por 10 días a una temperatura de 16-18 °C. La composición de los diluyentes comerciales se basa principalmente en un buffer, nutrientes, protectores térmicos, minerales y antibióticos¹, con viscosidades similares a la presentada por el agua (1 Cps). No obstante, es importante considerar la viscosidad del medio donde se encuentran suspendidas las células por el efecto benéfico de esta propiedad en la conservación celular. Se sugiere que al estar en un medio viscoso las células reducen su demanda metabólica; no sedimentan, distribuyéndose de manera uniforme y se previenen fluctuaciones de pH²⁻⁴.

Adicionalmente, un bajo porcentaje de las IA en la especie porcina se realizan con semen criopreservado. El proceso de congelación espermática implica la utilización de crioprotectores que minimicen las alteraciones celulares generadas tras el shock térmico. El glicerol y trehalosa son crioprotectores eficientes en la congelación de eyaculados de cerdo⁵, observándose, además, la capacidad de estas sustancias para incrementar la viscosidad del medio externo de la célula durante la congelación⁶⁻⁷.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es analizar la respuesta reológica del semen porcino, así como determinar cambios en su microestructura al descongelado.

Material y Métodos

La caracterización de las propiedades reológicas se realizó analizando 2 muestras de semen de verracos probados pertenecientes al C.E.I.E.P.P. (FMVZ-UNAM). Las condiciones evaluadas correspondientes a las distintas condiciones del protocolo de criopreservación son: a) fresco, b) diluido en diluyente comercial (Androstar Plus, Minitube, Alemania), c) diluido en medio de congelación (10% de liposomas cargados con trehalosa, 10% de yema de huevo, 300 mM de trehalosa y 3% de glicerol), d) descongelado y e) descongelado diluido en diluyente comercial. Se utilizó un reómetro de esfuerzos controlados modelo TA Instruments Discovery HR3[®] con una geometría de cilindros concéntricos. Las pruebas al flujo a la cizalla simple se llevaron a cabo en un rango de 1 a 100 s⁻¹, mientras que las pruebas de flujo a la cizalla oscilatoria (componentes viscoelásticos G' y G'') se llevaron a cabo en la región viscoelástica lineal ($\gamma=30\%$) a 37 °C, en una ventana de observación de 0.1 a 300 rad/s.

Resultados y Discusión

A partir de los resultados obtenidos en las curvas de viscosidad a la cizalla simple (Fig. 1a) se determinó el carácter no newtoniano de tipo adelgazante al flujo ($n < 1$)

del semen de cerdo. Al reconstituir las muestras en el medio de congelación se observó una mayor viscosidad, ocasionada principalmente por los crioprotectores⁸, la cual se mantuvo incluso tras su congelación-descongelación. Al diluir los eyaculados en un medio comercial (1:4 v/v) su viscosidad disminuyó un orden de magnitud, lo que es relevante dado el efecto protector que implica el mantener las células en un medio viscoso. Respecto a las pruebas de flujo a la cizalla oscilatorias (Fig. 1b), se observó una respuesta viscoelástica con un predominio del componente elástico sobre el viscoso en los eyaculados de cerdo fresco ($G' > G''$), mientras que en las muestras diluidas el módulo viscoso predominó sobre el módulo elástico ($G'' > G'$), es decir cambio su estructura. El proceso de criopreservación igualmente alteró la estructura de las muestras (G'), lo que se explica por la pérdida de las interacciones entre los componentes del medio y los espermatozoides con la membrana plasmática alterada⁹.

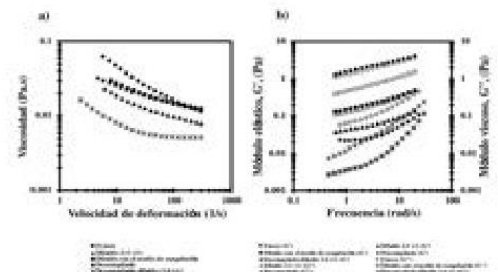


Fig. 1 Caracterización reológica del semen porcino antes y después de la criopreservación; a) curvas de viscosidad (viscosidad vs velocidad de deformación, $\dot{\gamma}$) y b) curvas de viscoelasticidad (G' vs G'' vs frecuencia, ω).

Conclusión

La respuesta reológica de las muestras de semen porcino durante la criopreservación corrobora su estabilidad mecánica al flujo, observándose un cambio en sus propiedades reológicas al diluirse en un medio de congelación que contiene trehalosa y posterior al descongelado. Los estudios del comportamiento viscoelástico del semen porcino criopreservado pueden ser la base para diseñar pruebas de calidad seminal.

Referencias

1. Pezo, F et al. *Reprod Domest Anim* 2019, 54:423-434.
2. Nagy, S et al. *Anim Reprod Sci* 2002, 70:283-286.
3. López-Gatius, F et al. *Theriogenology* 2005, 64:252-260.
4. Corcini, CD et al. *Livest Sci* 2011, 138:289-292.
5. Gutiérrez, O et al. *Cryobiology* 2009, 58:287-292.
6. Morris, GJ et al. *Cryobiology* 2006, 52:323-334.
7. Rodríguez-Martínez, H et al. *Vet Med Int* 2011, 2011:1-5.
8. Sampedro, JG et al. *Mol Cell Biochem* 2004, 256:319-327.
9. Song, YS et al. *J Korean Phys Soc* 2018, 72:858-862.

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEL SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS CARGADOS CON TREHALOSA.

Claudia Denisse Mendoza Viveros^{1*}, Luis Medina Torres², Oscar Gutiérrez Pérez¹, María Josefa Bernad Bernad², María Elena Trujillo Ortega¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, ²Facultad de Química-UNAM
[*denisse_mendoz@hotmail.com](mailto:denisse_mendoz@hotmail.com)

Palabras clave: Semen porcino, criopreservación, viscoelasticidad

INTRODUCCIÓN

La conservación de los eyaculados porcinos involucra su dilución previa en medios comerciales con viscosidades similares a la presentada por el agua (1 Cps). No obstante, es importante considerar la viscosidad del medio donde se encuentran suspendidas las células por el efecto benéfico de esta propiedad en la conservación celular. Se sugiere que al estar en un medio viscoso los espermatozoides reducen su demanda metabólica, no sedimentan y se previenen fluctuaciones de pH (Corcini *et al.*, 2011). Adicionalmente, un bajo porcentaje de las inseminaciones artificiales en cerdos se realizan con semen criopreservado. La congelación espermática implica el uso de crioprotectores que minimicen las alteraciones celulares generadas tras el shock térmico. La trehalosa es un crioprotector no permeable eficiente en la congelación de eyaculados de cerdo, atribuyéndole, además, la capacidad para incrementar la viscosidad del medio externo de la célula durante la congelación (Sampedro y Uribe, 2004). La reología es la ciencia encargada del estudio del flujo y la deformación de los materiales (viscosidad y elasticidad). Aplicada a materiales biológicos, la reología nos permite un mejor entendimiento sobre la respuesta a nivel macroestructural de la interacción de las células con su entorno (Janmey *et al.*, 2007).

