



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

**CORRELACION DEL DAÑO DE LA TECA PERINUCLEAR Y LA
DESCONDENSACION DEL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE
CRIOPRESERVADO DEL CERDO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A

OSCAR GUTIERREZ PEREZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

DR. DANIEL MOTA ROJAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MEXICO, D.F.

2006

D E D I C A T O R I A

Hasta el momento en que inicie mis estudios de posgrado, mi mundo andaba (como diría una cuentista mexicana de antaño) : “sobre patitas de puerco”...

Cada mañana iniciaba el día pensando: ¿cuantas dosis para inseminar debo preparar el día de hoy? y mi último pensamiento del día antes de irme a acostar (y muy tarde por cierto), siempre fue ¿que hare mañana para producir un lechon más?

Despues de doce años de esa rutina... me di cuenta: olvidaba mi historia personal...

Fue tu apoyo el que me brindo la oportunidad de cumplir un sueño, seguir creciendo a travez de una Maestría, lo cual trajo consigo un beneficio anexo: que pudieramos compartir más tiempo juntos.

No existen palabras para demostrarte mi agradecimiento y es por eso que te dedico esté trabajo...

Pero también debo dedicarselo a esas tres nuevas lucecitas que iluminan mi camino, Ferchu, Giorgio y Bekina gracias por llegar a mi mundo, brindarme sus sonrisas e impulsarme a seguir tratando de ser un buen ejemplo...

AGRADECIMIENTOS:

Antes que nada quiero agradecer a la FMVZ de la UNAM , que despues de tantos años me reabrio sus puertas recibiendo al hijo prodigo y permitiendole continuar un sueño...

A mis tutores: Maria Elena, por su apoyo incondicional y las horas robadas a sus multiples ocupaciones para brindarme sus consejos, gracias por creer en mi. A Lourdes por todas las horas de trabajo invertidas en el desarrollo de mi trabajo, la fe que depósito en mi capacidad y el aporte invaluable de sus conocimientos. A Daniel que siempre tuvo para mi palabras de aliento y observaciones puntuales. A los tres gracias por la transformación de maestros en amigos.

A la incondicional Dra. Mary Calderon que tantas veces me saco de aprietos, gracias por su apoyo y conocimientos. A mis profesores que han terminado siendo amigos y colaboradores: Al Dr. Everardo que cambio mi perspectiva sobre la reproduccion y su fisiologia, pero sobre todo mi idea sobre lo que debe ser un “medico de campo”, gracias por sus consejos. A la Dra. Rosy Viguera, por su apoyo y transmision de experiencias y conocimientos. A la infatigable Chepina con la que descubri que la ciencia es menos compleja de lo que parece, gracias por facilitarme la vida con sus experiencias personales.

A Jorge Hernandez que no sólo me brindo apoyo sino tambien su amistad. A mis compañeros y nuevos y entrañables amigos: Chavita, Manuel Barrientos, Lupita, Cipatli, Jazmin, Dania y Juan Carlos, gracias a todos por su apoyo, resolución de dudas, consejos y reafirmacion de conocimientos, fue muy grato crecer con ustedes y compartir presiones y desesperaciones. A Ivan por sus consejos basados en su experiencia personal. A Khaterine, amiguita que te puedo decir...gracias.

A todo el personal de la unidad de microscopia electronica que tan generosamente me brindaron su apoyo y me permitieron hacer uso de sus instalaciones sin reservas, gracias Carlos. Al perseverante señor Dominguez por las muestras donadas de sus sementales y su apoyo incondicional. A Juvencio que siempre me infundio su optimismo.

A mis revisores: Gracias Dr. Roberto por sus comentarios tan puntuales y su aportaciones a esta tesis. Gracias Dr. Javier por su crítica tan completa lo que me permitio mejorar en gran medida esté documento final y gracias tambien por su apoyo en congresos y seminarios.

A Toñita por los viajes a destiempo con tal de proveerme el material para trabajar , flaquita sin ti esta tesis no hubiera sido posible.

A Rosita y Fernando, a Miriam y Jorge, a Chata y a Jenny, a mi amigo Cesarin a todos gracias por sus palabras de aliento, saben que son mi familia...

A Mamá, a Efrain, a Esmeralda y Estrella, a mis sobrinos, lejanos, pero siempre presentes...

A Papá pues se que a pesar de todo estaria satisfecho de mi...

INDICE

	Pag.
INDICE	IV
Índice de figuras	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCION	1
I.- ANTECEDENTES	
El espermatozoide generalidades	4
Características del núcleo, envoltura nuclear y teca perinuclear	8
La maduración epididimal espermática	11
Capacitación y reacción acrosomal.....	14
La fertilización	15
La descondensación nuclear <i>in vivo</i>	18
Los estudios de descondensación <i>in vitro</i>	21
Métodos de conservación del semen.....	25
Efectos de la criopreservación sobre la célula espermática	26
II.- HIPOTESIS.....	31
III.- OBJETIVO GENERAL.....	31
IV.- OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
V.- MATERIAL Y METODOS	
Diseño experimental.....	32
Procedimientos.....	35
VI.- RESULTADOS	41
VII.- DISCUSION	50
VIII.- REFERENCIAS.....	56
ANEXO1: Figuras.....	62
ANEXO 2: Cuadros	79

Índice de Figuras

	Pag.
Esquema 1 Espermatozoide porcino	7
Esquema 2 Cortes de cabezas espermáticas	10
Figura 1 Subestructura de la teca perinuclear	63
Figura 2 Espermatozoides tratados con DTT/heparina.....	64
Figura 3 Espermatozoides tratados con DTT/heparina	65
Figura 4 Cabezas espermáticas descondensadas.....	66
Figura 5 Cabezas espermáticas en descondensacion	67
Figura 6 Cabezas espermáticas en descondensacion	68
Figura 7 Cabezas espermáticas en descondensacion	69
Figura 8 Espermatozoides frescos tratados con DTT	70
Figura 9 Espermatozoides descongelados tratados con DTT	71
Figura 10 Espermatozoides tratados con heparina.....	72
Figura 11 Espermatozoides tratados con heparina	73
Figura 12 Espermatozoides descongelados tratados con heparina	74
Figura 13 Espermatozoides frescos tratados con heparina	75
Figura 14 Espermatozoides tratados con heparina	76
Figura 15 Espermatozoides tratados con heparina.....	77
Figura 16 Espermatozoides tratados con heparina	78
Cuadro 1 Integridad en la subestructura postdescongelación	80
Grafica 1 Integridad en la subestructura postdescongelación.....	81
Cuadro 2 Diferencias dentro de los tratamientos	82
Cuadro 3 Diferencias entre tratamientos.....	83
Cuadro 4 Diferencias entre tiempos y entre tratamientos	84
Cuadro 5 Diferencias entre tiempos dentro del tratamiento.....	85

RESUMEN

La teca perinuclear (TP) es la estructura citoesquelética de la cabeza espermática de los mamíferos, que previene el acceso de los factores descondensantes al genoma paterno. La estabilidad de la TP se incrementa durante el tránsito epididimal, con el establecimiento de enlaces disulfuro y la formación de una subestructura (sTP), que se localiza en la zona apical de la hoja posacrosomal de la TP. Durante la fertilización la cromatina nuclear sufre una descondensación, lo que sugiere que la desaparición de la TP es un prerrequisito para la formación de un pronúcleo masculino normal, esto se inicia con la desestructuración de la sTP durante la reacción acrosomal (RA). Si la TP persiste dentro del ovocito fertilizado, la descondensación se lleva a cabo de manera irregular. Por su parte el proceso de congelación altera las proteínas del citoesqueleto de diversos tipos celulares. La criopreservación causa defectos en la descondensación de los espermatozoides del cerdo, reportados como una sobrecondensación que produce un retraso en la formación del pronúcleo masculino. El objetivo de este estudio fue comprobar que existe una relación entre el daño de la TP ocasionado por el proceso de criopreservación y una modificación en el proceso de descondensación nuclear espermática. Para ello se recolectaron dos eyaculados de tres sementales activos, dos de raza Duroc y uno de raza Pietrain. Los eyaculados se dividieron en dos fracciones, una para trabajarse en fresco y otro para ser congelada por el método de Thilman. Los espermatozoides frescos y descongelados (35×10^6 espermatozoides/ml) se trataron con el detergente Brij 36T (1.2%) por 5min, con la finalidad de retirar membranas y dejar la TP expuesta para su adecuada valoración al microscopio electrónico de transmisión (MET). Después se aplicó el tratamiento DTT 3.75mM/heparina 5USP para provocar la descondensación. Se fijaron alícuotas a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 y 600 seg postratamiento para dar seguimiento al proceso de descondensación progresiva. El mismo procedimiento se aplicó a espermatozoides frescos y descongelados previamente incubados en faloidina ($59 \mu\text{M}$) por 5 min a 37°C . Se observó que la subestructura de la TP de los espermatozoides de cerdo sufrió alteración significativa ($P < 0.0001$) durante el proceso de criopreservación, pasando del 8.9% en frescos, al 45.6% en descongelados. La región subacrosomal de las cabezas espermáticas fue la primera en descondensarse, lo cual puede atribuirse a una mayor concentración de enlaces disulfuro estabilizando sus proteínas. Los espermatozoides frescos iniciaron su descondensación a partir de los 30 seg de tratamiento, por su parte en los descongelados se observó un retraso en la desestructuración nuclear, pues en ellos la descondensación se inició hasta los 120 seg de tratamiento. La estabilización de actina F con faloidina, mostró alteración en los patrones de descondensación de espermatozoides descongelados tratados con DTT/heparina, que no presentaron el cinturón característico que constriñe la región ecuatorial en espermatozoides frescos. La valoración de la longitud de la cabeza espermática demostró diferencia significativa ($P < 0.0001$), entre espermatozoides frescos y descongelados. Se concluye que la alteración sufrida por la subestructura de la TP está involucrada con el retraso en la descondensación y se propone que el retraso se debe más a la pérdida de algún factor regulador que a una hiperestabilización de los enlaces disulfuro.

Palabras clave: Espermatozoide porcino, teca perinuclear, descondensación nuclear, enlaces disulfuro, faloidina, actina F.

ABSTRACT

The perinuclear theca (PT) is a cytoskeletal structural element that surrounds the mammalian sperm nucleus and it prevents the entrance of external factors. The PT increases its stability during sperm epididymal transit, by disulfide bond formation and by a PT substructure (sPT) formation, the last is located in the apical zone of postacrosomal-PT sheath. After fertilization, sperm nuclear chromatin must be decondensated, it is suggested that the removal of sperm PT is a prerequisite for normal male pronuclear development and this begins after the acrosomal reaction (AR) with the disappearance of the sPT. If the PT persists, decondensation is carried out in an irregular way. The freezing-thawing causes alterations in cytoskeletal proteins; the same process also causes a defect in boar sperm decondensation, reported as an overcondensation producing a delay in the male pronucleus formation. The aim of the present paper was to describe the relationship between the damage of the PT caused by the freezing-thawing and a modification in the decondensation process. For that, two ejaculates were collected from 3 active boars, 2 were Duroc and 1 was Pietrain breed. The fresh and frozen-thawed boar spermatozoa were suspended in NaCl (154mM) and adjusted at 35×10^6 cells/ml. To expose the PT spermatozoa were incubated in Brij 36T (1.2%) for 10 min. After that, spermatozoa were incubated with DTT 3.75mM and heparin 5USP. Aliquots were fixed at preestablished times (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 and 600 seconds, posttreatment). The fixed samples were processed and examined by TEM in negative stain. To evaluate the damage suffered by the PT after freezing-thawing, the integrity of the sPT was used as morphological marker. The same procedure was applied to fresh and thawed sperms previously incubated in phalloidin (59 μ M) for 5 minutes at 37°C. Fresh sperms showed an undamaged sPT; on the other hand, post thawed sperms have showed different levels of damage or a total absence of sPT ($P < 0.0001$), passing over 8.9% in fresh semen and 45.6% in frozen-thawed semen. The PT subacrosomal region was first decondensated; which could be attributed to the greater amount of proteins stabilized by disulfide bonds. The fresh sperm started decondensation at 30 seconds while frozen-thawed sperm suffered decondensed delay; it was only at 120 seconds. Additionally, the actin F stabilization with phalloidin shows alteration in decondensation patterns. Furthermore, in agreement with the last, thawed sperms treated with DTT/ heparin with phalloidin to stabilize F-actin showed since they did not present the characteristic belt that constricted the equatorial region in fresh sperms. Evaluation of sperm head length demonstrated difference ($P < 0.0001$), between fresh and frozen-thawed sperm. In conclusion, the alteration of the sPT by the freezing-thawing process is involved in the delay of nuclear decondensation. There was add the delay in the nuclear decondensation in thawed semen, this could be due to the loss of some PT regulating factor instead of overcondensation.

Key words: boar spermatozoa, perinuclear theca, nuclear decondensation, disulfide bond, phalloidin, actin F.

INTRODUCCION

La criopreservación es una biotécnica que permite el almacenamiento del semen de las especies domésticas por largo tiempo, intensificando el mejoramiento genético y permitiendo el uso más eficiente de los reproductores (Wevar *et al.*, 1997). Esta técnica se inició cuando los investigadores británicos C. Polges, A. Smith y A. Parkes descubren en 1949, los efectos crioprotectores del glicerol utilizando espermatozoides de gallo. Poco tiempo después continuaron sus trabajos en espermatozoides de bovino comprobando su efecto protector sobre la célula espermática de mamíferos (Watson, 2000).

En la especie porcina esta técnica esta lejos de ocupar un lugar destacado debido en parte a la mayor susceptibilidad del espermatozoide de esta especie a los daños provocados por el proceso de congelación-descongelación (Locksley *et al.*, 1985, Evenson *et al.*, 1994, Wevar *et al.*, 1997, Córdova *et al.*, 2002) y que se traducen en la necesidad de utilizar mayores concentraciones espermáticas por dosis de inseminación (Cerolini *et al.*, 2001). Sin embargo, esto último no logra compensar los bajos rendimientos reproductivos, como son una fertilidad menor al 50% y un tamaño de camada menor a los siete lechones en promedio (Hamamah *et al.*, 1990, Locksley *et al.*, 1990, Córdova *et al.*, 2001).

Otro factor que a limitado la utilización de semen congelado porcino, es la oportunidad que ofrece el acceso al semen fresco/refrigerado a temperaturas entre 15°C a 20°C el cual es capaz de preservar su calidad por varios días, lo que lo convierte en la mejor opción a escala comercial (Córdova *et al.*, 2001).

Sin embargo, las posibilidades que ofrece la disposición de semen congelado son interesantes como son: la utilización en la producción de líneas selectas, la posibilidad de crear bancos de germoplasma para la conservación de determinadas líneas y razas autóctonas, la prevención de enfermedades infectocontagiosas, la conservación de material genético de individuos útiles que deban ser sacrificados y la producción comercial de dosis para exportación hacia países con esquemas de selección establecidos (Johnson, 2000).

El problema que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C, sino la combinación de efectos que en el proceso del congelado descongelado tienen una acción dañina sobre la fisiología y morfología espermática (Watson, 1995).

Según Johnson (2000) el daño celular que ocurre por la congelación y la descongelación se refleja en una disminución de la motilidad y daños ultraestructurales en la membrana.

El núcleo es otra estructura que sufre alteraciones, estas son de tipo funcional más que estructural, como lo comprueban Royere *et al.*(1988) quienes reportan lesiones en membrana plasmática, acrosoma, pieza media y flagelo, pero no encuentran alteraciones en la cromatina espermática; sin embargo Hamamah *et al.*(1990) y Córdova *et al.*(2002) reportan que la congelación-descongelación provocan un estado denominado “sobrecondensación” que demora la descondensación de la cromatina paterna durante la fertilización, lo cual se refleja en un retraso de la segmentación y mortalidad embrionaria temprana posterior a la inseminación con semen descongelado.

El citoesqueleto también se ve afectado después del proceso de criopreservación, Watson, (1995) menciona que el citoesqueleto sufre alteraciones debido a que sus proteínas constituyentes son termosensibles, lo que las hace sufrir despolimerización tras los cambios de temperatura, estos cambios conformacionales tendrán como consecuencia la alteración en su funcionalidad, por ejemplo, pérdida en la capacidad membranal para la conductividad hidráulica (Noiles, 1997; Storey *et al.*, 1998). Estos autores utilizaron espermatozoides de ratón descongelados y asociaron esta disfunción de conductividad hídrica (permeabilidad), a la pérdida de capacidad del citoesqueleto para lograr las adaptaciones a los cambios osmóticos a los que se enfrenta la célula durante la criopreservación.

En un estudio más reciente se llegó a las mismas conclusiones, al encontrar daño citoesquelético y pérdida de capacidad para el control del mantenimiento osmótico espermático en perros posterior al descongelado (Petrunkina *et al.*, 2004), esto se reafirmo en un estudio posterior con espermatozoides porcinos (Petrunkina *et al.*, 2005).

Al hablar de citoesqueleto espermático, se debe mencionar que la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide es la teca perinuclear, la cual se encuentra envolviendo al núcleo espermático, excepto donde el flagelo se une a la cabeza (Courtens *et al.*, 1976) y que entre otras funciones, le brinda al núcleo la protección contra los agentes externos que pudieran dañarlo intraestructuralmente (Sutovsky *et al.*, 1997, 2000, 2003; Juárez, 2000; Mújica *et al.*, 2003); recientemente en el laboratorio del departamento de Morfología de la FMVZ de la UNAM, se ha comprobado que la teca perinuclear del bovino

(Martínez, 2003) y del cerdo (Arancibia-Salinas, 2005, datos sin publicar) sufren daño posterior al proceso de congelación descongelación.

Si como se ha mencionado una de las funciones de la teca perinuclear es la protección del material genético (Sutovsky *et al.*, 1997, 2000, 2003; Juárez ,2000; Mújica *et al.*, 2003), el daño sufrido por esta estructura debiera reflejarse en alguna alteración sobre la cromatina, siendo la única reportada el ya mencionado estado de “sobrecondensación”, ya que no se han comprobado daños en la estructura de la cromatina nuclear (Royere *et al.*, 1988; Hamamah *et al.*, 1990; Córdova *et al.*, 2002).

Por lo anterior, el objetivo principal en esta investigación fue observar las diferencias que presenta *in vitro*, el proceso de descondensación por medios químicos, entre espermatozoides de cerdo frescos y descongelados, valorando además el estado de la teca perinuclear después del descongelado, con la finalidad de ver si es posible establecer una relación entre el daño a la teca y la alteración en el proceso de descondensación nuclear espermática.

ANTECEDENTES

Para tener una visión general sobre la participación de la teca perinuclear espermática en el proceso de descondensación que sufre el espermatozoide durante la fertilización, y cómo esté proceso puede verse alterado por el estrés al que la célula espermática es sometida en un proceso de congelado-descongelado, es necesario hacer una revisión sobre los diferentes conceptos que se desarrollaran a continuación.

Generalidades

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada en estructura y función, cuya finalidad principal es transportar el material genético paterno hasta el sitio de fertilización y una vez ahí, participar conjuntamente con el ovocito en todos los procesos subsecuentes que logran el desarrollo de un nuevo individuo (Bedford, 1990).

Esté espermatozoide o gameto masculino adquiere sus principales características durante el proceso conocido como espermatogénesis. Esté proceso se inicia con una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, que son células que se diferencian a partir de un cúmulo de células troncales. Por medio de estas divisiones mitóticas las espermatogonias aumentan su número y se convierten en espermatocitos, que posteriormente se transformaran través de dos divisiones meioticas, en espermatides.

Estas espermatides aun sufrirán remodelaciones morfológicas que acontecen durante la segunda parte de la espermatogénesis que es llamada espermiogénesis y dan lugar a los espermatozoides propiamente dichos. Estos cambios terminan poco antes de que los espermatozoides sean liberados como células libres en el lumen de los túbulos seminíferos por la espermiación (Eddy y O'Brien, 1994).

El espermatozoide de mamífero suele dividirse para su estudio en dos componentes principales: La cabeza y el flagelo, aunque algunos autores consideran una tercera región conocida como pieza de conexión o cuello.

La cabeza (ver Esquema 1) contiene de adentro hacia fuera las siguientes estructuras: un núcleo altamente condensado que contiene la mitad del par de cada cromosoma (núcleo haploide), la teca perinuclear que lo rodea y el acrosoma que se encuentra circunscrito por una membrana y que posee enzimas proteolíticas (ver Esquema 2).

La pieza de conexión o cuello tiene forma cónica con la base más ancha en contacto con la cabeza y la más estrecha en contacto con la pieza intermedia (ver Esquema 1), en la zona más cercana a la cabeza se observa una protuberancia anular conocida como envoltura redundante (ver Esquema 1), la región del cuello va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza intermedia y dentro se pueden distinguir las siguientes estructuras: la placa basal, los cuerpos laminares, el *capitulum* y las columnas segmentadas (ver esquema 2a en pagina 10)(Bonet, 2000).

El flagelo o cola por su parte se subdivide en tres regiones: la pieza media, intermedia o mitocondrial (que se extiende desde la parte distal de la pieza de conexión hasta el *annulus* o anillo de Jensen), la pieza principal que es el segmento más largo de la cola y la pieza terminal (ver Esquema 1).

La estructura general del flagelo contiene al axonema rodeado por las fibras densas y que se extienden desde el sitio de inserción a la cabeza hasta el inicio de la pieza terminal.

La pieza media se encuentra forrada por las mitocondrias que rodean a las fibras densas de manera helicoidal, mientras que el resto del flagelo se halla envuelto por las vainas fibrosas que junto con las fibras densas forman el Citoesqueleto flagelar (Longo, 1987), la pieza terminal no posee ninguna estructura citoesquelética, pues sólo posee axonema y membrana plasmática (Bonet, 2000).

Tanto la cabeza, como el flagelo se encuentran recubiertos por membrana plasmática y en general el espermatozoide posee una cantidad insignificante de citoplasma, **la membrana plasmática espermática** ha sido considerada un mosaico de dominios, cada uno con características específicas. Estos dominios presentan grupos específicos de lípidos, proteínas y glicoconjugados que pueden actuar de manera independiente o coordinada durante los procesos fisiológicos de la célula y se han caracterizado de la siguiente manera: un dominio denominado del segmento principal del acrosoma y que se ubica donde esté se encuentra, otro dominio que corresponde al segmento ecuatorial del acrosoma y un tercer dominio correspondiente a la región postacrosomal y que así es denominado.

La naturaleza heterogénea de la membrana plasmática del espermatozoide se ha hecho patente mediante el estudio de los patrones de distribución de proteínas intercaladas en ella, así como a través de la distribución diferencial de cargas eléctricas de sus diferentes

regiones y también por la tinción de regiones específicas con anticuerpos y lectinas (Eddy y O'Brien, 1994; Gutiérrez-Ruiz, 2001).

Se ha comprobado que la membrana plasmática del espermatozoide posee diferencias de especie en sus moléculas lipídicas constituyentes, de tal manera que aunque presentan la característica de membrana bilipídica de toda membrana biológica, la membrana plasmática del espermatozoide del cerdo posee una composición característica con un 60 a 70% de fosfolípidos de los cuales el 50% son lípidos esterés, además posee mayores cantidades de etanolamina y fosfatidilcolina, mayor concentración proteica y menos colesterol que las membranas de espermatozoides de otras especies, todas estas características parecen concederle una mayor susceptibilidad a los cambios de temperatura (Córdova *et al.*, 2001).

Todas las estructuras y características morfológicas antes descritas son compartidas de manera general por todos los espermatozoides de mamífero con diferencias de especie, específicas en el tamaño y forma de la cabeza y en el largo y tamaño relativo de los componentes del flagelo (Eddy y O'Brien, 1994).

De manera general, el espermatozoide de la especie porcina presenta una cabeza de tipo espátulado, con forma oval, aunque las dos caras no son iguales, mientras que una es llana, otra presenta una protuberancia apical en forma de semiluna, de unos 0.4 μm de ancho que se extiende por los márgenes de la cabeza a lo largo de 1.2 μm . (ver Esquema 1) El núcleo contiene cromatina muy condensada y electrodensa, su longitud es de 6.6 μm y el grosor varía en las dos regiones de la cabeza (ver esquema 2 en pagina 10). En la región acrosómica el grosor es de 220 nm y en la región posacrosómica es de 320nm aproximadamente (Bonet, 2000).

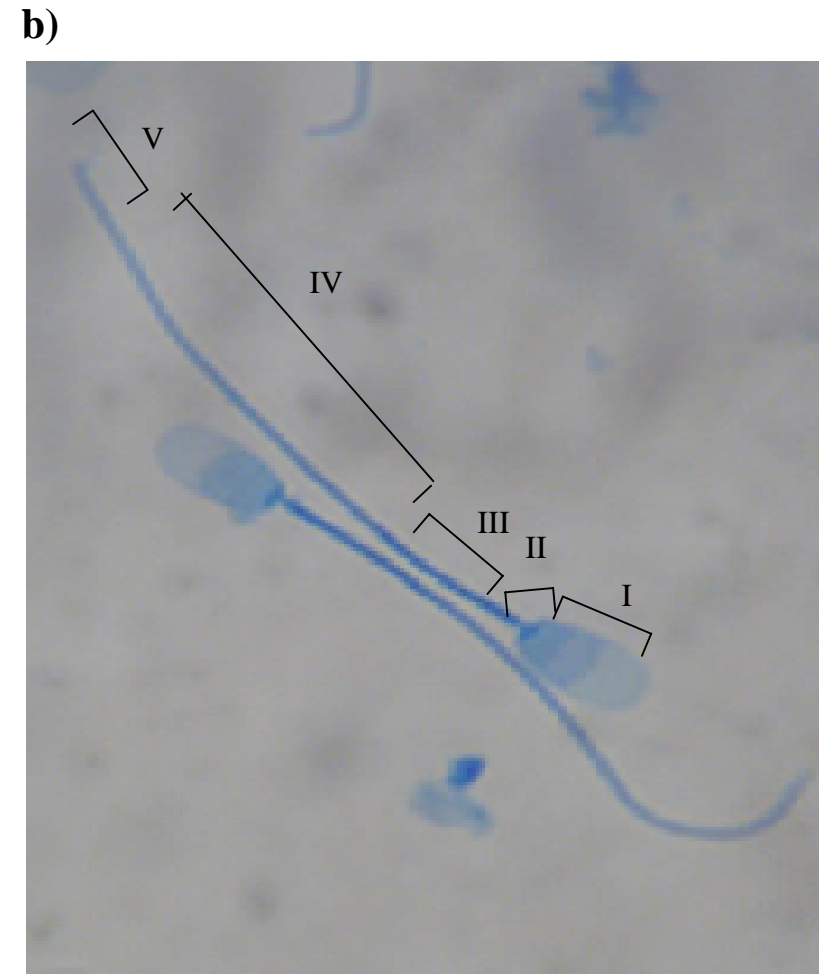
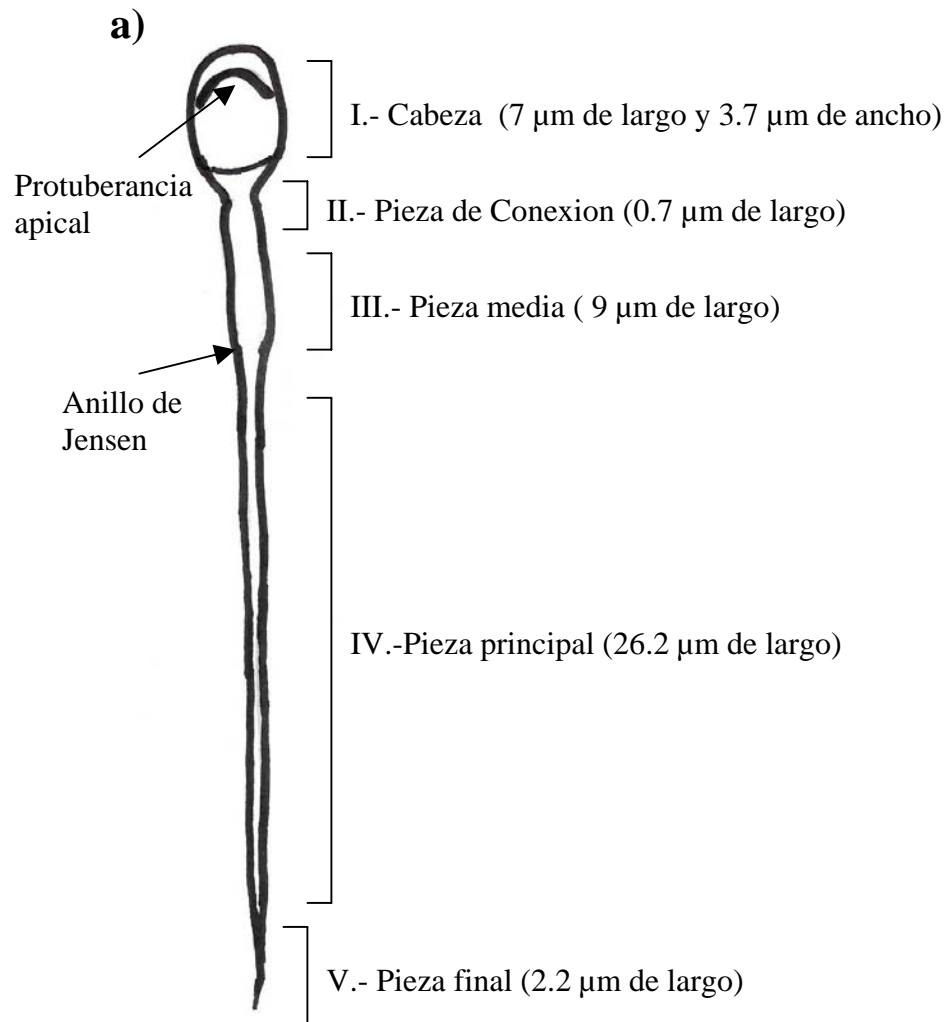
Las dimensiones reportadas por Cummins y Woodal (1985) son para el largo de la cabeza de 6.55 a 8.5 μm y de ancho 3.47 a 4.3 μm , en un estudio más reciente, Bonet (2000) reporta como promedios una longitud total del espermatozoide de 45 μm , para la cabeza un largo de 7 μm , un ancho de 3.7 μm y un grosor de 0.4 μm (ver Esquema 1).

