



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**IDENTIFICACIÓN DE LA(S) PROTEÍNA(S) DE LA TECA
PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO DESPUÉS
DEL PROCESO DE CONGELACIÓN**

T E S I S

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

PRESENTA

SALVADOR MARTEL BRAVO

TUTOR:

Dra. MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITE TUTORAL:

Dra. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Dr. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicárselo a todas las personas que siempre han estado a mi lado compartiendo un sueño, una ilusión, un anhelo, un objetivo o una meta. A todos aquellos que han sido un ejemplo a seguir como personas o en el ámbito profesional.

A mi familia, que de cualquier manera siempre me ha permitido realizar lo que me gusta hacer. En especial se lo dedico a mis padres Salvador y Sofía que me dieron la oportunidad de estar aquí y me proporcionaron las herramientas para lograr mis proyectos de vida, hoy me doy cuenta que sin su apoyo no hubiese aprendido a enfrentar y disfrutar de la vida como hoy lo hago. Nunca encontrare la manera de agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Pedro, Lorena, Reyna y Rocio que siempre están al pendiente de las aventuras que se me ocurren y me permiten enfrentar y resolver los problemas a mi manera. Gracias por compartir sus experiencias, triunfos y fracasos.

A mis sobrinos Jorge, Tania, Alejandra, Vanessa, Brenda, Mireya y Daniel por que su felicidad se contagia y son el motor para seguir adelante en todo momento. Gracias por tener la ilusión de ser “Veterinario” como su tío.

A todos y cada uno de ustedes mil gracias por sus sacrificios, por su apoyo incondicional y por permitirme compartir con ustedes esta extraordinaria experiencia que un día decidí emprender y finalmente he concluido.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial Dra. Lourdes Juárez, por su apoyo y dedicación a la realización de este trabajo. A la Dra. Maria Elena Trujillo por darme la oportunidad de llevar a cabo esta ilusión. Al Dr. Carlos García por sus atinados comentarios respecto a las técnicas y métodos y por el apoyo brindado para la realización de experimentos en su laboratorio.

A los profesores y académicos de esta casa de estudios que participaron en mi formación académica.

Un especial agradecimiento al Dr. José Manuel Hernández por su sabiduría, amabilidad, confianza y disposición por hacer del trabajo algo cotidiano y por permitirme realizar algunas técnicas en su laboratorio.

Gracias al M. en C. Armando Pérez por el apoyo brindado y el tiempo dedicado que sin importar sus actividades siempre mostró la mejor disposición para aclarar o sugerir la más adecuada solución a los problemas.

A las Biólogas. Sirenia González y Lourdes Rojas de microscopia electrónica del CINVESTAV por el apoyo técnico.

A Blanquita de la unidad de microscopia confocal del CINEVESTAV por el apoyo brindado en la toma de imágenes.

Al MVZ. Carlos Cedillo de la unidad de microscopia electrónica del Departamento de Patología de la UNAM por permitirnos el uso del equipo, así como por su apoyo en la toma de las imágenes de microscopia electrónica

A mis compañeros y amigos inolvidables; Katherine por ser la pionera en este proyecto gracias por regalarme tu valioso tiempo.

Oscar gracias por todo y por contagiarnos de ese ímpetu que pones al realizar las actividades.

Juan Carlos por que al final de cuentas compartimos muchos momentos inolvidables y aventuras.

Dania únicamente te quiero agradecer por permitirme ser parte de tu espacio y por la confianza que siempre depositaste en mí.

Cipatli te agradezco el haber compartido un sin fin de experiencias en el laboratorio, finalmente siempre nos divertíamos con nuestros experimentos.

Hector Villaseñor siempre serás un amigo muy especial nunca olvidare tu apoyo y por supuesto esa amistad incondicional.

Al Sr. Francisco López, Abel Maldonado y Sandra Romero como olvidar su apoyo incondicional en todo momento.

Sin duda, ninguno de ustedes dejara de ser parte de mi recuerdo durante este proceso de aprendizaje.

A todos simplemente gracias.

El autor recibió una beca para realizar sus estudios de maestría por parte del CONACYT (No. de registro 186155). Este trabajo fue también financiado por el DGAPA por medio de los proyectos PAPIIT IN206702 y PAPIIT IN206506

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
Índice de figuras y tablas.....	II
Resumen.....	III
Abstract.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	14
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
VI. RESULTADOS.....	31
VII. DISCUSIÓN.....	42
VIII. CONCLUSIONES.....	46
IX. LITERATURA CITADA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Esquema de la morfología de la teca perinuclear (TP) de la cabeza espermática.....	5
Figura 2. Morfología de la subestructura de la TP de espermatozoides de cerdo.....	6
Figura 3. Microscopia confocal del ensamblaje de las proteínas de la teca perinuclear durante la espermiogénesis.....	7
Figura 4. Esquema del método de decapitado de espermatozoides de cerdo.....	26
Figura 5. Microfotografía del decapitado de los espermatozoides con perlas de vidrio y filtrado a través de las membranas de nylon	31
Figura 6. Microscopia Electrónica de cabezas espermáticas después del proceso de decapitado con perlas de vidrio.....	32
Figura 7. Microscopia electrónica de cabezas espermáticas de semen fresco con TP expuesta.....	33
Figura 8. Microscopia electrónica de una cabeza espermática de semen descongelado con TP expuesta	33
Figura 9. Microscopia electrónica de una cabeza espermática de semen fresco tratado para la extracción de la teca perinuclear	34
Figura 10. Microscopia electrónica de cabezas espermáticas de semen descongelado mostrando la extracción total de la teca perinuclear	35
Figura 11. SDS-PAGE al 12% de las proteínas extraídas de la TP de cabezas espermáticas de semen fresco y descongelado	37
Figura 12. Inmunodetección de actina de los extractos proteicos de la TP mediante Western blot...	38
Figura 13. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de actina en espermatozoides frescos	39
Figura 14. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de actina en espermatozoides descongelados	39
Figura 15. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de distrobrevina en espermatozoides frescos	40
Figura 16. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de distrobrevina en espermatozoides descongelados	40
Tabla 1. Concentración proteica en los extractos de TP obtenidos de cabezas espermáticas provenientes de semen fresco y descongelado	36

Resumen

La teca perinuclear (TP) es el principal citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide, es una capa densa que rodea al núcleo del espermatozoide de los mamíferos, excepto en una limitada área, donde la pieza del cuello del espermatozoide se implanta en la base del núcleo. Diversas investigaciones señalan que las proteínas del citoesqueleto exhiben una despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura. Recientemente, daños ultraestructurales en la TP han sido descritos en el espermatozoide del bovino y del cerdo, lo cual podría tener una implicación significativa en la viabilidad del espermatozoide criopreservado ya que esta estructura ha sido involucrada en diversos eventos durante el proceso de fertilización espermática. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la criopreservación sobre la estabilidad de las proteínas de la TP del espermatozoide criopreservado del cerdo e identificar la distribución de alguna de estas. La TP fue extraída de las cabezas espermáticas desprovistas de acrosoma y membrana plasmática por el tratamiento con el detergente Brij 36-T (0.65%) y ditiotreitol (3.5 mM). En las cabezas provenientes de espermatozoides criopreservados en comparación con la de los frescos se logró la extracción total de la TP bajo las mismas condiciones de tratamiento. La electroforesis en gel reveló que el extracto estuvo compuesto de aproximadamente de 4 bandas polipeptídicas en ambos tipos de muestras de las cuales las proteínas con un peso Mr 17, 45, 55 y 97 kDa fueron las más prominentes, de manera notoria en las muestras de los espermatozoides descongelados las bandas se tiñeron más intensamente. La presencia de actina fue evaluada en los extractos de TP transferidos a papel de nitrocelulosa y fue inmunolocalizada en frotis espermáticos preparados para microscopía confocal. En ambos tipos de muestras los anticuerpos monoclonales anti-actina reconocieron una banda de 43-kD por Western blot, por inmunolocalización en los espermatozoides provenientes de semen fresco, a excepción del segmento ecuatorial toda la TP se observó fluorescente, mientras que los espermatozoides provenientes de semen congelado-descongelado presentaron un cinturón de fluorescencia en la región ecuatorial y una ligera fluorescencia en la región postacrosomal. En conclusión, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo las proteínas de la TP del espermatozoide de cerdo son desestabilizadas durante la criopreservación del semen.

Abstract

The perinuclear theca (PT) is the main cytoskeletal element of the sperm head, is a dense layer that surrounds the nucleus of mammalian spermatozoa, except in a limited area where the neck piece of the sperm tail implants into the base of the nucleus. Diverse researches points that cytoskeletal proteins exhibit a temperature-dependent depolymerization and repolymerization. Recently, ultrastructural damages in PT have been described in boar and bovine sperms, wich could have a significative implication in the cryopreservative spermatozoa viability, since for this structure has been entailed in diverse events during fertilization process. The aim of this work waste evaluate the cryopreservation effect of the PT proteins stability of the cryopreserved boar spermatozoa, and to identificare the distribution of some of this. The PT was extracted of the sperm heads deproved of acrosome and plasmatic membrane by the treatment of Brij 36-T (0.65%) detergent and dithiotreitol (DTT) (3.5 mM). In the heads arised from cryopreserved sperms in comparison with fresh, it was achived the entired extraction of the PT under the same conditions of treatment. The electrophoresis in gel, revealed that the extracted was composed of approximated 4 polipeptidic bands in both types of samples in wich proteins with a weight of Mr 17, 45, 55 y 97 kDa were the most prominents, in a notorius way, in the samples of post-thawed sperms, bands were stained with more intensivity. The presence of actin were evaluated in the extracted of the PT tranfered to nitrocellulose membranes and it was inmunolocalized in sperm slides treated for confocal microscopy. In both types of samples, anti-actina monoclonal antibodies recognized a 43 kDa band by western blotting; by immunolocalization in the sperm arised from fresh semen with the exception of ecuatorial segment, the entired PT was observed fluorescent, while sperms arised from thawed-posthawed presented a fluorescent belt in the acuatorial region and a ligh fluorescence in the postacrosomal region. In conclusion, in agreement with the result obtained in the present workpaper, the PT proteins of boar sperm are unstabilized during the sperm cryopreservation.

I. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre la criopreservación del semen tienen una larga historia, más de dos siglos, pero la mayoría de los trabajos datan de las últimas cuatro décadas. Sin embargo, a la fecha persiste el problema de que aún con las mejores técnicas de preservación la sobrevivencia de la población espermática después del congelamiento es cercana al 50% (Guthrie y Welch, 2005). Como consecuencia de ello en muchas especies la fertilidad de los animales inseminados artificialmente es más pobre comparada con la del semen fresco, lo cual solo puede ser parcialmente compensado inseminando con un mayor número de espermatozoides. La célula espermática posee una diversidad de atributos funcionales reflejados en sus diferencias regionales (Watson, 1995), por lo que posiblemente en cada uno de los pasos de la criopreservación podría estar perdiendo alguna habilidad funcional. Por ejemplo, varios organelos de la célula espermática están envueltos por una membrana y es sabido que las membranas espermáticas afectadas por la criopreservación incluyen la plasmática, las acrosomales y las mitocondriales. A excepción de las mitocondriales las demás membranas están regionalmente diferenciadas desplegando distinto comportamiento y por lo tanto una composición variable. Se sabe que en las células somáticas el citoesqueleto participa en el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática (Watson, 1995).

La arquitectura tipo-específica de una célula es determinada y mantenida por la expresión génica de proteínas responsables del ensamblaje del citoesqueleto. Entre las características del citoesqueleto está su resistencia a la lisis y a la extracción con detergentes desnaturizadores, así como a soluciones amortiguadoras a diferentes concentraciones de sales y pH. El citoesqueleto de las células somáticas ha sido intensamente estudiado, mientras que de los elementos que conforman al citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos existe información escasa. Esto es particularmente cierto para el principal componente del citoesqueleto de la cabeza espermática, **la teca perinuclear (TP)** (Juárez-Mosqueda, 2000).

EL CITOESQUELETO

El citoplasma de las células eucariotas está organizado espacialmente por una red de filamentos proteicos conocida como **citoesqueleto**. Esta red contiene tres tipos principales de filamentos: los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios. Los tres tipos de filamentos se forman como ensamblajes helicoidales de subunidades que se autoasocian generando combinaciones de contactos proteicos extremo-extremo o laterales. Las diferencias en la estructura de las subunidades y la forma de autoensamblaje confieren a los filamentos propiedades mecánicas distintas. Los filamentos intermedios forman estructuras semejantes a cuerdas, fáciles de formar pero difíciles de romper. Los microtúbulos son tubos rígidos y fuertes, mientras que los filamentos de actina son los más finos, difíciles de ensamblar y mucho más fáciles de romper (Alberts *et al.*, 2002).

La tubulina y la actina son las subunidades de los microtúbulos y microfilamentos respectivamente, ambas proteínas han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución de las células eucariotas. Las subunidades de los filamentos intermedios son más diversas, siendo específicas de tejido en las que se incluyen entre otras, a las queratinas de las células epiteliales, a los neurofilamentos de las células nerviosas y a las desminas de las células musculares.

En todas las células la función primaria de los filamentos intermedios es proporcionar resistencia mecánica (Nogales *et al.*, 1998). La actina es la principal proteína citoesquelética de todas las células de mamíferos y tiene papeles bien establecidos en la regulación de la forma celular, migración e interacción con la matriz extracelular (Howes *et al.*, 2001). Además una función común de las estructuras citoesqueléticas de actina consiste en endurecer o cambiar la forma de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2002). Por su parte, los microtúbulos participan en un gran número de funciones celulares incluyendo el mantenimiento de la forma y polaridad, mitosis, citocinesis, el posicionamiento de organelos, transporte intracelular a regiones específicas y la locomoción celular (Malhotra y Shnitka, 1991)

Proteínas accesorias del citoesqueleto

Las funciones de los filamentos del citoesqueleto dependen de proteínas accesorias. Cada tipo (microtúbulos, filamentos intermedios y de actina) tiene un grupo importante de tales proteínas.