OBJETIVO

Analizar la respuesta reológica del semen porcino criopreservado en presencia de liposomas cargados con trehalosa, así como determinar los cambios en las propiedades viscoelásticas (microestructura) al descongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las propiedades reológicas se analizaron en 2 muestras de semen de verracos pertenecientes al C.E.I.E.P.P. (FMVZ-UNAM). Las condiciones evaluadas correspondientes a las distintas condiciones del protocolo de criopreservación fueron: a) fresco, b) diluido en diluyente comercial (Androstar Plus, Minitube, Alemania), c) diluido en medio de congelación (10% de liposomas cargados con trehalosa, 10% de yema de huevo, 300 mM de trehalosa y 3% de glicerol), d) descongelado y e) descongelado diluido en diluyente comercial. Se utilizó un reómetro de esfuerzos controlados modelo TA Instruments Discovery HR3[®] con una geometría de cilindros concéntricos. Las pruebas al flujo a la cizalla simple (viscosidad) se llevaron a cabo en un rango de 1 a 100 s⁻¹, mientras que las pruebas de flujo a la cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación (viscosidad compleja y propiedades viscoelásticas) se llevaron a cabo en la región viscoelástica lineal ($\gamma=30\%$) a 37 °C, en una ventana de observación de 0.1 a 300 rad/s. Los datos experimentales se obtuvieron y analizaron directamente en el software TA Rheology Advantage Data Analysis V.5.7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de flujo a la cizalla simple se muestran en la Figura 1, destacándose el comportamiento no newtoniano de tipo adelgazante al flujo ($n<1$) del semen de cerdo. La dilución de los eyaculados en un medio de conservación comercial implicó la disminución de su viscosidad en un orden de magnitud, lo que resulta relevante si se considera el efecto de la viscosidad en la conservación celular (Corcini *et al.*, 2011). Por el contrario, al reconstituir las células en el medio de congelación se observó una mayor viscosidad, la cual se mantuvo después de su congelación-descongelación, no obstante, el daño oxidativo ocasionado durante el proceso de criopreservación. Este comportamiento puede ser atribuido a la presencia de la trehalosa, cuyo mecanismo de acción involucra un incremento en la viscosidad del medio que la contiene (Sampedro y Uribe, 2004).

Research Article

Cite this article: Mendoza-Viveros CD *et al.* (2022). Boar semen cryopreserved with trehalose-containing liposomes: disaccharide determination and rheological behaviour. *Zygote*, page 1 of 8. doi: 10.1017/S0967199422000442

Received: 17 January 2022

Revised: 17 June 2022

Accepted: 14 July 2022


Keywords:

Frozen-thawed boar sperm; Liposomes; Rheology; Trehalose; Viscoelastic behaviour

Author for correspondence:

María Elena Trujillo-Ortega, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico. Tel: +52 555622 5869/+52 555622 5870. E-mail: elenam@unam.mx

Boar semen cryopreserved with trehalose-containing liposomes: disaccharide determination and rheological behaviour

Claudia Denisse Mendoza-Viveros¹ , Oscar Gutiérrez-Pérez¹, María Josefa Bernad-Bernad², Luis Medina-Torres², Minerva Monroy-Barreto², Miquel Gimeno² and María Elena Trujillo-Ortega¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 Ciudad de México, Mexico and ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 Ciudad de México, Mexico

Summary

This study aimed to detect intracellular trehalose in boar sperm that were cryopreserved with liposomes and conduct an analysis of its effects on some characteristics of thawed sperm, including rheological properties. First, soybean lecithin cholesterol-based liposomes were produced and characterized in the presence of 300 mM trehalose. Next, semen samples were frozen in two freezing media: a control medium with 300 mM trehalose and an experimental medium supplemented with 300 mM trehalose and 10% liposomes, both of which were thawed and then studied to ascertain their integrity, motility, rheological response, and trehalose quantities by testing two methods of spermatic lysis via high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector (HPLC-ELSD). The results found spherical liposomes measuring 357 nm that were relatively stable in an aqueous medium and had an entrapment efficiency of 73%. An analysis of the cryopreserved ejaculates showed that their viability and motility did not significantly differ between groups ($P > 0.05$). The viscous response of the samples was influenced by the extracellular medium rather than by the freezing-thawing process, which resulted in a loss of interaction between the cells and cryoprotectants. Finally, intracellular trehalose levels were determined using HPLC-ELSD, with no differences observed ($P > 0.05$) when comparing both sperm lysis methods. The use of liposomes with trehalose appears to be a promising option for boar semen cryopreservation, with a marked effect on rheological properties. The proposed HPLC-ELSD method was effective for measuring trehalose in cryopreserved cell samples.

Introduction

The extreme conditions to which sperm are subjected during the cryopreservation process result in several changes that diminish their fertilizing capacity (Waberski *et al.*, 2019). To reduce this damage to sperm cells, various cryoprotective agents are used in freezing-thawing protocols. Trehalose (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) is a disaccharide that is used as a nonpermeable cryoprotectant because it does not permeate the plasma membrane and exerts its effects at the extracellular level (Yeste, 2016). It acts by forming complexes with the biomacromolecules of the plasma membrane through hydrogen bonds, replacing water molecules, decreasing phospholipid-phase transition temperatures, preventing protein denaturalization, promoting an increase in the viscosity of the medium, and reducing the effects of lipid oxidation (Crowe, 2002; Oku *et al.*, 2003; Sampedro and Uribe, 2004).

While it has been reported that trehalose maintains boar sperm quality upon thawing (Athurupana *et al.*, 2015; Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009), trehalose must be present on both sides of the lipid bilayer to exercise its cryoprotective function by neutralizing reactive oxygen species (ROS) (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008; Herdeiro *et al.*, 2006). Although the above hypothesis has now been confirmed in several types of cells (Eroglu *et al.*, 2000; Holovati *et al.*, 2009; Motta *et al.*, 2014; Stefanic *et al.*, 2017; Uchida *et al.*, 2017), it has still not been confirmed for sperm.

