



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**ESTUDIO DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE UN MEDIO DE
CONGELACIÓN A BASE DE TREHALOSA SOBRE LA VIABILIDAD DEL
ESPERMATOZOIDE DEL CABALLO**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
DANIEL FERNANDO RAMÍREZ VEGA

TUTOR
Dra. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITÉ TUTORAL
Dr. JAVIER VALENCIA MENDEZ
Dr. SALVADOR URIBE CARVAJAL





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la FMVZ de esta universidad por recibirme y por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, haciéndome crecer como profesionalista y como persona.

A mis tutores que hicieron posible este sueño que en algunos momentos parecía imposible de alcanzar, en especial a la Dra. Ma. de Lourdes Juárez Mosqueda por compartir conmigo tantos conocimientos, por su paciencia y la confianza que deposito en mi para lograr concluir este posgrado y que con tantos conocimientos y experiencias adquiridos espero nunca defraudarla gracias doctora.

Al Dr. Javier Valencia Méndez por enseñarme que la ciencia si se lleva con el trabajo de campo por transmitirme en cada momento sus experiencias y conocimientos, por sus observaciones tan acertadas y por transmitirme tanta pasión a nuestra profesión.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal por sus consejos, por transmitirme su pasión por la ciencia con esa sencillez que lo hace una persona admirable para mi, y por su observaciones puntuales a esta tesis gracias.

A todos los doctores que contribuyeron en mi formación de posgrado Gracias.

A mi amigo Oscar Gutiérrez por transmitirme tanta pasión, empeño y dedicación por tu apoyo y por tu amistad, a Dania, Juan Carlos y Salvador por su gran amistad y solidaridad, a Marta, Mariana, Daniela, y Erica gracias por ser mis incondicionales durante todo este tiempo a Elías, Alejandra, Adrián, Gilberto, Gloria, Luna, a todos gracias por su amistad.

A los Doctores: Jorge fuentes, Carlos Reyes y Carlos Juárez de grupo REI por sus enseñanzas su amistad y por su importante colaboración en la realización de este trabajo gracias.

A los departamentos de morfología y reproducción, al personal del laboratorio de morfología de la FMVZ-UNAM por todas las facilidades brindadas para realizar este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis Padres: Fernando y Elsa

Se que no existen palabras con las que pueda algún día demostrarles mi agradecimiento por todo lo que hoy soy, por su infinito amor, por su apoyo incondicional en todo momento por difícil que pareciera, por ser un gran motivo de superación en mi vida, esta tesis es para ustedes.

A mis Hermanos: Alberto y Elsa

A ustedes por ser mis amigos y confidentes durante tantos años y un ejemplo de apoyo, superación, fuerza y por hacer mas grande a nuestra familia y darle tanta felicidad, siempre vamos a estar juntos.

ÍNDICE	Página
INDICE	I
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
El espermatozoide	3
Capacitación espermática	6
Reacción acrosomal	7
Fertilización	9
Cambios durante la criopreservación	10
Sobre enfriamiento	10
Influencia de factores físicos	10
Efecto solución	11
Estrés osmótico	12
Alteraciones inducidas por la criopreservación	13
Membrana y citoesqueleto	14
Peroxidación lipídica	16
Alteraciones al DNA	17
Crioprotectores celulares	18
El glicerol	20
La trehalosa	21
Estabilización de las estructuras celulares por trehalosa	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
MATERIALES Y METODOS	25
Reactivos	25
Obtención y procesamiento de muestras	25
Evaluación de las muestras	25
Proceso de congelación	26
Congelación	27

Descongelación.....	27
Evaluación de viabilidad e integridad acrosomal por triple tinción	27
Evaluación de viabilidad mediante eosina-nigrosina	28
Evaluación de integridad acrosomal por azul de Coomassie	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
Valoración de la motilidad espermática	30
Evaluación de vitalidad por tinción eosina-nigrosina	32
Valoración de viabilidad por triple tinción.....	33
Valoración de la integridad acrosomal	35
Valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides vivos	36
Evaluación de la integridad acrosomal por tinción azul de Coomassie	37
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	42