La cinética de ensamblaje y desensamblaje de un filamento puede verse alterada por las proteínas accesorias ya sea a través de su unión a las subunidades libres o a los propios filamentos. Algunas alteran la dinámica de los filamentos por unirse a sus extremos y otros fragmentándolos en trozos más pequeños, mientras que ensamblan a los filamentos en estructuras de orden superior entrecruzándolos unos con otros de una forma geoméricamente definida. Un tercer grupo de proteínas determinan la forma y las propiedades de adhesión de las células al unir a los filamentos a la membrana plasmática (Hall, 1998).

La dinámica del citoesqueleto de actina está dada principalmente por la capacidad que tiene la célula para polimerizar y despolimerizar sus microfilamentos como respuesta a estímulos extracelulares, los cuales actúan a través de varios receptores celulares que encienden mecanismos para regular la dinámica del citoesqueleto a través de diferentes proteínas, tales como: WASp, Arp2/3 y Cdc42 (Delgado-Buenrostro, 2004). En muchos tipos celulares, la estructura del citoesqueleto de actina es regulada por GTPasas de la familia Rho, mientras que las múltiples formas y variadas funciones de la actina dependen de un grupo de proteínas de unión a la actina. Por ejemplo, la tropomiosina se une a lo largo de los filamentos de actina y los convierte en estructuras más rígidas alterando su afinidad por otras proteínas; la filamina entrecruza los filamentos de actina formando geles laxos; la fimbrina y la α -actinina forman haces de actina paralelos; la gelsolina media una fragmentación dependiente de calcio de los filamentos de actina. Además, diversas formas de miosina utilizan la energía de hidrólisis de ATP para desplazarse a lo largo de los filamentos de actina llevando una carga (por ejemplo, una vesícula, otro filamento, etc) (Alberts *et al.*, 2002).

Los microfilamentos junto con la distrofina están involucrados en el mantenimiento de los dominios funcionales de la membrana plasmática, es decir la distrofina es uno de los elementos estructurales principales del citoesqueleto sub-membranal involucrada en la estabilización de la membrana plasmática (Ervasti y Campbell, 1993; Hernández-González *et al.*, 2001). De hecho el termino “citoesqueleto sub-membranal” se refiere al arreglo de los elementos citoesqueléticos que se extienden por debajo de la membrana plasmática de las células eucariotas. Otro componente principal del citoesqueleto sub-membranal es la espectrina, la cual media la asociación de los microfilamentos y otras proteínas con la membrana (Coleman *et al.*, 1989).

En cuanto a los filamentos intermedios, estos son estructuras muy estables y resistentes a la extracción con amortiguadores desnaturalizantes. Tal estabilidad podría indicar que son estructuras poco dinámicas, sin embargo diversos estudios han mostrado que existe el intercambio dinámico de subunidades y un ensamblaje y desensamblaje. La dinámica de ensamblaje está modulada por la fosforilación de los filamentos intermedios. Las proteínas de filamentos intermedios son fosforiladas por un gran número de cinasas y generalmente la fosforilación inhibe el ensamblaje de las proteínas de filamentos intermedios, facilitando así el desensamblaje de los mismos (Stewart, 1993).

Finalmente, entre las proteínas que se asocian a los microtúbulos están: la dineína, la cinecina y las MAPs (proteínas asociadas a microtubulos). Las MAPs unen y promueven el ensamblaje de los microtúbulos; estas incluyen MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 y tau. La interacción de todas estas proteínas con los microtúbulos depende de su estado de fosforilación (Lee, 1993). Por otra parte, una multitud de diversas formas de motores de transportes intracelulares, basados en microtúbulos, generan las fuerzas para el mantenimiento de la organización estructural y dinámica del citoplasma. Las proteínas motoras de microtúbulos basan su movimiento sobre ellos por la hidrólisis del ATP y estas son la dineína y la cinecina (Skoufias y Scholey, 1993)

Citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos

La teca perinuclear (TP), también llamada sustancia perinuclear (SP) o matriz perinuclear es el principal citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos (Bellvé *et al.*, 1992), está es una cápsula citoesquelética poco tradicional que cubre al núcleo espermático. La TP es ensamblada durante la espermiogénesis entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, llenando efectivamente la mayor parte del espacio citoplásmico disponible en la cabeza espermática; aunque es estructuralmente continua, morfológicamente la TP ocupa 3 principales regiones en la cabeza espermática (Fig. 1):

1. La TP de la región subacrosomal (RSA), la cual se encuentra intercalada entre la membrana acrosomal interna (MAI) y la envoltura nuclear (EN).
2. La TP que se extiende sobre el segmento ecuatorial (SE), entre la membrana plasmática (PM) y la membrana acrosomal externa (MAE).
3. La TP de la región de la hoja postacrosomal (RPA) se extiende distalmente desde el SE entre la MP y la EN.

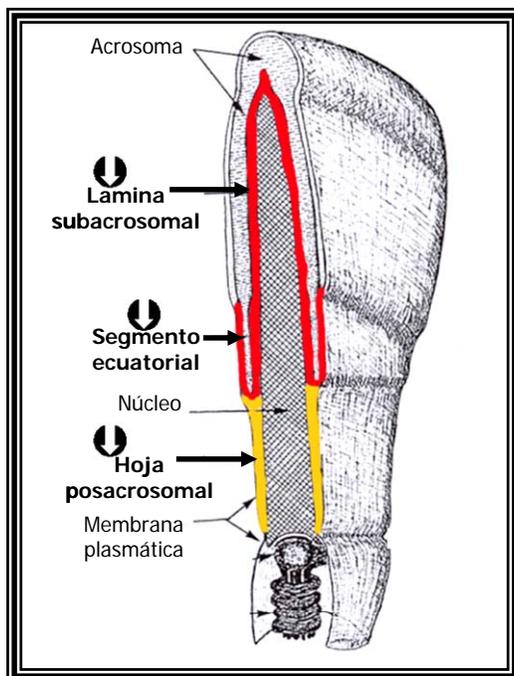


Figura 1. Esquema de la morfología de la teca perinuclear (TP) de la cabeza espermática (de Oko, 1995). Representación grafica de un corte sagital de la cabeza espermática en relación a tres dimensiones.

El análisis ultraestructural de espermátides y espermatozoides ha mostrado una estrecha relación entre la TP y las membranas espermáticas en contacto. Apoyando lo anterior, estudios en espermatozoides sonicados muestran que la MAI permanece unida fuertemente a la TP después de dicho tratamiento (Oko y Maravei, 1994). Adicionalmente, se ha sugerido que existe una interacción estructural entre la matriz nuclear y la TP. Funcionalmente, durante la espermiogénesis la TP participa en el ensamblaje del acrosoma y en la formación de la cabeza del espermatozoide (Sutovski *et al.*, 2003).

Subestructura de la teca perinuclear

En estudios sobre cambios en la composición de las proteínas de la teca perinuclear durante la reacción acrosomal Juárez-Mosqueda y Mújica (1999), reportan la formación de una subestructura en la región apical de la hoja postacrosomal de la teca perinuclear de espermatozoides de cobayo. La subestructura de la teca perinuclear (sTP) consiste en proyecciones en forma de pestañas, que rodea la cabeza espermática. Esta subestructura también ha sido reportada en espermatozoides de conejo (Koehler, 1970) carnero (Watson *et al.*, 1995), cerdo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999) y bovino (Olson *et al.*, 1983; Martínez, 2003) (ver Fig. 2).

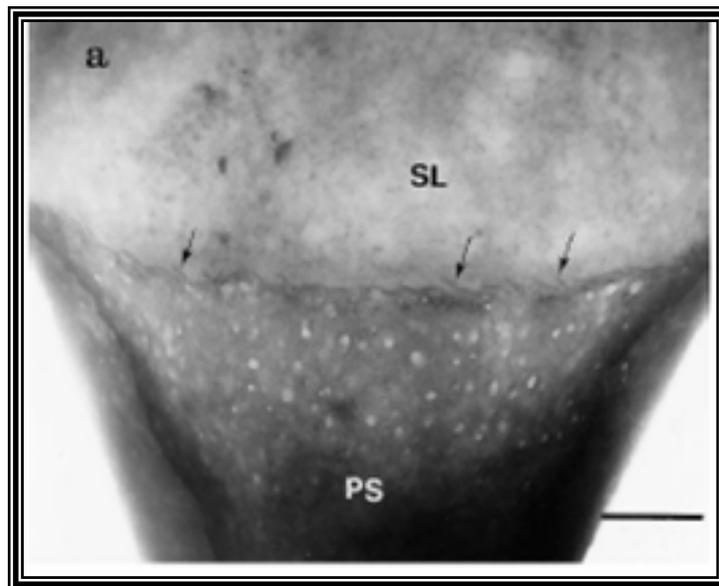


Figura 2. Morfología de la subestructura de la TP de espermatozoides de cerdo. Microscopía electrónica de preparaciones de espermatozoides con tinción negativa. Las flechas indican presencia de la subestructura de la TP. Escala de la barra 500 nm. Tomado de *Journal of Structural Biology* 128, 225-236 (1999).

BIOGÉNESIS DE LA TP

Los principales constituyentes de la teca perinuclear, las proteínas nucleares no protaminicas, son sintetizadas primariamente durante la espermatogénesis, coincidiendo con el periodo de la transformación nuclear. El material nuclear aparece primero en la espermatide temprana entre el gránulo acrosomal en formación y la envoltura nuclear (ver Fig. 3). Durante la espermiogenesis la estructura se extiende periféricamente sobre el polo anterior, justo al frente del acrosoma en formación. Posteriormente el espacio subacrosomal se ensancha más, permitiendo la deposición de material adicional y la extensión del material perinuclear en la región postacrosomal. El otro componente de la teca perinuclear, la lámina densa postacrosomal aparece primero en la espermatide en elongación, al tiempo que el material perinuclear se extiende en la región postacrosomal (Bellvé y O'Brien, 1983).

Adicionalmente en el cobayo se ha reportado que la sTP se encuentra ausente en los espermatozoides 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 cola del epidídimo y del conducto deferente. Además, se ha observado que la sTP se conserva en los espermatozoides capacitados, pero no en los que sufren reacción acrosomal (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

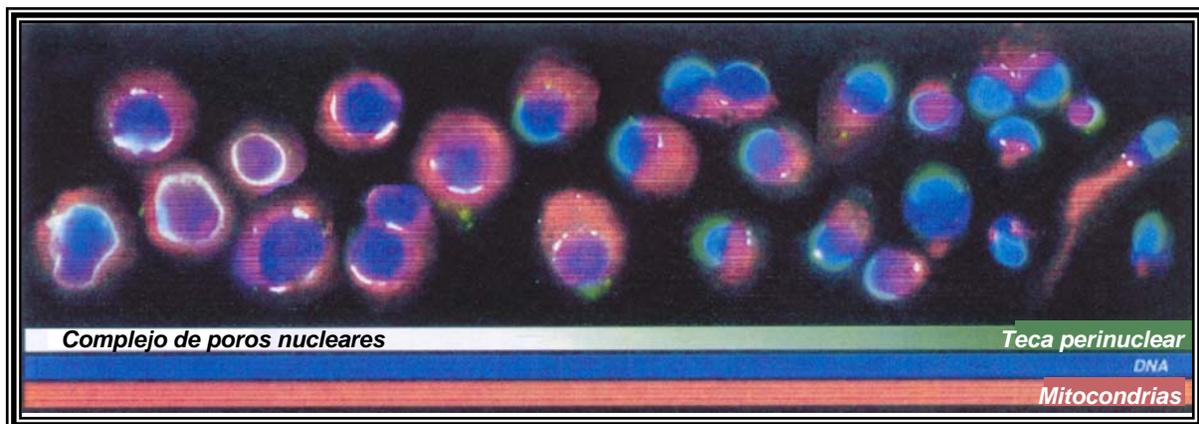


Figura 3. Microscopia confocal del ensamblaje de las proteínas de la teca perinuclear (en verde) durante la espermiogenesis. Tomado de Human Reproduction vol.14, no. 9 pp. 2301-2312 (1999).

COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA TP

Un grupo de proteínas diferentes, por su insolubilidad en dodecil sulfato de sodio (SDS), que requieren para su aislamiento una extracción diferencial, conforman a la TP del espermatozoide del bovino. Dicho grupo está compuesto por 6 proteínas principales de 15, 25, 28, 32, 36 y 60-kDa (Oko y Maravei, 1994; Sutovski *et al.*, 1997).

Varios de los péptidos más prominentes de la TP ya han sido secuenciados e involucrados en varios procesos espermáticos. Por su función se pueden distinguir por lo menos 3 clases de proteínas en la TP: estructurales, histónicas y proteínas de señalización.

Las proteínas estructurales del espermatozoide maduro, son en su totalidad específicas de los espermatozoides y con un carácter muy básicas ($PI > 10$) e incluyen a la calicina (von Bulow *et al.*, 1995), cilicina I y II (Hess *et al.*, 1993,1995). Estas últimas son una clase nueva de proteínas que se unen a actina. (Rousseux- Prevost, 2003). En la especie porcina a la cilicina II se le ha localizado en la región postacrosomal.

La calicina, una proteína de 60-kD, ha sido identificada en la hoja postacrosomal de los espermatozoides estudiados. Tiene tres unidades repetidas consecutivas, llamadas elementos Kelch, los cuales fueron descritos en la proteína Kelch de 74-kDa de *Drosophila* en donde se encontró se asocian a los puentes intracelulares ricos en actina que conectan al ovocito con la célula madre (Lecuyer *et al.*, 2000).

Las proteínas relacionadas con actina Arp-T1 y Arp-T2 fueron recientemente descritas en la TP de la región postacrosomal (Heid *et al.*, 2002). Al igual CP β -3 y CP α -3, que se unen al extremo barbado de los filamentos de actina.