En un eyaculado normal de cerdo (*Sus scrofa domestica*) se puede encontrar un porcentaje de entre el 80 y el 95% de espermatozoides maduros.

Por su parte entre el 5 y el 15% de los espermatozoides del eyaculado porcino son espermatozoides inmaduros que presentan tres características diferenciales con respecto a

los maduros: La primera es la presencia de gota citoplasmática, la segunda es un mayor desarrollo de la protuberancia acrosómica apical y la tercera es una mayor flexibilidad en la cabeza (Bonet, 2000).

Del total de espermatozoides presentes en el eyaculado se considera normal encontrar entre el 1 al 5% con morfoanomalías (espermatozoides aberrantes) que pueden ser clasificadas de la siguiente manera: a) malformaciones de cabeza, de forma, de tamaño o de número y b) malformaciones de la cola de forma o trayectoria, de tamaño y de número (Bonet, 2000).



Esquema 1. Espermatozoide porcino

En esta figura se aprecian espermatozoides porcinos y las regiones o componentes principales en los que se a dividido y subdividido para su estudio: a) esquema grafico que muestra las divisiones y sus medidas entre paréntesis de acuerdo a Bonnet (2000). También se indica la protuberancia apical en la cabeza y el anillo de Jensen que limita el movimiento de las mitocondrias y da fin a la vaina mitocondrial. b) Tinción con Azul de Coomassie donde se muestran las diferentes porciones del espermatozoide (Gutiérrez-Pérez, 2004).

Características del núcleo, envoltura nuclear y la teca perinuclear

Ya se ha mencionado que la cabeza espermática se encuentra constituida de adentro hacia fuera por el núcleo, su envoltura nuclear, la teca perinuclear y el acrosoma; y que esta recubierta por la membrana citoplasmática, pero de manera más detallada se debe agregar que la cromatina nuclear muestra ciertas características que sugieren que su organización es importante para cumplir con sus funciones, por lo cual durante la espermatogénesis el DNA espermático debe ocupar un volumen mucho menor que el de las células que lo originaron, lo que se resuelve condensado su material genético más que el de cualquier otra célula somática (Bedford, 1974), de ahí su apariencia más alargada y su forma que también es característica de especie.

De manera general la estructura nuclear consiste en un atado grueso de fibras de cromatina con un entramado en red de fibras más finas, que penetran en algunos puntos de la teca perinuclear que envuelve el halo de DNA (Bellvé, 1983).

La cromatina presenta una densidad uniforme aunque algunas especies como el humano y algunos roedores presentan zonas más electrolúcidas llamadas vacuolas nucleares (Longo, 1987; Bedford, 1974).

El alto grado de condensación nuclear se logra gracias a que las histonas son substituidas de manera progresiva por proteínas básicas más simples, las protaminas (Wykes, 2003). Las protaminas se unen al DNA de manera distinta a las histonas ya que las protaminas se ubican en el surco menor de la doble hélice formada por el DNA y de esta manera neutralizan totalmente las cargas negativas del mismo, esto facilita que cadenas vecinas de DNA puedan asociarse por uniones de tipo Van der Waals, lo que tiene como resultado un denso empaquetamiento del mismo. La formación de puentes disulfuro entre las moléculas de las protaminas refuerza todavía más, esta compacta estructuración. El complejo DNA-protaminas se condensa hasta una forma casi cristalina y bioquímicamente inerte debida a que el grado de condensación alcanzado inactiva el proceso de transcripción, por eso se dice que la cromatina espermática es inactiva (Ward y Zalensky, 1996).

Por otra parte, el arreglo seguido para el empaquetamiento no sólo es importante para la organización tridimensional del núcleo espermático sino que además parece proveer información epigenética esencial para proveer al núcleo de sus funciones (Wykes, 2003).

Se puede decir que la compactación del DNA es mediada por dos procesos:

a) La fosforilación/desfosforilación de las serinas y en menor grado de las treoninas integrantes de las protaminas (Marushige y Marushige, 1978).

b) La formación de puentes disulfuro entre los residuos cisteína característicos de las protaminas de mamífero (Bedford y Calvin, 1974).

A su vez el núcleo se encuentra cubierto por dos estructuras la envoltura nuclear y la teca perinuclear.

La envoltura nuclear se relaciona estrechamente con la cromatina y consiste en dos membranas separadas entre 7 a 10 nm. Cerca del polo caudal de la cabeza espermática, la membrana plasmática y la membrana nuclear se fusionan y forman el anillo posterior, el cual se considera una especie de sello que separa a cabeza y el flagelo en compartimientos. La envoltura nuclear no contiene poros nucleares, estos se concentran en una estructura residual de la espermiogénesis conocida como “envoltura redundante” que se aloja en la región del cuello y lejos de la cromatina, sin embargo el núcleo espermático se encuentra en un estado latente sin síntesis de proteínas por lo cual no requiere la presencia de dichos poros en su envoltura (Bellvé y O’Brien, 1983).

Por su parte la teca perinuclear es la principal estructura citoesquelética de la cabeza espermática que también ha sido llamada sustancia perinuclear y que al microscopio electrónica presenta una apariencia fibrillogranular (Courstens *et al.*, 1976, Lalli y Clermont, 1981; Oko y Clermont, 1988, Bellvé *et al.*, 1992; Mújica *et al.*, 2003).

Esta estructura constituye un citoesqueleto único y continuó que envuelve al núcleo excepto en su base (ver Esquema 2), donde se implanta el cuello del espermatozoide y donde como ya se mencionó se forma el anillo posterior (Longo *et al.*, 1987, Mújica *et al.*, 2003).

Es una cubierta citoesquelética no tradicional, muchos de sus componentes proteicos no son compartidos con los del Citoesqueleto de otros tipos celulares. La mayoría de las proteínas integrales son características de la teca y se reportan seis proteínas mayoritarias con 15, 25, 28, 32, 36 y 60 kDa (Oko y Maravei, 1994).

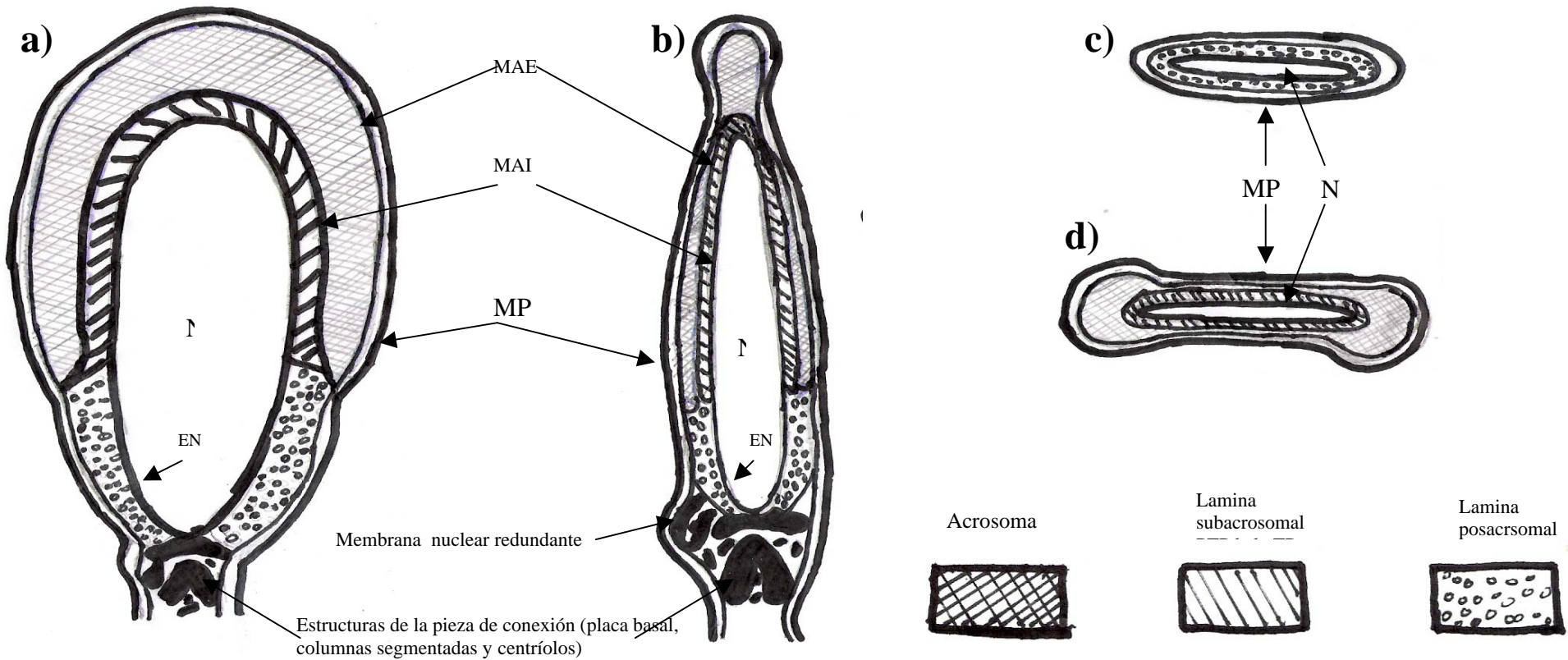
La teca perinuclear es ensamblada durante la espermiogénesis, estableciéndose entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear de manera estructuralmente continua. Esta integrada por dos segmentos distintivos que ocupan las dos regiones de la cabeza

espermática (acrosomal y postacrosomal). Morfológicamente ha sido dividida en dos regiones. La primera de estas dos regiones de la teca recibe el nombre de hoja o lamina subacrosomal (ver esquema 2), que se intercala entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y llena este espacio entre acrosoma y núcleo. La segunda región se conoce como hoja o lamina postacrosomal (ver esquema 2) y se extiende de manera distal desde la región ecuatorial de la cabeza espermática y se acomoda entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, las dos regiones no tienen su morfogénesis en la misma etapa de la espermiogénesis y difieren en composición proteica (Sutovsky *et al.*, 2003).

La teca perinuclear mantiene una continuidad estructural con la matriz nuclear, por lo que se convierte en una estructura citoesquelética que da forma al núcleo, además análisis ultraestructurales de espermátides y espermatozoides epididimales demuestran una estrecha relación entre la teca y las membranas acrosomales espermáticas, lo que sugiere que la teca participa además en la formación de la cabeza en el ensamblaje del acrosoma (Sutovsky *et al.*, 2003).

Otras funciones propuestas para la teca son la protección mecánica al envolver al núcleo y así mantenerlo íntegro durante la maduración espermática y el tránsito por el tracto femenino hasta el sitio de fecundación, otra es la rigidez estructural que aporta y favorece la penetración de las envolturas del óvulo, esta rigidez se debe al aumento en la estabilidad de la teca perinuclear conferida por el incremento progresivo de puentes disulfuro intra e intermolecularmente entre sus constituyentes proteicos durante la maduración epididimal al mismo tiempo que se establecen los enlaces entre las protaminas nucleares (Juárez y Mújica, 1999).

Es así que la teca es considerada un reservorio de moléculas de señalización que pueden ser las desencadenantes de la activación del ovocito, la defensa antipoliespérmica y el desarrollo embrionario temprano (Mújica *et al.*, 2003; Sutovsky *et al.*, 2003).



Esquema 2 Cortes de cabezas espermáticas

La figura representa cortes de cabezas espermáticas, las siglas representan: N núcleo, EN envoltura nuclear, MP membrana plasmática, MAI membrana acrosomal interna, MAE membrana acrosomal externa, en los recuadros de la derecha las texturas representan al acrosoma (izquierda), Lamina acrosomal de la TP (centro) y lamina posacrosomal de la TP (derecha). Los índices indican: a) Corte Longitudinal, se indica una sección de la pieza de conexión. b) corte sagital, nótese la posición de la membrana nuclear redundante que contiene los poros nucleares no funcionales, c) corte transversal a nivel de la región posacrosomal, nótese que aquí sólo se aprecia N, MP y Lamina posacrosomal de la TP. d) corte transversal a nivel de la región subacrosomal donde se aprecia el acrosoma.

La maduración epididimal espermática

En un principio los espermatozoides recién liberados del testículo son inmóviles e incapaces de unirse a la cubierta extracelular del ovocito (la zona pelúcida), de hecho los espermatozoides liberados de los túbulos seminíferos son infértiles, pero una vez que son transportados de la *rete testis* por los ductos eferentes al epidídimo, sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que les conferirán su potencial fecundante. Es durante el tránsito por el epidídimo donde entre otras cosas varias estructuras espermáticas aumentarán su resistencia o sufrirán una serie de modificaciones que más adelante le permitirán lograr adecuadamente la capacitación espermática e interactuar con el ovocito (Bellve, 1983; Juárez, 2000; Sutovsky, 2003).

Se ha mencionado que la conformación particular del núcleo celular espermático, esta dado por las protaminas, que son pequeñas proteínas básicas, ricas en cisteína. Poco después de su síntesis y hacia el fin de la espermiogénesis, estas protaminas son altamente fosforiladas en un proceso rápido que facilita la unión correcta de estas proteínas al DNA, esta unión favorece la eficiencia en la formación de puentes disulfuro covalentes, que se establecen entre los grupos tiol de las cadenas de protaminas adyacentes, lo que da mayor estabilidad a las cromatina (Marushige y Marushige, 1978; Balhorn, 1982).

Al respecto, Papottopoulou *et al.*,(1999), identificaron que la protamina conocida como P1 es fosforilada por una cinasa 1 específica llamada SR, cuya expresión es muy alta en las células espermáticas obtenidas de los testículos y se ve disminuida o ausente en los espermatozoides maduros. Por otra parte Pfeifer *et al.*, (2001) reportan que una selenio proteína de 34 kDa presente únicamente en el núcleo espermático, actúa como una tiol peroxidasa sobre las protaminas durante la maduración espermática (citado por Dadoune, 2003).

Varios estudios en el ser humano, ratas, ratones, cuyos, hámster y verracos, han mostrado que la estabilización de la cromatina se inicia en el testículo y luego se va desarrollando a través del paso de los espermatozoides de la cabeza a la cola del epidídimo, esto debido a que el número de puentes disulfuro se va incrementando en las protaminas. Imágenes por citometria estructural de espermatozoides de ser humano también han establecido que la condensación de la cromatina se incrementa de manera significativa durante el tránsito de

la célula espermática por el epidídimo, reflejando el aumento en el número de puentes disulfuro (Dadoune, 2003).

Otro estudio empleando electroforesis en gel SDS-poliacrilamida, compara las proteínas obtenidas de espermatozoides recuperados de la cabeza y la cauda del epidídimo, lo cual coincide con los resultados anteriores al detectar un mayor porcentaje de grupos sulfhidrilo libres en espermatozoides de cabeza, que podrán formar puentes disulfuro en la cauda epididimal (Sattayasai y Panyim, 1982).

Adicionalmente, estudios en la rata confirman que la maduración espermática en los mamíferos conlleva el establecimiento de enlaces, ya que muestran que los espermatozoides de la región de la cabeza del epidídimo contienen aproximadamente un 84% de grupos sulfhidrilo (SH) y el 16% de grupos disulfuro, a diferencia de los recuperados de la cauda del epidídimo, donde sólo el 14% del total de SH +SS son grupos thiol. Este mismo estudio reporta que durante el tránsito por el epidídimo, el espermatozoide de la rata, forma por lo menos 1.5 billones de puentes disulfuro por espermatozoide (Chapman, 2003).

Debido a la estabilización brindada por la formación de los enlaces disulfuro, no es sorprendente la alta resistencia del núcleo espermático a una gran variedad de agentes como ácidos fuertes, proteasas, DNAasas y detergentes, además del efecto consecuente de una inactivación transitoria que favorecerá la protección del genoma paterno, ya que esta estabilización compensa la ausencia de enzimas de reparación del DNA (Chapman, 2003).

En un experimento para comprobar el grado de protección brindado al DNA por la condensación nuclear, se adicionó actinomicina D a espermatozoides tratados y no tratados con el detergente sodio dodecil sulfato (SDS) y el reductor de enlaces disulfuro ditionitrosol (DTT), y se comprobó que en los no tratados, la presencia de los puentes disulfuro minimizó la unión de actinomicina D sobre el núcleo espermático (Bedford y Calvin, 1974). Con la condensación nuclear y la formación de un armazón estructural por las protaminas para el núcleo durante la maduración espermática, se logra un núcleo espermático protegido, lo cual es requerido para el transporte seguro del genoma paterno en el tracto reproductivo de la hembra y la penetración de las envolturas del ovocito con éxito (Gall, 1991; Montang, 1992; Sutovsky, 2000).

Ya se mencionó que la teca perinuclear es otra estructura que aumenta su estabilidad durante la maduración epididimal, a este respecto algunos cambios morfológicos ocurren en la hoja postacrosomal, como se ha comprobado en el cobayo (Juárez, 2000); primero durante su paso por el epidídimo se forma una **subestructura** por debajo de la región ecuatorial, esta subestructura también ha sido reportada en espermatozoides de conejo (Koehler, 1970), carnero (Watson *et al.*, 1995), cerdo (Juárez y Mújica, 1999) y bovino (Olson *et al.*, 1983; Martínez, 2003).

En el cobayo la subestructura se encuentra ausente en los espermatozoide tomados de la cabeza del epidídimo, sin embargo en la mayoría de las células espermáticas obtenidas del cuerpo del epidídimo ya se encuentra presente y se localiza en todos los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo y del ducto deferente. Además, se ha observado que la subestructura se conserva en los espermatozoides capacitados, pero no en los que sufren reacción acrosomal (Juárez y Mújica, 1999).

Por su parte, la actina es la proteína más abundante del citoesqueleto en las células eucariotas y juega un papel fundamental en muchos y diversos procesos celulares dinámicos (Ocampo, 1995). La actina-F se ha identificado en la región postacrosomal de la teca del espermatozoide del toro y del conejo (Flaherty, 1986), cobayo (Ocampo 1995; Juárez y Mújica, 1999) y del cerdo (Mújica *et al.*, 2003), y parece tener un papel importante en el proceso de formación y estabilización de la subestructura tal como lo valoraron Juárez y Mújica (1999) utilizando faloidina y citocalisina D.

Capacitación y reacción acrosomal

Previo a la fusión con el ovocito el espermatozoide debe sufrir dos procesos fisiológicos secuenciales para obtener su poder fertilizante, **la capacitación** y **la reacción acrosomal**. *In vivo* el espermatozoide pasa por un periodo de residencia en el tracto reproductor de la hembra que es conocido como **capacitación** y que lo prepara para la reacción acrosomal, durante este proceso el espermatozoide sufre un aumento en el calcio libre intracelular, cambios en la fluidez de su membrana plasmática, en su metabolismo energético y en la motilidad del gameto, producto de la remoción de glicoproteínas absorbidas de la superficie del espermatozoide (Yaganimachi, 1994).

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis regulada, en la que el acrosoma libera sus enzimas proteolíticas para que el espermatozoide logre atravesar las vestimentas del ovocito, además provoca modificaciones a nivel segmento ecuatorial y postacrosomal necesarias para la fusión con la membrana del ovocito, de hecho uno de estos cambios se traduce en la pérdida de la subestructura de la teca perinuclear (sTP) que se formó durante la maduración epididimal (Juárez *et al.*, 2000).

In vivo la RA es inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida (ZP3) es entonces cuando la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la membrana plasmática que recubre al acrosoma, lo que resulta en la liberación de su contenido, la RA es un requisito para que se logre la fusión (Bedford *et al.*, 1990), es importante notar que la membrana plasmática en su región ecuatorial no participa en la fusión con la membrana acrosomal externa, sino que es ahí donde se formará el nuevo sitio de fertilización de la cabeza espermática (Flesch *et al.*, 2000).

La fertilización

La interacción del espermatozoide con el óvulo inicia una serie de transformaciones que involucran a los componentes citoplásmicos y nucleares de ambos gametos, este fenómeno múltiple se conoce como fertilización y comienza con la interacción de los gametos que posteriormente se fusionan y termina con la asociación de los cromosomas correspondientes derivados de los dos pronúcleos en la etapa conocida como singamia (Flesch *et al.*, 2000).

En el caso del espermatozoide los eventos secuenciales que se llevan a cabo después de la fusión de las membranas y la incorporación del gameto masculino al citoplasma del ovocito son: la ruptura de la envoltura nuclear, la desestructuración de la teca perinuclear, la descondensación de la cromatina espermática y por último la formación del pronúcleo masculino (Bedford, 1990; Sutovsky, 2003). El esquema 2 se diseñó por el autor de este trabajo para representar de manera gráfica la secuencia de estos eventos.

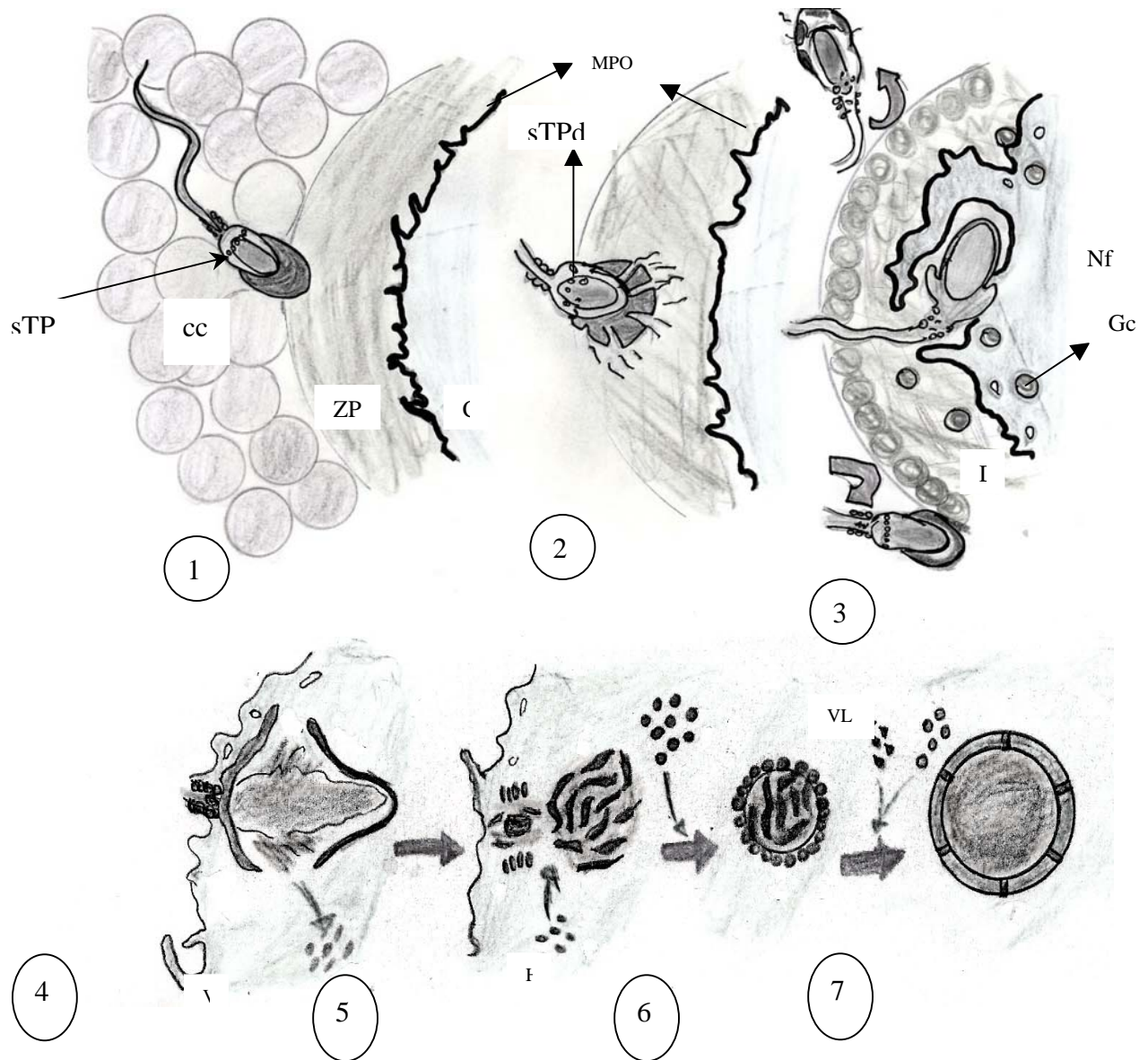
Inmediatamente después de la incorporación del espermatozoide al ovocito, las envolturas interna y externa de la envoltura nuclear se fusionan en múltiples sitios alrededor del núcleo espermático condensado para formar vesículas que se distribuyen en el citoplasma

circundante y rápidamente se confunden con otros elementos membranosos, entonces se puede decir que la envoltura nuclear desaparece (Marushige, 1978, Bellvé, 1983, Bedford, 1990) y como resultado de su rompimiento la cromatina espermática queda rodeada solamente por la teca perinuclear (Sutovsky, 2000).

La ruptura de la envoltura nuclear inicia a nivel del segmento ecuatorial y procede de manera antero-posterior (Yaganimachi, 1994).