Trehalose exercises its antioxidant function through interactions that are carried out via hydrogen bonds between disaccharides (α , α -1,1) and the double bonds of unsaturated fatty acids (Oku *et al.*, 2003). Docosahexaenoic acid (22:6n-3) is the most plentiful fatty acid in the boar-sperm membrane. As this fatty acid is particularly sensitive to lipid peroxidation during freezing (Cerolini *et al.*, 2000), the use of cryoprotectants is recommended to minimize damage at that level.

Several methods of facilitating the intracellular incorporation of trehalose have been described, and one example is liposomes. These vesicles were quickly identified as being an

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution and reproduction, provided the original article is properly cited.



efficient means of releasing molecules due to their biocompatibility and low toxicity levels (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Toh and Chiu, 2013). Research into erythrocytes (Holovati *et al.*, 2009) and stem cells obtained from umbilical cord blood (Motta *et al.*, 2014) has shown that liposomes are an efficient means of facilitating the permeabilization of trehalose.

Holovati *et al.* (2009) asserted that the extent to which trehalose exerts cryoprotective effects depends on its concentration. This research stresses the importance of determining the specific cryoprotective concentration for each type of cell. One of the techniques that has been described for analyzing trehalose is high-performance liquid chromatography (HPLC), which can be used in conjunction with high-sensitivity evaporative light-scattering detection (ELSD) (Allgeier *et al.*, 2003; Dvořáčková *et al.*, 2014). ELSD detection represents an alternative to the inconveniences inherent in chemical derivatization as trehalose is an analyte that lacks chromophores (Allgeier *et al.*, 2003).

Therefore, this study used HPLC in conjunction with ELSD to determine the intracellular presence of trehalose in boar sperm cryopreserved with liposomes after conducting a preliminary analysis of its effects on the integrity, progressive motility, and rheological behaviour of sperm upon thawing. To the best of our knowledge, there have been no reports of trehalose use at the intracellular level in sperm cells.

Materials and methods

The experimental procedures in this work that involved animals were approved by the Internal Committee for the Care and Use of Animals of the Autonomous National University of Mexico (Spanish acronym: UNAM).

The reagents used to prepare liposomes and for cryopreserving sperm, namely, soybean lecithin, cholesterol, and trehalose, were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glycerol and phosphate-buffered saline solution (PBS) were obtained from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Dichloromethane (analytical grade), acetonitrile, and methanol (HPLC grade) were acquired from JT Baker, whereas trichloroacetic acid was obtained from Mallinckrodt AR (Paris, KY, USA).

Preparation and characterization of the liposomes

The liposomes were formulated using lecithin (3 mM), cholesterol (2 mM) at a 6:4 molar ratio, trehalose (300 mM), and glycerol (3% v/v) in a PBS (e.g. NaH₂PO₄·H₂O, NaCl and NaOH; 0.1 M, pH 7.45). The liposomes were prepared using a heating method with the adaptations proposed by Linares-Alba *et al.* (2016). After heating the PBS-diluted cholesterol to 83°C while stirring at 750 rpm for 15 min, the remaining constituents of the formula were added, the final volume was adjusted with PBS, and N₂ was applied. After heating the mixture to 75°C with constant stirring (750 rpm, 35 min), it was kept at room temperature for 60 min. The mixture was extruded and subsequently sterilized under aseptic conditions using a 0.45-µm Millex PVDF Millipore syringe filter (Billerica, MA, USA) in the first case and a 0.22-µm Millex PVDF Millipore syringe filter in the second case. The liposomes were refrigerated until used.

The liposome properties that were evaluated were particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), morphology, and entrapment efficiency (EE%).

Particle size and PDI: The analysis was carried out via dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS analyzer ZEN

3600 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK.) at a temperature of 25°C and a detection angle of 173°. Each dispersion was analyzed three times, and the average of the three results was reported.

Zeta potential (ζ): The zeta potential was determined via electrophoretic light scattering (ELS) using the aforementioned Zetasizer Nano-ZS ZEN 3600, each dispersion was analyzed three times, and the average of the three results was reported.

Morphology: The appearance of the liposomes was studied using transmission electron microscopy (TEM) and a JEOL JEM 1200EX II transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) with ×10,000 magnification and using uranyl acetate at 2% as a negative stain.

Entrapment efficiency (EE%): The entrapment efficiency of the liposomes was determined by determining the amount of trehalose via HPLC with an Infinity LC 1260 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) adapted to work with a 1290 Infinity evaporative light-scattering detector (Agilent Technologies) and an 8-µm (300 × 7.7 mm) Hipler H Agilent PL1170-6830 column. The mobile phase consisted of HPLC-grade water filtered through a 0.22-µm membrane. The injection volume was 1 µl, while a flow rate of 0.6 ml/min and temperature of 65°C were used. Before carrying out the chromatographic analysis of the liposomes, a calibration curve was plotted using aliquots with known trehalose concentrations (e.g. 0.1 to 10 mg/ml), and each aliquot was analyzed three times.

To measure the trehalose amounts in the liposome suspensions, it was necessary to centrifuge the latter at 14,000 g for 40 min to separate the liposomes in the samples using Amicon® Ultra 0.5 ml, 10K Centrifugal Filters (Millipore Co, Billerica, MA, USA). The liposomes were recovered by placing the same filter face-downward in a clean tube and centrifuging the sample again at 14,000 g for 10 min. Dichloromethane (1:1 v/v) was used to lyse the liposomes, and the sample was vortexed for 2 min before finally obtaining the aqueous phase for analysis.

The entrapment efficiency was calculated based on the formula shown below. The total trehalose values were obtained in the chromatographic analysis of the lysed liposomes, without having them undergo a separation protocol with the Amicon® filter:

$$EE\% = \frac{\text{Entrapped trehalose}}{\text{Total trehalose}} \times 100$$

Freezing-thawing method

Fifteen ejaculates were obtained from four mature boars that were provided by the Center for Education, Research and Extension in Swine Production (Spanish acronym: CEIEPP) of UNAM and were evaluated and diluted (1:1 v/v) in a commercial extender (Androstar Plus, Minitube, Tiefenbach, Germany). Only those ejaculates with progressive motilities greater than 85% and less than 20% abnormalities were accepted.