Proteínas histónicas también han sido identificadas en la región subacrosomal de la TP, en estas se incluye la variante histónica H2B, designada anteriormente como PT15 (Tovich y Oko, 2001).

Otra proteína la PERF 15, relacionada con la superfamilia de proteínas de anclaje de lípidos, se encuentra principalmente en la región subacrosomal de la TP (Sutovski *et al.*, 2003).

Adicionalmente, moléculas de señalización como el factor de transcripción Stat 4 y dos proteínas de la vía de señalización de la familia Src de tirosina cinasas (PT32 y c-Yes), han sido detectadas en la TP (Herrada y Wolgemuth, 1997).

Otras proteínas llamadas tecinas (Mr 70,000, 50,000 y 48,000) han sido localizadas en toda la teca perinuclear. La teca perinuclear también contiene un grupo de proteínas referidas como banda multipéptica (**PMB**) (Dadoune, 2003).

De las proteínas citoesqueleticas conocidas, la **actina** ha sido detectada en la TP de todos los espermatozoides de mamíferos estudiados. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios sobre su localización y estado de agregación, aún no se ha llegado a un consenso acerca de la relación que existe entre las formas monomérica (actina-G) y polimérica (actina-F) de la actina en el espermatozoide. Se ha reportado que la actina-F se encuentra presente en las espermátides, asociada a la región subacrosomal, pero con el desarrollo del espermatozoide esta poza de actina se despolimeriza (Howes *et al.*, 2001). Algunos autores reportan que en los espermatozoides maduros solo existe la forma monomérica (Flaherty *et al.*, 1988); mientras que otros han encontrado actina polimérica en espermatozoides maduros de algunas especies de mamíferos (Sexena *et al.*, 1986; Peterson *et al.*, 1990; Moreno-Fierros *et al.*, 1992; Howes *et al.*, 2001). Castellani-Ceresa *et al.*, (1992) mediante pruebas inmunocitoquímicas, demostraron la presencia de la actina-F en el segmento ecuatorial y en la región postacrosomal de espermatozoides de cerdo.

En adición, a las proteínas básicas específicas del espermatozoide, se ha reportado que proteínas de unión actina son componentes de la TP.

La espectrina ha sido detectada en la cara citoplásmica más externa de la región postacrosomal, incluyendo la lámina postacrosomal.

La isoforma Dp71f (un miembro de la familia de las distrofinas) ha sido identificada en hoja postacrosomal y la β -distrobrevina otro miembro de la familia ha sido detectada en la región subacrosomal.

También, se ha establecido firmemente que la calmodulina es un componente integral de la TP del espermatozoide. La proteína ha sido reportada por algunos autores en la región post-acrosomal mientras que otros la reportan ya sea en la región subacrosomal o sobre toda la TP. Otra proteína la p30, de unión a calmodulina ha sido localizada en la TP (Leclerc y Goulpi, 2000).

FUNCIONES DE LA TP

La TP parece jugar papeles relevantes en muchos de los procesos que ocurren durante todos los cambios bioquímicos y morfológicos que el espermatozoide sufre durante su diferenciación. Además conforme la TP madura en el epidídimo adquiere más resistencia la cual puede ser necesaria para proteger al genoma espermático durante el tránsito del gameto a través del aparato genital.

La espermatogénesis de los mamíferos es un programa de diferenciación que conduce a la producción del gameto masculino, el espermatozoide. Durante el desarrollo de la espermatide a espermatozoide, toman lugar cambios de forma muy drásticos. Como ya se mencionó, el principal elemento citoesquelético específico de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos es la TP. Basados en la composición proteica de la TP esta parece tener un papel en la estructuración de la cabeza espermática (por ejemplo en la elongación del acrosoma sobre el núcleo) y estar involucrada en la asociación estable entre la membrana nuclear y la MAI o la MP. Consistente con estas sugerencias la TP aparece tempranamente en la espermiogénesis estrechamente asociadas con el acrosoma y la membrana nuclear. Además, fallas en la diferenciación de la TP han sido asociadas con espermatozoides deficientes de acrosoma (espermatozoides de cabeza redonda).

Longo et al., 1987, han sugerido que las proteínas de la TP contribuyen a la reducción de la cabeza espermática en formación y a la compresión del citoplasma residual en una red densamente entrelazada.

Las proteínas de la TP podrían contribuir a la asociación núcleo-acrosoma al proporcionar una clase de cemento intramembranoso. Un interesante rasgo de las proteínas de la TP está relacionado con las interacciones proteína-proteína, las cuales podrían jugar un papel en la formación de la red citoesquelética y del cemento intermembranoso para la asociación núcleo-acrosoma. Así, proteínas como la actina y la espectrina que tiene una función estructural podrían ayudar a mantener la forma característica del espermatozoide (Juárez-Mosqueda, 2000)

La membrana plasmática espermática posee propiedades de superficie únicas y está organizada en cinco principales dominios, tres de ellos reconocidos en la cabeza: el segmento anterior y ecuatorial del acrosoma, y la región postacrosomal. Se ha demostrado que existen rearrreglos particulares de las partículas intramembranas durante la capacitación y la reacción acrosomal, las cuales se relocalizan en diferentes dominios. Moléculas de señalización y receptores de superficie implicados en la fertilización y desarrollo están anclados en la membrana plasmática espermática. Normalmente, el espermatozoide fertilizante, (célula capacitada y con reacción acrosomal) muestra un nuevo dominio de MP en la región ecuatorial de acrosoma, el cual será reconocido por la MP del huevo para unirse y fusionarse durante la fertilización. Como fue mencionado, el posicionamiento y la motilidad de las proteínas transmembranales son controlados por uniones entre el citoesqueleto y la membrana plasmática, por lo que el citoesqueleto juega un papel crítico en la estabilización de la membrana y en el mantenimiento funcional de los dominios de la misma, en una gran variedad de tipos celulares. En este contexto existen, dos posibles implicaciones para las proteínas de la TP. La primera, existen proteínas localizadas en la capa periacrosomal externa entre la MAE y la MP a nivel del segmento ecuatorial del acrosoma, estas proteínas podrían servir para estabilizar las membranas (la MAE y la MP) y los componentes intramembranosos en la región ecuatorial. La estabilización podría prevenir que estas membranas sufrieran una vesiculización durante la reacción acrosomal; después de este proceso la región ecuatorial permanece intacta y

además ancla moléculas de señalización y receptores en este nuevo dominio de la membrana plasmática implicados en el reconocimiento y fusión con la MP del ovocito. Segundo, la MP de la región postacrosomal espermática también ha sido implicada en el proceso de fertilización y su estabilidad es similar a la de la MP que cubre la región ecuatorial. En esta zona de la TP las distrofinas y la actina están presentes; en las células de otros tejidos ambas proteínas han sido consideradas estar relacionadas con el mantenimiento y funcionalidad de la membrana plasmática (Mújica *et al.*, 2003).

Adicionalmente, durante la incorporación del espermatozoide al citoplasma del ovocito, las microvellosidades parecen unirse a la TP para la incorporación del mismo (Sutovski *et al.*, 2003). Posteriormente la membrana acrosomal interna y la hoja subacrosomal TP son engullidos de manera similar a la fagocitosis y englobado con la membrana plasmática del ovocito, creando una estructura semejante a la vacuola endocítica.

Después de la fusión espermatozoide-ovocito, antes que cualquier otra estructura espermática la hoja postacrosomal de la TP queda expuesta al citoplasma del ovocito. La remodelación del núcleo espermático depende de la actividad de factores citoplásmicos producidos por el ovocito, incluyendo las histonas y el glutatión reducido. De acuerdo con esto la TP debe ser removida del núcleo espermático previo a la inducción de la descondensación nuclear (Sutovski *et al.*, 2003). La hoja postacrosomal se dispersa rápidamente durante la entrada de la cabeza del espermatozoide, un evento probablemente relacionado con la cascada de activación del ovocito. En apoyo a esto ovocitos microinyectados con el núcleo espermático sin TP no son activados (Kimura *et al.*, 1998). Adicionalmente, Kimura *et al.*, (1998) y Perry *et al.*, (1998) ensayaron dos factores de la TP, uno obtenido por congelamiento-descongelamiento espermático y otro por la solubilización secuencial con Triton X-100 seguido por el tratamiento con SDS, estos factores fueron nombrados factores de activación I y II, ambos factores mostraron una acción sinérgica durante la activación del huevo; cuando ambos factores son inyectados dentro del ovocito, éste es activado ya que estos inducen las elevaciones transitorias de calcio, (un proceso esencial para la activación el huevo) (Swann y Parrington, 1999).

Adicionalmente, se ha reportado que cuando la TP permanece intacta el núcleo espermático no es susceptible de ser descondensado.

II. ANTECEDENTES

Efectos de la criopreservación sobre la célula espermática

El proceso de criopreservación de semen involucra diferentes cambios intracelulares que pueden originar una disminución en la sobrevivencia espermática. Durante el proceso de enfriamiento y congelación, el espermatozoide está sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico. Uno de estos cambios toma lugar intracelularmente cuando el agua en fase líquida pasa a sólida en forma de cristales. La aparición espontánea del primer núcleo de hielo o nucleación, ocurre cuando la solución llega a temperaturas entre -5 y -15 °C (Zachariassen, 2000). Este núcleo, de forma hexagonal, adhiere moléculas de agua por medio de interacciones electrostáticas promoviendo la formación de núcleos de mayor tamaño, y a medida que avanza la formación de cristales de hielo también se libera energía calorífica (calor latente) (Viveiros *et al.*, 2001), lo que produce un pico transitorio de ascenso en la temperatura que puede ser letal para la célula. El agua externa también cambia a forma sólida, lo que conlleva a que la concentración de solutos en los canales residuales no congelados aumente progresivamente, mostrándolo hiperosmótico con respecto a la célula. Esto último induce la salida del agua de la célula y su congelamiento en el medio externo, ocasionando una concentración de los solutos intracelulares. Si la deshidratación celular es excesiva, la osmolaridad podría ser muy alta por lo que no se permitiría a la membrana plasmática recuperar su forma en el proceso de descongelación (Mazur, 1980). Por otra parte, la congelación intracelular es letal para la célula dependiendo particularmente del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo formados en el citoplasma. Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos, sin embargo, estos pueden unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización (Holt, 2000). Este proceso es promovido por una inapropiada velocidad de descongelación, la cual debe corresponder con la velocidad de congelamiento empleada (Mizukami *et al.*, 1999); sin embargo, los procesos de recristalización pueden suceder aún durante la congelación, favorecidos por las regiones no congeladas que permiten interactuar a los cristales de hielo ya formados.

Además, el tamaño de los cristales de hielo formados durante la congelación está directamente relacionado con la velocidad de enfriamiento y el grado de hidratación intracelular. En el caso de los embriones, cuando éstos son enfriados rápidamente de

-30 a -40 °C, seguido por inmersión en nitrógeno líquido (NL), es necesario un protocolo rápido de descongelamiento de 200-500 °C/min para prevenir la fusión de los pequeños cristales de hielo que formarían grandes cristales. Cuando la velocidad lenta de enfriamiento se continúa por debajo de -60 °C, son necesarias velocidades de descongelamiento lentas menores de 25 °C/min, con el fin de prevenir el choque osmótico debido a la alta deshidratación celular. El daño celular por choque osmótico resulta como consecuencia del flujo rápido de líquidos extracelulares hacia el interior (Mizukami *et al.*, 1999).

Adicionalmente, cuando las células son enfriadas lentamente, la deshidratación puede avanzar hasta lograr el punto de equilibrio osmótico. Como es sabido la deshidratación conduce al aumento en la osmolaridad de las células, exponiéndolas a un largo y continuo incremento de la concentración de solutos en la fracción no congelada externamente, lo cual puede causar el así llamado “efecto solución” (Dzuba, 2002), que hace referencia específicamente a las modificaciones de las propiedades de la solución en la cual las células están suspendidas (Mazur, 1980). Así, durante la congelación el hielo se separa de la solución acuosa durante la congelación y su proporción incrementa progresivamente a medida que decrece la temperatura.

Por todo ello, se ha propuesto que el control de la velocidad de cambio de la temperatura, la osmolaridad y la formación de cristales de hielo en el medio intra y extracelular son los aspectos más relevantes para optimizar la viabilidad celular durante el proceso de criopreservación. La velocidad de enfriamiento juega un papel importante en este sentido. Si la congelación es suficientemente lenta el equilibrio es alcanzado a través de la salida de agua, pero si la congelación es muy rápida, la célula no puede perder agua lo suficientemente rápido para alcanzar el potencial de equilibrio, congelándose intracelularmente (Mazur, 1980; Watson, 2000).

Adicional a lo anterior, se ha encontrado que las proteínas del citoesqueleto espermático por debajo de la MP, dependiendo de la temperatura, experimentan una despolimerización y/o repolimerización. Con respecto a esto último, Petrunkina *et al.*, (2004, 2005), mencionan que en la célula espermática el citoesqueleto juega un papel importante en el envío y transducción de las señales que controlan los cambios de volumen, por lo que un citoesqueleto íntegro es de vital importancia en la funcionalidad

y supervivencia del espermatozoide. Lo anterior se refleja en los rápidos cambios de volumen que sufren las células espermáticas durante el proceso de congelación.

También Watson (2000), basado en la alta sensibilidad de la membrana plasmática, propone al estrés osmótico como el factor clave en la optimización de la velocidad de enfriamiento, no por la permeabilidad al agua, sino por la tasa de desplazamiento requerida por la membrana plasmática para acomodarse al cambio de volumen, pudiendo estar relacionado con la tensión de la adhesión del citoesqueleto.

Efecto del diluyente y del crioprotector sobre el ambiente celular

Estos compuestos cumplen funciones como incrementar el volumen del eyaculado, proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura. Los diluyentes utilizados han sido formulados simulando la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de no activar la movilidad, ya que soluciones no isosmóticas conducen a cambios iónicos membranales produciendo la activación espermática.