De manera casi paralela, la región postacrosomal de la teca perinuclear se desestructura y su material comienza a mezclarse con el citoplasma del ovocito antes de que la descondensación del núcleo espermático se haga aparente (Usui, 1996; Sutovsky, 2003). Esta desestructuración en la teca perinuclear debe acontecer como un requisito para un adecuado proceso de descondensación y formación del pronúcleo y esté fenómeno también se presenta al igual que la desestructuración de la envoltura a partir de la porción apical de la región postacrosomal espermática, donde también se inicia como siguiente paso la descondensación nuclear (Gopalkrishan, 1991; Gall, 1991; Montang, 1992; Sutovsky, 2000).

Por otra parte, estudios con inyección intracitoplasmática (ICSI) han demostrado que si persisten el acrosoma y la teca perinuclear, dentro del ovocito fertilizado, la descondensación del DNA espermático de la región postacrosomal se lleva a cabo de manera irregular (Rhamalo-Santhos, 2000). Por lo tanto todo parece indicar que la teca debe prepararse para permitir su desestructuración de manera secuencial después de la pérdida de la envoltura nuclear para que el núcleo sufra una descondensación adecuada (Juárez, 2000; Mújica *et al.*, 2003).



Esquema 3 Principales eventos durante el proceso de fertilización:

1. El espermatozoide se abre paso a través de las células del cúmulo (cc) y entra en contacto con la zona pelúcida (ZP), nótese la integridad en la subestructura de la teca perinuclear (sTP). C: citoplasma del ovocito, MPO: membrana plasmática del ovocito.
2. Al entrar en contacto con la zona pelúcida las membrana citoplasmática del espermatozoide y la membrana externa acrosomal se fusionan en múltiples sitios a excepción de una pequeña porción en la región ecuatorial donde se formara el nuevo sitio de fertilización. Esta fusión permite la exocitosis regulada de las enzimas acrosomales (reacción acrosomal, RA), lo que permite al espermatozoide avanzar a través de la zona pelúcida (ZP) y llegar hasta la membrana plasmática del ovocito (MPO), la sTP se desestructura durante el proceso (sTPd).
3. Tras la reacción acrosomal la porción redundante de membrana acrosomal forma el nuevo sitio de fertilización (Nf) que entra en contacto con la MPO, en ese momento el espermatozoide es engolfado por el ovocito, por lo tanto no es el espermatozoide el que penetra al ovocito, sino el ovocito quien lo "fagocita", en ese momento el ovocito se activa, libera los gránulos corticales(Gc) que alteran la composición de la zona pelúcida(D) y la vuelven impermeable a otros espermatozoides (reacción cortical), evitando la poliespermia.
4. Ya dentro de citoplasma del ovocito se produce la ruptura de la envoltura nuclear y desintegración de la Teca que inicia en la región ecuatorial, la descondensación se inicia igualmente a nivel de la región ecuatorial por la acción del GHS, la envoltura se vesiculiza y se pierde en el citoplasma del ovocito (V), el núcleo inicia el recambio de sus protaminas empiezan a ser remplazadas por acción de los GAGs, por histonas provenientes del ovocito (H1, H2,H3 y H4), aunque existe la posibilidad de que algunas provengan de la teca perinuclear.
5. El núcleo completamente descondensado se encuentra desnudo mientras que la porción del cuello del flagelo que se internaliza en el ovocito y donde se encuentran las mitocondrias espermáticas, es atacada por los agentes reductores de disulfuro y se libera el centríolo proximal que empieza a condensar material pericentriolar para formar el aster espermático.
6. Vesículas membranales se agrupan alrededor del material nuclear para después fusionarse y formar la membrana del pronúcleo masculino. La fusión vesicular en una envoltura nuclear continua es dependiente de ATP y GTP como sustratos energéticos y requiere de estructuras polares espermáticas lipofílicas (LSs) que permitan la adhesión de estas vesículas a la cromatina
7. El aumento de tamaño del pronúcleo y el reensamblaje de la ovocito nuclear requieren de vesículas membranales adicionales citoplasma y lamininas (VL). Las lamininas proveen al pronúcleo de poros nucleares funcionales. Una vez formada la ovocito nuclear, la membrana del pronúcleo y un núcleo organizado por histonas, esté se transforma en funcional y esta listo para la singamia

La descondensación nuclear *in vivo*

Una vez que el núcleo espermático pierde su recubrimiento (envoltura y teca perinuclear) se inicia el proceso de recondensación, y este proceso debe darse por que si bien es cierto que la compactación de la cromatina espermática es necesaria para la protección del DNA (Gall, 1976; Montang, 1982), una vez en el citoplasma del óvulo las protaminas son incapaces de aportar la estructura tridimensional adecuada que permita la transcripción y replicación del DNA, por lo que tienen que ser reemplazadas por histonas derivadas del óvulo, esto como prerequisite para que pueda participar en el desarrollo pronuclear masculino y la singamia (Usui, 1996; Sutovsky, 2003).

Este intercambio favorece la reactivación en el genoma espermático paterno de los procesos de replicación y transcripción dentro del ovocito lo cual como ya se mencionó, es un proceso necesario para que los dos grupos de cromosomas (paterno y materno) se encuentren con el mismo arreglo estructural y funcional en el momento adecuado permitiendo la interacción de la cromatina del pronúcleo masculino con la cromatina del pronúcleo femenino (Zirkin, 1985; Colleu, 1997).

Después de la reducción de los puentes disulfuro y la hidrólisis de la protaminas, éstas serán reemplazadas por histonas que no son sintetizadas por el espermatozoide ya que este reemplazo de protamina por histona, ocurre en ausencia de síntesis proteica lo que sugiere que en el citoplasma del ovocito debe existir un depósito de histonas maternas disponibles para este recambio (Usui, 1976; Kuist, 1980; Longo, 1987; Sutovsky, 2003)

Por otra parte Sutovsky y Oko (2003) basándose en la presencia de proteínas parecidas a las histonas en la hoja subacrosomal de la teca perinuclear detectadas por Oko y Maravei (2001), consideran que estas proteínas estructurales de la teca, podrían convertirse en una fuente de aporte rápido de histonas en los estadios tempranos del desarrollo pronuclear masculino.

Algunos autores proponen que el reemplazo de las protaminas por histonas durante el proceso de fertilización se inicia desde la unión a la zona pelúcida cuando parece haber una inducción a la desestabilización del complejo DNA-nucleoprotamina siendo esta desestabilización el prelude para dicho reemplazo (Colleu, 1997); este reemplazo se inicia en la periferia del material condensado y continúa cuando se incrementa el volumen de la

zona en dispersión y se sugiere que los agentes responsables de la dispersión, inician el proceso en la periferia, para que una vez que la cromatina periférica esté dispersa, la cromatina ubicada en las zonas nucleares centrales esté libre para dispersarse también, sin embargo, en algunos casos se ha visto que la dispersión no parece llevarse de manera uniforme sino que simultáneamente se forman regiones de diferente densidad y conformación en diferente estado de descondensación lo que provoca un considerable aumento de volumen en la cromatina espermática (Longo, 1987).

La remodelación de la cromatina durante este proceso de descondensación sigue un patrón característico que algunos autores han descrito en tres etapas. En la primera, mientras que el ovocito se encuentra completando la anafase II, la cromatina espermática se dispersa y aumenta el volumen de la cabeza espermática (swelling o hinchazón) y aunque al microscopio óptico el volumen de dispersión es difícil de calcular, parece ocupar un área tres veces mayor.

En una segunda etapa, cuando el ovocito se encuentra completando la telofase II, la cromatina nuclear espermática se condensa en una masa pequeña ocupando la mitad del volumen anterior. En la tercera etapa, la cromatina del pronúcleo masculino vuelve a incrementar su volumen hasta casi diez veces su tamaño, al mismo tiempo y de manera sincrónica la cromatina del pronúcleo femenino también sufre hinchamiento.

Al parecer los mecanismos involucrados en el aumento del volumen nuclear y en el reemplazo de las protaminas por histonas se basan en una cadena fosforilaciones de las histonas del ovocito inmediatamente después de la fertilización (Reyes *et al.* 1991).

Se ha especulado si la de dispersión de la cromatina es el proceso inverso de la condensación nuclear ocurrida durante la espermatogénesis, pero al parecer si éste es reversible, al menos no es regulado por el mismo mecanismo. Por otra parte, aunque la velocidad de descondensación varía entre especies, las condiciones citoplásmicas que provocan la descondensación y la subsiguiente formación del pronúcleo masculino aparentemente no presentan especificidad; por ejemplo, los núcleos de los espermatozoides del ser humano se descondensan y forman pronúcleos normales en ovocitos de hámster (Longo, 1987) y en ovocitos o extractos citoplásmicos de ovocitos de ranas del género *Xenopus* (Longo, 1987).e

Por lo anterior se puede considerar que el evento de descondensación es la pérdida de la estructuración del núcleo espermático. Diversos agentes han sido propuestos en el desencadenamiento del mecanismo de descondensación; las primeras teorías hablaban de una proteasa acrosomal, parecida a la tripsina, que participa en la degradación de las protaminas (Mahie *et al.*, 1975; Marushige y Marushige, 1978). Por su parte, Gall, 1976, Chang, 1978 y Zirkin, 1980, demuestran en el espermatozoide de conejos una enzima tipo acrosina que interactúa con la cromatina nuclear durante la reacción acrosomal y sugieren que esta podría estar participando en la degradación proteolítica de las protaminas (citados por Colleu, 1997).

Sin embargo, para que las protaminas puedan quedar libres primero es necesario que se reduzcan los puentes disulfuro que las mantiene estables y el principal agente reconocido que podría realizar este proceso en los ovocitos de mamífero es el glutatión reducido (GSH). El GSH es un tripéptido glicosilado presente en el citoplasma del ovocito y presente en mayor cantidad por ovocitos maduros. Actúa en la reducción de los puentes y facilita también el desensamble de las piezas que conectan la cola espermática con el centriolo y que soportarán la formación del primer huso mitótico (Zirkin, 1985).

Varios estudios han demostrado que la pérdida de la envoltura nuclear y la consecuente descondensación del núcleo espermático, dependen del estado de maduración del ovocito penetrado ya que estos eventos sólo se presentan en ovocitos maduros en anafase o telofase II (Usui, 1996).

En los anfibios se ha identificado a la nucleoplasmina, una fosfoproteína ácida (Dean, 1983), como una proteína importante en el recambio de proteínas al competir por carga y unirse a las protaminas, por las cuales tiene una gran afinidad, lo que permite que el DNA libre se una inmediatamente a las histonas provenientes del ovocito. En el caso de los mamíferos se han identificado algunas sustancias parecidas a la nucleoplasmina, pero además en el citoplasma del ovocito se encuentran glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs, por ejemplo la heparina) que actúan de la misma manera descrita para la nucleoplasmina, favoreciendo el intercambio protaminas-histonas (Reyes *et al.*, 1991).

Tanto el GSH como los GAGs están presentes en mayor concentración en los ovocitos maduros recién ovulados, de hecho los ovocitos inmaduros no son capaces de provocar la

descondensación del núcleo espermático (Usui, 1996). El citoplasma del ovocito, por otra parte contiene elementos que facilitan los procesos de oxidorreducción necesarios en la descondensación pues es capaz de aportar el equivalente reductor usual que es el NAD(P)⁺, que puede ser reducido a NAD(P)H, la región nuclear del ovocito contiene un suplemento casi ilimitado de NAD(P)⁺, y se ha reportado la existencia de una NADPH oxidasa en la membrana espermática que favorecería la transferencia de estos agentes reductores (Reyes *et al.*, 1991).

Por otra parte durante todo el proceso de descondensación, distintas proteínas adicionales son importadas del citoplasma del ovocito hacia el interior del pronúcleo masculino en formación y la mayoría de ellas se encuentran directa o indirectamente asociadas con la cromatina, un ejemplo son las proteínas del cinetocoro CENP-A y CENP-B, estas proteínas son requeridas como elementos que ayudan a la preparación de la cromatina paterna para que se pueda reiniciar la fase S (fase de síntesis) del ciclo celular (Reyes *et al.*, 1991).

Gallina, 1996, reporta la posibilidad de que las mitocondrias del espermatozoide participen en el proceso de descondensación aportando los sustratos energéticos por medio de la vía de lanzadera lactato/piruvato (citado por Chapman, 2003).

El mecanismo anteriormente descrito de descondensación espermática inducido por el ovocito es exclusivo de los mamíferos (Zirkin, 1985; Usui, 1996; Sutovsky, 2000) y una vez realizado, una nueva envoltura nuclear es reconstruida alrededor del núcleo espermático a partir de vesículas derivadas del óvulo. Este último paso marca la formación de los compartimientos nucleares y citoplásmicos en el ovocito fertilizado, provocando además la necesidad de establecer una comunicación bidireccional con el intercambio de moléculas necesarias para formar el pronúcleo masculino y el posterior desarrollo embrionario (Zirkin, 1985; Córdova, 2002).

Los estudios de descondensación *in vitro*

Los estudios *in vitro* del proceso de descondensación se han utilizado para revelar la capacidad funcional del espermatozoide, así como para valorar la correcta compactación del material genético durante la espermiogénesis, su estabilización durante la maduración espermática, su protección durante el viaje espermático al sitio de fertilización y

finalmente una vez dentro del ovocito, para evaluar la adecuada formación del pronúcleo masculino.

Aunque el espermatozoide maduro es resistente a la acción directa de varios agentes químicos, detergentes y enzimas (Strzezek y Kordan, 2003), *in vitro* se ha logrado la descondensación utilizando combinaciones de agentes descondensantes (Calvin y Bedford, 1971; Bedford *et al.*, 1973; Gall y Ohsumi, 1976; Usui y Yaganimachi, 1976; Reyes *et al.*, 1991; Ocampo, 1995; Hernandez, 2004).

Los tratamientos a base de ditioneitol (DTT) han sido utilizados desde que Cleland demostrara su actividad como agente reductor de enlaces disulfuro en 1964. Calvin y Bedford (1971) reportan la descondensación del núcleo espermático de diferentes especies de mamíferos combinando la acción del DTT con SDS, determinando que los espermatozoides obtenidos del epidídimo se descondensaban más rápidamente que los espermatozoides maduros, ello debido a la menor cantidad de puentes disulfuro que contenían los primeros. En otro estudio Fornes (1994) utiliza DTT en combinación con Thioglicolato para descondensar el material nuclear de espermatozoides de rata, provenientes de diferentes regiones del epidídimo.

Por su parte, Perreault y Zirkin, (1982) lograron producir la descondensación del núcleo espermático de hámster empleando una dosis de 5 mM de DTT más 1% del detergente Triton X-100.

En el espermatozoide de ratón, la combinación de DTT y tripsina produce una descondensación en primer lugar de la región postacrosomal de la cabeza espermática, mientras que la región subacrosomal presenta una mayor integridad (Gall y Ohsumi, 1976). Adicionalmente, la presencia necesaria de DTT para lograr la descondensación *in vitro* de espermatozoides de rata, cobayo y conejo también se reportó en este experimento.

Otro estudio que confirma la necesidad de un reductor de enlaces disulfuro en la descondensación *in vitro*, muestra que los núcleos de los espermatozoides de ratón no pueden ser teñidos con Giemsa a menos de que sean tratados con DTT o bien hasta que entran en contacto con el citoplasma del ovocito, lo que otra vez confirma que los enlaces disulfuro son reducidos una vez que las nucleoproteínas entran en contacto con el citoplasma del ovocito (Miller, 1982).

Un caso aparte ha sido el de los espermatozoides del ser humano ya que se ha comprobado que existen grupos tiol libres en las protaminas de su cromatina que se mantienen estabilizados por la unión a iones zinc aportados por las secreciones de la próstata (Kuist, 1982), para superar la estabilidad brindada por el zinc y lograr la descondensación óptima de estos núcleos espermáticos dentro del ovocito maduro, éste último cuenta con un número de grupos tiol libres en su citoplasma que secuestran el zinc y de esta manera liberan a las protaminas espermáticas, facilitando el proceso de descondensación en esta especie (Usui, 1996). *In vitro*, se ha utilizado la mezcla de dodecil sulfato de sodio (SDS) un detergente neutro y treacetato etilen diamino (EDTA) un agente quelante, para comprobar la estabilización dada a los grupos tiol libres de las proteínas espermáticas del ser humano. El SDS solubiliza las membranas y el EDTA atrapa el zinc dejando libres los grupos tiol de las protaminas (Kuist *et al.*, 1980; Kuist, 1982; Huret y Groyer, 1985; Huret, 1986; Gopalkrishnan *et al.*, 1991), provocando la descondensación del material nuclear sin emplear agentes reductores de disulfuros (Kuist, 1980, 1982). Por otra parte esta habilidad para descondensar el núcleo se pierde si se agrega un agente alquilante que actúa sobre los grupos tiol de los espermatozoides, como por ejemplo la iodo acetamida (Kuist, 1982)

Esta podría ser la explicación del por que en un estudio para valorar la estabilidad de la cromatina de verraco empleando diferentes agentes descondensantes y el radioinmunoensayo (RIA), se encontró que los tratamientos con SDS, GSH, Heparina, DTT y mercaptoetanol incrementan la absorción del radioisótopo utilizado; mientras que en comparación los tratamientos a base de EDTA y BSA provocaron una disminución de la incorporación del mismo. En este caso los autores atribuyeron la hipercondensación a la reacción entre los grupos tiol liberados por el quelante utilizado (Strzezek y Kordan, 2003) Por otra parte retomando la acción reductora de enlaces disulfuro que el DTT presenta sobre la cromatina espermática, Dean (1983) logra la descondensación de núcleos desnudos resuspendidos de ratón con concentraciones de DTT 10 mM y una incubación por 30 min a 37°C. Cuando se mencionan núcleos espermáticos desnudos se refiere a núcleos que han sido desprovistos de la membrana plasmática y acrosomal, pero también de la teca perinuclear como es el caso de Delgado *et al.* (1999) que aplicando una incubación con

detergente CTAB (1%) más DTT (9mM), lograron solubilizar membranas y obtener núcleos desnudos.

La heparina es capaz de descondensar núcleos espermáticos desnudos como lo comprueba Ocampo (1995) que descondensó núcleos de cobayo aplicando 1500 USP de heparina. Por otra parte, la heparina ha sido utilizada como un agente descondensante en combinación con otros agentes como por ejemplo el GSH, tomando en consideración la acción de este último, como reductor de puentes disulfuro y en la capacidad de la heparina para competir con el DNA por las protaminas.

Reyes *et al.* (1996) lograron descondensar núcleos de los espermatozoides de hámster con GSH (12.5 mM) y heparina (60 μ M). Con esas mismas concentraciones Sánchez *et al.* (1996) descondensaron núcleos de espermatozoides de rata y ratón.

Delgado *et al.* (2001) encontraron que el GSH sólo no logra producir la descondensación del núcleo de espermatozoides de bovino y sólo después de agregar heparina se logró su descondensación por lo que concluye que la ruptura de los puentes disulfuro no es suficiente para lograr la descondensación, la cual se ve favorecida por la acción de la carga negativa de la heparina.

Por otra parte se ha dicho que la TP también aumenta su estabilidad en base al establecimiento de enlaces disulfuro por lo que Juárez y Mújica (1999) estudiaron el efecto del tratamiento del DTT sobre la morfología de la subestructura de la TP del cobayo, encontrando que a una concentración de 15mM, el DTT no tiene efecto alguno sobre la teca perinuclear ni sobre la subestructura, sin embargo concentraciones de 22.5mM y 50 mM provocaron alteraciones en la región subacrosomal de la TP, aunque la subestructura permaneció íntegra, lo que indica que la estabilidad de esta última no depende de los enlaces disulfuro.

Adicionalmente, Hernández, (2004), logró la descondensación del núcleo del espermatozoide de cobayo aplicando una combinación de DTT a una concentración de 5 mM y 5USP de heparina y los comparó con la acción de estos dos agentes por separado, encontrando los mejores resultados en la combinación de ambos agentes y al estudiar la teca perinuclear y su relación con el proceso de descondensación, llegó a la conclusión de que la subestructura de la teca perinuclear participa de manera importante en la estabilidad

del núcleo espermático, ya que al tratar la teca con faloidina y evitar la despolimerización de actina F, la subestructura se mantuvo y la descondensación del núcleo fue retardándose, con lo cual se confirma que la subestructura debe sufrir una desestructuración para favorecer la descondensación.

Métodos de conservación del semen

La inseminación artificial (IA) consiste en depositar el semen por medios mecánicos en el aparato reproductor de la hembra en el momento adecuado, en esta técnica el macho que aporta el semen no está presente, por lo cual debe procesarse para su conservación.

La conservación del semen porcino puede realizarse de tres maneras: fresco, refrigerado o congelado.

El semen fresco se obtiene y se utiliza en la misma explotación conservándose a temperatura ambiente y aplicándose en un período no mayor a tres horas después de su recolección (Guzmán, 2003).

El semen refrigerado es el de mayor aplicación comercial y consiste en semen diluido en medios de conservación que permiten la viabilidad del semen por 2, 5 y hasta 7 días manteniendo su capacidad fertilizante mientras se conserve entre 15 y 16°C (Córdova, 2001).

Una variante menos utilizada es la conservación a 5°C, ya que en este caso se requiere de la adición de sustancias crioprotectoras (Jhonson *et al.*, 2000)

Por último, se tiene que a pesar de que la congelación permite conservar a los espermatozoides por tiempo indefinido, en la práctica, su aplicación ha demostrado sus limitaciones al obtener bajas tasas de fertilidad.

El semen porcino se caracteriza por ser producido en grandes volúmenes en comparación con otras especies domésticas, pero es más sensible al enfriado posterior a la recolección. La producción diaria de espermatozoides es de aproximadamente 16.2×10^9 , de los cuales hasta un 54% se puede encontrar en la cola del epidídimo. El proceso de maduración de los espermatozoides de verraco en el epidídimo es de 5.4 días de duración en la región cabeza-cuerpo y de 6.4 días de duración en la cola. Los espermatozoides de verraco de origen epididimario son más resistentes al choque por frío que los eyaculados, debido a los

cambios que ocurren durante su maduración epididimal ya que como hemos mencionado el espermatozoide sufre varios cambios al pasar por el epidídimo, el cambio principal al que los autores han referido como causante de este aumento de sensibilidad es la disminución en el contenido lipídico del espermatozoide ya que como se mencionó, un espermatozoide eyaculado contiene una membrana con una alta relación de ácidos grasos poli insaturados-saturados en los fosfolípidos y un bajo nivel en su contenido de colesterol (Locksley *et al.*, 1990; Hamamah *et al.*, 1990; Evenson *et al.*, 1994; Cerolini *et al.*, 2001; Córdova *et al.*, 2001, 2002).

Esta mayor sensibilidad al daño por congelación ha motivado que en la búsqueda de eficientizar la técnica se desarrollaran diversos protocolos para la congelación que combinan distintos diluyentes, crioprotectores, tasas de enfriamiento y condiciones de procesado en la congelación y la descongelación, aunque no se han obtenido mejores resultados (Johnson, 2000).

Una buena técnica de congelación será aquella que mantenga: a) la actividad metabólica productora de energía para realizar las diversas funciones celulares, b) la integridad de las proteínas estructurales necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino y para la adhesión al ovocito en el momento de la fecundación, c) el mantenimiento de las enzimas acrosomales útiles para la penetración del espermatozoide en las vestimentas del ovocito y e) la capacidad del espermatozoide para realizar movimientos progresivos (Palacios, 1994; Flores, 2005), de ahí la necesidad de realizar estudios sobre el comportamiento fisiológico de la célula espermática bajo el estrés por congelación.

Efectos de la criopreservación sobre la célula espermática

Como se mencionó anteriormente, el problema real que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C sino la combinación de efectos dañinos que en el proceso del congelado- descongelado tienen sobre la fisiología y morfología espermática (Watson, 1995).

La teoría del daño celular por congelación se basa en los cambios físicos que afectan la estabilidad celular, estos son el sobreenfriamiento, la transición de fases, la formación de

cristales de hielo, la liberación de calor latente y el daño por concentración de solutos (Flores, 2005).

El sobreenfriamiento ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0°C y el agua extracelular se congela, mientras que la intracelular no lo hace al mismo tiempo, ya que la membrana funciona como una barrera que impide que el cristal extracelular crezca hacia el interior de manera continúa. Es por ello que se recomiendan tasas de enfriado lentas que permitan al agua salir de la célula y congelarse fuera de ella (Watson, 1995).

La transición de fases es el cambio físico que sufren los lípidos de la membrana plasmática, la cual se encuentra en un estado laminar líquido cristalino, pero al congelarse la fluidez de la membrana disminuye ya que se vuelve rígida y poco elástica al adoptar un estado de gel (Holt, 2000; Chen, 2002).

Mazur (1985), propone la teoría de que la curva de supervivencia espermática depende de una velocidad intermedia de congelación y que se puede graficar en forma de U invertida.

Por su parte Bwanga (1991) menciona que al producirse cambio de estado físico se libera el denominado “calor latente” de fusión, subiendo la temperatura desde el punto en que se forma el hielo hasta cerca del punto teórico de congelación de la solución y se mantendrá así hasta que el calor se disipe, ello dependerá a su vez de la concentración de solutos del medio y la concentración del crioprotector incluido, por lo que para evitar daño celular, esté debe ser disipado lo más rápido y uniformemente posible.

En el espermatozoide después de la formación del hielo la concentración de solutos excede su solubilidad y estos se precipitan, esto se conoce como punto eutéctico, lo cual provoca cambios en la osmolaridad y un encogimiento de la membrana (Watson, 1995).

Debido a los fenómenos mencionados anteriormente el proceso de congelación-descongelación altera la membrana plasmática, la membrana acrosomal externa y la membrana mitocondrial que son altamente susceptibles al daño por congelación.

Como también se mencionó la transición de fases puede dañar a la membrana de manera irreversible afectando sus propiedades, por lo que una pérdida en su asimetría se refleja en una mayor fluidez (Patist y Zoerb, 2005). Por lo que un aumento en la fluidez es una condición que le confiere a la membrana plasmática una mayor inestabilidad y se traduce en una expectativa de vida mucho más reducida para el espermatozoide.

Además, debido al aumento en la fluidez de la membrana plasmática la criopreservación incrementa la proporción de espermatozoides capacitados, fenómeno que ha sido llamado criocapacitación, falsa capacitación o “cambios similares a la capacitación” (Curry, 2000; Green y Watson, 2001; Cerolini, 2001; Petrunkina *et al.*, 2005).

Por otra parte, algunas enzimas son termodependientes y su participación en la pérdida de la asimetría membranal se encuentra asociada con los cambios de temperatura sufridos durante la congelación-descongelación (Watson, 1995).

Estudios comparativos revelan que la congelación provoca en el espermatozoide del ser humano y en el del porcino una hipercondensación de la cromatina (Hamama, 1990) lo que parece retrasar la formación del pronúcleo masculino durante la fertilización (Córdova, 2002), lo cual induce una muerte embrionaria temprana y/o un pobre desarrollo embrionario (Hamama, 1990; Evenson, 1994; Córdova, 2002)

El citoesqueleto también se altera por la congelación; ya desde principios de la década de los 90's se sabe que los procesos de congelación tienen un efecto directo sobre el citoesqueleto. Vincent *et al.* (1990) reportan despolimerización de los filamentos de actina en los embriones criopreservados de conejo en etapa de una célula. Hall *et al.* (1993) estudiando la congelación de las células endoteliales de las arterias pulmonares, reportan la falla de adhesión entre la membrana basal y la placa de cultivo, debido a la pérdida en la organización de las fibras de actina de sus citoesqueletos.