Two freezing media, an experimental medium and control medium, were evaluated. The experimental medium was composed of 10% liposomes, 10% egg yolk, 300 mM trehalose, and 3% glycerol. For the control medium, a tested extender containing 20% egg yolk and no liposomes was used (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009). The freezing medium used during the freezing process were split into two parts, namely, Part A without glycerol and Part B with glycerol.

Sperm samples with concentrations adjusted to 600 × 10⁶ cells/ml were centrifuged for 10 min at 800 g. Supernatants were removed, and

Part A of the freezing medium was added to the pellets. The samples were kept at room temperature for 60 min, then at 16°C for 60 min, and finally at 4°C for 120 min. Part B of the freezing medium was gradually added to these samples over a period of 30 min.

The samples were placed in 0.5-ml straws, sealed with polyvinyl alcohol, exposed to liquid nitrogen vapour (−130 to −150°C) for 20 min, and finally conserved in liquid nitrogen (−196°C). At 15 days after being frozen, they were thawed in a water bath at 36°C for 30 s, and the contents of the straws were diluted with a commercial extender (Androstar Plus) (1:4 v/v).

Post-thaw sperm assessment

The viability and progressive motility of the sperm were studied by analyzing the contents of three straws per control and experimental treatment 10 min after thawing.

Cell viability: The percentages of living cells upon thawing were determined by eosin–nigrosin staining (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009). After diluting the semen sample with the stain (1:8 v/v) and then incubating it at 37°C for 5 min, smears were taken and left to dry at room temperature. The evaluation consisted of distinguishing the live (unstained) cells from the dead (stained) cells with a ×100 optical microscope by examining at least 200 cells.

Progressive motility: Motility was ascertained by placing a drop of the sample on a pretempered slide (37°C) with a coverslip and observing the sample with an optical microscope (×10 and ×40).

Ultrastructure of the sperm: TEM was used to study the ultrastructure of the cryopreserved sperm in the presence of trehalose-containing liposomes, and the samples were fixed with 3% glutaraldehyde. After being postfixed with osmium tetroxide (OSO₄) at 1%, the samples were dehydrated with ethanol at concentrations of 30% to 100%, with acetonitrile being used between the dehydration of the samples and their embedding in EPON resin. The samples were contrasted using uranyl acetate at 2% and lead citrate at 2% and were examined with a JEOL JEM 1200EX II transmission electron microscope.

Rheological analysis

Characterization of the rheological properties was conducted by studying the ejaculates from two different boars to ensure that the test was replicable. The semen samples were analyzed under the different cryopreservation protocol conditions (e.g. fresh, diluted with commercial extender, diluted with freezing medium, thawed, and thawed–diluted in a commercial extender) using a stress-controlled DHR3+ Discovery Hybrid Rheometer with a concentric-cylinder geometry (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). The steady simple shear flow tests were carried out over a range 1–100 s^{−1}, whereas the linear oscillatory shear flow tests used to estimate the viscoelastic properties (storage modulus, G′ and loss modulus, G″) were carried out under small-amplitude oscillatory flow ($\gamma = 30\%$) at a constant temperature of 37°C (circulating water bath, Cole-Parmer Polystat, and Peltier AR-G2) with an observation window of 0.1–300 rad/s. Experimental data were obtained and analyzed directly using TA Rheology Advantage Data Analysis v.5.7.0 (TA Instrument Ltd, Crawley, UK) software.

Chromatographic analysis

The analysis was carried out by means of HPLC using an Agilent Technologies HPLC Infinity Quaternary 1260 system that was adapted to work with a PL-ELS 1000 ELSD detector (Polymer

Table 1. Physical characterization of liposomes

Size (nm)	357 ± 23.22
PDI	0.43 ± 0.01
ζ (mV)	−18.13 ± 0.47

The values presented are the means ± standard error (SE) of the three measurements that were taken.

Laboratories, Amherst, MA, USA) and a 250 × 4.6 mm Unison UK-Amino column (Imtakt, Kyoto, Japan).

Chromatographic conditions: 70% acetonitrile and 30% HPLC-grade water were filtered through a 0.22-μm membrane and used in the mobile phase. The injection volume was 0.5 μl of sample at a flow rate of 0.7 ml/min and temperature of 60°C.

Calibration curve: The calibration curve was constructed using aliquots with known trehalose concentrations (e.g. 5–25 mg/ml) that were dissolved in ultrapure water.

Sample preparation: Samples of four thawed ejaculates were centrifuged for 10 min at 800 g, and the supernatants were removed. Sperm lysis was carried out on the pellets obtained to evaluate the effectiveness of the two protocols. The first protocol (P1) consisted of reconstituting the pellets with 450 μl of ultrapure water and vortexing for 2 min. The samples were then ultrasonicated in VCX 500 ultrasonic processors (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) for 30 min at 30% amplitude. Next, 50 μl of trichloroacetic acid was added to the samples, which were centrifuged at 14,000 g for 15 min. Finally, the supernatants were recovered, filtered through a 0.45-μm nylon syringe filter and analyzed via HPLC.

The second cell lysis protocol (P2) was based on the findings reported by Kralikova *et al.*, (2017) but with some changes. Cell pellets were reconstituted with 450 μl of 80% methanol and incubated for 60 min at room temperature. Five freezing processes were carried out using liquid nitrogen and ultrasound thawing at 36°C, after which 50 μl of trichloroacetic acid was added. The samples were then centrifuged again for 15 min at 14,000 g. Finally, after the supernatants had been recovered and filtered using a 0.45-μm Millex-HN nylon filter, chromatographic analysis was carried out.

Statistical analysis

The regression coefficients for the calibration curves, the results of the variance analysis, and mean differences (as determined by Tukey's test) were calculated using Version 20 of the IBM SPSS statistical package. The distribution of sperm evaluation data was normal.

Results

Characterization of the liposomes

The results of the liposome characterization are shown in Table 1. DLS analysis revealed the presence of particles with an average size of 357 nm. The PDI of the liposomes was 0.4, which indicated that the sample was moderately homogeneous with respect to the vesicle sizes. The electrostatic stability of the dispersion was evaluated based on the ζ value (e.g. −18.13 mV) and was considered moderate. The surface load of the vesicles that were obtained was negative.