Por otro lado, la acción de los crioprotectores puede ser clasificada en dos grupos según la permeabilidad de la membrana a los mismos. En el primer grupo se encuentran las sustancias crioprotectoras que poseen bajos pesos moleculares (Mizukami *et al.*, 1999) y que, por lo tanto, penetran al citoplasma celular (Holt, 2000), tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida y el dimetil sulfóxido (DMSO).

El segundo grupo reúne aquellas sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el alcohol polivinílico (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina.

Los crioprotectores no permeables son usados para remover osmóticamente el agua intracelular, remplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicionalmente para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Mizukami *et al.*, 1999).

Una vez que los crioprotectores ingresan al citoplasma en favor del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser superenfriado a temperaturas entre -5 y -15 °C, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la reducción en la interacción entre las moléculas de agua (Vincent *et al.*, 1998). A estos rangos de temperaturas los cristales de hielo comienzan a formarse en el medio externo.

Cuando las temperaturas descienden por debajo de estos rangos, se inicia la formación de cristales de hielo intracelular (Mizukami *et al.*, 1999). La temperatura a la cual deben ser incorporados los crioprotectores a la solución de semen y el tiempo de exposición celular, depende del grado de toxicidad del crioprotector y de su velocidad de difusión a través de la membrana plasmática (Spinel, 2002).

En medios que no contienen crioprotectores, la fracción de agua no congelada en la célula decrece a medida que disminuye la temperatura, como resultado de la deshidratación y concentración de solutos intracelulares. Si el medio contiene un crioprotector, la respuesta de la célula depende entonces de la permeabilidad de éste. Si no es permeable, aumenta la osmolaridad fuera de la célula, pero si penetra totalmente, reemplaza el agua intracelular y decrece la fracción congelada, evitando la concentración de solutos. A velocidades de congelación lentas la posibilidad de formación de cristales de hielo intracelular es poca; sin embargo, las células podrían morir por el efecto solución (Mazur, 1980).

Por lo tanto, los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de crioconservación, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado.

Mecanismo de acción de los crioprotectores sobre la célula

Los mecanismos de acción específicos de los agentes crioprotectores a nivel celular no están aún muy bien dilucidados. Por ejemplo, se ha sugerido que existe una interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática. Esta interacción podría darse entre la molécula de la cabeza polar de fosfatidilcolina o por una interacción entre el oxígeno del DMSO y el grupo fosfato

de la cabeza polar de los fosfolípidos por medio de un puente de hidrógeno con una molécula de agua (Anchordoguy, 1991). Sin embargo, durante el proceso de crioconservación no sólo es importante establecer como interactúa el crioprotector con la célula, sino que también se hace necesario determinar el efecto tóxico de éstos, que es finalmente el evento de mayor importancia a controlar durante la exposición de los espermatozoides a estas sustancias.

Aparentemente, la toxicidad del DMSO está dirigida al estado bioenergético del espermatozoide, interfiriendo con el balance entre síntesis y utilización de ATP. Frente a una deficiencia de ATP, por ejemplo durante la congelación, el control metabólico sobre los procesos celulares dependientes de iones podría verse afectado, ocasionando una inapropiada activación de fosfolipasas y proteasas y un daño celular irreversible (Holt, 2000). También ha sido postulado que los crioprotectores, como el glicerol, tienen la capacidad de modificar la bicapa lipídica por su habilidad de insertarse entre los fosfolípidos, llegando a afectar las vías de metabolismo intermedio; de igual manera se ha asociado su acción sobre el citoesqueleto y las proteínas microtubulares (Hammerstedt *et al.*, 1992).

Métodos de conservación de semen porcino

La utilización del semen porcino puede hacerse de tres formas; fresco, refrigerado y congelado. El semen fresco se obtiene y se utiliza en el mismo sitio de recolección conservándose a temperatura ambiente y utilizándose en un periodo no mayor de tres horas (Guzman, 2003).

Las otras dos son las dos formas en las que se conserva el semen; el refrigerado es el que se utiliza de forma comercial con mayor frecuencia (99% de las inseminaciones) y consiste en diluir el semen en medios de conservación que permitan la viabilidad del semen por 2, 5 y hasta 7 días mientras se mantenga entre los 15 y 16 °C (Cordova, 2001).

Por ultimo, a pesar de que es bien sabido que la congelación permite conservar el semen por tiempo indefinido, en la práctica su aplicación ha demostrado serias limitaciones al obtener bajas tasas de fertilidad (menos del 1% de las explotaciones utilizan este tipo de semen).

El semen porcino a comparación con otras especies domésticas se produce en grandes volúmenes (un verraco puede eyacular desde 150 a 500 ml), sin embargo, es muy sensible al enfriado posterior a la recolección. 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 es bien sabido que el espermatozoide sufre varios cambios al pasar por el epidídimo. La principal modificación causante de este aumento de sensibilidad es la disminución en el contenido lipídico del espermatozoide ya que, la membrana de los espermatozoides eyaculados contienen una mayor relación de fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados vs saturados y un bajo contenido de colesterol (Cerolini, 2001)

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

Hipótesis del criodaño

Los protocolos de crioconservación producen un número potencial de daños sobre las células, ocasionados ya sea por el choque térmico, el estrés tóxico y osmótico (originado por la exposición a los crioprotectores), la formación y disolución de cristales de hielo en el ambiente intra y extracelular (Watson, 2000).

A través de los años, varias teorías han sido propuestas para explicar el daño causado por el proceso de crioconservación. Lovelock (1953) atribuye el daño como resultado de una alta concentración de solutos en el fluido extracelular, causado por la formación de cristales de hielo fuera de la solución.

Quinn (1985), propuso una teoría de la ruptura de la membrana basada en la transición de fase termo trópica de los lípidos. De acuerdo con esta teoría, la sobrevivencia depende del tiempo permitido para que ocurra el evento de separación de fases durante la congelación. Si este no ocurre se pueden crear orificios en la membrana por fallas en el agrupamiento de los lípidos durante la descongelación. Muldrew y McGann (1990), proponen otra teoría, en la cual la ruptura de la membrana sería causada por la fricción del agua al pasar rápidamente a través de ella, excediendo así la capacidad de la

membrana de conducirla. Por otra parte, Watson (1995), menciona que algunas enzimas termodependientes podrían estar participando en la pérdida de la asimetría membranal, asociada con los cambios de temperatura sufridos durante la congelación-descongelación.

Por su parte, Meryman (1974) ha atribuido el daño a la contracción de la célula por debajo del volumen mínimo tolerable.

Martínez (2003), en un estudio sobre congelación de espermatozoides de bovino encontró cambios estructurales en la teca perinuclear cercano 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 dañada menor será el número de espermatozoides vivos.

Así mismo, Arancibia-Salinas *et al.*, (2005) valoraron la subestructura de espermatozoides descongelados de cerdo, encontrando un porcentaje significativo ($P < 0.0001$) de teca perinuclear (subestructuras) alterada, con una diferencia porcentual de 35.6% de espermatozoides con subestructura dañada en comparación con el semen fresco.

De acuerdo con los antecedentes mencionados queda claro que la criopreservación provoca alteraciones en las estructuras espermáticas entre ellas, al citoesqueleto, el cual hasta el momento no ha sido estudiado a fondo.

En el presente trabajo consideramos a la teca perinuclear, que es el principal elemento citoesqueleto de la cabeza espermática y que es de gran importancia establecer si el proceso de congelación-descongelación provoca alguna alteración en sus proteínas constituyentes.

III. HIPÓTESIS

Durante el proceso de congelación-descongelación las proteínas constituyentes de la TP del espermatozoide de cerdo sufren una desestabilización que las hace más susceptibles a una extracción química.

IV. OBJETIVOS

General

Caracterizar bioquímicamente a la o las proteínas mayoritarias de la TP que sean desestabilizadas por el proceso de congelación-descongelación en el espermatozoide del cerdo.

Específicos

- Extraer las proteínas de la TP del espermatozoide de cerdo a partir de semen fresco y descongelado.
- Realizar la separación proteica del extracto de la TP tanto de semen fresco como descongelado.
- Identificar por lo menos una de las proteínas desestabilizadas de la TP del semen de cerdo por inmunodetección.
- Verificar si existe una relación entre el daño estructural en la TP producido por la congelación-descongelación con las proteínas desestabilizadas de la TP.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Cloruro de sodio, trizma base, metanol, formaldehído en solución (38%), azida de sodio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de potasio dibasico y dextrosa, fueron obtenidos de J.T. Baker, (Edo. Mex.). De Sigma Chemical (Missouri, EUA.) fueron adquiridos: glutaraldehido, ditioneitol (DTT), Triton X-100, glicina, glicerol, duodecil sulfato de sodio (SDS); acrilamida, *bis*-acrilamida, persulfato de amonio (PSA), TEMED, 2-mercaptoetanol y los marcadores de bajo peso molecular de Bio-Rad (California, EUA.). El cocktail de inhibidores de proteasas Complete™ de Roche. La leche descremada Svelty, de Nestlé (Veracruz, México).

Anticuerpos

El anticuerpo primario monoclonal anti-actina y el anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), fue donado por el Dr. José Manuel Hernández H. del Departamento de Biología Celular de CINVESTAV-IPN. El anticuerpo monoclonal anti-calmodulina fue donado por la Dra. Adela Mújica, del CINVESTAV-IPN y el anticuerpo monoclonal anti-distrobrevina fue donado por el Dr. Enrique O. Hernández, del CINVESTAV-IPN.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SEMINALES Y PROCEDIMIENTOS

Los eyaculados (solo fracción rica) fueron obtenidos por la técnica de la mano enguantada y se depositaron en un termo previamente atemperado a 38 °C; previo a esto último se separó la fracción gelatinosa a través de una gasa estéril. Se utilizaron únicamente verracos sexualmente activos de las razas comerciales Yorkshire, Pietrain y Duroc, de un centro de inseminación ubicado en el estado de México. Una vez obtenidas las muestras se midió el volumen y se diluyó en una proporción 1:4 con el medio comercial de larga duración IMV USA870XT-R y se transportó en un recipiente hermético, a una temperatura de 20-23 °C, al laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM para su procesamiento.

De cada verraco se obtuvieron dos eyaculados, los cuales fueron divididos en dos fracciones, la primera se utilizó como control (semen fresco) y la segunda se procesó para su congelación, haciendo un total de 36 muestras.

Evaluación del semen

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

La concentración espermática se estimó empleando una cámara de Neubauer, para ello, en 1 ml de Triton X-100 al 0.1% en PBS se adicionaron 50µl de semen, homogenizándose gentilmente. El conteo se realizó en cinco recuadros y se aplicó la siguiente ecuación para obtener el total de espermatozoides: factor de dilución (21) por el número de células contadas por 10,000 (dimensión de la cámara) x 5 (número de cuadros contados).

La motilidad progresiva se evaluó en alícuotas de semen observadas con el objetivo de 32x en un microscopio de luz, marca Carl Zeiss.

La evaluación de las anomalías morfológicas (gota citoplasmática, cola enrollada, cabezas sueltas, flagelos sueltos, bicéfalos, macrocéfalos) se realizó durante el conteo celular.

Se utilizaron únicamente eyaculados con una motilidad superior al 80% y un porcentaje de morfoanomalias no mayor a 15%.

Congelación de semen

Para el congelamiento de las muestras, el plasma seminal y el diluyente de transporte fueron eliminados, para ello las muestras fueron lavadas mediante su centrifugación a 800Xg durante 10 minutos y la pastilla fue resuspendida en solución salina (NaCl, 154 mM).

El semen fue procesado de acuerdo con el método descrito por Westendorf *et al.*, (1975) y modificado por Bwanga *et al.*, (1990). Una vez lavadas las muestras la concentración se ajustó a 6×10^9 espermatozoides/ml con el diluyente A o de refrigeración (dextrosa 11%,

yema de huevo 20%; en agua destilada) y se dejaron estabilizar a 16 °C durante 3 horas. Posteriormente se descendió gradualmente la temperatura hasta 4 °C (90 minutos).

Una vez que las muestras fueron equilibradas a 4 °C en el diluyente A se procedió a adicionar el diluyente B o de congelación (dextrosa 11%, yema de huevo 20% y glicerol 6% en agua destilada) en una relación 1:1, quedando una concentración espermática final de 6×10^8 /ml. La adición del diluyente B se realizó de manera gradual 5, 10, 15, 20% del volumen total, con intervalos de 10 minutos entre cada adición.

Finalmente las muestras fueron envasadas en pajillas tipo francés (0.5 ml), se sellaron con plastilina no tóxica. Las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido a 4 cm de distancia para alcanzar una temperatura entre -130 a -150 °C, durante 10 minutos y posteriormente fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C y almacenadas hasta su uso.

Descongelación

La descongelación del semen se realizó introduciendo las pajillas en baño María a 39 °C durante 30 segundos y se dejaron estabilizar durante 30 minutos para ser procesadas posteriormente. Para eliminar el diluyente de congelación las muestras se lavaron 5 veces con Betsville Thawing Solution (BTS), los lavados se realizaron por centrifugación (a $800 \times g$ /10 minutos) en una centrífuga clínica. A las muestras se les realizó la evaluación de motilidad progresiva.

Los procedimientos que se describen a continuación se realizaron tanto a muestras frescas como descongeladas.

Decapitado de los espermatozoides

Para el decapitado de espermatozoides, se implementó un método basado en lo descrito por Si y Okuno (1999) y modificado por nosotros. Todo el procedimiento se realizó a 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas 40µl/ml. Tanto muestras frescas como descongeladas fueron lavadas en solución salina fisiológica (NaCl, 154mM) y resuspendida a una concentración de 10×10^6 . El decapitado de espermatozoides se realizó empleando perlas de vidrio $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma, México) en una relación 3:1; es decir en un tubo de ensayo se colocaron 3 cm de perlas y sobre ellos se colocó 1 ml de la suspensión espermática. Las muestras fueron homogenizadas en un vortex durante 2 minutos (Si y Okuno, 1999).