Watson (1995) en una revisión sobre el daño espermático por el proceso de congelación, menciona que las proteínas del citoesqueleto espermático que soportan las membranas plasmáticas y acrosomal también presentan despolimerización y repolimerización dependiente de temperatura, lo cual se refleja en los rápidos cambios de volumen que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación.

En estudios sobre espermatozoides de ratón se ha visto que el estrés osmótico ocasionado por la congelación afecta la permeabilidad de la membrana, alterando la energía de activación necesaria para la conductividad hidráulica y esta a su vez es dependiente de las interacciones membranales con el Citoesqueleto (Luna, 1992), que se encarga de mantener los parámetros de conductividad hidráulica al permitir las adaptaciones de la célula a los cambios osmóticos (Noiles, 1997; Storey *et al.*, 1998).

Esta capacidad de regular el volumen celular, que es crítica durante el proceso de criopreservación también se ha comprobado en espermatozoides porcinos y caninos, en los que el citoesqueleto ayuda a la formación de gradientes osmóticos locales que atraviesan la membrana plasmática a través de canales iónicos, y que son establecidos para mantener un proceso de transferencia de osmolitos hacia dentro y hacia fuera de la célula, para tratar de restablecer el equilibrio osmótico. Petrunkina (2004, 2005) hace mención de otras investigaciones en diferentes líneas celulares (células tumorales, leucocitos, ovocitos de, y espermatozoides porcinos) en las que sugiere que el Citoesqueleto juega un papel importante en el envío y traducción de las señales que controlan los cambios de volumen por lo cual un citoesqueleto íntegro es de vital importancia en la funcionalidad y supervivencia celular tras la congelación.

En un estudio reciente sobre congelación de espermatozoides de bovino se encontraron cambios estructurales en la teca perinuclear cercanos al 52% (52.5 ± 2.66) consistentes en alteraciones morfológicas de la subestructura de la teca perinuclear y se concluyó que entre mayor sea el porcentaje de espermatozoides con la teca perinuclear ausente menor será el número de espermatozoides vivos (Martínez, 2003).

De la misma manera en el laboratorio del departamento de morfología de la FMVZ de la UNAM valorando al microscopio electrónico de transmisión con tinción negativa subestructuras de espermatozoides de cerdo descongelado se encontró, un porcentaje significativo ($P < 0.0001$) de subestructuras alteradas con una diferencia porcentual de 35.6% más espermatozoides con subestructuras dañadas en comparación con el semen fresco (Arancibia-Salinas, 2005 comunicación personal).

Pese al daño sufrido por el citoesqueleto la integridad de la cromatina no parece afectarse, Reyes *et al.*, (2001) estudiando el efecto de la criopreservación en núcleos espermáticos de bovino y carnero no encontraron alteraciones en cuanto mediciones morfométricas (área total, perímetro, largo o ancho de los núcleos) durante el proceso de congelado en el rango de los 5 °C a los -5°C, aunque por otro lado si encontraron variación significativa en la hidrolización del fluorocromo FDA, lo que interpretaron como una pérdida en la funcionalidad espermática y que concuerda con lo reportado por Royere *et al.* (1988), Hamama *et al.* (1990) y Córdova *et al.* (2003), quienes en sus trabajos mencionan no haber

encontrado daño en la estructura de la cromatina nuclear, pero si un fenómeno de retraso en el proceso de descondensación que ellos llaman “sobrecondensación”.

Por todo lo anteriormente desarrollado queda claro que la congelación-descongelación es una técnica que provoca alteraciones en estructuras espermáticas bien definidas una de las cuales, el citoesqueleto, ha sido relativamente poco estudiado.

De ahí que en el presente trabajo se haya elegido a la teca perinuclear como objeto de estudio, ya que esta estructura parece ser un elemento dinámico que participa de diversas maneras en el proceso de fertilización, por lo cual resulta interesante determinar el papel que la TP podría estar desempeñando en el proceso de descondensación, para lo cual es importante establecer si la alteración que presenta la subestructura de la TP tras el descongelado, puede relacionarse con el retraso en la descondensación nuclear en espermatozoides descongelados, por lo que, establecer esta relación fue la finalidad de este estudio.

HIPÓTESIS

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

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Valorar el daño sufrido por la teca perinuclear posterior a la criopreservación utilizando para valorar el grado de alteración la integridad de la subestructura (sTP).
- Comparar el proceso de descondensación nuclear después de un tratamiento combinado DTT/heparina en espermatozoides frescos y descongelados.
- Evaluar el proceso de descondensación nuclear anterior en los espermatozoides frescos y descongelados tratados con faloidina.
- Valorar el efecto del tratamiento por separado del DTT en los espermatozoides frescos y descongelados.
- Valorar el efecto del tratamiento por separado de la heparina en los espermatozoides frescos y descongelados.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron los eyaculados de tres cerdos reproductores sexualmente activos. Dos de los animales de la raza Duroc, pertenecieron a una granja comercial de Tepeji del Río, y el tercer macho fue de la raza Pietrain y perteneció a una granja productora de pie de cría en el estado de Tlaxcala. Dos eyaculados fueron obtenidos por cerdo, el segundo con un intervalo de tres semanas después del primero.

El diseño experimental se realizó en tres fases que son descritas a continuación.

En la **primera fase** se efectuó:

- 1) La valoración de la integridad de la teca perinuclear posterior al descongelado.
- 2) La observación del proceso de descondensación progresiva inducida por el tratamiento con DTT/heparina en espermatozoides frescos y descongelados
- 3) La medición de la región ecuatorial de las cabezas de los espermatozoides del punto anterior.

Para ello cada eyaculado obtenido fue dividido en dos partes, una para ser utilizada como semen fresco y otra para someter a los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación.

Por lo tanto cada muestra fue analizada en dos momentos, una antes de la congelación y otra después de este proceso. Cada una de las características fue evaluada de la siguiente manera:

- A) La morfología de la subestructura de la teca perinuclear (sTP) fue clasificada en tres grados: íntegra, cuando su morfología aparentaba continuidad, dañada si perdía continuidad y mostraba zonas en desestructuración y ausente. La variable a medir fue el porcentaje de células que presentaron tecas alteradas y para ello se contabilizaron 30 células en cada una de las muestras control es decir la primera la alícuota de semen fresco o semen descongelado fijada antes de la aplicación del tratamiento descondensante, esta fue denominada tiempo 0. El conteo y la clasificación se efectuaron en el microscopio electrónico de transmisión.

- B) El proceso de la descondensación progresiva se valoró por observación directa de su evolución en las muestras, después de la aplicación del tratamiento DTT/heparina. Para ello se definieron dos grupos experimentales, el grupo 1 que contempló a los espermatozoides frescos y el grupo 2 para los espermatozoides descongelados. De forma similar a la valoración de la integridad de la sTP, se consideró como unidad muestral el espermatozoide, por lo cual se realizó la observación de 30 espermatozoides en muestras fijadas a diferentes momentos del tratamiento denominados tiempos progresivos y que fueron un total de nueve. El tiempo cero o control fue antes de la aplicación del tratamiento con DTT/heparina y los ocho restantes fueron a los 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 y 600 segundos posteriores al inicio del tratamiento. Para valorar el efecto progresivo del tratamiento descondensante se tomaron micrografías electrónicas de cada uno de estos tiempos.
- C) La medición del diámetro de la región ecuatorial de las cabezas espermáticas se valoró por medio de la longitud que presentaba esta región en 30 células de cada uno de los “tiempos progresivos de descondensación” citados. La evaluación se realizó empleando el microscopio óptico, a 100 x en objetivo de inmersión.

Por lo tanto en esta fase las variables de estudio fueron:

- Integridad de la teca perinuclear
- Descondensación progresiva
- Medición de la región ecuatorial

El análisis aplicado fue el siguiente:

- a) Para la integridad de la teca se utilizó la prueba estadística χ^2
- b) Para la descondensación se valoró el proceso a través de las micrografías secuenciales del proceso.
- c) La medición ecuatorial se analizó por diferencia entre medias

En la **segunda fase** se valoró el proceso de descondensación progresiva presentado por ambos tipos de espermatozoides sometidos a una preincubación con faloidina. Este tipo de

muestras serán denominados espermatozoides estabilizados, y referidos como grupo experimental 3 frescos y grupo experimental 4 descongelados.

Para ello tres de los seis eyaculados fueron sometidos a la aplicación de la faloidina, para después valorar el proceso de descondensación progresiva inducido por el tratamiento base de DTT/heparina.

Como en el caso de la fase anterior también se consideró como unidad muestral el espermatozoide en ambos grupos experimentales (grupo 3 espermatozoides frescos y grupo 4 espermatozoides descongelados) por lo cual se tomaron micrografías electrónicas de cada uno de los 9 “tiempos progresivos de descondensación” con el fin de valorar el efecto descondensante del DTT/heparina en cada grupo de espermatozoides estabilizados.

Como en el caso anterior las variables de estudio contemplaron:

- La descondensación progresiva que se analizó estadísticamente por medio de un análisis de varianza.
- Y la medición de la región ecuatorial que se analizó por medio de la diferencia entre medias.

En la **tercera fase** se determinó el efecto descondensante del DTT y la heparina por separado, sobre ambos tipos de espermatozoides (frescos y descongelados). Definiéndose como grupo a los 5 espermatozoides frescos tratados con DTT, grupo 6 a los espermatozoides descongelados tratados con DTT, grupo 7 a los espermatozoides frescos tratados con heparina y grupo 8 a los espermatozoides descongelados tratados con heparina.

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

No se realizaron las mediciones ecuatoriales en estos tratamientos.

PROCEDIMIENTOS

Recolección de semen: El método empleado fue la técnica de la mano enguantada, colectando únicamente la fracción rica en espermatozoides la cual se filtró a través de una doble gasa estéril.

Una vez obtenidos los eyaculados, el volumen se midió con base en el peso (1 kg = a 1L) y se diluyó a una proporción 1:4 con el medio comercial de larga duración IMV USA870 XT-R y se transportaron al laboratorio de morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El transporte se realizó en una caja térmica de poliuretano atemperada con bolsas refrigerantes de gel, previamente calentadas a 35°C en baño María y se permitió el descenso de la temperatura de manera gradual durante el transporte de las muestras.

Al llegar al laboratorio se hizo el cálculo de la concentración espermática. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, para ello 25 µl de semen se diluyeron en 500 µl de una solución de Triton X-100 al 0.1% en PBS.

El conteo se efectuó en cinco de los recuadros (los cuatro de las esquinas y el recuadro central) y se aplicó la siguiente fórmula: $FD \times No. \text{ Células} \times 10,000 \times 5$

Donde: FD es el factor de dilución (en este caso es 21); No. De células contadas en los 5 cuadros; 10,000 esta dado por la dimensión de la cámara; 5 es el número de cuadros contabilizados.

El porcentaje de anomalías morfológicas se efectuó junto con el conteo celular y se comprobó en frotis teñidos con eosina-nigrosina y secados al aire, utilizados para valorar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

La evaluación de la motilidad espermática se realizó en gotas de semen observadas con el objetivo de 40x en microscopio de luz, marca Carl Zeiss.

Los eyaculados que no cumplieron con los parámetros establecidos: porcentaje de motilidad mayor al 80 y presencia de morfoanomalías menor al 15 por ciento, fueron desechados.

Para todos los tratamientos después de su valoración, 20 ml de cada una de las muestras seleccionadas fueron lavados por centrifugación a 800 gravedades por 10 minutos y resuspendidos en NaCl 154 mM (solución salina), el volumen fue ajustado para alcanzar

una concentración de 35×10^6 espermatozoides por ml, y las células volvieron a resuspenderse en un volumen de 20 ml. Este volumen fue dividido en dos fracciones; una para ser utilizada como semen fresco y otra para su congelación.

Congelación

Las muestras de semen arribaron al laboratorio a una temperatura entre 20 a 23 °C. Cada muestra seleccionada para la congelación se centrifugó a 800xG por 10min para retirar plasma y diluyente de transporte, después se resuspendió en solución salina a una concentración de 600×10^6 espermatozoides x mililitro y se dejaron estabilizar por tres horas a 16°C, bajando la temperatura de manera gradual, para lo cual las muestras fueron colocadas en una caja de poliuretano que contenía refrigerantes congelados. La temperatura se monitoreo cada 10 minutos hasta que se llegó a la temperatura de estabilización mencionada.

Para la congelación se utilizó el protocolo propuesto por Thilman (1997) modificado por Martin Rillo (Cordova, 2001).

Una vez que transcurrieron las tres horas de estabilización a 16 °C a las muestras se agregó el diluyente A o de refrigeración (lactosa 11% y yema de ovocito 20% en agua destilada) en una relación 1:1 y se dejaron estabilizar por una hora y media a 4°C.

Después del periodo de estabilización en el diluyente A las muestras fueron adicionadas con el medio B o de congelación (lactosa 11%, yema de ovocito 20% y glicerol 4% en agua destilada) en una relación 1:1 y atemperado a 4°C. Este último se agregó de manera creciente al 5, 10,15 y 20% del volumen total final de almacenado, con intervalos de 10 minutos entre cada adición y manteniendo la temperatura a 4°C.

Como último paso las muestras fueron empacadas en pajillas tipo francés de 0.5 ml, manteniendo la concentración final espermática de 600×10^6 espermatozoides por mililitro y se expusieron a vapores de nitrógeno líquido, aproximadamente a 4 cm de distancia, para alcanzar una temperatura entre -130 a -150° C, durante 20 minutos para después sumergirlas en el Nitrógeno líquido para su almacenamiento a -196°C.

Descongelación

Después de transcurridos 15 días de almacenaje en el nitrógeno líquido, se descongelaron dos pajillas (1 ml) de cada una de las muestras congeladas. Las pajuelas fueron descongeladas en baño María a 56°C por 16 segundos, y se resuspendieron en el diluyente de larga duración en una relación 1:20 y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 minutos para su estabilización, donde se valoró el porcentaje de motilidad y se les aplicaron los tratamientos de experimentación especificados en cada fase del estudio.

Tratamientos de los espermatozoides con los agentes químicos descondensantes.

Como se planteó en los antecedentes, la combinación de DTT y heparina han resultado ser una efectiva combinación de agentes descondensantes por la acción reductora del DTT sobre los enlaces disulfuro existentes entre las protaminas del núcleo espermático y la acción de la heparina de secuestrar a las mismas protaminas al competir por ellas con el DNA debido a su carga.

Después de su valoración los eyaculados fueron lavados por centrifugación a 800xG por 10 min y resuspendidos en NaCl 154 mM (solución salina).

Posteriormente el volumen fue ajustado para alcanzar una concentración de 35×10^6 espermatozoides por ml.

Después del lavado y el ajuste de la concentración, las muestras fueron tratadas con el detergente neutro Brij 36-T (1.2% concentración final) por 5 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de dejar la teca perinuclear expuesta (espermatozoides desmenbrados) (Juárez y Mújica ,1999).

Una vez tratados con Brij los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en solución salina para la aplicación de los tratamientos, se dividió la muestra en tres porciones para ser sometidas por separado a los tres tratamientos diferentes. Una porción de la muestra fue tratada con DTT (Dithithreitol) en una concentración final de 3.75 mM, la segunda porción de la muestra con heparina 5USP y la tercera porción de la muestra con una combinación de DTT 3.75/heparina 5USP.

En cada tratamiento fueron fijadas muestras alícuotas en Karnovsky a los “tiempos de descondensación progresiva” preestablecidos: 0, 15, 30,60, 90, 120, 180, 300 y 600 segundos postratamiento.

La concentración de 3.75 mM de DTT y la de 5USP de heparina fueron establecidas después de realizar una cinética tomando como referencia la de DTT 15mM reportada por Juárez y Mújica (1999). Esta concentración se ensayó en dos eyaculados frescos en los que no se logró dar seguimiento al proceso de descondensación progresiva (Figura 2), de ahí que se ensayaron concentraciones menores (7.5 mM y 3.75 mM)

Tratamiento con faloidina

La faloidina es una fungotoxina obtenida del *Amonita phalloides* y que ha sido ampliamente utilizada en investigaciones sobre el Citoesqueleto ya que posee una acción estabilizadora sobre los filamentos de actina (actina F), impidiendo su despolimerización.

Antes de la aplicación de los tratamientos con los agentes descondensantes, las muestras de espermatozoides frescos o descongelados fueron tratadas con faloidina a una concentración final de 59 μ M. Para ello los espermatozoides fueron lavados por centrifugación y resuspendidos en solución salina (NaCl 154mM), a una concentración de 35×10^6 espermatozoides por mililitro y fueron incubados durante 5 minutos a 37°C con faloidina.

Posteriormente las muestras se lavaron tres veces en solución salina por centrifugación-resuspensión con el fin de retirar el exceso de faloidina y después someterlos al tratamiento con DTT 3.75 mM/heparina 5 USP.

Microscopia electrónica

Con la finalidad de retirar el fijador a las alícuotas de las muestras fijadas de los diferentes tratamientos, se lavaron tres veces, con PBS filtrado por centrifugación a 800xG por tres minutos, tres lavados más en agua bidestilada también filtrada. Las muestras se resuspendieron en agua.

Posteriormente las muestras fueron montadas en rejillas de cobre de 300 mesh, para ello, un pedazo de papel parafilm fue extendido sobre la base de una caja de Petri de cristal y cada rejilla se colocó sobre esté con la cara que presentaba la membrana de colodión-

carbón hacia arriba y una gota de cada muestra fue colocada sobre las rejillas. Esta gota se dejó sedimentar sobre la rejilla por diez minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se retiró el exceso de muestra con papel filtro.

Para la tinción negativa de las células, se aplicó una gota de ácido fosfotúngstico al 0.01% filtrado. Para ello la gota fue colocada sobre cada rejilla y se dejó por un tiempo no mayor a tres minutos, transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de ácido con papel filtro y se procedió a enjuagar las rejillas con agua destilada filtrada.

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

La alícuota restante se almacenó en refrigeración adicionando azida sódica para evitar contaminación por si hubiera sido necesario repetir alguna rejilla y por lo tanto recurrir a más muestra.

Para la valoración de las muestras se utilizó el microscopio electrónico de transmisión Zeiss M9 perteneciente al Departamento de patología de la FMVZ de la UNAM. Esta se llevó a cabo en varias sesiones donde se analizó la secuencia de descondensación presentada en cada uno de los 8 grupos experimentales. De cada grupo se tomaron micrografías electrónicas con las imágenes de los espermatozoides representativos de cada tiempo y grupo experimental.

Mediciones de la región ecuatorial

Para valorar el aumento de volumen de las cabezas espermáticas, después de los tratamientos aplicados, se midió la región ecuatorial de los espermatozoides, para ello se elaboraron frotis duplicados de cada uno de los 9 tiempos de descondensación progresiva establecidos y se tiñeron con hematoxilina de Harris.

Las muestras teñidas se montaron con resina para su observación y la posterior medición de la región ecuatorial de las cabezas espermáticas.

La medición se realizó tomando fotografías en el fotomicroscopio óptico Wild Leite MPS 52 del laboratorio de morfología de la FMVZ de la UNAM, de cada uno de los frotis montados utilizando el objetivo de inmersión (100x)

Una vez reveladas las fotografías se escanearon y las mediciones longitudinales de la región ecuatorial de las cabezas espermáticas se realizaron por medio del programa Automontage™ Sigmascan Pro., en el departamento de Morfología de la FMVZ de la UNAM.

El análisis de varianza del aumento de volumen debido a la descondensación entre los diferentes tratamientos y de las diferencias entre medias de la longitud de las regiones ecuatoriales se efectuó con el programa estadístico MINITAB™ Release versión 13.1.

RESULTADOS

Alteraciones en la teca perinuclear por el proceso de congelación

Después de la exposición de los espermatozoides frescos de cerdo a la acción del detergente neutro Brij 36T (1.2%) que permitió la solubilización de las membranas y del acrosoma, se observó con claridad la teca perinuclear expuesta, que presentó la apariencia de pequeños eslabones de cadena y su morfología fue utilizada como un criterio de integridad de la TP. De acuerdo con esto la integridad de la sTP fue clasificada en tres tipos: a) sTP íntegra (ver Figura 1a), b) sTP alterada (ver Figura 1b) y c) sTP ausente (ver Figura 1c).

La evaluación de las sTP en las muestras de los espermatozoides frescos, mostró que en el 91.1% de los mismos se mantuvo una subestructura íntegra mientras, que el 8.9% restante presentó alteraciones en la misma (ver Cuadro 1y Grafica 1).

En el caso del semen descongelado sólo el 54.4% de los espermatozoides contabilizados presentó la subestructura íntegra, mientras que un 24.4% presentó alteraciones en la misma y el 21.1 % restante fue clasificado como espermatozoides con subestructura ausente, y que se considero pérdida durante el proceso de congelación (ver Cuadro 1y Grafica 1).

La diferencia presentada por la sTP, en el número de alteraciones sufridas después del proceso de congelación en comparación con las presentadas por el semen fresco, demostró ser significativa ($P < 0.0001$) al someterse a una prueba χ^2 .

Tratamiento con la combinación de DTT y heparina

Para evaluar el efecto descondensante del tratamiento combinado del DTT y heparina sobre el espermatozoide porcino, el estudio se inicio con una concentración de DTT 15mM/5USP de heparina combinación reportada en trabajos anteriores efectuados en otras especies (Juárez y Mújica, 1999).

Las muestras de espermatozoides frescos (grupo experimental 1) tratadas con esta concentración al ser evaluadas al microscopio electrónico de transmisión mostraron que a los 15 segundos de exposición la mayoría de las cabezas de los espermatozoides presentaban el núcleo en proceso de descondensación y a partir de los 30 segundos de incubación, se encontraron ya en franca descondensación, no encontrándose cabezas

intactas, por lo cual esta concentración fue descartada pues no permitió darle seguimiento al proceso de descondensación (ver Figura 2a).

Con este tratamiento la descondensación se inició en la porción apical de la región subacrosomal y siguió un mismo patrón de descondensación, en donde aparecieron de 2 a 7 regiones electrolúcidas en la porción apical de la región subacrosomal.

A una concentración de 7.5mM DTT /heparina 5USP, los espermatozoides presentaron descondensación generalizada los 15 segundos de tratamiento. El patrón de descondensación fue similar al presentado por los espermatozoides tratados con DTT 15mM /heparina 5USP, aunque el grado de desestructuración fue menos drástico (ver Figura 2b).

A la concentración de 3.75mM DTT /5USP de heparina (ver Figura 2c), la secuencia observada de descondensación siguió el siguiente patrón: a los 15 segundos de tratamiento, los espermatozoides frescos iniciaron la descondensación en la región subacrosomal, la teca se observó rodeando la cabeza y la subestructura se observó íntegra (ver Figura 3a). A los 30 segundos la región subacrosomal comenzó a presentar regiones translúcidas más marcadas y la subestructura, aunque estuvo presente, se observó alterada, pues presentó zonas donde había perdido continuidad (ver Figura 3b).

A los 60 segundos de tratamiento la teca perinuclear se observó manteniendo la forma de las cabezas espermáticas; la región subacrosomal continuó perdiendo su estructuración y se observaron espermatozoides sin la subestructura, en los que aún la mantenían se observaron diversos grados de alteración, como fueron sTP adelgazadas, pérdida de continuidad en otras y sTP ausentes (ver Figura 3c). A los 90 segundos de tratamiento la desestructuración de la TP fue notable, sin embargo varios espermatozoides presentaron la subestructura, aunque dañada, y en estos el contorno de la cabeza se apreciaba bien definida (ver Figura 4a). A los 120 segundos de tratamiento, la desestructuración del material nuclear afectó la forma de las cabezas, la región postacrosomal que anteriormente se mantenía intacta empezó a desestructurarse y el material nuclear a descondensarse, observándose zonas translúcidas circulares (ver Figura 4b). A los 180 segundos postratamiento se apreciaron una gran cantidad de flagelos libres a causa de la desestructuración de las cabezas y en aquellos que aún no la perdían, la región postacrosomal se notó desestructurada.

Por otra parte los espermatozoides descongelados (grupo experimental 2), presentaron un patrón diferente de descondensación después de la aplicación del tratamiento de DTT 3.75mM/heparina 5USP. En este tipo de espermatozoides se hizo patente un retraso en la descondensación, aunque la observación de las células a los 15 segundos mostró un mayor número de sTP alteradas, las células mantuvieron la integridad de la cabeza, pero la región apical de la hoja subacrosomal se mostró más electrolúcida que el resto de la cabeza (ver Figura 3d). A los 30 segundos postratamiento se observó una desestructuración en las sTP de todos los espermatozoides presentes y la zona electrolúcida de la región subacrosomal se hizo más notoria, sin embargo, no se observó pérdida de material del contorno de la cabeza espermática (Figura 3e). A los 60 segundos de tratamiento el número de espermatozoides con la sTP ausente era mayor y en las pocas células que aún la conservaban estaba alterada, a pesar de ello las cabezas se mantuvieron íntegras, aunque fue posible ver algo de material de descondensación adherido al contorno de la cabeza (Figura 3f). A los 90 segundos postratamiento, las cabezas no sufrieron cambios aparentes (Figura 4c). A los 120 segundos de tratamiento, la pérdida de material de la cabeza fue más notoria de ahí su apariencia esponjosa, y en la teca perinuclear se observó material desprendiéndose lo que se aprecia en la micrografía como una extensión que sobresale del lado derecho de la región subacrosomal (Figura 4d), aun así, las cabezas mantuvieron su forma y la región postacrosomal no se observó alterada (Figura 4d).

Estabilización de actina F por faloidina

En la observación secuencial, en el microscopio electrónico, se observó que los espermatozoides estabilizados frescos (grupo experimental 3), mantuvieron, a los 15 segundos posteriores a la aplicación del tratamiento DTT 3.5 mM/heparina 5USP, las cabezas bien estructuradas, con el contorno bien definido (sin pérdida de material), aunque la zona subacrosomal se vio ligeramente translúcida y las subestructuras presentaron sólo ligeras alteraciones vistas como pequeños puntos sin continuidad en los eslabones de la cadena (Figura 5a). A los 30 segundos de tratamiento la subestructura permaneció siendo visible, al igual que el resto de la teca, sin embargo las cabezas presentaron una apariencia esponjosa en la región apical de la zona subacrosomal (Figura 5b). A los 60 segundos de

tratamiento, la subestructura aún se mantenía detectable aunque muy electrolúcida hacía la región ecuatorial. La población espermática que prevaleció mostró un aumento de volumen de la porción apical de la cabeza que abarco toda la región subacrosomal y tomo la apariencia de una “esponja atrapada en un cáliz”, ya que la región postacrosomal mantuvo su estabilidad. Esta última región presento ligeros dobleces debido a la constricción de sus paredes hacia el centro (ver Figuras 5c y 5d). Después de transcurridos 90 segundos de tratamiento la subestructura presento alteraciones bien marcadas como zonas sin continuidad, a este tiempo la región postacrosomal mantuvo su electrodensidad. La descondensación siguió el patrón “esponjoso”, aumentando las formas de cáliz en la población espermática (ver Figuras 5e, 5f y 5g).

En síntesis, en el patrón de descondensación seguido por las muestras de semen fresco preincubadas con faloidina y posteriormente sometidas al tratamiento de descondensación por DTT 3.5 mM /heparina 5USP, la región subacrosomal fue también la primera en descondensarse como en el caso de los espermatozoides frescos sin faloidina, pero el patrón seguido fue diferente, ya que aquí no se definieron las diferentes regiones translúcidas vistas en la descondensación del semen fresco, sino que la región subacrosomal del espermatozoide con faloidina tomo una apariencia esponjosa (ver Figuras 5c y 5d), con un mayor aumento de volumen, tal vez atribuible a la acción de estabilización de la actina F; por su parte la región posacrosomal presento una mayor electrodensidad y una constricción que hizo que los espermatozoides en descondensación presentaran una forma característica parecida a un cáliz (ver figuras 5e, 5d y 5g).