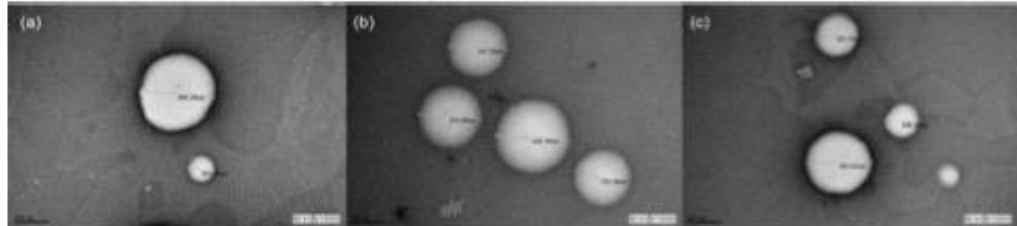


Figure 1. (a–c) TEM micrographs of trehalose-containing liposomes.

The TEM images confirmed the formation of liposomes (Figure 1) and showed spherical electron-lucid vesicles that were surrounded by electron-dense edges. The average diameter of the liposomes that were observed measured ~ 325 nm. This was consistent with the DLS data.

The chromatographic analysis provided a determination coefficient (R^2) of 0.993, obtained from the calibration curve. This indicated a strong correlation between the concentrations used in the standards and the areas below the peaks. A total trehalose concentration of 94.6 ± 0.5 mg/ml was observed in the liposome-dispersion samples, while the trehalose concentration found in the vesicles was 69.4 ± 3.8 mg/ml, with a 73% entrapment efficiency. A trehalose retention time of 8.383 min was observed in the chromatogram.

Post-thaw sperm assessment

The resulting semen quality that was observed upon thawing is presented in Table 2, and shows that the levels of viability and progressive motility of the thawed semen did not differ significantly from the results that were obtained for the freezing medium that were used ($P > 0.05$). Although no significant differences were found for the studied variables, the largest percentage of viable spermatozoa (28%) was found in the ejaculates that were cryopreserved in the presence of trehalose-containing liposomes whereas, in contrast, a smaller percentage of spermatozoa with progressive movement was found in the experimental group.

The TEM images (Figure 2) showed cryopreserved spermatozoa from the experimental medium that remained structurally intact (Figure 2a), along with cells with changes commonly associated with the freezing–thawing process. Additionally, vesicles that, due to their appearance, were identified as liposomes interacted with the plasma membrane of the cryopreserved spermatozoa (Figure 2b).

Rheological analysis

The results obtained from the simple shear viscosity tests (Figure 3a) showed that the boar semen examined was a non-Newtonian shear-thinning fluid, that is, the viscosity decreases with respect to shear rate (shear-thinning behaviour, $n < 1$). Furthermore, no variations were observed in the sample viscosities before and after cryopreservation. When diluted with a commercial extender (1:4 v/v), the sample viscosities were one order of magnitude less while retaining their non-Newtonian shear-thinning properties ($n < 1$). Conversely, the linear viscoelastic oscillatory test (Figure 3b) showed a significant viscoelastic response, with elastic behaviour prevailing over viscous behaviour ($G' > G''$) in the fresh boar semen, whereas in the samples that were

diluted with a commercial extender or experimental freezing medium, G'' (viscous modulus) prevailed over G' (elastic modulus), so the ejaculate changed its behaviour from a viscoelastic solid material ($G' > G''$) to a viscoelastic liquid material ($G'' > G'$). The freezing–thawing process changed the microstructure of the samples (G'). This phenomenon was more evident over short times or high frequencies, as shown in Figure 4. The Han plot allows us to visualize and compare the sample microstructures before and after cryopreservation. The solid black line represents the equimodulus line (where $G' = G''$), which shows the transition from viscous ($G' < G''$) to elastic ($G' > G''$) behaviour, so that the systems above the diagonal line (fresh semen) exhibit predominantly elastic solid behaviour, while the diluted samples below the diagonal line mainly exhibit the behaviour of a viscoelastic liquid ($G'' > G'$). It should be noted that, in the samples of diluted semen, the data relating to the experimental freezing medium lie closer to the diagonal line, indicating a predominant viscoelastic liquid behaviour and therefore pointing to more interactions among the components of the system. The rheological results of frozen–thawed boar semen suggested typical pseudosolid-like behaviour. The presence of this pseudosolid-like behaviour needs to be confirmed with other experimental evidence; however, it is consistent and could explain the microscopic behaviour and mechanical properties observed.

Chromatographic analysis

The calibration curve results showed a linear relationship between the trehalose concentrations (5–25 mM) and the areas below the peaks that were detected by the device, with a determination coefficient (R^2) of 0.999. Table 3 shows the trehalose concentrations that were detected in cryopreserved boar sperm with respect to the freezing medium used and the sample-preparation protocol. The trehalose concentrations that were observed in the cryopreserved sperm in the experimental group were higher in P2 (2.8 ± 0.4 mg/ml), although no significant differences were observed between the two sample-preparation protocols ($P > 0.05$).

Although the freezing medium formula did not include trehalose-containing liposomes, a trehalose concentration level similar to that observed in the experimental group was also observed in the cryopreserved sperm pertaining to the control group for both sample-preparation protocols ($P > 0.05$).

Discussion

HPLC-ELSD was used in this study to detect trehalose at the intracellular level in cryopreserved boar sperm. The obtained results revealed the presence of trehalose inside the spermatozoa that had been frozen and subsequently thawed, and an effective

Table 2. Effects of liposomes on cryopreserved sperm

Treatment	Sperm viability (%)	Progressive motility (%)
Control	27.29 ± 3.27	21.06 ± 3.76
Experimental	28.22 ± 2.72	18.92 ± 1.41

The values presented are the means ± SE, n = 15.

analytical method for measuring sugars in cryopreserved cell samples is proposed.

Two distinct trehalose-extraction protocols were used, and no significant differences were found between them. In the first protocol, sonication was used to break down the sperm-cell membranes whereas, in the second protocol, methanol was used along with repeated freezing-thawing cycles. Among the findings reported when using HPLC-ELSD to quantify intracellular trehalose levels, the detection of trehalose in the control-group samples should be stressed. Intracellular incorporation of trehalose during freezing has been reported in platelets (Gläfke *et al.*, 2012) and fibroblasts (Zhang *et al.*, 2016). It has been suggested that the lipid phase transition that occurs during freezing makes the plasma membrane more permeable, facilitating the permeation of trehalose (Stewart and He, 2019). However, the part played by liposomes in the incorporation of trehalose inside the cryopreserved sperm was found to be minimal, a finding that concurs with that of Holovati *et al.*, (2009), who reported low concentrations of intracellular trehalose when using liposomes to cryopreserve human erythrocytes. Notwithstanding the above, the adverse effects of liposomes are minimal compared with those of other methods used to facilitate the intracellular release of trehalose.