Posteriormente el sobrenadante conteniendo cabezas y flagelos fue recuperado y se pasó a través de una membrana de Nylon con un tamaño de poro de 11 μm (Millipore) utilizando para ello como soporte un filtro para colectar embriones. Con este paso se recuperaron solo las cabezas. Las cabezas recuperadas se centrifugaron a 2400Xg durante 10 min, en una centrífuga clínica, el sobrenadante fue descartado, la pastillas fue resuspendida en SSF. Para la evaluación del porcentaje de cabezas recuperadas una alícuota de las cabezas resuspendidas se colocó en un porta objetos y se evaluaron con el objetivo 32X al microscopio de luz. La concentración de las cabezas espermáticas fue determinada empleando una cámara de Neubauer y la concentración se ajusto a 35×10^6 . Las muestras fueron centrifugadas a 2400Xg durante 10 minutos y resuspendidas en PBS. Con este método se aseguro el 95% de purificación de las cabezas espermáticas (ver figura. 4).

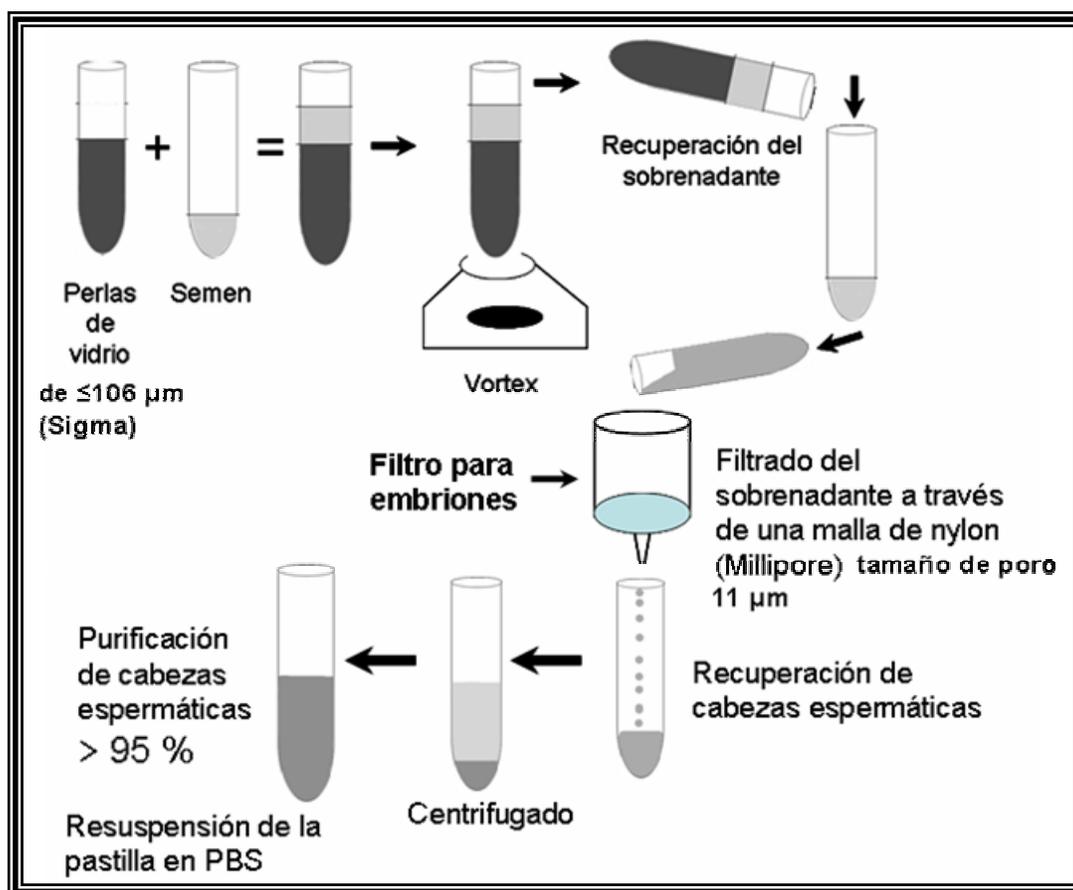


Figura 4. Esquema del método de decapitado de espermatozoides de cerdo. Método por el cual se logra la purificación de más del 95 % de las cabezas espermáticas utilizando perlas de vidrio $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma) y una membrana de nylon con un tamaño de poro de 11 μm (Millipore).

Exposición de la teca perinuclear (TP)

Para exponer la TP de las cabezas espermáticas se utilizó el detergente neutro Brij 36-T (Juárez-Mosqueda, 2000). Para ello las cabezas espermáticas fueron lavadas por centrifugación-resuspensión en solución salina y resuspendidos en la misma a la concentración de 35×10^6 células/ml. Enseguida a las muestras se les añadió Brij 36-T (0.65% concentración final) y se incubaron 10 segundos a temperatura ambiente. Después del tratamiento con Brij, los espermatozoides fueron fijados con solución de Karnowsky (Karnowsky, 1965) y se procesaron para su observación al microscopio electrónico.

Las cabezas tratadas con Brij se denominaran indistintamente cabezas Brij o cabezas con teca expuesta.

Extracción de la TP

La extracción de la TP se hizo tratando las cabezas espermáticas con la TP expuesta (150×10^6 células/ml) nuevamente con el detergente neutro Brij 36-T (0.65% concentración final) y DTT (3.75 mM concentración final) durante 40 segundos. Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 2400 g durante 5 minutos en una centrífuga clínica, el sobrenadante fue recuperado y colocado en un tubo que contenía acetona fría (v/v), para precipitar las proteínas. La pastilla obtenida fue fijada con solución de Karnowski a su volumen original y procesada para su observación al microscopio electrónico. Después de 12-18 horas a -20°C las proteínas precipitadas en acetona fría fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE).

Microscopía electrónica

Las muestras fueron fijadas con solución de Karnowsky por 20 minutos a temperatura ambiente después de este tiempo las células fueron colectadas por centrifugación a 1000 g por 3 min en una centrifuga clínica, se lavaron por el mismo método dos veces en PBS, dos veces en agua desionizada y se resuspendieron en esta última en su volumen inicial. Una gota de la suspensión espermática fue colocada en rejillas de cobre de 200 mesh, cubiertas con membranas de soporte colodión-carbón y se esperó por 10 minutos a retirar el exceso de muestra. Las muestras fueron teñidas durante 2 min, sobre una gota de ácido fosfotúngstico al 0.2% en solución acuosa. Las muestras fueron observadas en un

microscopio electrónico de transmisión Zeiss M9 perteneciente al Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM.

Cuantificación proteica por el método de Lowry

Para realizar esta técnica se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A

Na ₂ CO ₃	10g
Na OH	2g
Tartrato de Na-K	0.134g
Agua bidestilada	500 ml

Solución B

Cu SO ₄ 5H ₂ O (sulfato cúprico)	0.5g
H ₂ O bidestilada	100 ml

Solución C (Preparar fresca)

50 partes de A + 1 parte de B

Reactivo Folin-Cicalteaus (Merck)

Diluido 1:1 con agua bidestilada

Solución patrón BSA

Albúmina serica bovina (BSA) 1mg
disuelto en 1 ml de agua bidestilada

La curva de titulación de BSA utilizada fue la siguiente:

Concentracion de BSA	Solución patrón BSA	H ₂ O bidestilada
0 µg	0 µl	200 µl
5 µg	10µl	190 µl
10 µg	20µl	180 µl
20 µg	40 µl	160 µl
30 µg	60 µl	140 µl
40 µg	80 µl	120 µl
50 µg	100 µl	100 µl

Para determinar la concentración proteica, se colocaron 10 µl del extracto de la TP en un tubo de vidrio y se completó a un volumen de 200 µl con agua destilada, enseguida se agregó 1 ml de solución C, se agitó suavemente y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 100 µl de reactivo de Folin y se dejó

incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Finalmente se hizo la lectura en un espectrofotometro a 660 nm (Lowry *et al.*, 1951).

Electroforesis SDS-PAGE y Western-blotting de los extractos proteicos de la TP

Para la electroforesis, las proteínas de la TP precipitadas con acetona (ver arriba) se centrifugaron (3100 g) y las pastillas se solubilizaron en 50 µl de amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 6.8, glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.00005%) y se hirvieron a 100 °C por 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% aplicando una corriente de 100 volts constantes durante 2 horas (Laemmli, 1970); se usaron marcadores de bajo peso molecular para referencia y análisis del corrimiento. Después de la electroforesis las proteínas se tiñeron con plata (Oakley, 1980, Morrisey, 1981) o se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Biotrace NT, Bio-Rad) a 300 milliamperes (mAmp) durante 90 minutos en un sistema de tanque (Protean III, Bio-Rad) a 4 °C. Para comprobar la transferencia de las proteínas se tiño el papel de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau-S al 0.5% en ácido acético al 1% durante 10 minutos con agitación suave (Towbin y col., 1979).

Inmunodetección de actina, calmodulina y distrobrevina en papel de nitrocelulosa

Las muestras transferidas a papel de nitrocelulosa fueron inmuno-detectadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-actina, diluido 1:500, anti-calmodulina, diluido 3:500 y anti-distrobrevina, diluido 1:100. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo marcado con HRP, dirigido contra el anticuerpo primario. Como solución de bloqueo y diluyente de los anticuerpos se utilizó leche descremada al 5% en Tween-20 al 0.05% en PBS. Las incubaciones con la solución de bloqueo, el anticuerpo primario y secundario, fueron de 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó con el kit de quimioluminiscencia (Amersham) en película radiográfica.

Inmunofluorescencia indirecta mediante microscopia confocal (actina, calmodulina y distrobrevina).

Para la microscopia confocal se emplearon preparaciones enteras de espermatozoides permeabilizados. Una alícuota de 30×10^6 células espermáticas fueron colocadas en

portaobjetos cubiertos con Poly L-Lysina durante 20 minutos a temperatura ambiente, los portaobjetos fueron colocados en un vaso de Koplín conteniendo formaldehído al 3.7% en PBS durante 20 minutos para la fijación de la muestra. Enseguida las muestras fueron lavadas en PBS 5 veces y las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1% en PBS durante 15 minutos y se lavaron nuevamente con PBS 5 veces. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario apropiado, en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente, transcurrido este periodo se lavó 15 veces con PBS y se enjuagó con agua destilada, posteriormente se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con FITC. Finalmente se montaron las laminillas utilizando el medio Gelvatol y se observaron en un microscopio confocal (Bio Rad modelo MRC 600, Watford, Inglaterra, compuesto de una doble fuente de láser Kriptón-Argón con una fuente de emisión de 586 DF10). Se realizaron 5 cortes ópticos de 0.2 μm de espesor cada uno y se observaron a 63x aumentos en la Unidad de Microscopía del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

VI. RESULTADOS

Aislamiento de las cabezas espermáticas

El método descrito por Si y Okuno (1999), originalmente empleado para el aislamiento de los flagelos de hámster, fue modificado para obtener las cabezas del espermatozoide de cerdo. En la Fig. 5 se muestra que con las modificaciones efectuadas se logró una purificación mayor del 95 % de cabezas. La observación ultraestructural de las cabezas obtenidas reveló que la membrana plasmática se daña por este tipo de método; las cabezas presentaban cierto desprendimiento de la membrana plasmática, esto debido probablemente a la fricción que se generó entre las perlas de vidrio y la célula (Fig. 6). Sin embargo, las demás estructuras de la cabeza se conservaron intactas, incluyendo entre estas a la TP.



Figura 5. Microfotografía del decapitado de los espermatozoides con perlas de vidrio y filtrado a través de las membranas de nylon, cabezas recuperadas (>95%). 100x al microscopio de contraste de fases.

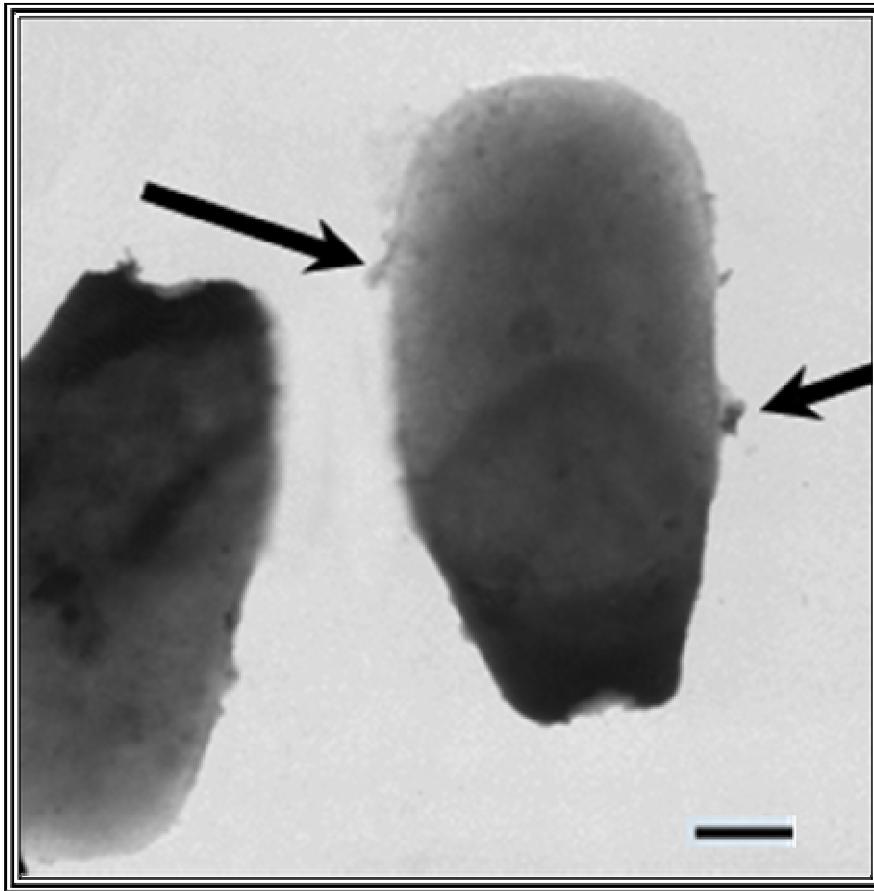


Figura 6. Microscopía Electrónica de cabezas espermáticas después del proceso de decapitado con perlas de vidrio. Las flechas indican el desprendimiento de membrana plasmática, debido a la fricción producida entre las perlas y la célula. Barra 1.1 μm .