Los espermatozoides descongelados tratados con faloidina (grupo experimental 4), a los 15 segundos posteriores a la aplicación del tratamiento DTT 3.5 mM/heparina 5USP al igual que las muestras de los espermatozoides frescos estabilizados con faloidina presentaron las cabezas bien estructuradas, con un contorno bien definido y sin pérdida de material. La zona subacrosomal se noto ligeramente translúcida, la subestructura en algunos casos se presento alterada y en otros ausente. A los 30 segundos de tratamiento aparentemente la teca permaneció sin otra alteración más que la subestructura dañada, el contorno de la cabeza se mantuvo integro, esta misma apariencia en las observaciones se mantuvo a los 60 segundos de tratamiento. A los 90 segundos de tratamiento, las cabezas se observaron

íntegras y aunque la subestructura se mantuvo, presento alteraciones. No se observó descondensación en la región subacrosomal, mientras que la apariencia electrodensa de la región postacrosomal fue muy marcada. Sin embargo esta última no tomó la forma de cáliz característica de las poblaciones de espermatozoides estabilizados frescos, en este caso la porción electrodensa se hizo más patente en la zona caudal de la región postacrosomal, esto provocó que a diferencia de los espermatozoides estabilizados frescos que presentan apariencia de cáliz (ver Figuras 6a y 7a), las cabezas de espermatozoides estabilizados descongelados presentaron una apariencia de “globos redondeados” (ver Figuras 6b y 7b).

Tratamiento con DTT

El efecto de la aplicación del DTT 3.75 mM se valoró por observación directa de las muestras de los nueve “tiempos progresivos de descondensación”, donde a los 15 segundos de tratamiento los espermatozoides frescos tratados con DTT (grupo experimental 5) presentaron pérdida en la integridad de la subestructura (ver Figura 8a). A los 30 segundos el daño fue más evidente ya que aunque la subestructura aún estuvo presente, el daño se vio reflejado en una apariencia completamente lisa, al mismo tiempo la zona apical de la región subacrosomal de la cabeza espermática empezó a verse translúcida (ver Figura 8b). A los 90 segundos de tratamiento, la subestructura presentó un ensanchamiento, también se hizo más notoria la pérdida de material de la región subacrosomal; la región postacrosomal empezó a adquirir una apariencia esponjosa, sin embargo las cabezas no perdieron su integridad (ver Figura 8c). A los 180 segundos la subestructura sólo fue identificable como una línea difusa, mientras que la región subacrosomal ya presentaba una franca desestructuración. A los 300 segundos ya sin subestructura, la descondensación del núcleo espermático fue aparente en ambas regiones (ver Figura 8d). Es decir que el patrón de descondensación que presentaron los espermatozoides descongelados tratados con DTT (grupo experimental 6), fue similar al presentado por los espermatozoides frescos tratados con la combinación DTT/ heparina (grupo experimental 2), en donde la principal alteración morfológica evidente, a los tiempos 15, 30 y 60 segundos postratamiento, fue la presentada por la subestructura con alteraciones evidentes (ver Figura 9a). Por otra parte la apariencia de la cabeza espermática no sufrió cambios sino hasta después de los 90 segundos, tiempo

donde además se observaron células descondensadas que no representaron más del 1% del total (ver Figura 9c).

La observación de una muestra a los diez minutos de este tratamiento, mostró los espermatozoides con el contorno de la cabeza definido, aunque con zonas translúcidas evidentes en la región posacrosomal. Por otra parte la principal diferencia entre los espermatozoides frescos y descongelados tratados con DTT (grupos experimentales 5 y 6) fue la uniformidad de la población: siendo que en el primero (frescos), los cambios morfológicos son más uniformes, mientras que en el segundo (descongelados) se pudo apreciar una menor uniformidad en la población (ver Figuras 9d y 9e).

Tratamiento con heparina

La valoración del efecto descondensante de la heparina se llevó a cabo aplicando tres diferentes concentraciones de la misma (5USP, 10USP y 15USP) tanto a los espermatozoides frescos, como a los espermatozoides descongelados.

En los espermatozoides frescos la heparina a una concentración de 5USP, a tiempos tempranos no provoca descondensación, pero después de los 60 segundos provocó alteraciones en la subestructura y un desprendimiento de la teca perinuclear en la región subacrosomal. A los 120 segundos de tratamiento se observó desprendimiento de material de la teca en ambas regiones, subacrosomal y postacrosomal, aunque la subestructura todavía era reconocible (ver Figura 10a). A los 180 segundos de tratamiento el desprendimiento de material de la teca en el contorno de la cabeza espermática fue generalizado (ver Figura 10b).

A pesar de que la pérdida de material de la teca se presentó de manera gradual conforme avanzó el tiempo de exposición, a la hora de tratamiento con esta concentración de heparina (5USP), la región postacrosomal se observó menos afectada en comparación a la región subacrosomal (ver Figura 10c) y la subestructura se observó con diversos grados de alteración (ver Figuras 11a, 11b y 11c).

Por su parte, los espermatozoides descongelados tratados con 5USP de heparina mostraron a los 15 segundos de tratamiento, una ausencia generalizada de la subestructura, además la teca perinuclear pareció más sensible a la acción de la heparina, pues su extracción se vio

facilitada con respecto a la del semen fresco expuesto al mismo tiempo de tratamiento. A partir de los 180 segundos postratamiento los espermatozoides descongelados presentaron la extracción total de la teca (ver Figura 12).

Por otra parte la concentración de 10 USP de heparina en los espermatozoides frescos, mostró al microscopio electrónico un efecto más evidente sobre la cabeza espermática, ya que la subestructura en la mayoría de las células, se observó alterada a partir de los 30 minutos de tratamiento y se perdió totalmente a los dos minutos de tratamiento (ver Figura 13). Además las zonas electrolúcidas en la zona apical de la región subacrosomal se hicieron más aparentes conforme transcurrió el tiempo de exposición (ver Figura 14).

El tratamiento con una concentración de 15 USP en los espermatozoides frescos logró extraer a la subestructura a partir de los 15 segundos, donde su pérdida fue patente y generalizada en todas las células observadas (ver figura 15). A los 180 segundos de tratamiento las cabezas espermáticas sufrieron un aumento de volumen aunque a esta concentraciones de heparina y tiempo de tratamiento no fue posible lograr la descondensación (ver Figura 16).

Valoración de la longitud de la cabeza espermática

Las diferencias de las longitudes ecuatoriales entre las repeticiones del mismo tratamiento fueron sometidas a un análisis de varianza que no encontró diferencia significativa ($P > 0.0001$) entre las repeticiones del mismo tratamiento por lo cual en el caso de los grupos 3 y 4 sólo se corrieron dos repeticiones del mismo tratamiento (ver Cuadro 2).

El cuadro 3 muestra que se encontró diferencia significativa entre las mediciones de las regiones ecuatoriales de las cabezas espermáticas desmembradas frescas y descongeladas ($P < 0.0001$) y las cabezas espermáticas desmembradas frescas y descongeladas preincubadas con faloidina ($P < 0.0001$) lo cual se representa con literales diferentes.

En el cuadro 4 se puede observar en la primera y segunda línea, la diferencia entre los cambios de volumen presentados entre los espermatozoides frescos y descongelados por tiempo, después del tratamiento con DTT/heparina. Como se puede observar al comparar la mediciones de los espermatozoides del grupo 1 (frescos) y del grupo 2 (descongelados), antes de la aplicación del tratamiento (tiempo 0), se encontró diferencia significativa

($P < 0.0001$) por medio de una prueba T pareada, de ahí las literales diferentes, esta diferencia se hace evidente al ver la disminución de longitud del diámetro ecuatorial, presentada por los espermatozoides descongelados, ya que la longitud de la región ecuatorial de las cabezas espermáticas frescas desmembradas tuvo una media de 3.6 ± 0.216 , mientras que el semen descongelado presentó una media de 3.3 ± 0.08 presentado diferencia significativa ($P < 0.0001$). Los demás tiempos de tratamiento también demostraron diferencias significativas ($P < 0.0001$), entre frescos y descongelados a excepción de los 15 segundos después de la aplicación del tratamiento donde no existió diferencia significativa ($P > 0.0001$), es decir la diferencia estadística ($P < 0.0001$) entre las mediciones ecuatoriales entre tiempos de descondensación del semen fresco y descongelado se observó a partir de los 30 segundos (ver cuadro 4). Por otra parte, al analizar las mediciones de los espermatozoides frescos vemos que el mayor aumento de volumen de la región ecuatorial se alcanza a los 90 segundos, mientras que en el descongelado el mayor volumen se hace evidente hasta los 180 segundos.

A realizar las mediciones de las regiones ecuatoriales del semen fresco y el semen descongelado preincubados en faloidina, también se encontró diferencia significativa entre espermatozoides frescos y descongelados ($P < 0.0001$). Por otra parte en el caso de la comparación entre tiempos postratamiento de estos espermatozoides estabilizados con faloidina, la diferencia entre tiempos se muestra a partir de los 60 segundos postratamiento, no existiendo diferencia ($P > 0.0001$) entre los tiempos 0 a 30 segundos postratamiento (ver Cuadro 4).

Al analizar los datos de tiempo contra tiempo dentro del tratamiento por medio de una prueba de tukey (cuadro 5), los espermatozoides descongelados mostraron menor variación que los espermatozoides frescos tras la aplicación del tratamiento, sin embargo la diferencia entre tiempos es significativa ($P < 0.0001$). En el caso de los espermatozoides preincubados con faloidina la menor variación entre grupos se presentó igualmente en el semen fresco, habiendo mayores diferencias entre los tiempos del semen descongelado, lo que puede apreciarse en un mayor número de literales diferentes, mientras que el semen fresco presenta literales a, b y c, el descongelado presenta a, b, c y d (ver cuadro 5).

Discusión

El citoesqueleto del espermatozoide de mamífero es una estructura sensible al daño por congelación como lo reportan diversos estudios, ya que durante la criopreservación sus proteínas sufren alteraciones, encontrándose entre estas proteínas termosensibles a los microfilamentos (actina-F) (Vincent *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1993; Watson, 1995; Noiles, 1997; Storey *et al.*, 1998; Petrunkina, 2004, 2005). En el caso del espermatozoide de los mamíferos, la teca perinuclear es el principal elemento citoesquelético de la cabeza (Sutovsky *et al.*, 2003; Juárez y Mújica, 1999) y la sensibilidad de la misma al daño por congelación ha sido reportada por Martínez (2003), quien encontró **alteraciones de la sTP** en el espermatozoide del bovino posterior a la descongelación, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, que también demostraron una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en el aumento de sTP alteradas posteriores a la descongelación en el espermatozoide del cerdo (Cuadro 1).

A su vez, en este estudio se observó que el **proceso de descondensación** de la cromatina nuclear del espermatozoide descongelado después de la aplicación de un **tratamiento con DTT 3.75mM/heparina 5USP**, presentó un retraso en el proceso en comparación con el observado en espermatozoides frescos. Esto concuerda con lo reportado por Hamamah *et al.* (1990) y por Córdova *et al.* (2002), sin embargo el retraso observado por estos autores, fue atribuido a una supercondensación de la cromatina, lo cual no coincide con los resultados observados en el presente estudio, ya que las células espermáticas descongeladas expuestas únicamente a DTT, presentaron una mayor variabilidad de respuesta al reductor de puentes disulfuro que los espermatozoides frescos, y por otra parte estas células descongeladas mantuvieron en su mayoría la integridad aparente de la cabeza, por lo tanto esto parece indicar, que las células que retrasan su descondensación pudieran no ser el reflejo de una sobrecondensación nuclear en donde existiría la participación de enlaces disulfuro, como la que sugieren Hamama (1990) y Córdova (2002) si no a otro tipo de alteración que podría contemplar la pérdida de algún factor durante la criopreservación. Por lo anterior se puede suponer que al dañarse la teca tras el descongelado y perder su integridad, algunos de los elementos alterados o perdidos pudieran ser los involucrados en el proceso de descondensación. Con respecto a lo anterior, existen estudios que señalan que

la teca podría ser el reservorio potencial de distintas proteínas con la capacidad de funcionar como activadoras en diversos procesos de señalización (Sutovsky, 2003; Mújica, 2003).

Además reforzando el hecho de que las proteínas de la TP se ven alteradas por el proceso de criopreservación y que participan en el proceso de descondensación tenemos los resultados obtenidos con la aplicación de los agentes descondensantes después de una **preincubación con faloidina**, donde son notorias las diferencias entre el patrón de descondensación en semen fresco y descongelado, con una aparente variación en la zona estabilizada, lo que sugiere que los cambios sufridos por la sTP y el retraso observado en la descondensación del núcleo espermático, podrían tener cierta relación, ya que en este estudio se encontró que la estabilización de la actina-F, por la faloidina difirió entre los espermatozoides frescos y descongelados, debido muy probablemente a que los filamentos de actina-F son más abundantes en la región posacrosomal, tal como lo proponen Oko y Maravei (1994). La estabilización de estos filamentos en el semen fresco interfiere con el proceso de descondensación, y al no desestructurarse esta región hace que se compriman las paredes laterales de la cabeza espermática. Adicionalmente podemos inferir que al igual que en el espermatozoide del cobayo, la actina-F participa en la estabilización de la subestructura (Juárez y Mújica, 1999), ya que esta se conserva aún después del tratamiento de descondensación aplicado y su presencia evito que el núcleo se descondensara correctamente, lo cual coincide con lo reportado por Hernández (2004). Esta podría ser la causa del patrón de descondensación diferente presentado por los espermatozoides porcinos frescos y descongelados tratados con faloidina en este trabajo, siendo además uno de los posibles factores que intervienen en el retaso presentado en la descondensación de los espermatozoides descongelados.

Por otra parte, el patrón de descondensación presentado por el espermatozoide desmembranado del verraco, se inicio en la zona apical de la zona subacrosomal, este protocolo de descondensación no había sido ensayado en esta especie, no existiendo referencias sobre el patrón que seguiría la cromatina durante su descondensación. Sin embargo, una diferencia importante encontrada entre el patrón de descondensación observado en los espermatozoides en este estudio y los reportes *in vivo*, es la zona en donde

se inició la descondensación ya que *in vivo* se reporta que la descondensación inicia cerca de la región ecuatorial del espermatozoide, donde también se inician tanto la desestructuración de la envoltura nuclear, como la desestructuración de la teca perinuclear (Yaganimachi, 1994; Sutovsky, 2003). Como se mencionó, en este estudio la descondensación inició en la zona apical de la región subacrosomal pasando posteriormente a la región posacrosomal que fue la última en descondensarse y que permaneció estable aún después de que las cabezas espermáticas empezaron a perder su forma e integridad.

El patrón de descondensación observado sugiere que la estabilidad de la región posacrosomal de los espermatozoides porcinos, no depende únicamente de la formación de enlaces disulfuro entre sus proteínas constituyentes por lo cual la **acción del DTT** se presentó de manera más lenta en esta región. Lo cual no se contrapone con los resultados obtenidos por Gall y Ohsumi (1976) que reportan que *in vitro* la descondensación de núcleos desnudos de espermatozoides de ratón inicia en primer lugar en la región posacrosomal, bajo la acción de un tratamiento con DTT/ tripsina, ya que posiblemente en este caso la tripsina, al degradar a las proteínas de esta región permita la descondensación del material nuclear. Además esto parece indicar que la concentración de enlaces disulfuro en las diferentes regiones de la cabeza espermática varía con la especie, de hecho Juárez y Mújica (1999), reportan que en el cobayo el efecto del tratamiento con DTT a una concentración de 15mM no tiene efecto alguno sobre la teca perinuclear ni sobre su sTP, sin embargo concentraciones de 22.5mM y 50 mM provocaron cambios en la región subacrosomal, sin alterar la sTP. Estos resultados son indicadores de que en el cobayo la estabilidad de la sTP no depende de los puentes disulfuro, en el presente estudio, una concentración menor de DTT (3.5 mM) en los espermatozoides frescos de cerdo, provocó una alteración en la sTP a partir de los 30 segundos de exposición, terminando con la total desaparición de la misma después de los 300 segundos (5 minutos) de exposición, por lo cual se puede suponer que en las proteínas integrantes de la sTP del cerdo, los enlaces disulfuro si participan en su estabilización.

Esta diferencia en la distribución de los enlaces en las diferentes especies puede relacionarse con la morfología, ya que como ha sido reportada la sTP parece presentar una morfología especie-específica (Juárez y Mújica, 2000, 2003), de ahí que en el presente

trabajo no se observara la presencia de las proyecciones a manera de pestañas descritas por estas autoras en el cobayo. La sTP bajo nuestra apreciación, más bien presento una apariencia de pequeños eslabones de cadena que rodean la cabeza espermática a manera de cinturón.

La mayor sensibilidad demostrada por la teca perinuclear del espermatozoide porcino se ve reflejada en los resultados obtenidos en este estudio después de la aplicación de heparina, pues a pesar de que el **tratamiento con heparina** a la concentración utilizada (5 USP), no fue capaz de lograr la descondensación nuclear, la sTP pudo ser extraída después de su aplicación. Por lo tanto cabe resaltar el hecho de que un tratamiento a base de heparina podría funcionar como alternativa para la extracción de la teca y de manera más específica para la extracción de la subestructura, lo cual abre la posibilidad de facilitar la continuación de los estudios sobre dicha estructura.

La sensibilidad demostrada por la subestructura a la extracción por heparina nos sugiere que sus proteínas constituyentes son de carácter básico, lo cual coincide con lo reportado para otras especies en cuanto al carácter de las proteínas constituyentes de la TP (Longo, 1987).

Por su parte las **medias obtenidas de la longitud de la región ecuatorial** de las cabezas espermáticas antes de la aplicación de los tratamientos (o tiempo 0), caen dentro del rango reportado para el cerdo (*Sus scrofa domesticus*), la media de 3.7 μm (Bonet, 2000) es ligeramente mayor a las mediciones obtenidas en esta investigación, lo que se explica por que en este caso se midieron espermatozoides desmenbrados. Por otra parte la diferencia significativa ($P < 0.0001$) en el diámetro ecuatorial de los espermatozoides frescos y descongelados, podría ser debida al grado de deshidratación sufrido por la célula en el proceso de criopreservación al intentar adaptarse a los cambios osmóticos, tal y como lo sugieren los trabajos realizados por Holt, (2000), Chen, (2002) y Petrunkina, (2005), pero más aun, al proceso mismo de descondensación, que es dinámico y va dispersando la cromatina de manera gradual, tal como lo reportó Longo (1976).

A su vez, aunque la variación en las mediciones entre tiempos dentro del mismo tratamiento podrían ser el reflejo de las adaptaciones de la célula a los cambios osmóticos a los que ésta se enfrenta, se debe mencionar el hecho de que en el presente estudio, las

células después del proceso de criopreservación tuvieron una menor variación al comparar tiempo contra tiempo dentro del tratamiento, lo cual se explica por el retraso en la descondensación sufrida por el espermatozoide descongelado, y se confirma al comparar tiempo contra tiempo entre tratamientos donde el mayor aumento de volumen de la región ecuatorial se alcanza a los 90 segundos, mientras que en el descongelado el mayor volumen se hace evidente hasta los 180 segundos. Esta menor variación en el semen descongelado sugiere que este tipo de espermatozoides sufren menos variaciones en su volumen debido a que el espermatozoide de cerdo, ve disminuida su capacidad para manejar los cambios al ver alterada la integridad de su citoesqueleto tal y como es sugerido por Petrunkina (2004). Por otra parte el retraso en la descondensación coincide con el mayor aumento de volumen de la región ecuatorial, que en el espermatozoide fresco se alcanza a los 90 segundos, mientras que en el descongelado el mayor volumen se hace evidente hasta los 180 segundos.

Las mediciones ecuatoriales de los espermatozoides preincubados en faloidina, mostraron que aunque el retraso en la descondensación se mantiene en los espermatozoides descongelados, la variación entre las mediciones entre tratamientos se invierte ya que la variación de las mediciones entre tiempos fue mayor en el semen descongelado. Lo anterior puede explicarse por que la estabilización que la faloidina brinda a la actina-F de la región ecuatorial de la cabeza de los espermatozoides frescos les impidió variar significativamente de un tiempo a otro, mientras que la región estabilizada en el semen descongelado, no comprometió la región medida, por lo cual los cambios de volumen en estos espermatozoides fueron más notorios.

Por lo tanto, en este estudio se observó que el proceso de descondensación del núcleo espermático del cerdo se ve alterado por la aplicación del método de congelación-descongelación y este cambio se presenta como un retraso, acompañado de alteraciones en algunos componentes de la teca perinuclear, como es el caso de la actina-F que aparentemente sufre un reacomodo, y además por un daño que se refleja en la integridad de la subestructura de la teca perinuclear. Las implicaciones prácticas de los resultados obtenidos deberán contemplar la profundización en el estudio de las proteínas dañadas y/o pérdidas de la sTP durante la criopreservación, lo que permitirá ampliar el panorama sobre

su posible función en el proceso de descondensación nuclear espermática, esto a su vez permitirá diseñar protocolos de criopreservación y desarrollar diluyentes, que minimicen el daño celular, contemplando entre otros elementos a proteger, además de las membranas y el acrosoma, la estabilización de las proteínas citoesqueléticas de la cabeza espermática, favoreciendo con esto que la teca perinuclear mantenga su integridad durante el proceso. Lo anterior lograra aumentar la eficiencia en la técnica de criopreservación de semen porcino, logrando que esta biotecnología se convierta en una opción práctica para ser aplicada en los programas de reproducción porcina.

Conclusiones

- La subestructura de la teca perinuclear se ve alterada por el proceso de congelación-descongelación, sufriendo daños que van desde la pérdida de continuidad hasta la ausencia total de la misma.
- El proceso de descondensación nuclear se ve alterado por la criopreservación, ello debido a que los espermatozoides pierden la capacidad de descondensarse a una velocidad normal. Este retraso en el proceso parece estar más relacionado con la pérdida de un factor regulador de la TP, que con una hiperestabilización de los enlaces disulfuro de las protaminas del núcleo espermático.
- La estabilización de la actina con faloidina indica, que la distribución de la actina F parece modificarse por la criopreservación. Esta modificación o reacomodo de la actina posiblemente interfiera con la descondensación normal del núcleo espermático. Lo anterior podría apoyar que la distribución de las proteínas de la TP se modifican en el proceso y que esto puede ser un factor determinante en el retraso sufrido en la descondensación de los espermatozoides criopreservados.
- La mayor sensibilidad presentada por los espermatozoides del cerdo a la acción del DTT y de la heparina, en comparación a otras especies, sugiere que la constitución de teca perinuclear varía con la especie. Por otra parte la acción incrementada del DTT y de la heparina sobre la teca de los espermatozoides descongelados, comparados con espermatozoides frescos, confirma que no se produce una hipercondensación del material nuclear.

REFERENCIAS

- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298-305.
- Bellvé AR, O'Brien DA. The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*, Hartman JF (Ed.), Academic Press, 1983, pp. 55-133.
- Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS, Barth AH. The perinuclear matrix as structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol Reprod* 1992; 47: 451-456
- Bedford JM, Bent MJ, Calvin HI. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1992; 33: 19-29.
- Bedford JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974; 188: 137-156.
- Bedford JM. Germ cells and fertilization. In: *Reproduction in mammals*, Austin and Short (Ed.) Cambridge University Press, 1990, vol. 1, pp. 128-163.
- Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N y Badia E. Morfologia espermàtica en porcí. Institut d'Estudis Catalans (Ed.) Arxius de les Seccions de Ciències, vol.126. Barcelona, España 2000.
- Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. Cryopreservation of boar semen II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini-and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet Scand* 1991; 32: 455-461.
- Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymus. *J Reprod Fertil Suppl* 1971; 13: 65-75.
- Chapman JC, Michael SD. Hypothesis: Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1(20): 1-7.
- Chen T, Bhowmick S, Sputtek A, Fowler A, Toner M. The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 2002; 44: 301-306.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 2001; 121: 395-401.
- Córdova IA, Gutiérrez JF. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml straws. *Theriogenology* 2002; 57: 2119-2128.
- Córdova IA, Pérez JF, Lleo B, García A, Martín Rillo S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Repr Dom Anim* 2001; 36: 199-202.
- Cordova IA, Hernandez P E, Fernandez R F, Saltijeral OJ, Pérez G JF, Martín R S, García A C, Lleo CB. Congelación del semen de verraco. UAM-X, Division CBS, México, 2000.
- Colleu D, Lescoat D, Thomas D, Gouranton J. Changes in protamine 1 distribution in human sperm nucleus during in vitro sperm-oocyte interaction: an immunoelectron microscopic study. *Fertility and Sterility* 1997; 67(1): 123-128.
- Courtens JL, Courot M, Flechon JE. The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 1976; 57: 54-64.

- Cummins JM, Woodall PF. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fert* 1985; 75: 153-175.
- Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock .*Reviews of Reproduction* 2000; 5: 46-52.
- Dadoune JP. Expression of Mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* 2003; 61:56-75.
- Dean J Decondensation of mouse sperm chromatin and reassembly into nucleosomes mediated by polyglutamic acid in vitro. *Developmental Biology* 1983; 99: 210-216.
- Delgado NM, Sanchez V, Reyes R, Merchant LH. Nucleons,I: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Archives of Andrology* 1999; 43: 85-95.
- Delgado NM, Flores A, Rodriguez H, Merchant LH, Reyes R .Heparin and glutathione II: Correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Archives of Andrology* 2001; 47: 47-58.
- Eddy EM, O'brien DA. The spermatozoon. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E and Neill JD (Ed.), Raven Press, New York 1994, Vol. 1, pp. 189-318.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation between sperm from mammals of different fertility and resistance of the sperm DNA to in situ thermal denaturation. *Science* 1980; 210: 1131-1133.
- Evenson DP, Thompson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994; 41: 637-651.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 1975; 44: 394-436.
- Flaherty SP, Winfrey VP, Olson GE. Localization of actin in human, bull, rabbit, and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat Rec* 1988; 221: 599-610.
- Flesch F, Gadella B. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim et Bio Acta* 2000; 1469: 197-235.
- Flores GH) Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. Fes-C UNAM, México 2005.
- Fornes MW, Bustos O E. Study of nuclear decondensation of the rat spermatozoa by reducing agents during epididimal transit. *Andrologia* 1994; 26: 87-92.
- Gall W.E, Ohsumi Y. Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Experimental Cell Research* 1976; 102: 349-358.
- Gopalkrishnan, H, Kumar TC. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa assesing fertilizing potential. *Archives of Andrology* 1991; 27: 43-50.
- Green CE, Watson PF . Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitacion. *Reproduction* 2001; 122: 889-898.
- Gutiérrez-Ruiz JR. Caracterización de la subestructura de la membrana plasmática localizada en la región ecuatorial del acrosoma del espermatozoide del cobayo. Tesis de nivel Maestría en Ciencias. CINVESTAV, IPN, México 2001.