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Diagrama del espermatozoide de caballo.....	5
Figura 2. Participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosomal en el espermatozoide de los mamífero	8
Figura 3. Hipótesis del efecto de la trehalosa sobre la estabilidad de los fosfolípidos de las membranas durante la transición de fases	23
Tabla 1. Valoración de la motilidad espermática	30
Cuadro 1. Porcentajes de motilidad total en semen fresco y descongelado con trehalosa (100mM, 500mM) y glicerol al 3.5%.....	31
Cuadro 2. Células vivas en fresco y en descongeladas bajo cuatro tratamientos diferentes.....	32
Cuadro 3. Número de espermatozoides vivos en semen fresco y en el semen congelado-descongelado bajo los tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%)	33
Cuadro 4. Comparación entre las técnicas de valoración vital mediante T pareada	34
Cuadro 5. Número de espermatozoides con acrosoma integro en semen bajo tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%)	35
Cuadro 6. Número de espermatozoides vivos con acrosoma integro bajo los tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%)	36
Cuadro 7. Número de espermatozoides con acrosoma integro en el semen fresco y en el semen congelado-descongelado en trehalosa 100mM, 500mM y glicerol al 3%, mediante la evaluación con azul de Coomassie	37

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue conocer el efecto crioprotector de un medio de congelación a base de trehalosa sobre la viabilidad e integridad estructural de los espermatozoides de caballo y compararlo contra los diluyentes comerciales a base de glicerol. Este estudio se llevo a cabo utilizando 10 eyaculados de caballos diferentes evaluando: la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal en el semen fresco y después del proceso de congelado-descongelado con los diferentes diluyentes utilizados a base de trehalosa 100mM y 500mM y a base de glicerol 3.5%. Se determino la viabilidad espermática mediante las técnicas de eosina-nigrosina, triple tinción y azul de Coomassie con la que se evaluó la integridad acrosomal. En la evaluación de viabilidad mediante la técnica de eosina-nigrosina se encontró diferencia significativa ($P < 0.5$) que favoreció al diluyente de trehalosa 100mM entre el diluyente de trehalosa 100mM contra el diluyente de glicerol 3.5%. Sin embargo. La evaluación de los resultados mediante triple tinción no arrojaron diferencia significativas entre ambos tratamientos ($P > 0.5$) en el caso de la evaluación con 500mM en ambas tinciones se encontró un decremento considerable de la viabilidad.

Con respecto a la motilidad se observo un decremento en esta con los tratamientos de 100mM y 500mM de trehalosa sin embargo al adicionar 3% de yema de huevo se observo un incremento importante en la motilidad para la concentración 100mM igualando el porcentaje de motilidad obtenido con el diluyente a base de glicerol 3.5% (28.5 ± 2.3). En el caso de la integridad acrosomal en fresco fue de 185 ± 6.84 . Aunque en las muestras evaluadas después de la criopreservación mostraron un decremento en la integridad acrosomal, se encontró un alto número de células con acrosoma intacto, estadísticamente significativo ($P < 0.05$), en las muestras congeladas con el diluyente de trehalosa 100mM (143.7 ± 6.8); no así en el caso del tratamiento con el diluyente a base de glicerol donde la integridad acrosomal disminuyó significativamente (91.5 ± 6.8 células) siendo estadísticamente similar ($P > 0.05$) a lo observado con el diluyente trehalosa 500mM (88.2 ± 6.8 células)

Palabras Clave: trehalosa, viabilidad, acrosoma, congelación, criopreservación.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the crioprotector effect in a freezing medium of trehalose on the viability and integrity of stallion sperms and compare between a commercial extenders by glicerol. In this study was used 10 eyaculates of differents stallions and was evaluate the motility, viabilty and acrosomal integrity in raw semen and after cooling use the differents extenders of trehalose 100mm and 500mm and glicerol 3.5%. The viability was determinated by esosine-nigrosine and triple strain and the acrosomal integrity was evaluated by blue of Coomassie in wich was measure the acrosomal integrity. In the evaluation of the viability with the eosin-negrosin technique, not found difference ($P < 0.5$) but was better the trehalosa 100mM diluents between trehalosa 100mM diluents and glycerol 3.5% diluents. There was no significative difference between treatments ($P > 0.5$) but in tehe evaluation with 500mM was found a considerable decrement of viability. In the motility was observed a decrement in the 100mM and 500mM treatments of trehalosa but when was put yolk egg was observed an important increment in the motility just for the 100mM concentration making the same percentage of the motility obtained in the glycerol diluents 3.5% (28.5 ± 2.3). In the case of the fresh acrosomal integrity was 185 ± 6.84 . But in the samples observed after the cryopreservation, shown a decrement in the acrosomal integrity, and was found a higher number of cells with acrosoma intact, statics more significative ($P < 0.05$), in the freezing samples with trehalosa diluent 100mM (143.7 ± 6.8); but not in the case of the treatment in the glycerol diluents where the acrosomal integrity was reduce significative (91.5 ± 6.8 células) been statics similar ($P > 0.05$) in the observed of trehalosa diluents 500mM (88.2 ± 6.8 células).