Exposición de la TP

Las observaciones al MET de las cabezas de semen fresco tratadas con Brij 36-T reveló que las membranas de la cabeza incluyendo la plasmática, acrosomales y nuclear fueron solubilizadas dejando la TP expuesta. Durante las observaciones ultraestructurales la subestructura de la TP fue tomada como un marcador morfológico de la integridad de la misma, esta se encontró rodeando la cabeza espermática en la parte apical de la región postacrosomal de la TP y con un arreglo continuo en forma de grecas (Fig. 7). Adicionalmente, la región subacrosomal mostró una apariencia más electrolúcida mientras que en la región postacrosomal o cáliz esta fue electrodensa (Fig. 7). Además en el caso de las cabezas provenientes de espermatozoides congelados-descongelados se observaron subestructuras con cambios ultraestructurales, lo cual consideramos como una alteración o

daño morfológico en la TP ocasionado por la criopreservación. En este tipo de muestras se observaron subestructuras con grietas discontinuas y cabezas sin la subestructura (Fig. 8).

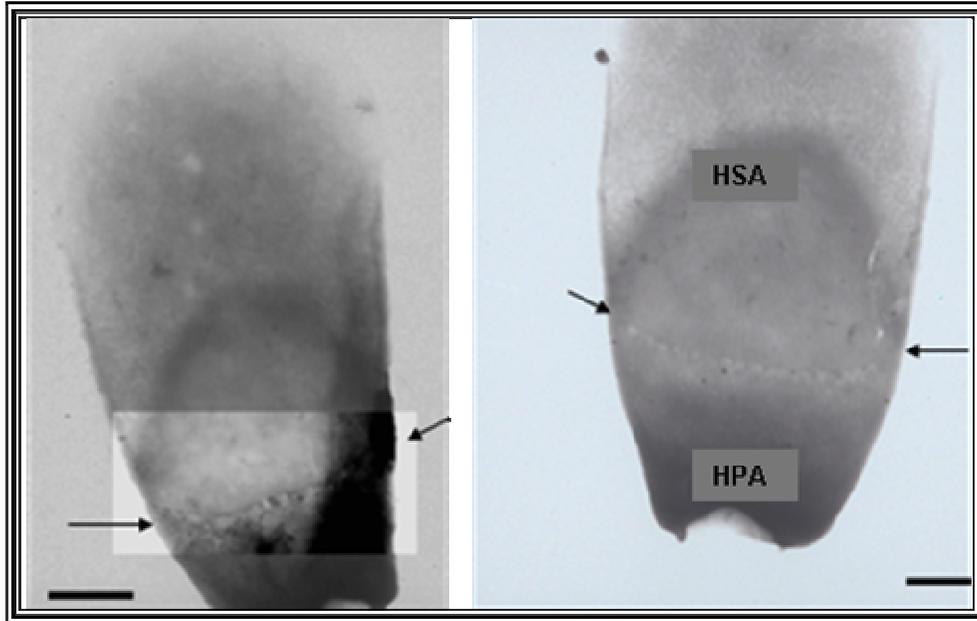


Figura 7. Microscopía electrónica de cabezas espermáticas de semen fresco con TP expuesta. Las flechas indican la detección e integridad de la subestructura de la TP. Hoja subacrosomal electroiluminada (HSA) y hoja postacrosomal electrodensa (HPA). Barra 1.1 μm

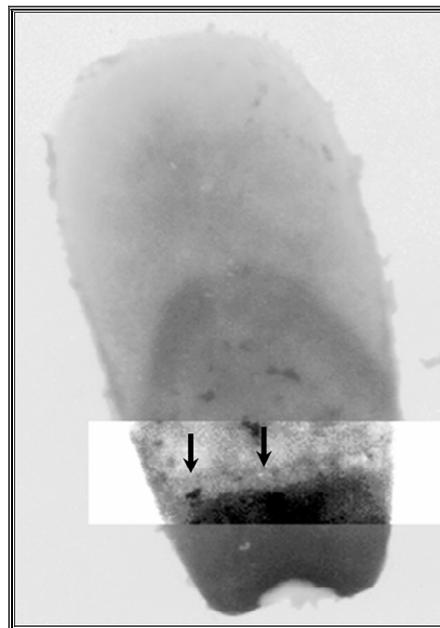


Figura 8. Microscopía electrónica de una cabeza espermática de semen descongelado con TP expuesta. Las flechas indican el daño a la subestructura de la TP observándose interrupciones en su continuidad (integridad). Barra 1.1 μm .

Extracción de la TP

Por medio de la microscopia electrónica se evaluó el proceso de extracción de la teca perinuclear, observándose restos de teca perinuclear en las cabezas espermáticas de semen fresco (ver Fig. 9), mientras que en el caso de las cabezas de semen descongelado la extracción de las proteínas de la teca perinuclear se logró de manera total observándose los núcleos totalmente desnudos (ver Fig. 10).

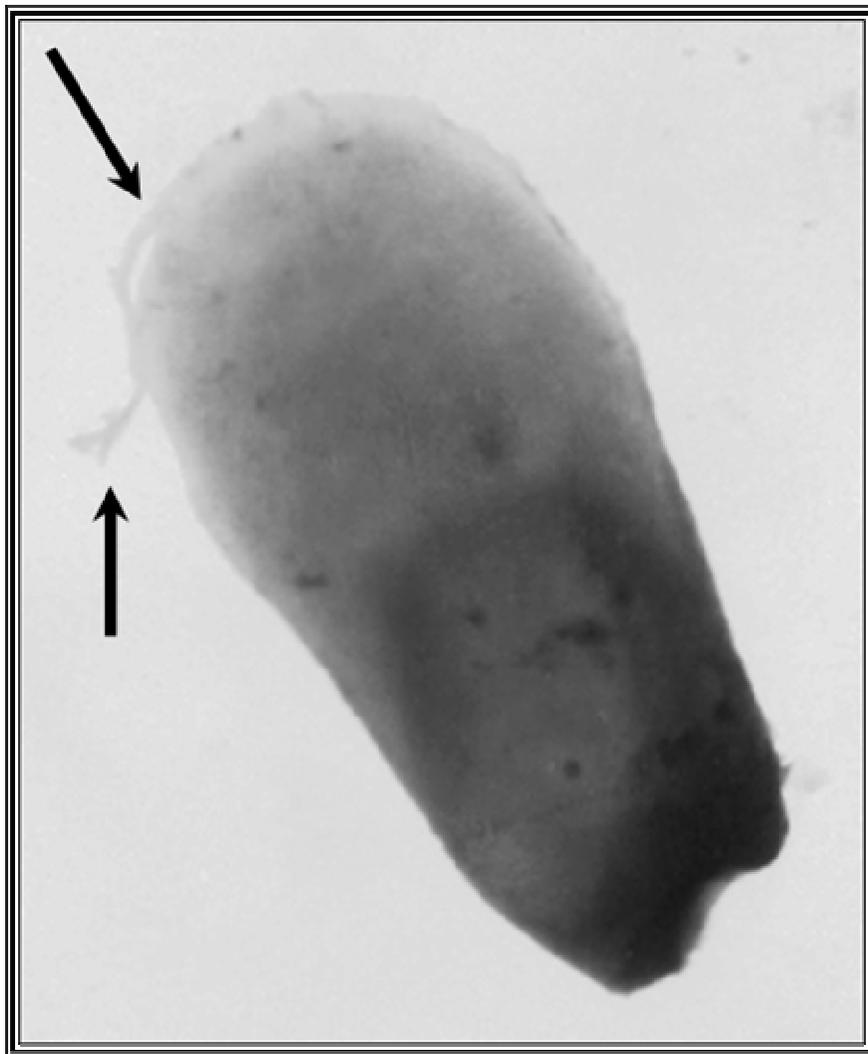


Figura 9. Microscopia electrónica de una cabeza espermática de semen fresco tratado para la extracción de la teca perinuclear. Las flechas señalan restos de teca desprendiéndose de la cabeza. Barra 1.1 μm .



Figura 10. Microscopia electrónica de cabezas espermáticas de semen descongelado mostrando la extracción total de la teca perinuclear. La flecha indica al núcleo desnudo sin teca perinuclear. Las cabezas de flecha muestran la ausencia total de la subestructura de la teca perinuclear. Hoja subacrosomal (HSA) y hoja postacrosomal (HPA). Barra 1.1 μm .

Concentración de proteínas de la TP

Para conocer la concentración de las proteínas extraídas de la TP se empleó el método de Lowry (1951). Las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 1. Como se puede observar, el análisis estadístico de las concentraciones mostró una diferencia estadística

($P < 0.005$) entre el semen fresco $0.552 (\pm 0.0921)$ y descongelado $2.123 (\pm 0.463)$ (ver tabla 1), siendo mayor la concentración de proteína en los espermatozoides descongelados.

Tabla 1. Concentración proteica en los extractos de TP obtenidos de cabezas espermáticas provenientes de semen fresco y descongelado.

Semen	Concentración Proteica $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$
FRESCO ($n=18$)	0.552 (± 0.0921) ^a
DESCONGELADO ($n=18$)	2.123 (± 0.463) ^b

Literales diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Electroforesis SDS-PAGE y Western-blot de los extractos proteicos de la TP

Las proteínas extraídas de la TP de semen fresco y congelado-descongelado fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). El patrón proteico en las muestras provenientes de semen fresco reveló la presencia de 3 bandas proteicas mayoritarias, las cuales se encontraron entre un peso molecular relativo de 45 - 66.2-kDa, y seis minoritarias en el rango 14.4 - 45-kDa de peso molecular relativo. El patrón obtenido en las muestras de semen congelado-descongelado aunque fue similar al obtenido en el semen fresco, consistentemente presentó una mayor intensidad en la tinción de las bandas, siendo esto más marcado para la banda proteica mayoritaria de 45-kDa y para la de 55-kDa (Fig. 11). Además, en este tipo de muestras aparecieron dos bandas (17 y 97-kDa de peso molecular relativo) que no se apreciaron en el semen fresco.

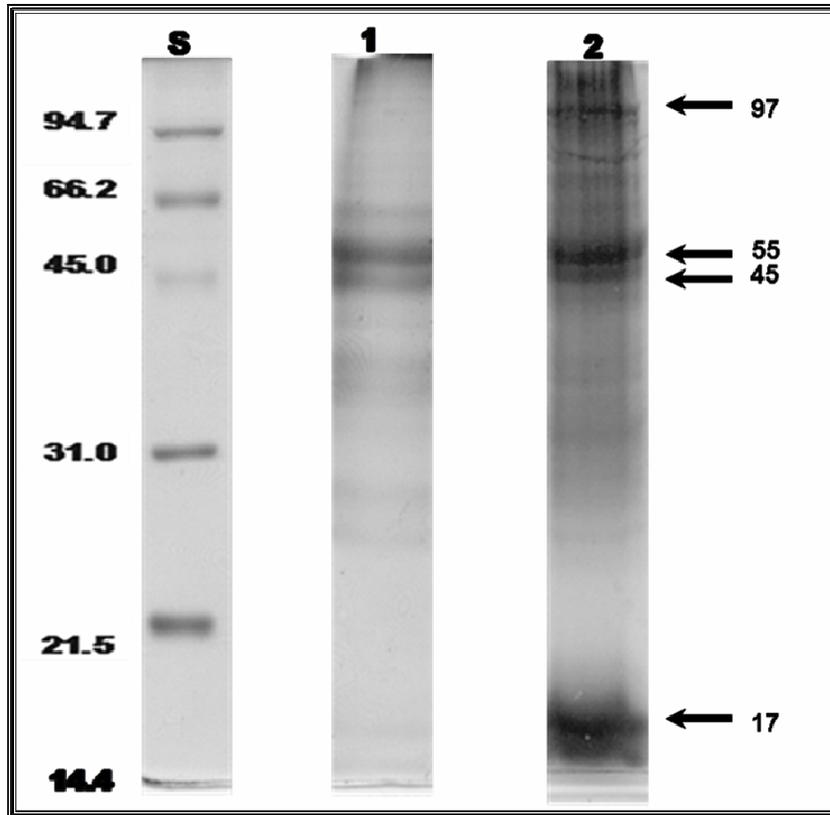


Figura 11. SDS-PAGE al 12% de las proteínas extraídas de la TP de cabezas espermáticas de semen fresco y descongelado. Marcadores de peso molecular estándar (S), TP de espermatozoides frescos (1) y descongelados (2). Las flechas indican las bandas proteicas diferentes entre ambos tipos de muestra.

Inmunodetección de actina, calmodulina y distrobrevina en papel de nitrocelulosa (Western blot)

Para identificar si la proteína con el peso molecular relativo de 45-kDa era actina se usaron anticuerpos específicos contra ésta proteína. El análisis por Western Blot de los extractos de la TP confirmaron que la actina es un componente de la TP de la cabeza espermática tanto para las muestras frescas como para las congeladas-descongeladas (Fig. 12), adicionalmente se pudo observar una marca por arriba de los 31 kDa posiblemente como resultado de la degradación de actina en las muestras descongeladas.

Para detectar si la distrobrevina forma parte de las proteínas de la TP del espermatozoide cerdo se utilizó el anticuerpo específico contra esta proteína. La distrobrevina no se detectó por esta técnica (datos no mostrados).