- Guzmán A. Evaluación de una técnica para la críoconservación del semen porcino. Tesis de nivel licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Nayarit, México 2003.
- Hall SM, Evans J, Hawthorth SG. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am.J.respir.cell Mol. Biol* 1993; 9: 106-114.
- Hammit DG, Martín PA. Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled rate freezing in straws. *Theriogenology* 1989; 32: 359-368.
- Hamamah S, Royère D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30: 59-64.
- Hernández E J. ¿Depende la descondensación del núcleo espermático del cobayo de la estabilidad de la subestructura de la teca perinuclear? Tesis de nivel Maestría en Ciencias. FMVZ- UNAM, México 2004.
- Holt MV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
- Huret JL, Groyer A. A Nuclear Chromatin decondensation of human sperm assessed by DNA measurement. *Archives of Andrology* 1985; 14: 7-13.
- Huret JL. Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Archives of Andrology* 1986; 16: 97-109
- Jager S, Wijchman J, Kremer J. Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *The Journal of Experimental Zoology* 1990; 256: 315-322.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 143-172.
- Juárez M ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de nivel Doctorado. CINVESTAV- I.P.N., México 2000.
- Juárez M ML and Mujica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology* 1999; 128: 225-236.
- Koehler JK. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J Ultrastuc Res* 1970; 33: 598-614.
- Kuist U. Spermatozoal thiol-disulphide interaction: A possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 503-505.
- Kuist U, Afzelius BA, Nilsson L. The intrinsic mechanism of chromatin decondensation and its activation in human spermatozoa. *Develop Growth and Differ* 1980; 22(3): 543-554.
- Lalli M, Clermont Y. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am J Anat* 1981; 160: 419-434.
- Leclerc P and Sirard MA. Decrease in Calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* 1992; 94: 23-32.
- Lohka JM and Maller JL. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation and spindle formation in cell-free extracts. *J Cell Biol* 1985; 101: 518-523.

- Locksley E, McGann. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Criobiology* 1985; 25: 178-185.
- Longo FJ. Development of the male pronucleus. In: *Fertilization*. Chapman and Hall Ltd (Ed.) London/New York 1987, pp. 117-125.
- Longo FJ. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids : a novel class of cyroskeletal elements. *The Journal of Cell Biology* 1987; 105: 1105-1120.
- Luna EJ, Hitt AL .Cytoskeleton-Plasma membrane interactions. *Science* 1992; 258: 955-963.
- Mahie CA, Yanagimachi R. Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J Reprod Fert* 1975; 44: 293-296.
- Martínez OC. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. Tesis de nivel Licenciatura. FMVZ. UNAM, México 2003.
- Marushige Y, Marushige K. Dispersion of mammalian chromatin during fertilization an in vitro study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; 519: 1-22.
- Mazur P. Basic concepts in freezing cells. In: *Deep freezing of boar semen*. Johnson and Larsson (Ed.) Swedish Univ. of Agri. Sci., Uppsala 1985, pp. 91-111.
- Medrano A, Holt WV. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado descongelado. *Archivos de Zootecnia* 1998; 47: 319-327.
- Medrano A, Watson PF, Holt WV. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction* 2002; 123: 315-322.
- Mújica A, Navarro FG, Hernández G, Juárez M ML. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique* 2003; 61: 76-87.
- Montag M, Tok V, Liow SL, Bongso A, Soon-Chyeng. In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Molecular Reproduction and Development* 1992; 33: 338-346.
- Miller MA, Masui Y. Changes in the stain ability and sulphhydryl level in the sperm nucleus during sperm-oocyte interaction in mice. *Gamete Research* 1982; 5: 167-169.
- Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability, L_p , of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology* 1997; 35: 79-92.
- Olson GE, Noland TN, Winfrey VP, Garbers DL. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J Ultrastuct Res* 1983; 85: 204-218.
- Ocampo LJ. Identificación de actina durante la descondensación *in vitro* de la cromatina del espermatozoide del cuy. Tesis de nivel Maestría. CINVESTAV- IPN, México 1995.
- Oko R, Clermont Y. Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 39: 673-687.

- Oko R, Maravei D. Protein composition, distribution and possible role of perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 50: 1000-1014.
- Palacios AA. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet Méx* 1994; 25: 207-210.
- Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Chalepakis G, Kruft V, Chevaillier P, Giannakouris T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamina 1. *Nucleic Acid Research* 1999; 27: 2972-2980.
- Patist A, Zoerb H. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2005; 40:107-113.
- Perreault SD, Zirkin BR. Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm associated proteinase in vivo. *The Journal of Experimental Zoology* 1982; 224: 253-257.
- Petrunkina AM, Gröpper B, Tröpfer-Petersen, Günzel-Apel AR. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 2005; 63: 1390-1406.
- Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction* 2004; 127: 105-115.
- Rhamalo SJ, Sutovsky P, Simerly C, Wessel GM, Oko R, Wewitson L, Schatten G. ICSI choreography: fate of sperm structures alter monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. *Human Reproduction* 2000; 15(12): 2610-2620
- Reyes R, Carranco A., Huacuja L, Delgado NM. Male pronuclei formation release of phosphorylation of histone H-3 during decondensation of human sperm nuclei activated in vitro by heparin. *Archives of Andrology* 1991; 26: 53-60.
- Reyes R, Sanchez V ML, Merchant L H, Rosado A, Delgado NM. Effect of heparin-reduced glutathione on hamster sperm DNA unpacking and nuclear swelling. *Archives of Andrology* 1996; 37: 33-45.
- Reyes R, Flores AJC, Merchant LHM, Delgado NM. Nucleons II: Cryopreservation and metabolic activity. *Archives of Andrology* 2001; 47: 23-29.
- Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R. Molecular Localization of free thiols in human sperm chromatin. *Biology of Reproduction* 1995; 52: 1066-1072.
- Royère D, Hamamah S, Nicolee JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res* 1988; 21: 51-57.
- Sanchez VML, Reyes R, Delgado NM, Merchant LH, Rosado A. Differential decondensation of class I (rat) and class II (mouse) spermatozoa nuclei by physiological concentrations of heparin and glutathione. *Archives of Andrology* 1996; 36: 161-176.
- Sattayasai, Panvim S. Nature of the proteins which form disulfide bonds during the maturation of rat spermatozoa. *International Journal of Andrology* 1982; 5: 337-344.
- Selles GE, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Dom Anim* 2003; 38: 66-72.

- Strzezek J, Kordan W. Effects of decondensing agents on chromatin stability of boar spermatozoa-radioisotope study. *Animal Science Papers and Reports* 2003; 3: 167-181.
- Storey BT, Noiles E, Tompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 1998; 37: 46-58.
- Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian Zygote: Fertilization after sperm-egg fusion. *International Review of Cytology* 2000; 195: 1-65.
- Sutovsky P, Oka R, Hewitson L, Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Development Biology* 1997; 188: 75-84.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oka R. Interactions of sperm perinuclear theca with the Oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique* 2003; 61:362-378.
- Thilmant P. Congélation du sperme de verrat en paillette de 0.5 ml resultants sur le terrain. *Ann Méd Vét* 1997; 141: 457-462.
- Usui N, Yanagimachi R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development. *J Ultrastructural Research* 1976; 57: 276-288.
- Usui N. Morphological differences in nuclear materials released from hamster sperm heads at an early stage of incorporation into immature oocytes, mature oocytes, or fertilized eggs. *Mol Reprod Dev* 1996; 121: 1129-1137.
- Vincent C, Pruliere G, Pajot-Augy E, Campion E, Garnier V, Renard J. Effects of cryoprotectans on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology* 1990; 27: 9-23.
- Ward WS, Zalensky AO. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Critical Reviews in Eukariotic Gene Expression* 1996; 6(2 & 3): 139-147.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871-891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 481-492.
- Wevar VC, Torreta ME , Forchetti O. Evaluación de dos técnicas de congelación de semen porcino. Resultados preliminares de fertilidad. *Arch Latinoam Prod Anim* 1997; 5(Supl. 1): 448-449.
- Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(32): 29471-29477.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*. Knobil and Neill (Ed.) Raven Press, New York 1994, Vol 1, pp. 189-318.
- Zirkin BR, Soucek DA, Chang TSK, Perrault SD. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decodensation. *Gamete Research* 1985; 11: 349-365.

A N E X O (1)

FIGURAS

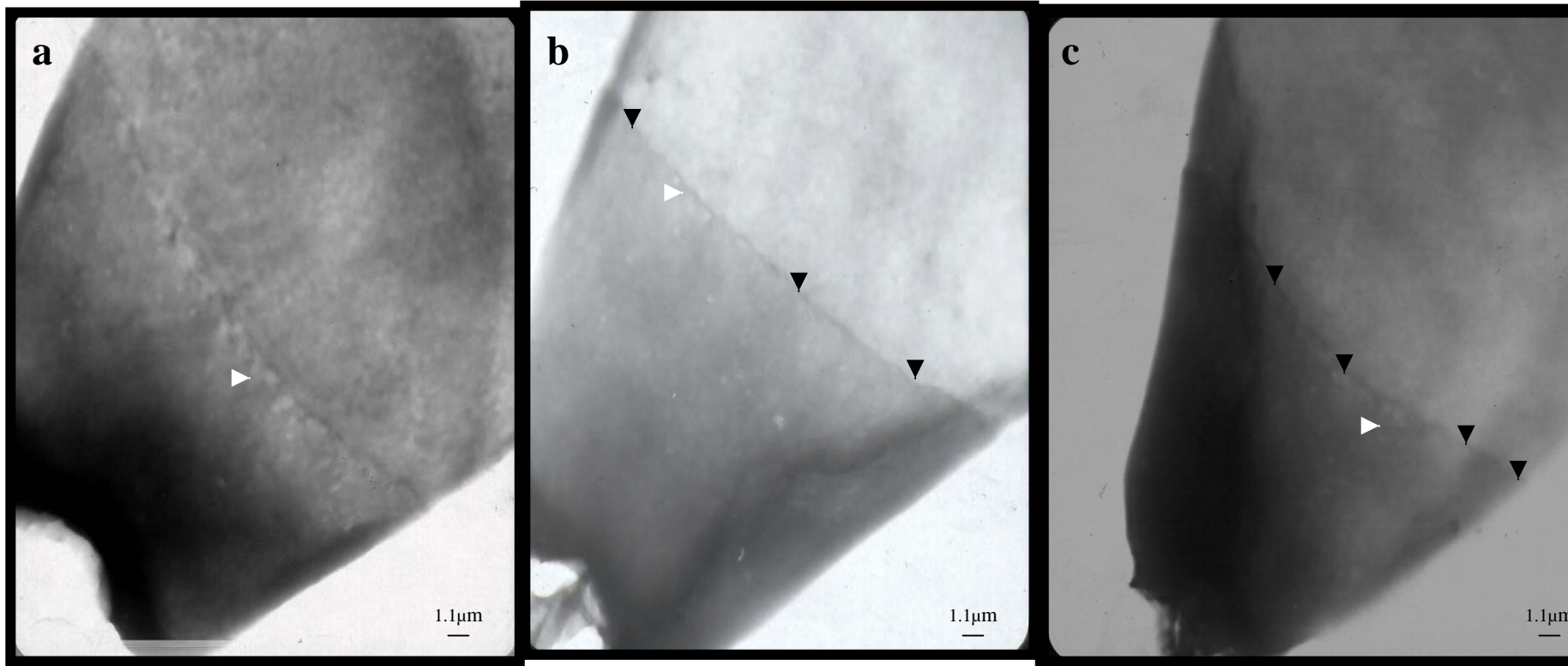


Figura 1 Subestructura de la teca perinuclear

Las imágenes muestran la subestructura de la teca perinuclear:

- a) Subestructura íntegra en espermatozoide de cerdo. Nótese la continuidad en la morfología de la misma formada por los pequeños eslabones de cadena. La flecha blanca indica un eslabón de la subestructura.
- b) Ausencia de subestructura en un espermatozoide, se ve únicamente una línea en la región donde debiera presentarse la subestructura (flechas negras). Nótese los restos de subestructura a manera de un eslabón (pequeña zona electrolucida, marcada con una flecha blanca).
- c) Pérdida de continuidad en la secuencia de eslabones en un espermatozoide de cerdo, las flechas negras indican donde se ve alterada la integridad, la blanca dónde aun se aprecian eslabones.

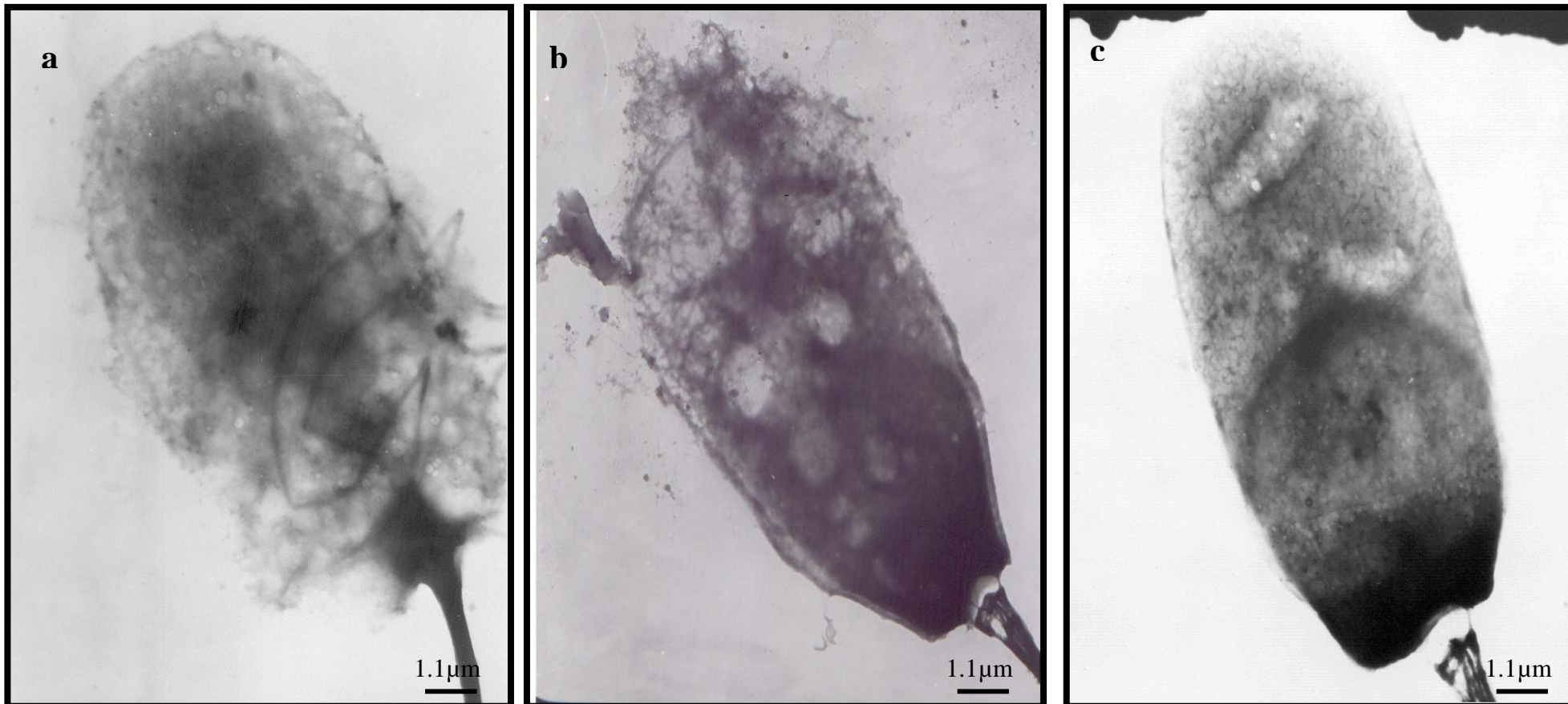


Figura 2 Espermatozoides tratados con DTT/ heparina

La imagen muestra cabezas espermáticas descondensadas con tres diferentes concentraciones de DTT/heparina: a) Un espermatozoide a los 15 segundos después de aplicado DTT 15mM /heparina 5USP. Nótese la región posacrosomal totalmente desestructurada y la notoria pérdida de material. La cabeza ha perdido su integridad. b) Desestructuración de una cabeza espermática después de 15 segundos de la aplicación de DTT 7.5mM/5USP de heparina; la cabeza ha perdido la definición en su contorno y son evidentes las zonas electrolúcidas que indican descondensación cerca de la región ecuatorial. También en la región postacrosomal aparecen zonas de descondensación. c) Un espermatozoide después de 15 segundos de tratamiento con DTT 3.75 mM/heparina 5USP. Aquí el efecto descondensante es menos agresivo y eso nos permite ver como la zona apical de la región subacrosomal es la primera en descondensarse, iniciando con una apariencia translúcida en esta región y la aparición de otras manchas translúcidas más internas en esta región. Esta fue la concentración que se utilizó en el desarrollo de todos los experimentos de esta investigación.

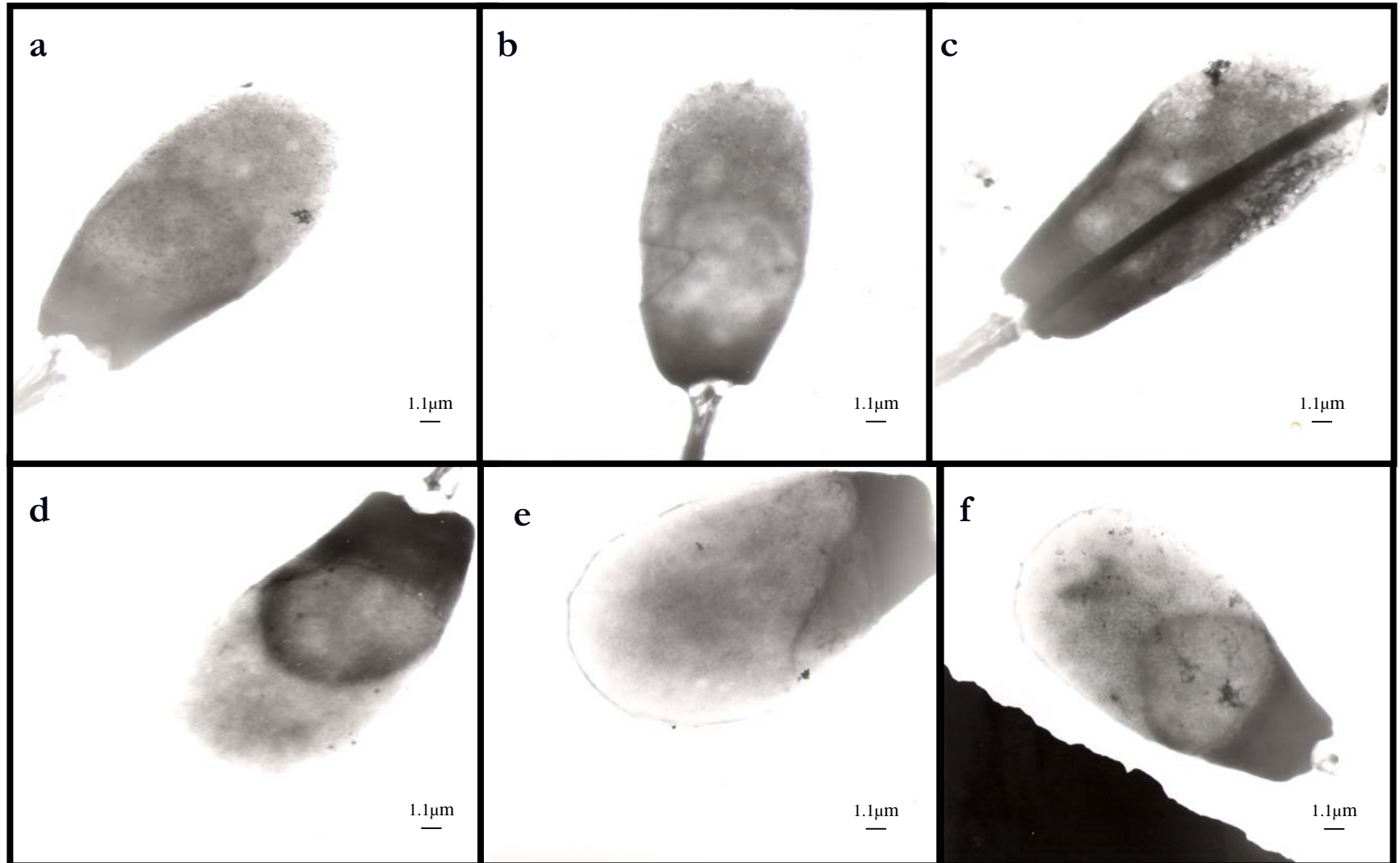


Figura 3. Espermatozoides tratados con DTT/heparina

Descondensación progresiva en espermatozoides frescos y descongelados tratados con DTT 3.75 mM/heparina 5USP. Panel superior, espermatozoides frescos: a) 15 segundos, b) 30 segundos y c) 60 segundos después del tratamiento. Panel inferior, espermatozoides descongelados: d) 15 segundos, e) 30 segundos y f) 60 segundos postratamiento. Se puede ver que las diferencias entre a) y d), y entre b) y e), no son aparentes, las cabezas se ven bien delineadas y las pérdidas de material no son perceptibles. Por otra parte a los 60 segundos en c) la zona apical de la región subacrosomal empieza a tomar apariencia esponjosa. Por su parte en f) no se ven alteraciones.

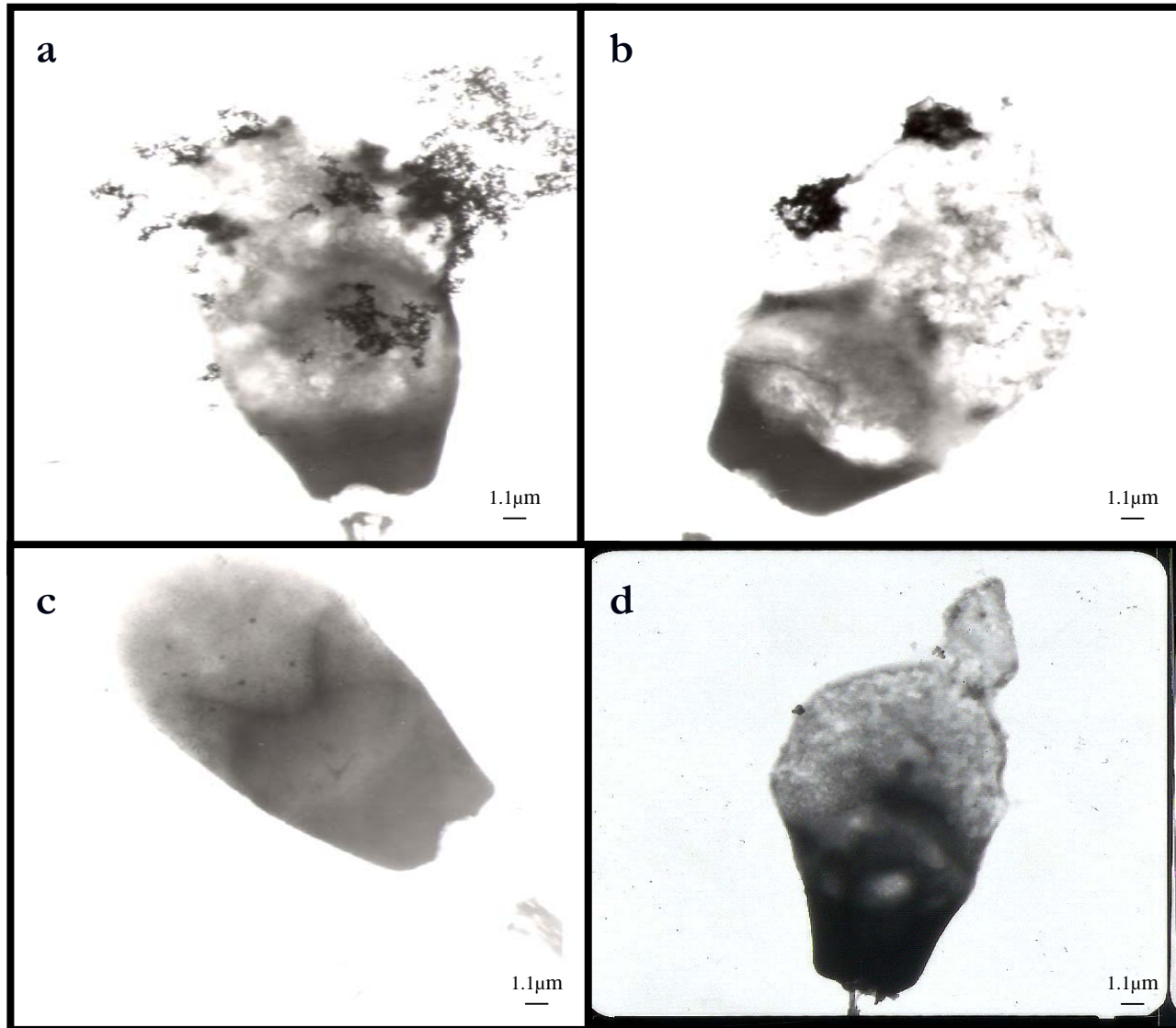


Figura 4 cabezas espermaticas descondensadas

Panel superior, espermatozoides frescos: a) 90 segundos y b) 120 segundos postratamiento DTT/heparina.

Panel inferior, espermatozoides descondensados:

c) 90 segundos y d) 120 segundos postratamiento. Nótese que los espermatozoides frescos presentan una franca descondensación con pérdida de material a los 90 segundos y gran cantidad de zonas translúcidas a los 120 segundos. Por su parte los espermatozoides descondensados han sufrido un retraso en el proceso pues a los 90 segundos las cabezas se ven con el contorno perfectamente definido y es hasta los 120 segundos de tratamiento que la cabeza se hincha y empieza a perder material nuclear de manera notoria.

Se observa que en ambos casos la región subacrosomal es la primera en descondensarse mientras que la región posacrosomal se presenta más electrodensa y estable.