In this work, liposomes were prepared using a heating technique, which facilitates the production of high-entrapment efficiency liposomes (Linares-Alba *et al.*, 2016). Subsequently, those features that have a significant effect on the *in vivo* performance of liposomes were studied (Saadeldin *et al.*, 2020). The results of the characterization confirmed that there was dispersion of spherical liposomes measuring 357 nm, moderately polydisperse (Danaei *et al.*, 2018), relatively stable (Bhattacharjee, 2016), and with a 73% trehalose-entrapment efficiency. The average vesicle size that was achieved via filtration is worth noting, and it is worth mentioning that the presence of trehalose fosters the formation of larger liposomes. Roy *et al.* (2016) reported that trehalose is able to form hydrogen bonds with the phospholipids of liposomes made from dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), increasing the size of the vesicles as a result of this interaction. Similar to the liposome size, the moderate levels of polydispersion that were observed in the system are due to the less effective interactions between trehalose molecules and phospholipids, therefore resulting in a lower percentage of vesicles with smaller sizes.

Regarding the influence of liposome size on the interactions between liposomes and cells, it has been shown that the use of small liposomes (<200 nm) favours interactions between the vesicles and plasma membranes of the target cells, providing more efficient cryoprotection of cells (Kheirilomoom *et al.*, 2005; Papahadjopoulos *et al.*, 1973). We also measured the zeta potential to determine the stability of our dispersion, with at least ±30 mV being necessary for the formulation to be deemed stable. According to the zeta potential values, our dispersion was classified as relatively stable, indicating that the electrostatic repulsive force between the vesicles is not sufficient to prevent their agglomeration (Bhattacharjee, 2016). Nevertheless, studies on exosomes have shown that trehalose

can maintain sufficiently high repulsion forces to keep the vesicles separate from each other (Bosch *et al.*, 2016).

Concerning the effects of intracellular trehalose on cryopreserved boar semen, the percentages of viable cells and progressive motility upon thawing showed no significant changes despite the presence of trehalose-containing liposomes in the freezing medium. We suggest that the aforementioned results might be influenced by the incubation conditions used in this study (Holovati *et al.*, 2008; Röpke *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2020) and by the soybean lecithin concentrations in the liposome dispersion (Zhang *et al.*, 2009). There have been no reports to date of liposomes made with soybean lecithin being used in boar semen. This opens the door for further research that contributes to the development of boar-sperm freezing techniques, which are becoming an increasingly relevant method for maintaining biosecurity.

Moreover, He *et al.* (2001) reported the use of liposomes made from a variety of phospholipids to cryopreserve boar sperm. These results are consistent with those presented here regarding the effects of liposomes on the viability and progressive motility of thawed boar sperm. The authors also described the use of liposomes combined with egg yolk to create a freezing medium.

A study of the rheological properties of boar semen was carried out to analyze sperm-medium and sperm-sperm interactions before and after the cryopreservation process, as well as the effect of trehalose-containing liposomes on the viscoelasticity of the samples. The results from simple shear tests showed higher viscosity levels in semen samples that were reconstituted in the experimental freezing medium. The higher viscosity levels were mainly due to the presence of cryoprotectants and remained unchanged even after freezing-thawing (Sampedro and Uribe, 2004; Morris *et al.*, 2006; Rodríguez-Martínez and Wallgren, 2011). Dissolving cryopreserved sperm in a commercial extender reduces its viscosity, which is a phenomenon that is relevant in view of the protective effects of conserving these cells in a viscous medium. Several investigations have stated that sperm-cell dilution in a viscous medium prevents cellular sedimentation and favours a reduction in sperm metabolic demand (Nagy *et al.*, 2002; López-Gatius *et al.*, 2005; Corcini *et al.*, 2011). Furthermore, studies on boar sperm have shown that increased viscosity of the medium enhances sperm membrane stability and their ability to move (Coy *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2014; González-Abreu *et al.*, 2017).

With regard to the oscillatory shear flow tests, we observed that the viscoelastic properties of semen samples were affected by the freezing-thawing process. This is related to the diminished interactions among the components of the freezing medium and sperm with a damaged plasma membrane (Barnes, 2000; Medina-Torres *et al.*, 2000). Additionally, a change in the slope and a slight plateau were observed in the flow curves of thawed semen at low frequencies (or long times), typical of a pseudosolid-like behaviour, which is associated with the strong interaction between the sample components (Medina-Torres *et al.*, 2019). Interestingly, Tung *et al.* (2017) reported that the elasticity of a medium induced collective swimming patterns of bovine sperm, facilitating sperm migration and therefore the success of fertilization. To our knowledge, there have been no reported studies of the viscoelastic behaviour of cryopreserved boar semen; therefore, the above findings may serve as a basis for designing quantitative tests to determine the quality of this semen.

It is worth mentioning that we also carried out a rheological analysis of those samples that were reconstituted in the control freezing medium (results not shown) and determined that their viscosities were similar to those of the experimental

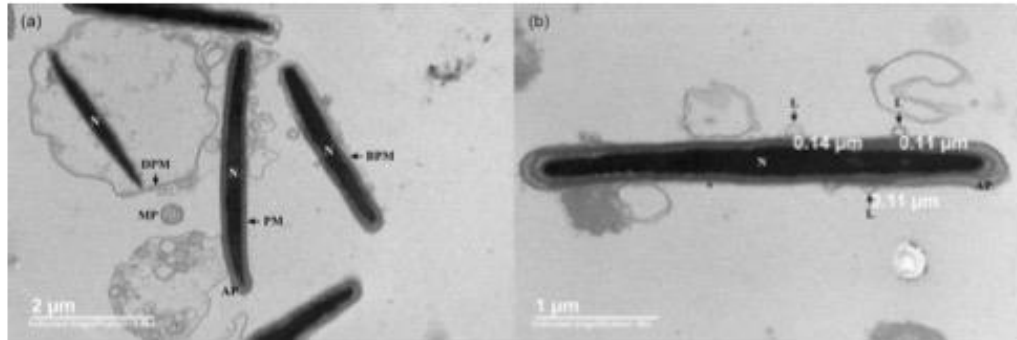


Figure 2. TEM micrographs of different segments of boar sperm cells cryopreserved in the presence of trehalose-containing liposomes. (a) Sperm cells with intact (PM), distended (DPM) and broken plasma membranes (BPM). (b) Cross-section of the sperm head showing the presence of liposomes (L) close to the plasma membrane of spermatozoa. AP, acrosomal protuberance; MP, main piece; N, nucleus.