Para identificar si la banda que apareció en los espermatozoides descongelados correspondía por su peso molecular a calmodulina se utilizaron anticuerpos específicos contra esta proteína. La calmodulina no se detectó por esta técnica (datos no mostrados).

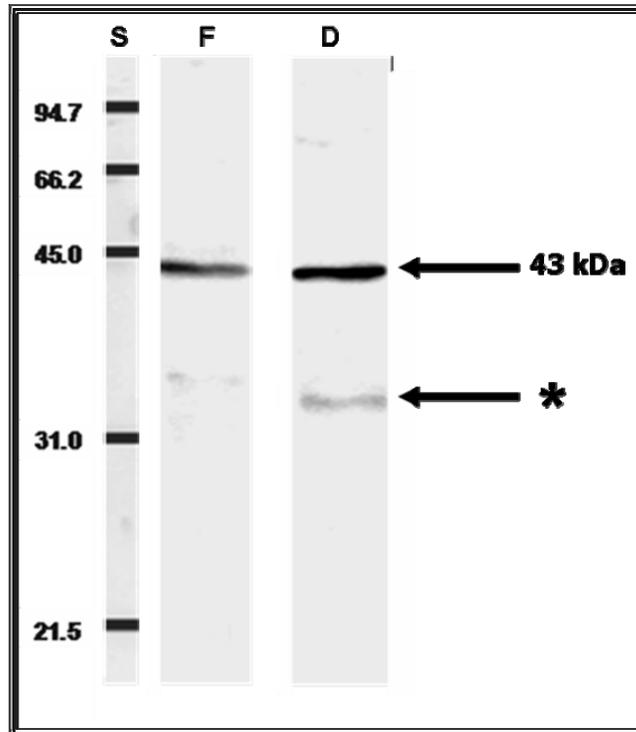


Figura 12. Inmunodetección de actina de los extractos proteicos de la TP mediante Western blot. Marcadores de peso molecular estándar (S). Espermatozoides frescos (F); espermatozoides descongelados (D); la flecha superior indica la presencia de actina detectada en el peso molecular relativo de 43 kDa. La flecha con el asterisco indica la presencia de proteína probablemente resultado de la degradación de actina siendo más intensa en las muestras descongeladas.

Inmuno-fluorescencia Indirecta para la localización de la actina, calmodulina y distrobrevina.

La microscopia confocal reveló que la actina se localiza en la toda la teca perinuclear excepto en la región ecuatorial del acrosoma de los espermatozoides frescos (Fig. 13). La marca para actina también fue positiva en las muestras congeladas-descongeladas (Fig. 14), sin embargo, la actina se localiza en la región del segmento ecuatorial y postacrosomal de la TP. Adicionalmente se localizó actina en todo el flagelo.

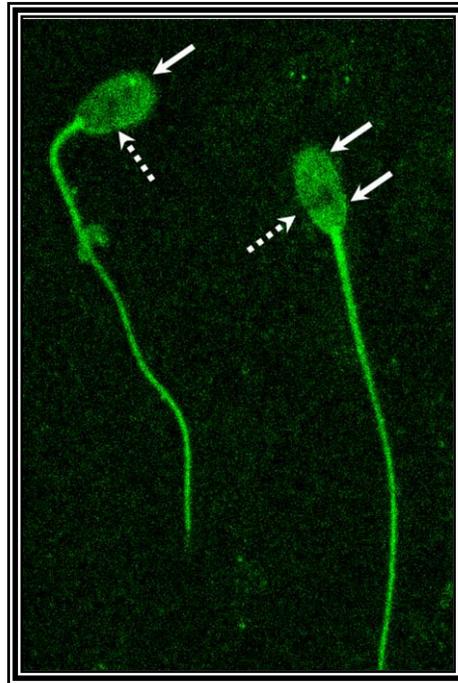


Figura 13. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de actina en espermatozoides frescos. Las flechas continuas indican la presencia de actina en la región subacrosomal y postacrosomal. Las flechas punteadas muestran la ausencia de actina en la región ecuatorial de la cabeza espermática. Imágenes a 600x.

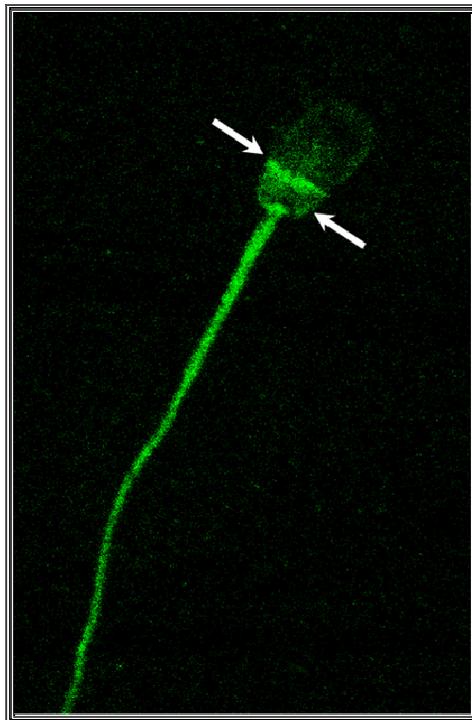


Figura 14. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de actina en espermatozoides descongelados. Las flechas continuas indican la presencia de actina en la región ecuatorial y postacrosomal de la cabeza espermática. Imágenes a 600x.

Por su parte la inmunodetección para distrobrevina, reveló una ligera fluorescencia en la región postacrosomal de la TP en las muestras de espermatozoides frescos (Fig. 15), así como una ligera fluorescencia en el flagelo. En las muestras congeladas-descongeladas no se observó tinción en ninguna región de la TP (Fig. 16), Sin embargo, la fluorescencia en el flagelo es más notoria.

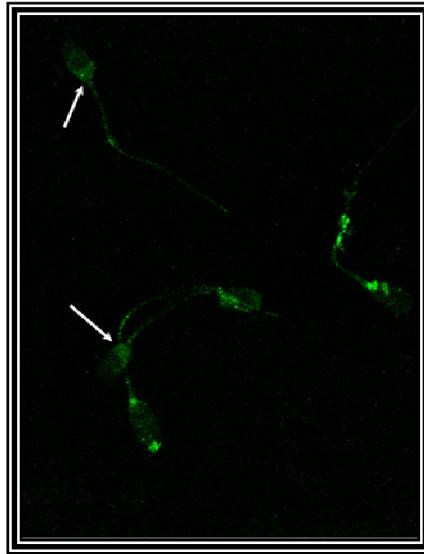


Figura 15. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de distrobrevina en espermatozoides frescos. Las flechas continuas indican la presencia de actina en la región postacrosomal de la cabeza espermática. Imágenes a 600x.

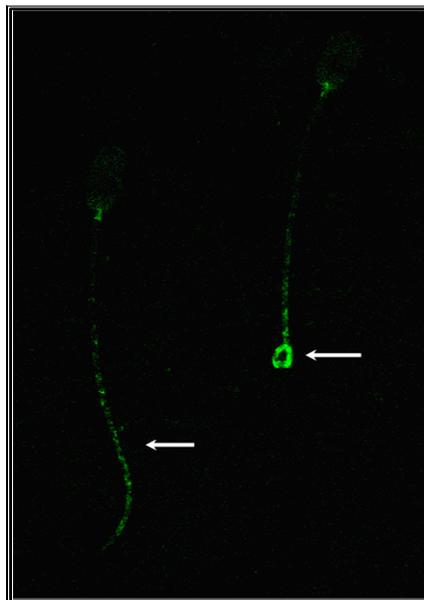


Figura 16. Fotografía de microscopia confocal, mostrando la inmunodetección de distrobrevina en espermatozoides descongelados. Las flechas continuas indican la presencia de distrobrevina en el flagelo. Imágenes a 600x.

La microscopia confocal de los espermatozoides incubados con el anticuerpo anti-calmodulina fue negativa con esta técnica al igual que lo sucedido con el Western blotting.

VII. DISCUSIÓN

La teca perinuclear es el principal elemento citoesqueletico de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos. En este trabajo encontramos que durante la congelación-descongelación las proteínas constituyentes de la TP sufren una desestabilización, ello debido a que las proteínas de los espermatozoides descongelados fueron más susceptibles a la extracción. En apoyo de la desestabilización de las proteínas de la TP por el proceso de criopreservación se presentó la extracción diferencial de la TP, observándose que en las cabezas espermáticas de semen fresco la extracción fue incompleta quedando remanentes de teca perinuclear, mientras que para el caso de las muestras de semen congelado-descongelado la extracción fue total quedando los núcleos espermáticos desnudos. Debido a ello la cantidad de proteína obtenida de la TP de cabezas espermáticas de semen fresco fue (0.552 μg) menor a la obtenida en semen congelado-descongelado (2.123 μg). Estos datos refuerzan lo observado en las evaluaciones de microscopía electrónica donde como se mencionó anteriormente que en las cabezas espermáticas de semen descongelado se extrajo por completo la TP.

Los resultados de las observaciones realizadas a la TP mediante microscopia electrónica en las cabezas espermáticas de semen fresco y congelado-descongelado, concuerdan con lo reportado por Gutiérrez-Pérez (2006) y Arancibia-Salinas *et al.*, (2005) al encontrarse un aumento en subestructuras de la TP alteradas posterior a la descongelación. Así mismo, Martínez (2003) reporta la pérdida de la continuidad de las grecas que forma la subestructura del espermatozoide de bovino de semen congelado-descongelado.

Los resultados de la extracción diferencial de las proteínas de la TP de las cabezas espermáticas entre el semen fresco y el descongelado coincide con los reportes de diversas investigaciones respecto a la termosensibilidad de algunas proteínas citoesqueleticas (Watson, 1995, 2000; Petrunkina, 2004, 2005). Es decir, debido a que las proteínas constituyentes de la TP están siendo alteradas o modificadas por el proceso de criopreservación, se observó una mayor concentración, así como mayor intensidad en las bandas proteicas en el semen descongelado.

Los Mrs de las bandas proteicas encontradas fueron similares a las reportadas para las proteínas que componen la TP del espermatozoide de bovino (Oko y Maravei, 1994) y

cerdo (Rousseaux-Prévost *et al.*, 2003). El rango de proteínas (17 a 97-kDa) concuerda con las reportadas en las investigaciones realizadas en espermatozoides de bovino (Sutovski *et al.*, 1997). En el rango de Mrs encontrados en este estudio se incluye a las proteínas solubles en álcalis de 25, 28, 32, 36 y 60-kDa (Oko y Maravei, 1994; Sutovski *et al.*, 1997) y actina de 43-kDa (Camatini *et al.*, 1986). Rousseaux-Prévost *et al.*, (2003) con el método de extracción utilizando Triton X-100 al 0.2% encontraron bandas proteicas en un rango que van desde los 6.5 hasta los 116-kDa. En este trabajo el rango de bandas proteicas encontrado fue desde los 17 a los 97 -kDa. Sin embargo, se debe considerar que nosotros empleamos un método de extracción diferente utilizando el detergente neutro Brij 36-T y un reductor de puentes disulfuro (DTT).

Además dentro del rango de 48 a 97-kDa se reportan las proteínas conocidas como banda multipeptídica (MBP) de 56 a 74-kDa (Longo *et al.*, 1987), calicina de 60-kDa (Oko y Maravei, 1994), cilicina I de 74-kDa y cilicina II de 53.5-kDa (Hess *et al.*, 1995). La mayor intensidad observada en las bandas proteicas en las muestras de semen congelado-descongelado podría sugerir que después del proceso de congelación las proteínas son más fáciles de extraer debido a una alteración estructural de las mismas, como lo sugiere Petrunkina *et al.*, (2003).

Las diferencias observadas entre los extractos proteicos de la TP de cabezas espermáticas de semen fresco y descongelado, podrían reflejarse en alteraciones en la funcionalidad de los espermatozoides descongelados. Mújica *et al.*, (2003) y Sutovski *et al.*, (2003) consideran que la TP podría ser un reservorio potencial de varias proteínas involucradas directamente en diversos procesos de vitales durante la fertilización, como por ejemplo la señalización, activación del huevo y la descondensación del núcleo espermático. Además, Noiles *et al.*, (1997) hacen referencia a que la permeabilidad de la membrana plasmática de espermatozoides de ratón depende principalmente del citoesqueleto.

Una de las proteínas que conforman la TP de la cabeza espermática es la actina, a la que se le ha implicado en el mantenimiento y estabilidad de los dominios funcionales de la membrana plasmática, adicionalmente es importante resaltar que esta proteína tiene la capacidad de unirse a otras proteínas de la TP (Lecuyer *et al.*, 2000) lo que le confiere la

habilidad de formar polímeros. Cabe resaltar que por el proceso de criopreservación uno de los elementos afectados fueron los microfilamentos (actina-F). Juárez-Mosqueda y Mújica (1999) mencionan que la subestructura de la TP del espermatozoide de cobayo es estabilizada por actina filamentosa (actina-F). Por lo tanto, posiblemente la desestabilización de actina provocó que la subestructura de la TP del espermatozoide de cerdo se altere o se pierda totalmente durante el proceso de criopreservación.

La presencia de actina como componente de la TP concuerda con lo reportado por Castellani-Ceresa *et al.*, (1993) quienes detectan la presencia de actina en espermatozoides de cerdo, Moreno-Fierros *et al.*, (1992) en cobayo y Howes *et al.*, (2001) en espermatozoides de bovino.