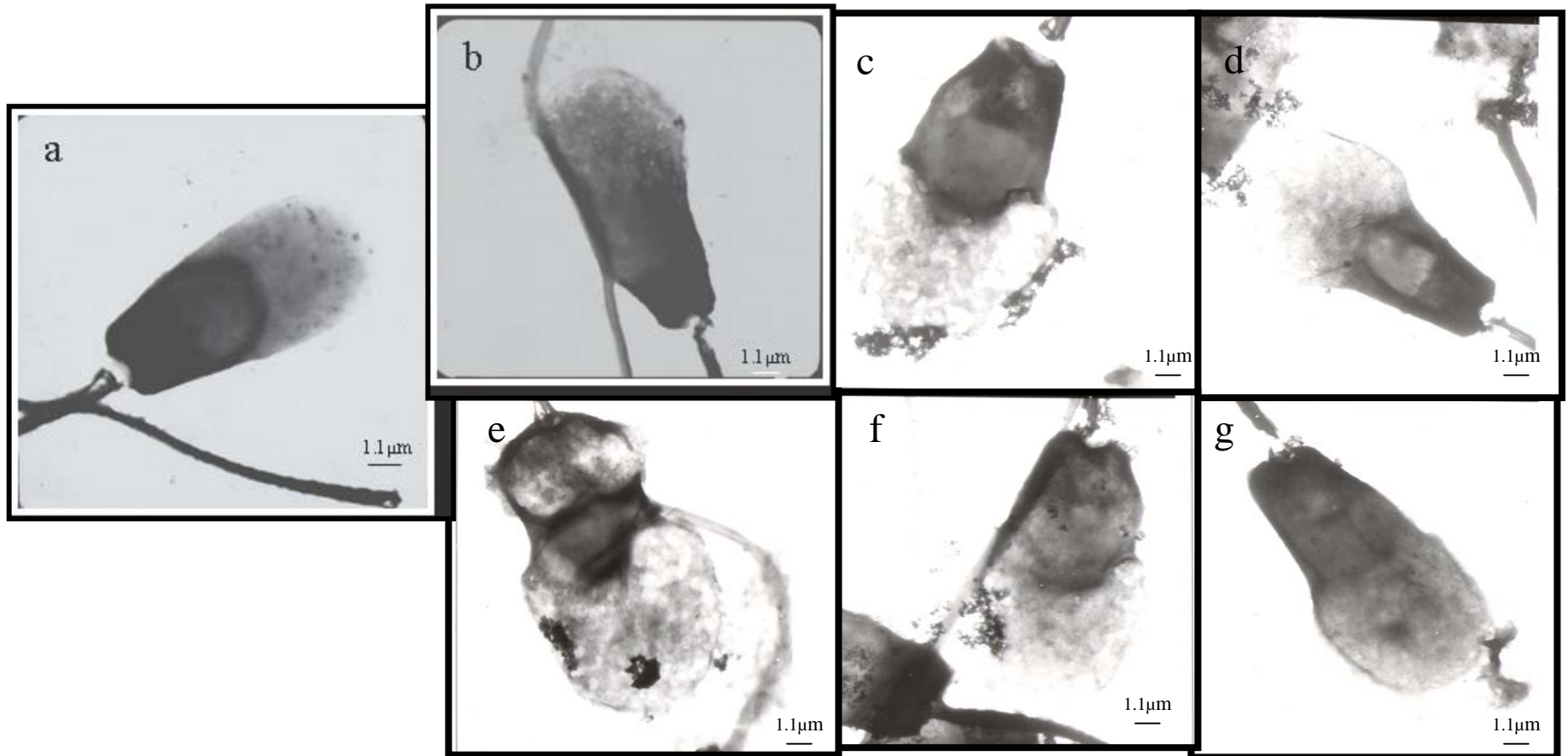


Figura 5 Cabezas espermáticas en descondensación

Estas imágenes de microscopía electrónica muestran el proceso de descondensación progresiva en semen fresco preincubado con faloidina y posteriormente tratado con DTT 3.75 mM/heparina 5 USP: a) Espermatozoide fresco a los 15 segundos del tratamiento, se aprecian los contornos de la cabeza bien delimitados. b) Espermatozoide con 30 segundos de tratamiento se aprecian zonas más electrolúcidas en la zona apical de la región subacrosomal y ligera pérdida de material. c) y d) A los 60 segundos se hace evidente en los espermatozoides la forma de “esponja atrapada en un caliz”.La región más electrodensa es la región estabilizada por la faloidina esta región no se desestructura fácilmente impidiendo la salida de material. A los 90 segundos de tratamiento se observan: e) espermatozoides que presentan descondensación en la región posacrosomal y que por lo tanto aumentan su volumen en esta zona de ahí que la región estabilizada por la faloidina forme una especie de cinturón, esta es la población predominante a esté tiempo, f) espermatozoides con la región subacrosomal descondensada y la posacrosomal que inicia esté proceso por lo que aun mantienen la forma de “esponja atrapada en el caliz” y g) algunos espermatozoides completamente estabilizados, que son la población minoritaria.

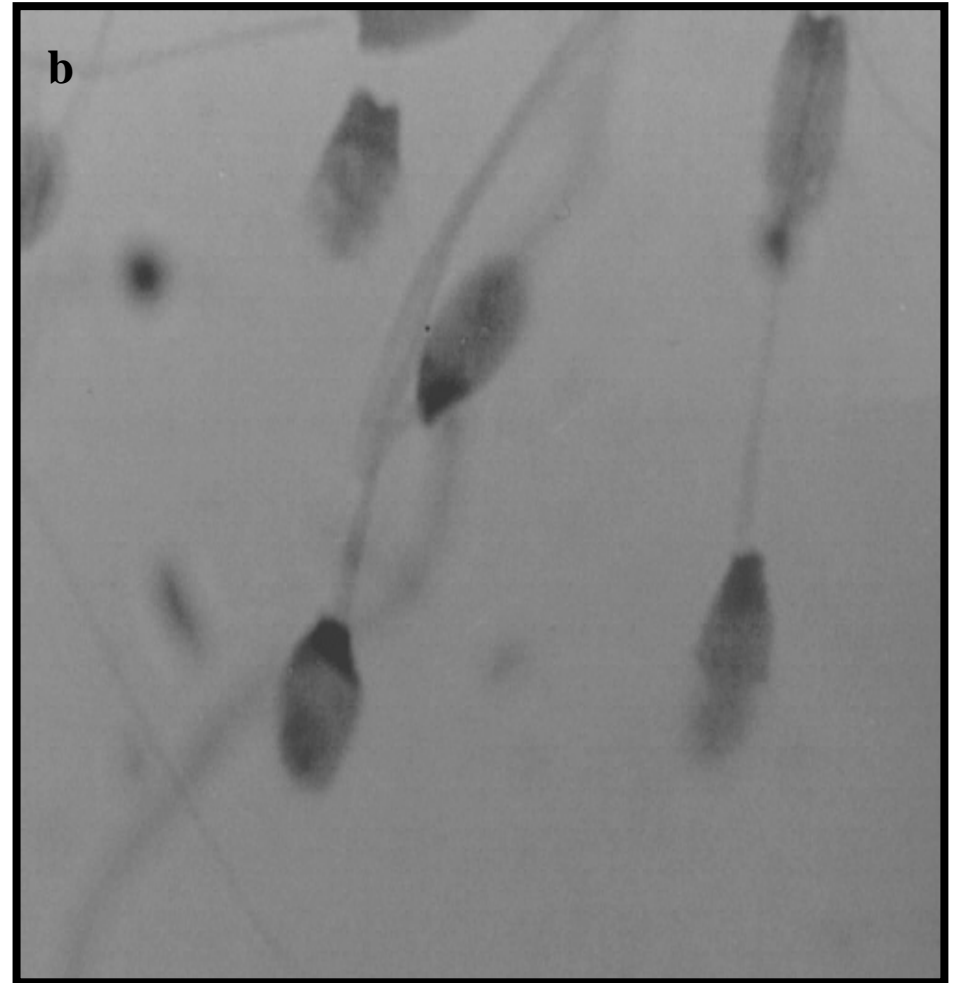
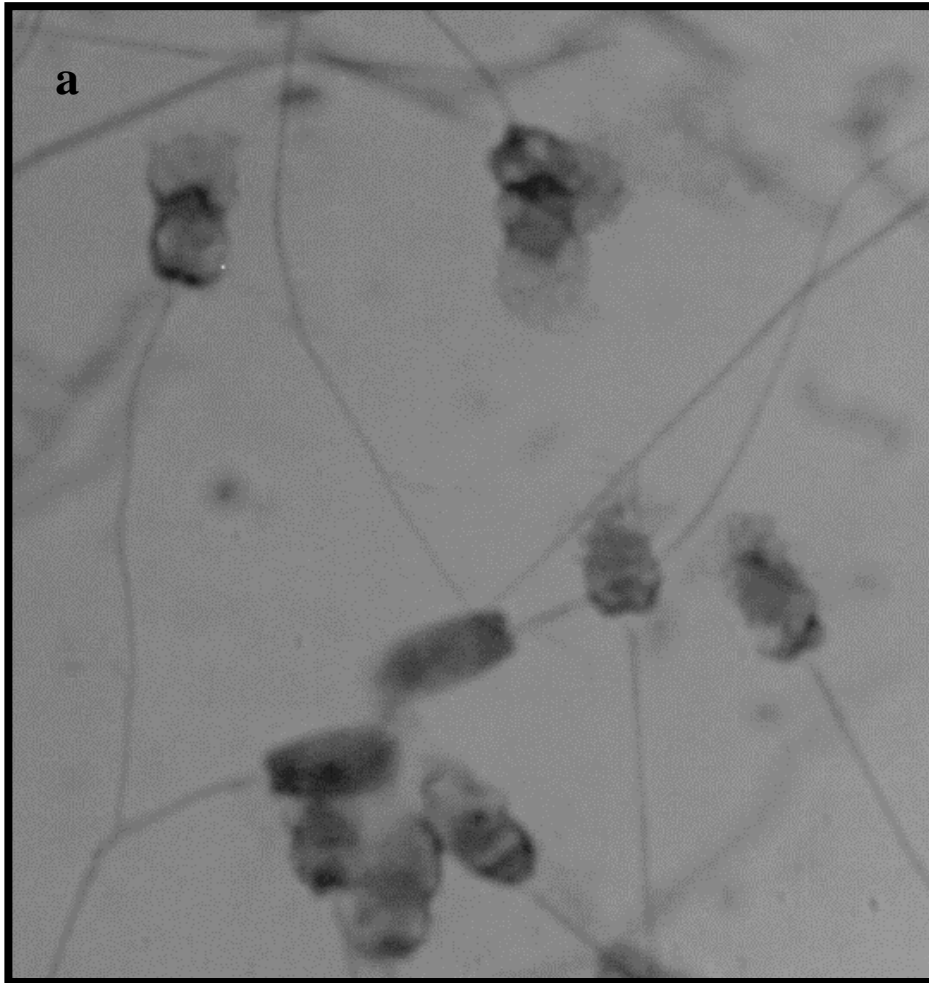


Figura 6 Cabezas espermáticas descondensadas

Estas fotografías tomadas con microscopio óptico en objetivo de inmersión (100x) en frotis con hematoxilina, muestran la descondensación en semen fresco y descongelado estabilizado con faloidina:

a) Espermatozoides frescos con 90 segundos de tratamiento DTT/heparina la región estabilizada se encuentra en la zona ecuatorial b) espermatozoides descongelados a 90 segundos de tratamiento DTT/heparina, la región electrodensa (estabilizada) por faloidina se retrae hacia la zona de inserción del flagelo, nótese la hinchazón de las cabeza a manera de "globo" aunque no hay pérdida de integridad aparente si es notable un retraso en la descondensación ya que la mayoría de las cabezas se notan íntegras.

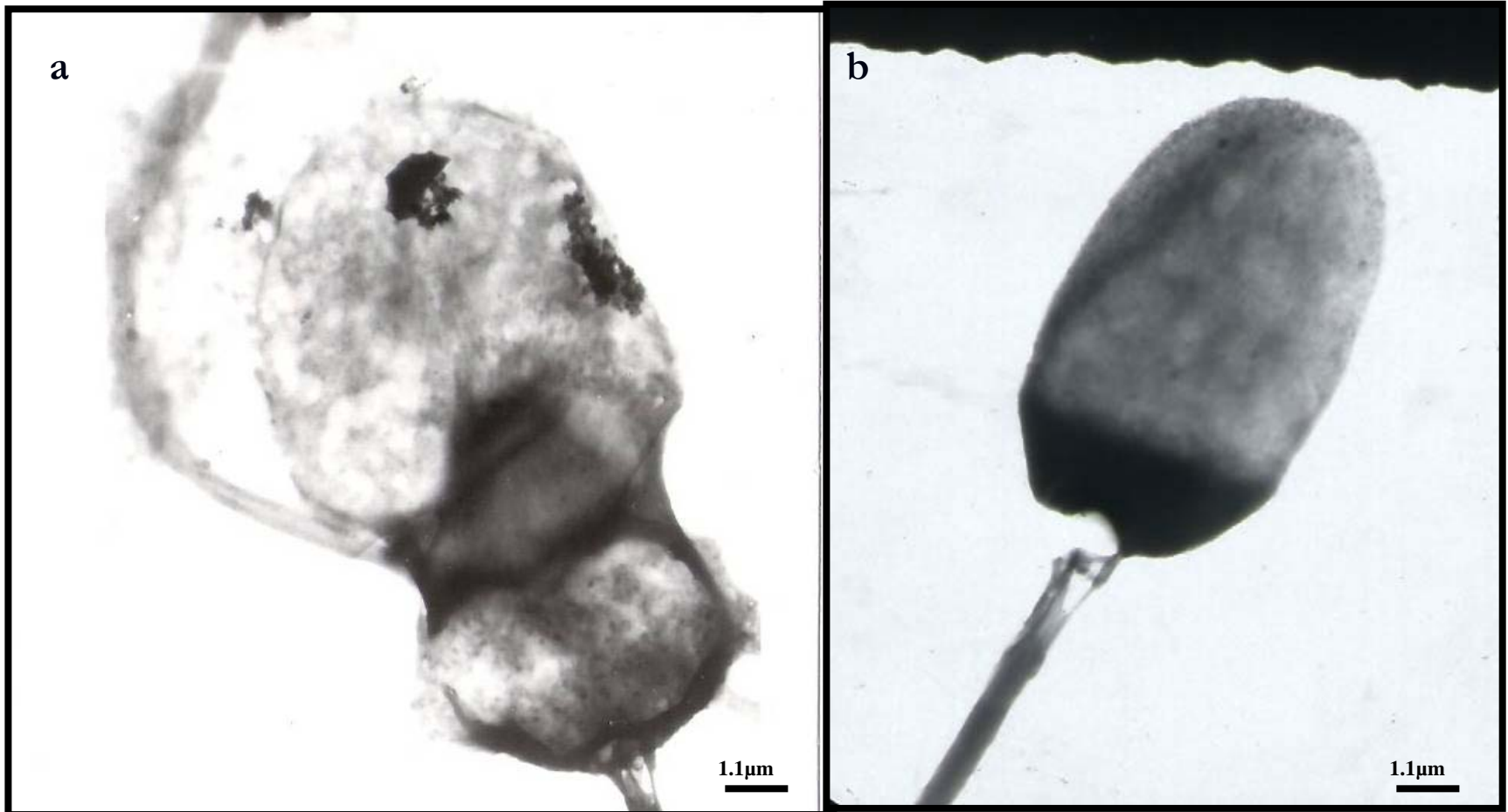


Figura 7 Cabezas espermáticas descondensadas

Estas micrografías electrónicas muestran un acercamiento de los patrones de descondensación en semen fresco y descongelado estabilizado con faloidina: a) espermatozoide fresco con 90 segundos de tratamiento DTT/heparina, la región estabilizada se encuentra en la zona ecuatorial. b) espermatozoide descongelado a 90 segundos de tratamiento DTT/heparina la región electrodensa (estabilizada) por faloidina se retrae hacia la zona de inserción del flagelo. Por otra parte además de que la faloidina estabiliza regiones diferentes, también es notoria la integridad que presenta la cabeza espermática descongelada.

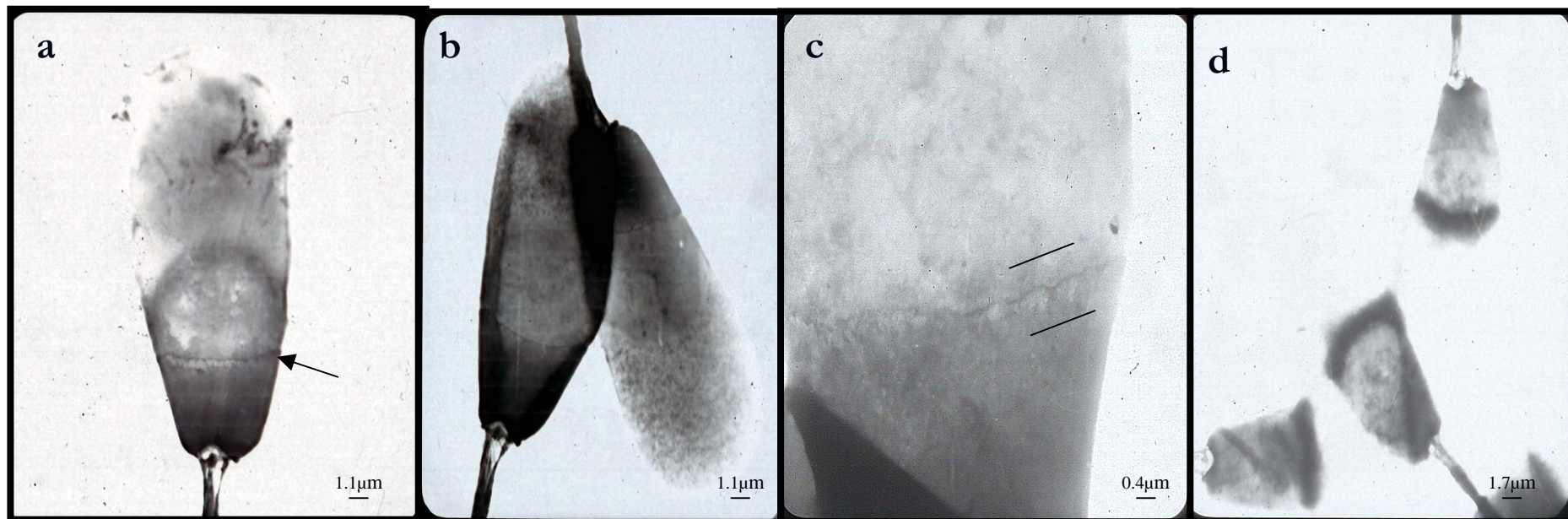


Figura 8 Espermatozoides frescos tratados con DTT

En la imagen se observan cabezas de espermatozoides frescos después del tratamiento con DTT 3.75 mM: a) La flecha marca la zona dañada en la sTP después de 15 segundos de tratamiento con DTT; en la región apical se observa la desestructuración de la teca. b) Espermatozoide que presenta apariencia esponjosa de la zona subacrosomal, esto indica una pérdida de material después de los 90 segundos de tratamiento con DTT. c) Un acercamiento de la región ecuatorial de una cabeza espermática a los 90 segundos de tratamiento donde se observa un ensanchamiento en la sTP que ocurre momentos antes de su desaparición. d) Espermatozoides con 300 segundos de tratamiento muestran una descondensación aparente, la región subacrosomal se ha perdido y la región posacrosomal presenta grandes regiones translúcidas, es interesante que la región ecuatorial se note más electrodensa.

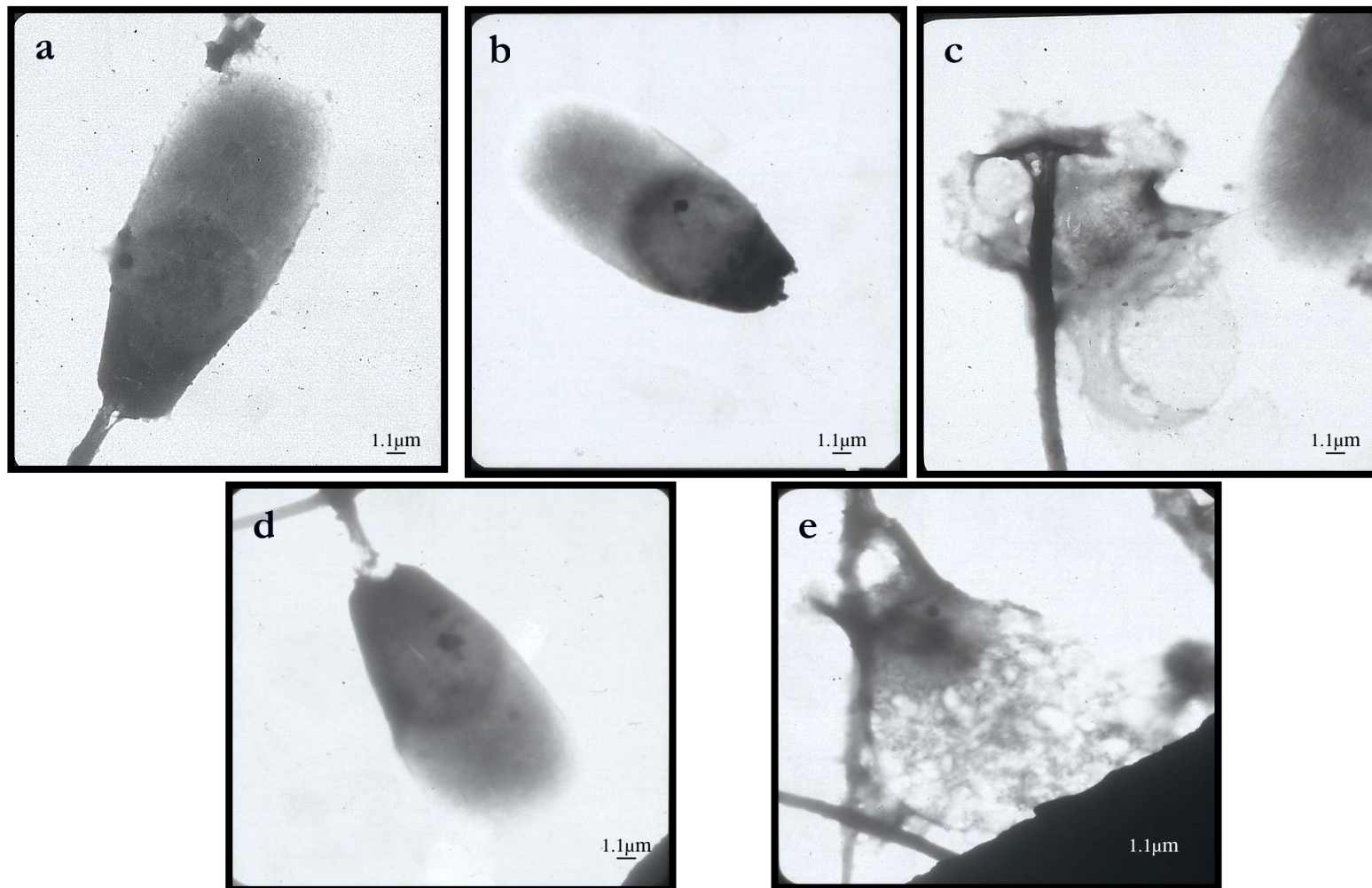


Figura 9 Espermatozoides descongelados tratados con DTT

Después del tratamiento con DTT 3.75 mM se observa la descondensación de las cabezas espermáticas descongeladas: a) cabeza espermática con 60 seg de tratamiento, ya no presenta sTP. b) y c) A los 90 segundos se ven cabezas espermáticas completamente íntegras, pero también cabezas espermáticas totalmente descondensadas. d) y e) Aún después de 60 minutos de aplicado el tratamiento, se mantiene la heterogeneidad de la población celular. Es posible encontrar cabezas íntegras a pesar de que la gran mayoría de la población se encuentra descondensada.

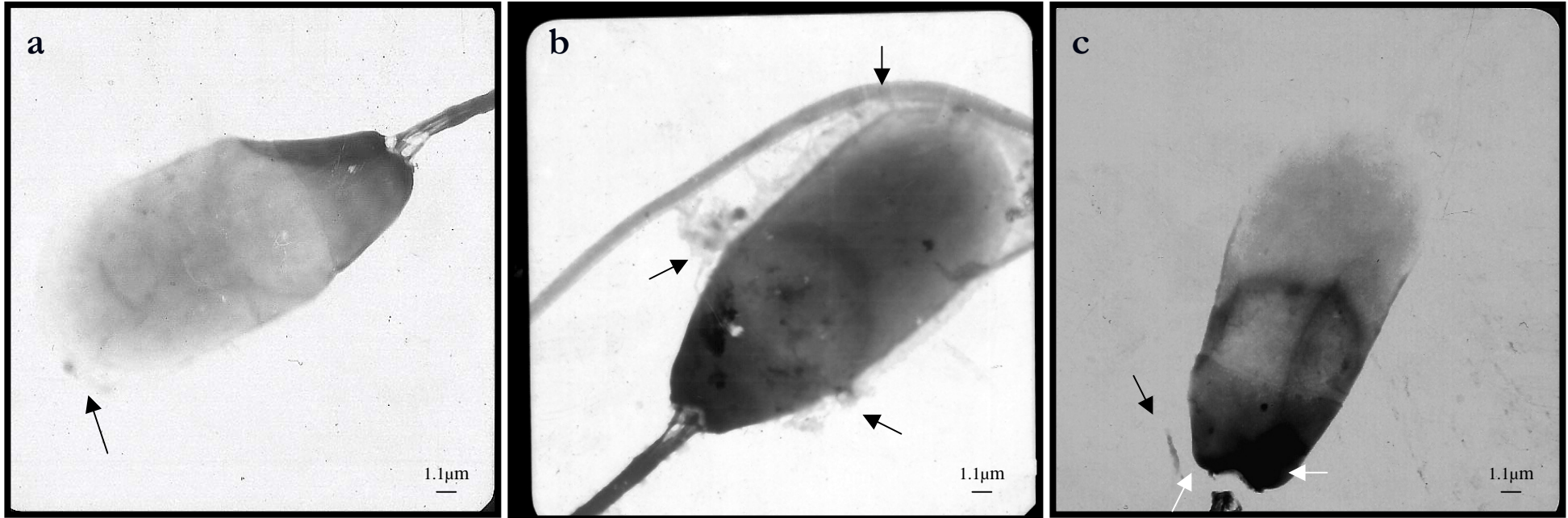


Figura 10 Espermatozoides tratados con heparina

La imagen muestra espermatozoides frescos tratados con heparina 5USP, las flechas negras indican pérdidas de material correspondientes a la TP. a) La pérdida a los 120 segundos es localizada en la región apical. b) A los 180 segundos la pérdida es generalizada, se ve el desprendimiento e toda la periferia nuclear. c) después de una hora de tratamiento la cabeza se ve completamente desnuda, la flecha oscura muestra material de la TP desprendido y las flechas blancas residuos adheridos a la zona posacrosomal del mismo material.

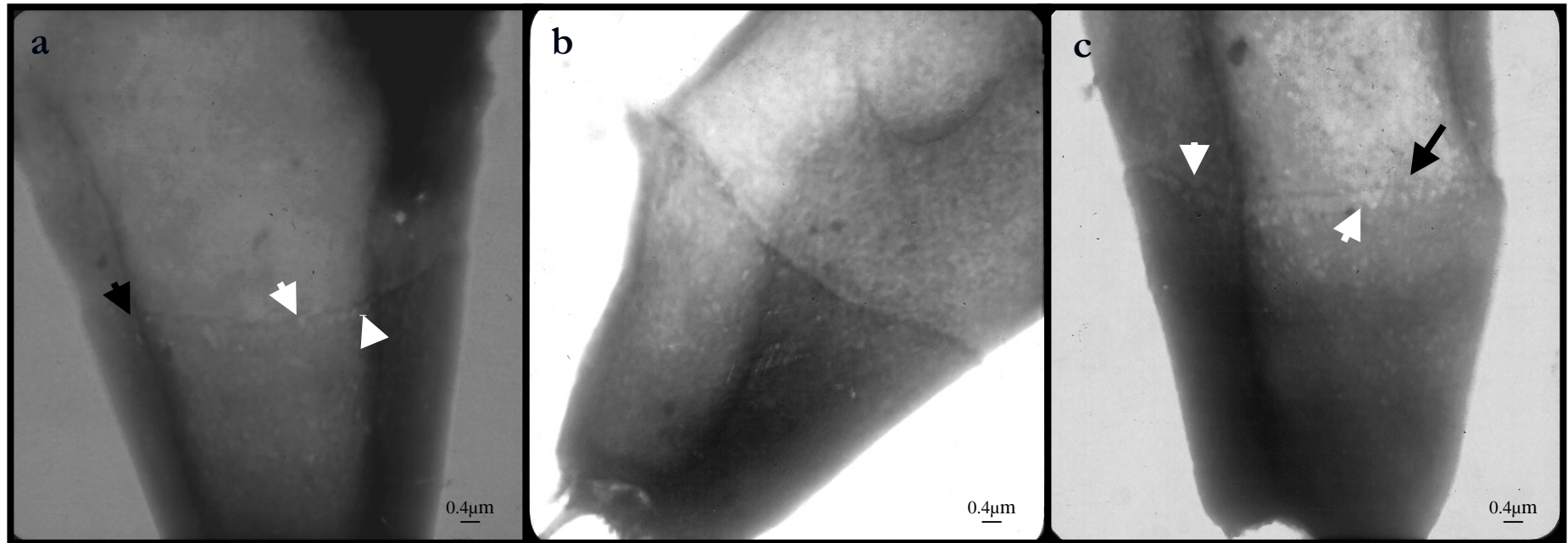


Figura 11 Espermatozoides tratados con heparina

Se aprecian las subestructuras alteradas después de una hora de tratamiento con 5USP de heparina en semen fresco: a) La subestructura sólo con pérdidas de pérdida de continuidad, la flecha negra señala la región donde la subestructura se ha perdido las blancas, las regiones que aun se conservan íntegras. b) La subestructura esta ausente sólo se aprecia una línea rasurada donde debiera estar presente la forma típica amañera de eslabones de cadena. c) La subestructura presenta una apariencia ensanchada (flecha negra), las flechas blancas señalan regiones donde la subestructura se ve más íntegra.