Key words: trehalosa, viability, acrosoma, freezing and cryopreservation.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen como una técnica biotecnológica junto con la inseminación artificial, han causado un gran impacto sobre la reproducción animal a nivel mundial. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado, intensificando la reproducción y el mejoramiento genético (Watson, 1995; Wevar *et al.*, 1997).

Mediante la criopreservación, es posible detener el deterioro que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo a través del tiempo potencialmente fértil. Sin embargo, se ha observado que espermatozoides descongelados aparentemente fértiles no mantienen la capacidad fecundante que tenían al momentote haber sido eyaculados debido a alteraciones celulares inducidas por la criopreservación (Storinelli *et al.*, 2005).

En 1949 los investigadores Polge y Smith en Cambridge, descubrieron los efectos crioprotectores del glicerol sobre los espermatozoides de gallo, confirmando años más tarde sus propiedades crioprotectoras al congelar exitosamente espermatozoides de toro (Foote, 2002).

Inicialmente, la técnica de congelación utilizada en bovinos fue extrapolada al caballo demostrando ser, desafortunadamente, pobre en comparación con los resultados obtenidos con los espermatozoides de bovino (Samper y Morris, 1998).

En la especie equina el primer reporte de inseminación artificial con semen congelado se realizó en 1957 por Barker y Gandier, quienes utilizaron semen obtenido de epidídimo, congelado en un diluyente que contenía 10% de glicerol (Amann y Pickett, 1987). En la actualidad ha aumentado la utilización de semen criopreservado de caballo, mejorando la crianza y la reproducción (Vyt *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005^a). Sin embargo, se ha observado que los espermatozoides del caballo son muy sensibles a este proceso. Diversos factores han sido implicados en las bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado: la metodología de congelación y descongelación, la tasa de congelación, la concentración espermática, el envasado, y la composición del diluyente (Mazur *et al.*, 1972).

Durante el proceso de congelación descongelación se pierde aproximadamente la mitad de la población inicial de los espermatozoides debido a los efectos de

la criopreservación sobre diversas estructuras celulares como: membrana (Neild *et al.*, 2003), citoesqueleto (Watson, 1995), aparato locomotor y núcleo del espermatozoide (Storinelli *et al.*, 2005). Los daños resultan en la pérdida de funciones como son la motilidad progresiva y la capacidad del espermatozoide para fertilizar al ovocito después de la criopreservación (Poomer, 2002).

Se ha postulado que el efecto dañino del proceso de criopreservación sobre el mantenimiento estructural y funcional de la membrana plasmática (MP) se debe a la eliminación de los puentes de H⁺ formados por el agua con la región polar de los fosfolípidos. El daño ocasionado a la célula se debe no sólo a los cambios en el estado físico de los fosfolípidos de la membrana sino también a la desnaturalización de proteínas sensibles al proceso de congelación (Lins *et al.*, 2004).

La trehalosa ha sido objeto de mucho interés al evitar la transición de fases de las membranas, y al estabilizar de manera importante a las proteínas. Esta habilidad de estabilizar proteínas y membranas durante la congelación y deshidratación ha sido atribuida a la formación de puentes de hidrógeno cuando el agua es removida de las proteínas y a su interacción directa con los grupos polares de las membranas (Patist y Zoerb, 2005).

Estas propiedades de la trehalosa abren la posibilidad de evaluar sus efectos durante el proceso de criopreservación sobre la viabilidad y mantenimiento de las estructuras del espermatozoide de caballo.