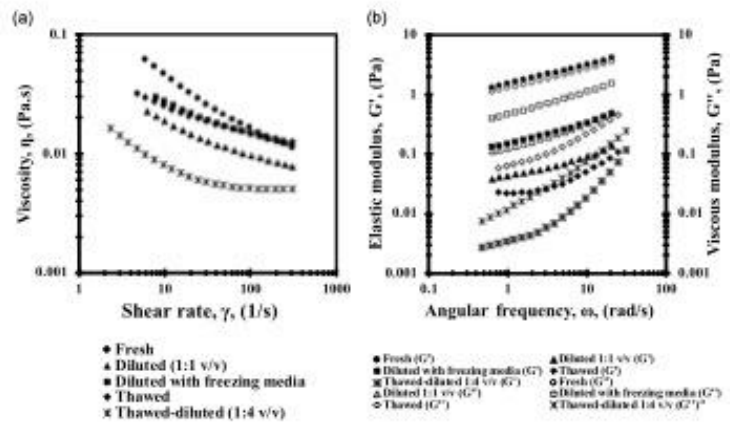


Figure 3. Rheological characterization of boar semen before and after cryopreservation. (a) Viscosity curves [viscosity vs. shear rate, γ] and (b) oscillatory shear curves (filled symbols are G' : elastic module and empty symbols are G'' : viscous module).

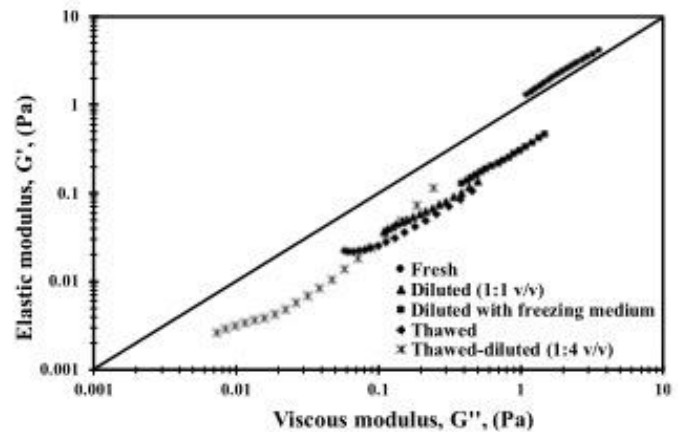


Figure 4. Han plot showing the elastic module (G') versus viscous module (G'') of boar semen samples before and after cryopreservation.

Table 3. Mean trehalose (mg/ml) concentrations in frozen–thawed semen

Protocol	Control	Experimental
P1	2.26 ± 0.62	2.81 ± 0.97
P2	3.24 ± 1.24	2.86 ± 0.39
Average	2.75 ± 0.66	2.83 ± 0.47

The values presented are the means ± SE. $n=4$.

group due to the presence of cryoprotectants in the freezing medium. Nevertheless, a slight effect of trehalose-containing liposomes on the viscoelastic properties of the samples (G') was observed.

In conclusion, in this study, we measured the amounts of intracellular trehalose in cryopreserved boar-sperm lysates by means of HPLC-ELSD and developed and characterized a freezing medium made from trehalose-containing liposomes that was effective in maintaining the viability and motility of thawed sperm. The rheological response of the samples during cryopreservation shows that they are mechanically stable for flow and that their rheological properties change when they are diluted in a freezing medium that contains trehalose and after thawing.

Further research should be carried out using soybean lecithin and trehalose in the boar-sperm freezing–thawing process to ascertain what concentrations are needed to achieve optimal cryoprotection.

Acknowledgements. The authors wish to thank the National Council of Science and Technology (Spanish acronym: CONACYT) for scholarship number 593892 assigned to Claudia Denisse Mendoza-Viveros. The authors also wish to thank Miguel Ángel Valdez-García, Carolina Flores Ávila (FC-UNAM), Rodolfo Paredes Dias (IFC-UNAM), Fred Rogers and Laboratorio Avi-mex, SA de CV for their collaboration in carrying out the present study.

Financial support. This research received no specific grant from any funding agency or from commercial or not-for-profit sectors.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest regarding this work.

Ethical standards. The authors assert that all procedures in this work that involved animals were approved by the Internal Committee for the Care and Use of Animals of the Autonomous National University of Mexico (Spanish acronym: UNAM).

References

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8**(1), 102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102
- Allgeier, M. C., Nussbaum, M. A. and Risley, D. S. (2003). Comparison of an evaporative light-scattering detector and a chemiluminescent nitrogen detector for analyzing compounds lacking a sufficient UV chromophore. *LCGC North Am.*, **21**, 376–381.
- Athurupana, R., Takahashi, D., Ioki, S. and Funahashi, H. (2015). Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, **61**(3), 205–210. doi: 10.1262/jrd.2014-152
- Barnes, H. A. (2000). *A handbook of elementary rheology*. University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017

- Bosch, S., de Beaupre, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chretien, D., Jegou, D. and Bach, J. M. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Scientific Reports*, **6**, 36162. doi: 10.1038/srep36162
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. and Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, **58**(1–2), 99–111. doi: 10.1016/S0378-4320(99)00035-4
- Corcini, C. D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, A. S., Torres, N. U. and Lucia, T. (2011). Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livestock Science*, **138**(1–3), 289–292. doi: 10.1016/j.livsci.2010.11.019
- Coy, P., Gadea, J., Rath, D. and Hunter, R. H. (2009). Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology*, **72**(9), 1171–1179. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.011
- Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: The role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, **131**(3), 505–513. doi: 10.1016/S1095-6433(01)00503-7
- da Costa Morato Nery, D., da Silva, C. G., Mariani, D., Fernandes, P. N., Pereira, M. D., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C. A. (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**(12), 1408–1411. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.05.011
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. and Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, **10**(2), 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057
- Dvořáčková, E., Šněblová, M. and Hrdlička, P. (2014). Carbohydrate analysis: From sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science*, **37**(4), 323–337. doi: 10.1002/jssc.201301089
- Eroglu, A., Russo, M. J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. and Toner, M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*, **18**(2), 163–167. doi: 10.1038/72608
- Gil, M. C. G., Barón, F. J., Guerrero, J. M., García-Marin, L. J. and Gil, J. (2014). Increasing extender viscosity improves the quality of cooled boar semen. *Journal of Agricultural Science*, **6**(3), 12–22. doi: 10.5539/jas.v6n3p12
- Glüfke, C., Akhond, M., Oldenhof, H., Sieme, H. and Walkers, W. F. (2012). Cryopreservation of platelets using trehalose: The role of membrane phase behavior during freezing. *Biotechnology Progress*, **28**(5), 1347–1354. doi: 10.1002/btpr.1600
- González-Abreu, D., García-Martínez, S., Fernández-Espin, V., Romar, R. and Gadea, J. (2017). Incubation of boar spermatozoa in viscous media by addition of methylcellulose improves sperm quality and penetration rates during in vitro fertilization. *Theriogenology*, **92**, 14–23. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.01.016
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, Mde L., Carvajal, S. U. and Ortega, M. E. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, **58**(3), 287–292. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.02.003
- He, L., Bailey, J. L. and Buhr, M. M. (2001). Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biology of Reproduction*, **64**(1), 69–79. doi: 10.1095/biolreprod64.1.69
- Herdeiro, R. S., Pereira, M. D., Panek, A. D. and Eleutherio, E. C. A. (2006). Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1760**(3), 340–346. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.01.010
- Holovati, J. L., Gyongyossy-Issa, M. I. C. and Acker, J. P. (2008). Effect of liposome charge and composition on the delivery of trehalose into red blood cells. *Cell Preservation Technology*, **6**(3), 207–218. doi: 10.1089/cpt.2008.0008
- Holovati, J. L., Gyongyossy-Issa, M. I. C. and Acker, J. P. (2009). Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality. *Cryobiology*, **58**(1), 75–83. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.11.002