La localización de actina en la región subacrosomal, postacrosomal y a lo largo de todo el flagelo de espermatozoides frescos concuerdan con los estudios realizados por Castellani-Ceresa *et al.*, (1992), mientras que el patrón de actina observado en espermatozoides descongelados fue similar a lo reportado por Delgado-Buenrostro *et al.*, (2005) en espermatozoides de cobayo que sufren la reacción acrosomal *in vitro*. La polimerización de actina en la región ecuatorial y postacrosomal ha sido reportado que ocurre en el espermatozoide de cerdo durante la capacitación (Castellani-Ceresa *et al.*, 1992) y en cobayo durante la RA (Moreno-Fierros *et al.*, 1992). La polimerización de actina en esas regiones específicas se ha involucrado en la adquisición de la habilidad fertilizante de espermatozoides con reacción acrosomal (Castellani-Ceresa *et al.*, 1993; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

Además la remodelación de la actina en los espermatozoides congelados, formando un cinturón en la región ecuatorial, es similar a lo que describen algunos autores (Delgado-Buenrostro, 2004) cuando en los espermatozoides se produce de forma fisiológica durante la capacitación, como una remodelación de las partículas de la membrana plasmática lo que le permite al espermatozoide formar un nuevo dominio de fertilización en esta región y que le permitirá fusionarse con el óvulo. Por lo que esta característica descrita como una “Criocapitación” (Petrunkina *et al.*, 2005), posiblemente se deba a las alteraciones que sufre la TP durante este proceso, específicamente la actina.

La distrobrevina es una proteína de la familia de las distrofinas las cuales interactúan con proteínas que forman complejos proteicos debido a la unión con otras proteínas del citoesqueleto que se encargan del mantenimiento y estabilidad de los dominios funcionales de la membrana plasmática.

Mediante el uso de anticuerpos específicos contra distrobrevina, en el presente trabajo no se detectó esta proteína en los extractos proteicos de la TP de cabezas espermáticas de cerdo tanto en semen fresco como en congelado descongelado. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Hernández-González *et al.*, (2001) quienes detectaron una banda de 66-kDa por Western blot en los extractos proteicos de espermatozoides de cobayo. La diferencia en la detección de la presencia de la proteína pudo deberse al método de extracción de la TP. Sin embargo, ésta si pudo ser identificada por inmunofluorescencia en la cabeza de los espermatozoides frescos, no así en la de los descongelados, lo cual indica que esta proteína también sufre una alteración durante el proceso de congelación y que posiblemente esto se refleje en alteraciones en la membrana plasmática.

La calmodulina, se ha reportado su presencia en la TP de espermatozoides de todas las especies de mamíferos estudiadas entre ellas cobayo, conejo (Jones *et al.*, 1980), bovino (Feinberg *et al.*, 1981), rata (Lagace *et al.*, 1981) y hámster (Moore y Dedman, 1984). Esta proteína ha sido localizada en la región acrosomal y postacrosomal de la TP así como en la región proximal y distal del flagelo. En este trabajo la proteína no fue detectada en el extracto proteico de la TP de cabezas espermáticas de cerdo. Posiblemente en la TP del espermatozoide del cerdo esta proteína se encuentra en una cantidad relativamente baja por lo que con nuestro sistema no pudo ser detectada.

Estos resultados abren la posibilidad de plantear nuevas investigaciones para establecer como es la dinámica de la actina y dilucidar si la desestabilización que sufre compromete a las células espermáticas en los eventos de capacitación y reacción acrosomal en relación con la fertilización.

VIII. CONCLUSIONES

La TP del los espermatozoides congelados-descongelados fue más sensible al proceso de extracción empleado en este trabajo (Brij 36-T y DTT).

El número de bandas proteicas del extracto de la TP de espermatozoides congelados-descongelados fue mayor que el de los espermatozoides frescos.

La actina es una proteína mayoritaria de la teca perinuclear del espermatozoide del cerdo.

En el espermatozoide congelado-descongelado la actina y la distrobrevina son dos proteínas desestabilizadas por el proceso de congelación.

El daño estructural de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo producido por la congelación-descongelación posiblemente este relacionado con la desestabilización de las proteínas que la constituyen entre estas la actina y distrobrevina.

Es necesario realizar otros estudios encaminados a conocer la participación de las proteínas de la TP, de tal forma que se pueda establecer su participación en la capacidad fertilizante del espermatozoide de los mamíferos y como afecta su desestabilización dicha capacidad en el espermatozoide congelado-descongelado.

IX. LITERATURA CITADA

Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Water P. 2002. The molecular Biology of the Cell. 4th edition, Gerland Science.

Anchordoguy TJ, Mechanis-Cecchine LA, Crowe JH. and Crowe LM. 1991. Insights into the crioprotective of dimethyl sulfoxide for phospholipids bilayer. *Cryobiology* 28:467-473.

Arancibia-Salinas K., Juárez-Mosqueda ML., Hernández-González EO, Montaldo Valdenegro HH, Gutiérrez CG y Trujillo Ortega ME. Integridad de la teca perinuclear y el acrosoma en semen fresco y congelado-descongelado de cerdo. *Memorias del XLI Congreso Nacional AMVEC 2006*. pp 45.

Bellvé AR., Chandrika R., Martinova YS. and Barth AH. 1992. The Perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. *Biol. Reprod.* 47:451-465.

Bellvé AR, and O'Brien DA. 1983. The mammalian spermatozoon structure and temporal assembly. In: Hartman JF (ed), *Mechanisms and Control of Fertilization* Academic Press, New York. Pp.55-137.

Bwanga CO., De Braganca M., Einarsson S. and Rodriguez- Martinez H. 1990. Freezing of boar semen in mini and maxi straws. *J Vet Med A.* 37:651-658.

Camatini M, Aneli G, and Casale A. 1986. Identification of actin in boar spermatids and spermatozoa by immunoelectron microscopy. *European Journal of Cell Biology* 42: 311-318.

Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, Barboni B, and Brivio MF. 1993. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Molecular Reproduction and Development* 36: 203-211.

Castellani-Ceresa L, Brivio MF, and Radaelli G. 1992. F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 33: 99-107.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, and Gliozzi TM. 2001. changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121:395-401.

Coleman TR, Fishkind DJ, Mooseker MS, and Morrow JS. Functional diversity among spectrin isoforms. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1989; 12:225-247.

Cordova IA, Pérez JF, Lleo B, García A, Martin Rillo S. 2001. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 an 5 ml straws. *Reprod Dom Anim* 36: 199-202.

Dadoue Jean-Pierre. 2003. Expresión of mammalian spermatozoa nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique* 61: 56-75.

Delgado-Buenrostro NL. Presencia y posible participación de proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina (Arp2, Arp3, WASp, Profilinas I y II y tres GTPasas pequeñas RhoA, RhoB y Cdc42) en los espermatozoides del cobayo con reacción acrosomal. Tesis nivel Doctorado en Ciencias. CINVESTAV-IPN, México 2004

Delgado-Buenrostro NL, Hernández-Gonzalez EO, Segura-Nieto M, and Mújica A. 2005. Actin polimerization in the ecuatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the

acrosome reaction is regulated by G proteins. *Molecular Reproduction and Development* 70: 198-210.

Dzuba BB, Kopeika EF. 2002. Relationship between the changes in cellular volume of fish spermatozoa and their cryoresistance. *CryoLetters*; 23:353-360.

Ervasti JM and Campbell PK. Dystrophin and the membrane skeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 1993; 5:82-87.

Flaherty SP, Winfrey VP and Olson GE. 1988. Localization of actin in mammalian spermatozoa: a comparison of eight species. *The Anatomical Record* 216: 504-515.

Guthrie HD. and Welch GR. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63: 396-410.

Gutiérrez-Pérez O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis nivel Maestría en Ciencias FMVZ-UNAM, México 2006.

Guzmán A. Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen porcino. Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Nayarit, México 2003.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.

Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*; 29:26-38.

Heid H, Figge U, Winter S, Kuhn C, Zimbelmann R, and Franke WW. 2002. Novel actin related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* 279: 177-187.

Hernandez-Gonzalez EO, Martinez-Rojas D, Mornet D, Rendon A, and Mújica A. 2001. Comparative distribution of short dystrophin superfamily products in various guinea pig spermatozoa domains. *European Journal of Cell Biology* 80: 792-798.

Herrada G, and Wolgemuth DJ. 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J Cell Sci* 110: 1543-1553.

Hess H, Heid H, and Franke WW. 1993. Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol* 122: 1043-1052.

Hess H, Heid H, Zimbelmann R, and Franke WW. 1995. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp Cell Res* 218:174-182.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*; 62:3-22.

Howes EA, Hurst SM and Jones R. 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Journal of Andrology* 22: 62-72.

Johnson LA., Weitze KF., Fisher P. and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Animal. Reprod. Sci.* 62:143-172.

Juárez-Mosqueda ML., and Mújica A. 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology* 128: 225-236.

Juárez-Mosqueda ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear dl espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de maestría. CINVESTAV-IPN., México 2000.

Karnowski MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electrón microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137^a.

Kimura Y., Yanagimachi R., Kuretake S., Bortkiewicz H., Perry ACF. and Yanagimachi H. 1998. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm Perinuclear material. *Boil. Reprod.* 58: 1407-1417.

Koehler JK. 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *Journal Ultrastruct. Res.* 33: 598-614.

Leclerc P, and Goupil S. 2000. Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Biol Reprod* 62:1875-1881.

Lecuyer C., Dacheux J.L., Hermand E., Mazeman E., Rosseaux J., and Rosseaux- Prévost R. 2000. Actin-Binding properties and colocalization whit actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biology of Reproduction* 63: 1801-1810.

Longo FJ ., Krohne G., And Franke W. W. 1987. Basic proteins of the Perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell. Biol.* 105:1105-1120.

Lovelock JE. 1953. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*; 10:414-426.

Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. & Randall, RS. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Malhotra SK., and Shnitka. The cytoskeleton-Microtubules and Microfilaments. Chapter 2, *Structural Biology. Fundamentals of Medical Cell Biology.* University of Wisconsin, Madison,. JAI PRESS INC. 1991; volume 2:77-115.

Martínez OC. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide de bovino. Tesis de nivel Licenciatura. FMVZ-UNAM. México 2003.

Mazur P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, whit emphasis on mammalian ova and embryos. En: 9th International congress on animal reproduction and artificial insemination. Madrid, España, p. 99-114.

Meryman HT. 1974. Freezing injury and its prevention in living cells. *Ann Rev Biophysics*; 3:341-363.

- Mizukami A, Carrell DT, Peterson CM. 1999. Cryopreservation of embryos. En: Encyclopedia of reproduction. vol 1. Utah: Academic Press; p. 765-772.
- Moore K. Embriología Clínica. 2ª impresión, Interamericana. México. 1985.
- Moreno-Fierros L, Hernandez EO, Salgado ZO, and Mújica A. 1992. F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* 33: 172-181.
- Morrissey JH. 1981. Silver stain for proteins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensivity. *Annal. Biochem.* 117:307-310.
- Mújica A., Navarro G.F., Hemández GE., and Juárez-Mosqueda ML. 2003. Perinuclear Theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique* 61: 76-87.
- Muldrew K, and McGann LE. 1990. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J*; 57:525-532.
- Nogales E., Wolf SG., and Downing KH. 1998. Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.
- Noiles EE, Bailey JL, and Storey BT. 1997. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0°C. *Cryobiology* 32:220-238.
- Oakley BR, Kirsch DR, and Morris NR. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- Oko R., and Maravei D. 1994. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biology of Reproduction* 50: 1000-1014.
- Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. 2004. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction* 127:105-115.
- Petrunkina AM, Gröpper B, Töpfer-Petersen E, Günzel-Apel AR. 2005. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 63:1390-1406.
- Prevost-Rousseaux R, Lecuyer C, Drobecq H, Sergheraert C, Dacheux JL, and Rousseaux J. 2003. Characterization of boar sperm cytoskeletal cylicin II as an actin-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303: 182-189.
- Quinn PJA. 1985. Lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membrane. *Cryobiology*; 22:128-146.
- Sanchez-Gutierrez M. Participación de la actina-F en la formación del dominio de la membrana plasmática, del espermatozoide del cobayo, involucrado en el reconocimiento y fusión con la membrana plasmática del ovulo durante la fertilización. Tesis de nivel Doctorado. CINVESTAV-IPN., México 2002.

Sexena N, Peterson RN, Sharif S, Sexena NK, and Russell LD. 1986. Changes in the organization of surface antigens during in vitro capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies. *Journal Reproduction Fertility* 78: 601-614.

Si y and Okuno M. 1999. Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation. *Biology of Reproduction* 61,240-246.

Skoufias DA and Scholey JM. Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 1993; 5:95-104.

Spinel C. 2002. *Biología molecular de la célula eucariótica animal*. 1 ed. Medellín (Colombia): Fondo editorial Biogénesis; p. 31-68.

Stewart M. Intermediate filament structure and assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 1993; 5:3-11.

Sutovski P., Oko R., Hewitson L., and Schatten G. 1997. The removal of the sperm Perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.* 188:75-84.

Sutovski P, Romalho-Santos J, Moreno RD, Oko R, Hewitson L, and Schatten G. 1999. on-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe Mito-Tracker and high resolution differential interference contrast microscopy. *Human Reproduction* 14:2301-2312

Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, and Oko R. 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique* 61:362-378

Tovich R, and Oko R. 2001. Immunolocalization of histones H2B and H3 in the manchete and postacrosomal sheath during spermiogenesis in bovine testis. *Mol Biol Cell* 12 (suppl):235a.

Towbin H, Staechelin T, and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

Vincent C, Pruliere G, Pajot-Augy E, Campion E, Douzou P. 1998. Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry*; 29:161-169.

Viveiros AT. 2001. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology*; 43:276-287.

von Bulow M, Heid H, Hess H, and Franke WW. 1995. Molecular nature of calicin, a major basic protein of mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp Cell Res* 219:407-413.

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*; 60-61:481-492.

Wesrtendorf P., Richter L., and Treu H. 1975. Zur tiefgefrierung von ebersperna. Laboround besamungsergebnisse mit dem hulsenberg pailletenverfahren. Dtsch tieraeztl. Wochenschr 82:261-267.

Zachariassen KE, Kristiansen E. 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. Cryobiology; 41:257-279.