EL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide de caballo es una célula única con un número haploide de cromosomas (Mckinnon y Voss, 1993), altamente especializada para el almacenamiento y transporte de material genético y con una limitada capacidad de auto-reparación (Aurich, 2005).

La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso permanente de división de las células germinales o espermatogonias.

Durante la espermiogénesis ocurren una serie de eventos en el epitelio de los túbulos seminíferos controlado hormonalmente por el eje hipotálamo hipófisis-gónada, que culmina con la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras, las espermatogonias. Durante la espermiogénesis los organelos de los espermatozoides son modificados morfológica y funcionalmente con la finalidad de tener las características apropiadas de una célula somática capaz de fertilizar al ovocito (Morel, 1999).

En el espermatozoide de caballo pueden identificarse 5 regiones estructurales: cabeza, cuello, pieza media, principal y final del flagelo todas delimitadas por la membrana plasmática, siendo en promedio de $87.85 \pm 7.02 \mu\text{m}$ de largo (fig. 1) (Amman y Gram, 1993).

La membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfolípidos, colesterol, y proteínas. Los lípidos se encuentran distribuidos en una bicapa, con una región hidrofílica o polar expuesta y una región hidrofóbica localizado al interior de esta bicapa. Las proteínas se encuentran distribuidas entre los lípidos de manera integral o bien en forma periférica; algunas sirven de canales o bien como receptores. Algunas proteínas en la superficie exterior se encuentran unidas a cadenas de carbohidratos. Es sabido que la proporción de colesterol-fosfolípidos, la naturaleza de los fosfolípidos y la temperatura determinan la fluidez de la membrana, por lo que a temperatura corporal se encuentra en un estado fluido (Juhász *et al.*, 2000).

La cabeza del espermatozoide incluye al núcleo delimitado por la membrana nuclear, donde se encuentra la cromatina altamente condensada, la teca perinuclear, principal elemento citoesquelético de la cabeza (Juárez, 2000). En la región apical, se encuentra el acrosoma que es una vesícula altamente especializada que contiene enzimas necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Mckinnon y Voss, 1993).

La cabeza para su estudio, se ha dividido en tres dominios de membrana el de la región apical o subacrosomal, el de la región ecuatorial y el de la región posacrosomal.

Pieza de conexión o cuello del espermatozoide. Se extiende desde la cabeza en la base del núcleo hasta la pieza media del flagelo. En la pieza de conexión se observan las siguientes estructuras: placa basal, cuerpos laminares, el *capitulum*, las columnas segmentadas, el cuerpo basal y el axonema (Mackinnon y Voss, 1993).

Pieza media Se extiende desde la región distal de la pieza de conexión hasta el anillo de Jensen (*annulus*). En la pieza media se distinguen el axonema, la vaina mitocondrial y las fibras densas (Fawcett, 1975).

El axonema ocupa el eje central de todo el flagelo (pieza media, principal y final) y está constituido por dos microtúbulos sencillos, rodeado por nueve dobletes de microtúbulos y sus proteínas asociadas. La vaina mitocondrial que rodea al axonema se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de mitocondrias distribuidas sobre su circunferencia; éstas contienen enzimas y cofactores necesarios para la producción de ATP, que a su vez es necesario para la actividad contráctil del flagelo. Las fibras densas son estructuras citoesqueléticas dispuestas entre la vaina mitocondrial y cada uno de los microtúbulos periféricos del axonema (Alberts *et al.*, 2002).

Pieza principal es el segmento más largo del flagelo. Se extiende desde el anillo de Jensen hasta el extremo proximal de la pieza terminal, distinguiéndose las siguientes estructuras: vaina fibrosa, fibras densas, anillo de Jensen y axonema.

Pieza terminal es el segmento final y el más corto del flagelo del espermatozoide está formada por el axonema envuelto directamente por la membrana plasmática.