- Kheirulomoom, A., Satpathy, G. R., Török, Z., Banerjee, M., Bali, R., Novaes, R. C., Little, E., Manning, D. M., Dwyre, D. M., Tablin, F., Crowe, J. H. and Tsvetkova, N. M. (2005). Phospholipid vesicles increase the survival of freeze-dried human red blood cells. *Cryobiology*, 51(3), 290–305. doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.08.003
- Kralikova, M., Crha, I., Huser, M., Melounova, J., Zakova, J., Matejovicova, M. and Ventruba, P. (2017). The intracellular concentration of homocysteine and related thiols is negatively correlated to sperm quality after highly effective method of sperm lysis. *Andrologia*, 49(7), e12702. doi: 10.1111/and.12702
- Linares-Alba, M. A., Gómez-Guajardo, M. B., Fonzar, J. F., Brooks, D. E., García-Sánchez, G. A. and Bernad-Bernad, M. J. (2016). Preformulation studies of a liposomal formulation containing sirolimus for the treatment of dry eye disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), 11–22. doi: 10.1089/jop.2015.0032
- López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yáñez, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Núñez, J. and Soler, C. (2005). Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64(2), 252–260. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.015
- Medina-Torres, L., Brito-de la Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B. and Katthain, R. (2000). Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*, 14, 417–424. doi: 10.1016/S0268-005X(00)00015-1
- Medina-Torres, L., Núñez-Ramírez, D. M., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Minjares-Fuentes, R., Valdez-García, M. A., Bernad-Bernad, M. J. and Manero, O. (2019). Microencapsulation of gallic acid by spray drying with aloe vera mucilage (*Aloe barbadensis* Miller) as wall material. *Industrial Crops and Products*, 138, 111461. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.06.024
- Morris, G. J., Goodrich, M., Acton, E. and Fonseca, F. (2006). The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. *Cryobiology*, 52(3), 323–334. doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.01.003
- Motta, J. P. R., Paraguassú-Braga, F. H., Bouzas, L. F. and Porto, L. C. (2014). Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*, 68(3), 343–348. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.007
- Nagy, S., Sinkovics, G. and Kovács, A. (2002). Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 283–286. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00189-0
- Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y., Komori, M., Inoue, Y. and Sakurai, M. (2003). NMR and quantum chemical study on the OH...π and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *Journal of the American Chemical Society*, 125(42), 12739–12748. doi: 10.1021/ja034777c
- Papahadjopoulos, D., Poste, G. and Schaeffer, B. E. (1973). Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles: Influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 323(1), 23–42. doi: 10.1016/0005-2736(73)90429-X
- Rodríguez-Martínez, H. and Wallgren, M. (2011). Advances in boar semen cryopreservation. *Veterinary Medicine International*, 2011, 396181. doi: 10.4061/2011/396181
- Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H. and Wolkers, W. F. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76(8), 1465–1472. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.015
- Roy, A., Dutta, R., Kundu, N., Banik, D. and Sarkar, N. (2016). A comparative study of the influence of sugars sucrose, trehalose, and maltose on the hydration and diffusion of DMPC lipid bilayer at complete hydration: Investigation of structural and spectroscopic aspect of lipid-sugar interaction. *Langmuir*, 32(20), 5124–5134. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01115
- Saadeldin, I. M., Khalil, W. A., Alharbi, M. G. and Lee, S. H. (2020). The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2281. doi: 10.3390/ani10122281
- Sampedro, J. G. and Uribe, S. (2004). Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256–257(1–2), 319–327. doi: 10.1023/B:MCBI.000009878.21929.eb
- Stefanic, M., Ward, K., Tawfik, H., Seemann, R., Baulin, V., Guo, Y., Fleury, J. B. and Drouet, C. (2017). Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation. *Biomaterials*, 140, 138–149. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.018
- Stewart, S. and He, X. (2019). Intracellular delivery of trehalose for cell banking. *Langmuir*, 35(23), 7414–7422. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02015
- Stewart, S., Arminan, A. and He, X. (2020). Nanoparticle-mediated delivery of cryoprotectants for cryopreservation. *Cryo Letters*, 41(6), 308–316.
- Toh, M. and Chiu, G. N. C. (2013). Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 88–95. doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.011
- Tung, C. K., Lin, C., Harvey, B., Fiore, A. G., Ardon, F., Wu, M. and Suarez, S. S. (2017). Fluid viscoelasticity promotes collective swimming of sperm. *Scientific Reports*, 7(1), 3152. doi: 10.1038/s41598-017-03341-4
- Uchida, T., Furukawa, M., Kikawada, T., Yamazaki, K. and Gohara, K. (2017). Intracellular trehalose via transporter TRET1 as a method to cryoprotect CHO-K1 cells. *Cryobiology*, 77, 50–57. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.05.008
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitz, K. F. and Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047
- Zhang, S., Hu, J., Li, Q., Jiang, Z. and Zhang, X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6476–6480. doi: 10.5897/AJB09.1070
- Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H. and Wolkers, W. F. (2016). Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(6), 1400–1409. doi: 10.1016/j.bbmem.2016.03.020