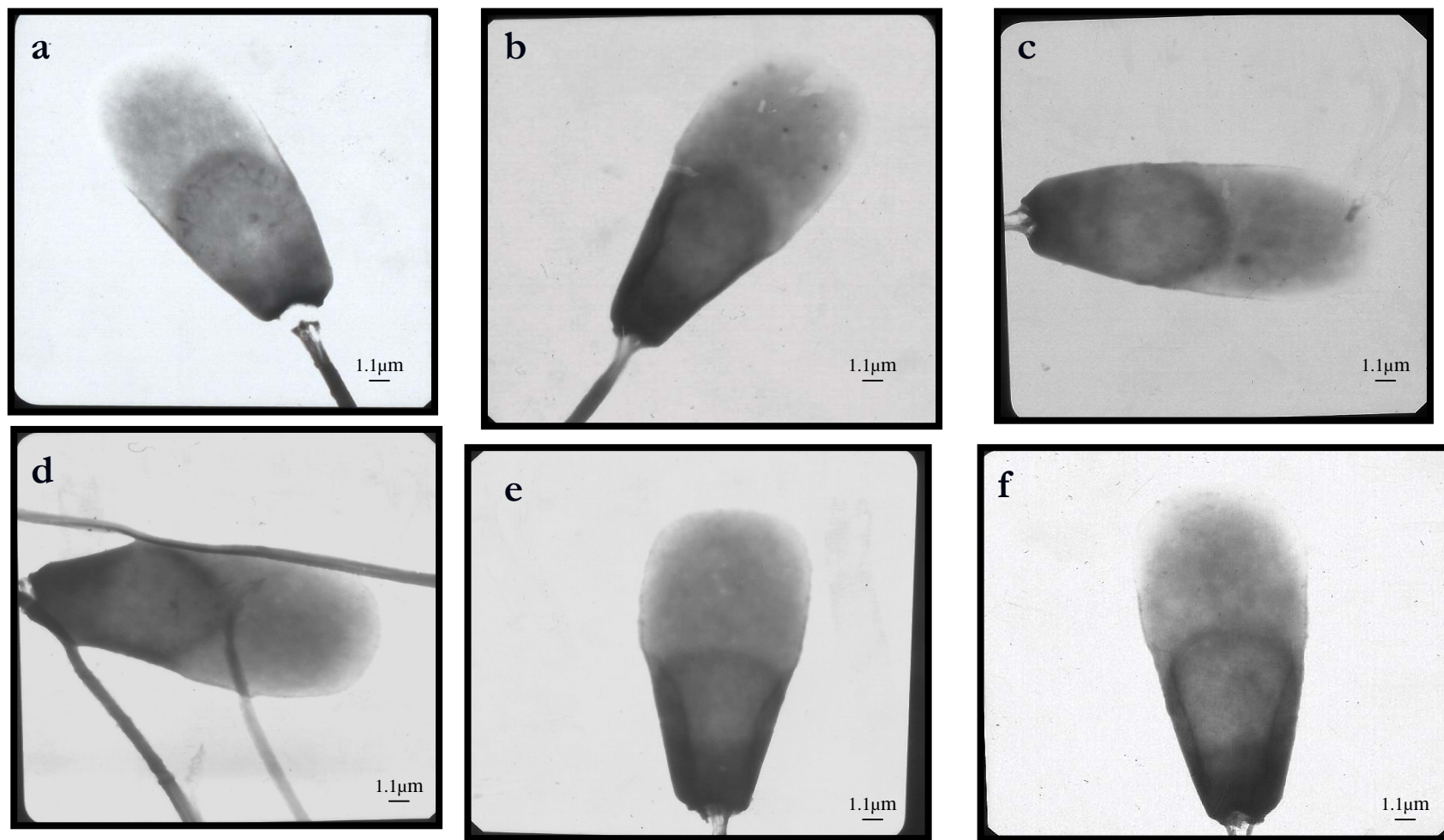


Figura 12 Espermatozoides descongelados tratados con heparina

Aquí se muestra la acción de 5USP de heparina en semen descongelado: a) A los 15 segundos de tratamiento, b) a los 30 segundos de tratamiento, c) a los 60 segundos de tratamiento, d) a los 2 minutos de tratamiento, e) a los 10 minutos de tratamiento y f) a los 20 minutos de tratamiento. En la secuencia es posible apreciar, que la subestructura desaparece desde los 15 segundos de tratamiento. Los cambios posteriores no son tan aparentes, al transcurrir los diversos tiempos pues sólo se ven zonas ligeramente más translúcidas en la región subacrosomal, aunque la pérdida de teca si es apreciable después de los 2 minutos donde casi no se aprecian residuos de la misma.

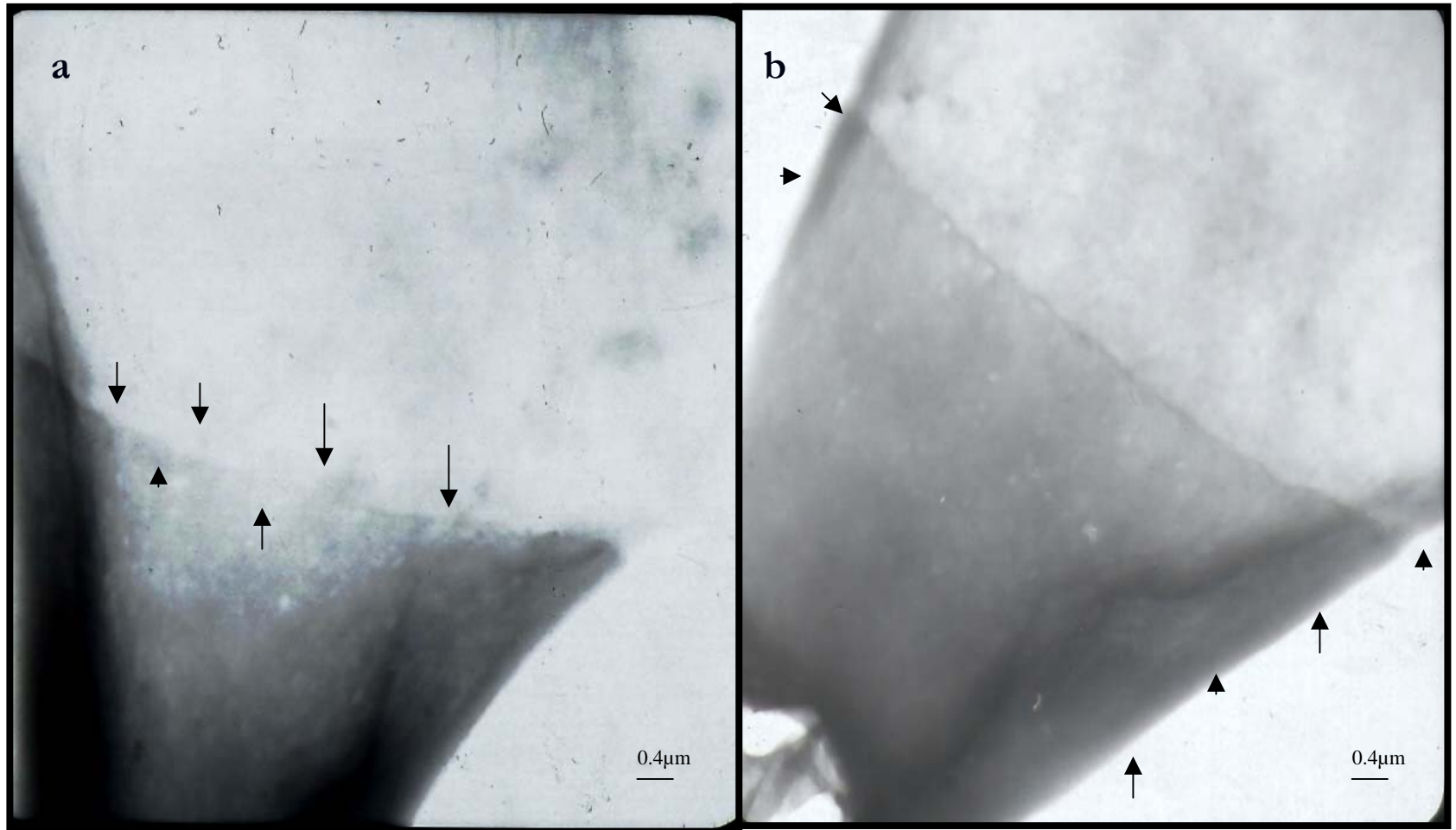


Figura 13 Espermatozoides frescos tratados con heparina

En este estudio no se logró la descondensación en espermatozoides frescos tratados con 10 USP de heparina, en el tiempo de tratamiento, pero la acción de la heparina sobre la subestructura si es notoria: a) Espermatozoide con 90 segundos de tratamiento la subestructura ya no es apreciable, las flechas indican donde debería encontrarse. b) En cabezas espermáticas con 3 minutos de tratamiento la teca se ha perdido por completo (flechas negras en la periferia).



Figura 14 Espermatozoides tratados con heparina

A concentración de 10 USP la heparina no causa descondensación en espermatozoides frescos, aunque es notorio el aumento de las zonas translúcidas en la región subacrosomal: a) 15 segundos de tratamiento. b) 60 segundos de tratamiento las flechas indican pérdida de material de la teca. c) 120 segundos de tratamiento, ya casi se ha desprendido. d) cabeza espermática con 180 segundos de tratamiento donde la teca perinuclear ya no es apreciable.

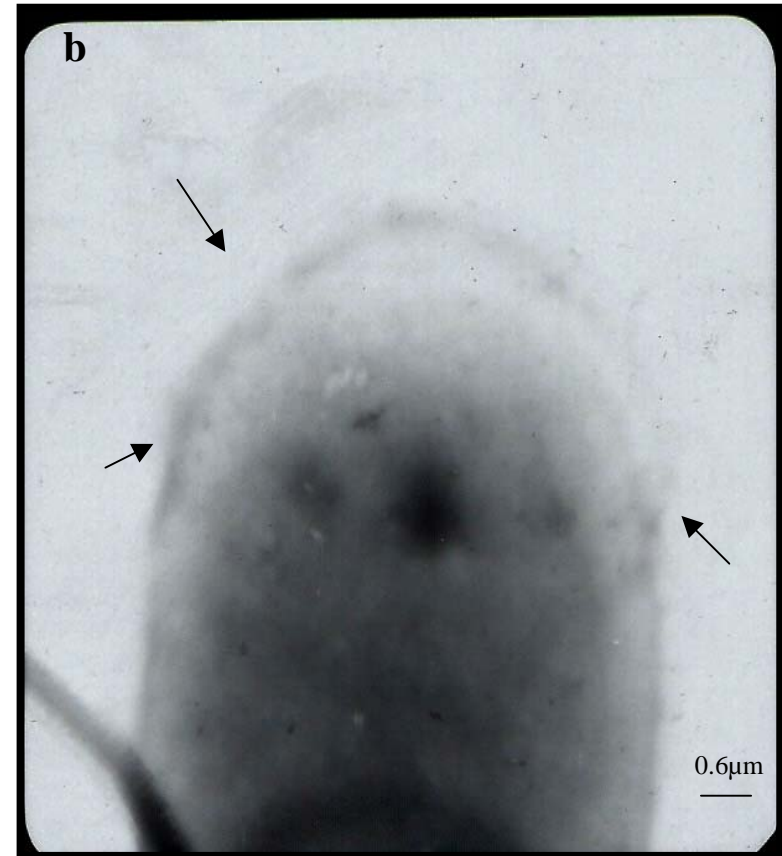
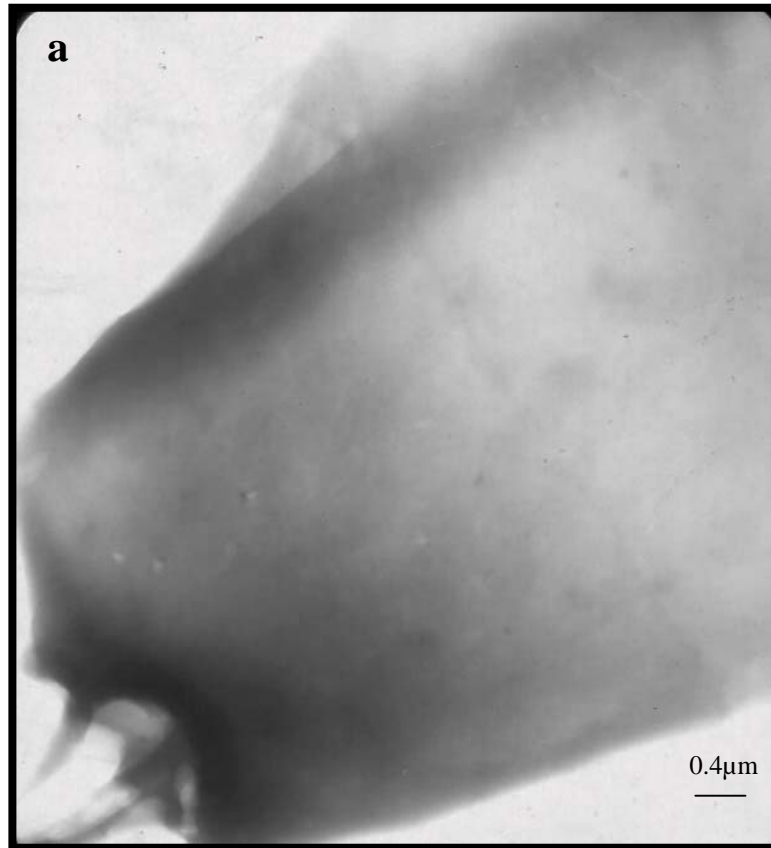


Figura 15 Espermatozoides tratados con heparina

Micrografías electrónicas que muestran un acercamiento del efecto de la aplicación de 15USP de heparina en semen fresco: a) A los dos minutos de tratamiento la subestructura ya se ha perdido y la teca también, la cabeza se ve desnuda. b) En un acercamiento se ve la pérdida de material de la teca en la zona apical de la cabeza espermática marcada por las flechas a los 60 segundos de tratamiento.

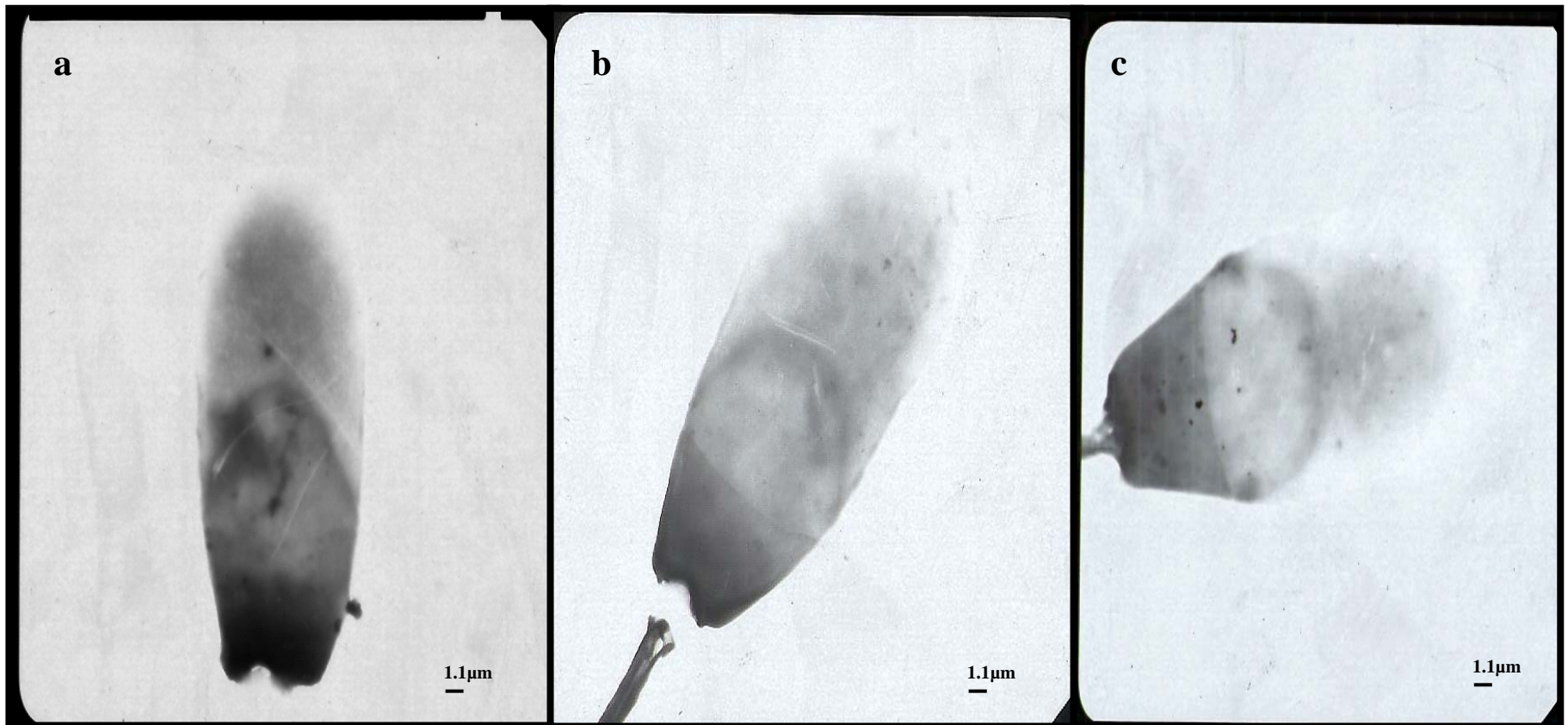


Figura 16 Espermatozoides tratados con heparina.

La aplicación de 15 USP de heparina en semen fresco tampoco logra la descondensación en el tiempo evaluado aunque el efecto sobre la zona subacrosomal es más rápido comparado con concentraciones más bajas de heparina, véase la progresión en que aparece el aumento de la apariencia translúcida en esa zona a los a) 15, b) 30 y c) 60 segundos de tratamiento.

A N E X O (2)

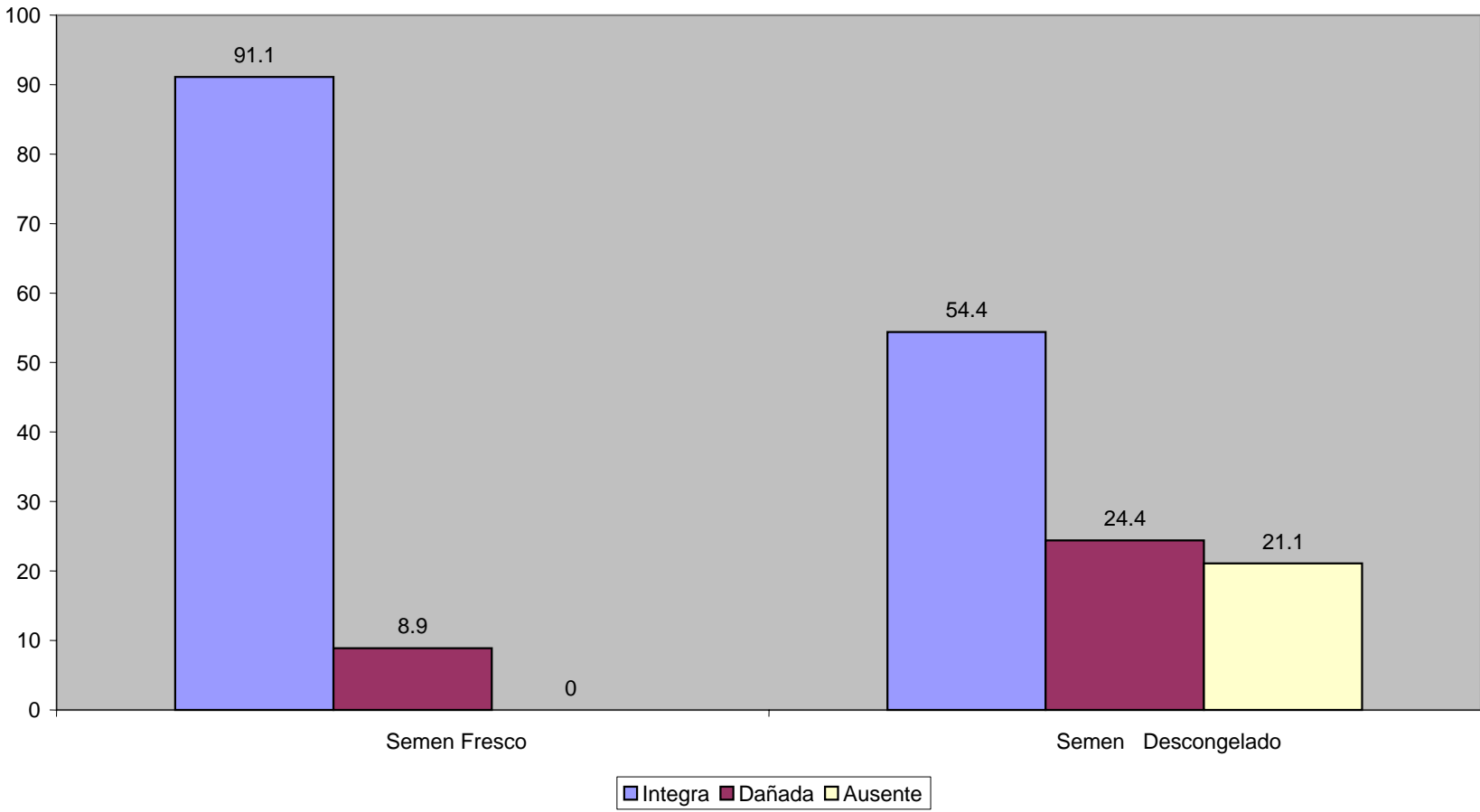
CUADROS

Cuadro 1 : Resultados de observaciones de integridad en la subestructura (sTP) tras 15 días de criopreservación.

Espermatozoides →	Frescos		Descongelados	
	No. de células	Porcentaje	No. de células	Porcentaje
Tipo de daño en la subestructura (sTP) ↓				
Integra	82	91.1	49	54.4
Dañada	8	8.9	22	24.4
Ausente	0	0.0	19	21.1
Total	90	100	90	100

Se encontró diferencia significativa ($P < 0.0001$) entre espermatozoides frescos y descongelados.

Grafica 1 : Integridad de la subestructura.



Cuadro 2 : Comparación entre las medidas ecuatoriales entre repeticiones presentadas por los espermatozoides después del tratamiento descondensante DTT 3.75mM/heparina 5USP.

Grupo experimental	Mediciones (N)	Muestra 1	Repetición 1	Repetición 2
Grupo 1: Fresco	240	3.587 ± 0.035 _a	3.582 ± 0.035 _a	3.557 ± 0.035 _a
Grupo 2: Descongelado	240	3.316 ± 0.032 _b	3.313 ± 0.032 _b	3.312 ± 0.032 _b
Grupo 3: Fresco estabilizado	240	3.235 ± 0.047 _c	3.239 ± 0.047 _c	-----
Grupo 4 : Descongelado estabilizado	240	3.207 ± 0.035 _d	3.186 ± 0.035 _d	-----

No se encontró diferencia significativa (P>0.0001) entre las repeticiones de los tratamientos.

Cuadro 3 : Diferencias entre la descondensación de espermatozoide frescos y descongelados después de la aplicación de un tratamiento de DTT 3.75mM/heparina 5USP (Mediciones ecuatoriales)

Tratamiento	N	Fresco	Descongelado	Diferencia
DTT/heparina	480	3.584 ± 0.019 _a	3.520 ± 0.013 _b	0.064 ± 0.015
Preincubación con faloidina	480	3.237 ± 0.017 _a	3.196 ± 0.017 _b	0.040 ± 0.011

Literales diferentes entre columnas indican diferencia significativa (P< 0.0001)

Cuadro 4 Diferencias entre las mediciones ecuatoriales entre tiempos postratamiento DTT 3.75mM/heparina 5USP en espermatozoides frescos y descongelados y entre frescos y descongelados preincubados con faloidina									
Grupos experimentales	N	Tiempo de tratamiento							
		0	15	30	60	90	120	180	300
Grupo 1: Frescos	60	3.816± 0.020 _a	3.523±0.033 _a	3.419±0.036 _a	3.756±0.036 _a	3.881±0.039 _a	3.772±0.039 _a	3.577±0.036 _a	2.930±0.057 _a
Grupo 2: Descongelados	60	3.317± 0.026 _b	3.602±0.032 _a	3.602±0.039 _b	3.531±0.047 _b	3.521±0.031 _b	3.529±0.031 _b	3.645±0.037 _b	3.484±0.038 _b
Diferencia Grupo 1/Grupo 2		0.498± 0.015	-0.089±0.015	-0.183±0.009	0.225±0.016	0.360±0.013	0.243±0.021	-0.067±0.018	-0.553±0.026
Grupo 3: Frescos estabilizados	60	3.530± 0.032 _a	3.305±0.033 _a	3.226±0.029 _a	3.348±0.049 _a	3.228±0.035 _a	2.821±0.063 _a	3.242±0.050 _a	3.196±0.054 _a
Grupo 4: Descongelados estabilizados	60	3.477± 0.040 _a	3.272±0.039 _a	3.221±0.044 _a	3.146±0.043 _b	3.071±0.050 _b	2.974±0.052 _b	3.134±0.031 _b	3.275±0.053 _a
Diferencia entre grupo3 y grupo 4		0.530± 0.025	0.032±0.028	0.005±0.021	0.201±0.026	0.156±0.221	-0.153±0.042	0.108±0.028	-0.079±0.025
Literales diferentes indican diferencia significativa (P< 0.0001)									

Cuadro 5 Diferencias de las mediciones ecuatoriales entre tiempos dentro del tratamiento DTT 3.75mM/heparina 5USP en espermatozoides frescos y descongelados y entre frescos y descongelados preincubados con faloidina.

Grupos experimentales	N	Tiempo de tratamiento							
		0	15	30	60	90	120	180	300
Grupo 1: Frescos	60	3.825±0.035 _a	3.509±0.035 _{bc}	3.418±0.035 _c	3.745±0.035 _a	3.856±0.035 _a	3.753±0.035 _a	3.573±0.035 _b	2.936±0.035 _d
Grupo 2: Descongelados	60	3.314±0.032 _c	3.526±0.032 _{ab}	3.604±0.032 _{ab}	3.532±0.032 _{ab}	3.525±0.032 _{ab}	3.530±0.032 _{ab}	3.643±0.032 _a	3.485±0.032 _b
Grupo 3: Frescos estabilizados	60	3.530±0.047 _a	3.305±0.047 _b	3.226±0.047 _b	3.347±0.047 _{ab}	3.228±0.047 _b	2.821±0.047 _c	3.242±0.047 _b	3.196±0.047 _b
Grupo 4: Descongelados estabilizados	60	3.477±0.047 _a	3.272±0.047 _b	3.221±0.047 _{bc}	3.146±0.047 _{bcd}	3.071±0.047 _{cd}	2.974±0.047 _d	3.134±0.047 _{bcd}	3.275±0.047 _b

Literales diferentes entre indican diferencia significativa (P< 0.0001)