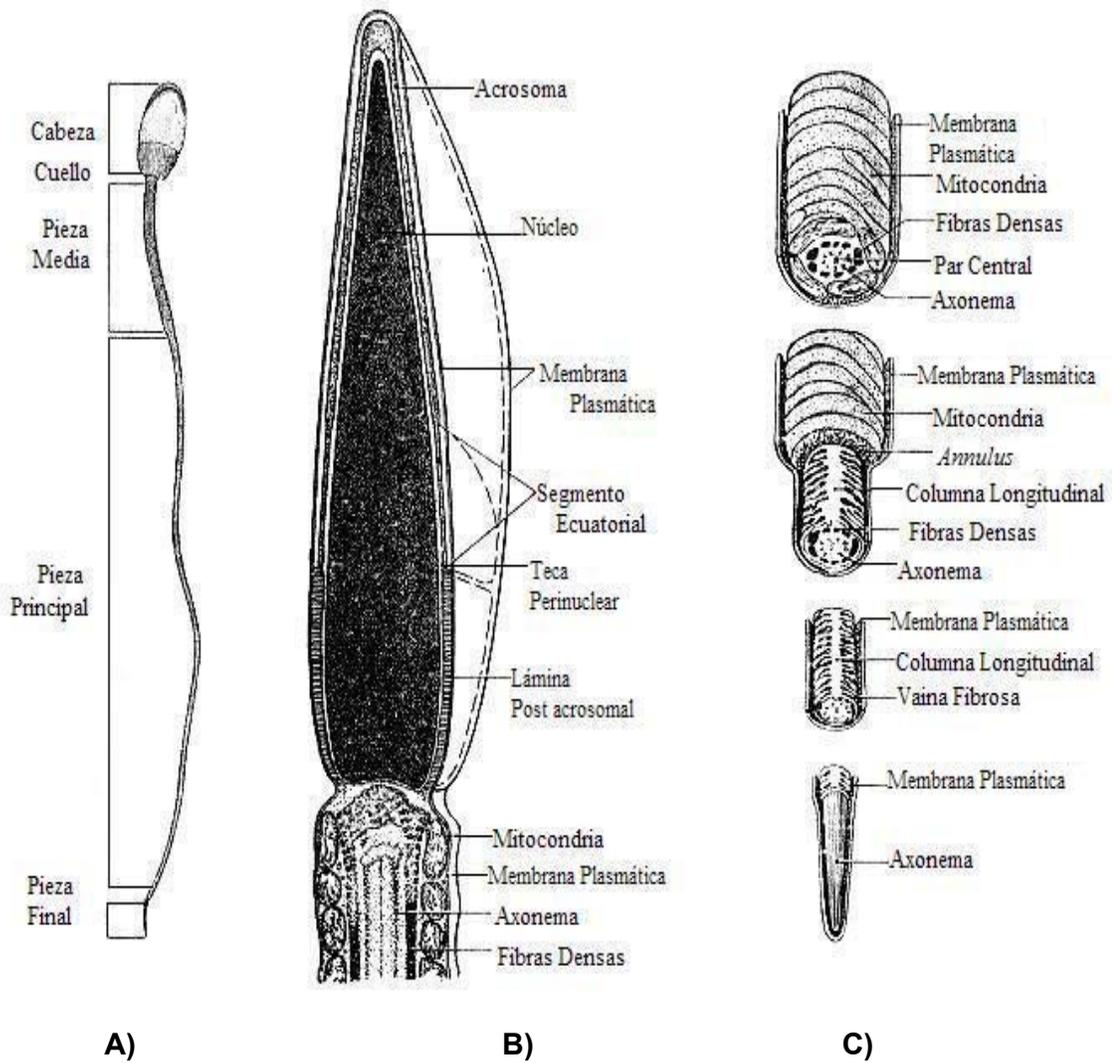


Figura 1. Diagrama del espermatozoide de caballo. A) El espermatozoide completo se encuentra cubierto por la membrana plasmática. Usualmente se encuentra dividido en 5 regiones específicas cabeza, pieza de conexión, pieza media, pieza principal y pieza terminal. B) La cabeza incluye al núcleo que almacena la información genética, el acrosoma que contiene enzimas necesarias para la fertilización y que termina en el segmento ecuatorial y finalmente la lámina postacrosomal, C) el cuello o pieza de conexión entre la cabeza y el flagelo. La longitud total es de $87.85 \pm 7.02 \mu\text{m}$ de largo (Modificado por Amann y Picket 1987; Juhász *et al.*, 2000).

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

El proceso de capacitación espermática es un requisito indispensable para que ocurra la fecundación (Peknicova *et al.*, 1994). La capacitación es un proceso dinámico, regulado por el incremento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Singh *et al.*, 1978) resultado de una serie de eventos intracelulares como consecuencia de una cascada de procesos fisiológicos consecutivos por la activación de diferentes vías de señalización dentro del tracto reproductor de la hembra (Roa, 2004). Estos cambios involucran la remoción o inactivación de factores descapacitantes en la superficie del espermatozoide, el reacomodo de proteínas estructurales y la adsorción de proteínas del aparato genital femenino (Medeiros *et al.*, 2002). Aunque todavía no se encuentra bien definido el o los mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} , existe evidencia experimental que sugiere que la albúmina sérica desempeña un papel importante en los cambios de permeabilidad de la membrana del espermatozoide durante la capacitación (Félix *et al.*, 2002). En contraposición a este efecto estimulador, se ha visto que pequeñas concentraciones de β -estradiol inhiben significativamente la actividad de los canales de Ca^{2+} , estos resultados sugieren que tanto la albúmina como el estradiol pudieran participar de manera importante en la regulación de los canales de Ca^{2+} durante el proceso de capacitación (Félix *et al.*, 2002). Algunos de los eventos que ocurren durante la capacitación son: aumento del metabolismo, hipermotilidad, incremento en la fluidez y permeabilidad de la membrana asociados a la salida de colesterol y al aumento en las concentraciones intracelulares de iones de Ca^{2+} y HCO_3^- asociado al aumento en la producción de cAMP, e hiperpolarización de la membrana dependiente del eflujo de K^+ (Harrison, 1996). Todos estos eventos son necesarios para desestabilizar la membrana y que el espermatozoide interactúe con las envolturas ovulares (estructuras extracelulares) que inducen la reacción acrosomal necesaria para la penetración del espermatozoide al ovocito (Parks *et al.*, 1987; Evans y Florman; 2002, Petrunkina *et al.*, 2005). La capacitación precede a la reacción acrosomal y es un requisito indispensable para que los espermatozoides sean capaces de realizar exitosamente la fertilización (Schembri *et al.*, 2002).

REACCIÓN ACROSOMAL

En el espermatozoide de mamíferos el acrosoma juega un importante papel durante la fertilización del huevo. Éste se origina a partir del aparato de Golgi durante la espermiogénesis (Garde *et al.*, 1992) y contiene enzimas hidrolíticas y proteolíticas como son: acrosina, proacrosina, hialuronidasa, y fosfolipasas (Peknicova *et al.*, 1994). La reacción acrosomal es entonces la continuación de los eventos ocurridos durante el proceso de capacitación en el aparato reproductor de la hembra.

Es aceptado que la capacitación y la reacción acrosomal, son eventos funcionalmente secuenciales ya que varios de los procesos de activación de señales intracelulares que ocurren durante la reacción acrosomal, fueron iniciados durante la capacitación (Haila y Tulsani., 2000).

La reacción acrosomal RA es desencadenada luego de que el espermatozoide entra en contacto con la ZP₃, una glicoproteína presente en la zona pelúcida y con la progesterona secretada por las células de la granulosa constituyentes del *cumulus*, y que es regulada por la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ intracelular (Evans y Florman, 2002).

Durante el proceso de RA, como consecuencia de la desestabilización de la MP, ésta aumenta su potencial fusogénico interaccionando con la membrana acrosomal externa (MAE) en distintos sitios conocidos como puntos de fusión, produciendo la formación de pequeñas vesículas y liberando al medio exterior las enzimas contenidas en el acrosoma que le permitirán al espermatozoide capacitado atravesar o penetrar la ZP y fusionarse con la MP del ovocito (Parks *et al.*, 1987).

Al perderse el acrosoma como consecuencia de modificaciones estructurales y fisiológicas durante la RA, queda expuesta la membrana acrosomal interna (MAI) en la región ecuatorial donde la MP se fusionará con la MAI manteniendo así la integridad del espermatozoide (Talbot y Chacón, 1981). En este proceso se expone un nuevo dominio de fertilización, esencial para la interacción de los gametos que facilitan la interacción y adhesión célula-célula (fusión) (Manandhar y Toshimori, 2001). Además, estas modificaciones estructurales provocan un cambio morfológico observándose la pérdida de la subestructura de la teca perinuclear (sTP) durante la capacitación y/o reacción acrosomal (RA) (Juárez, 2000).

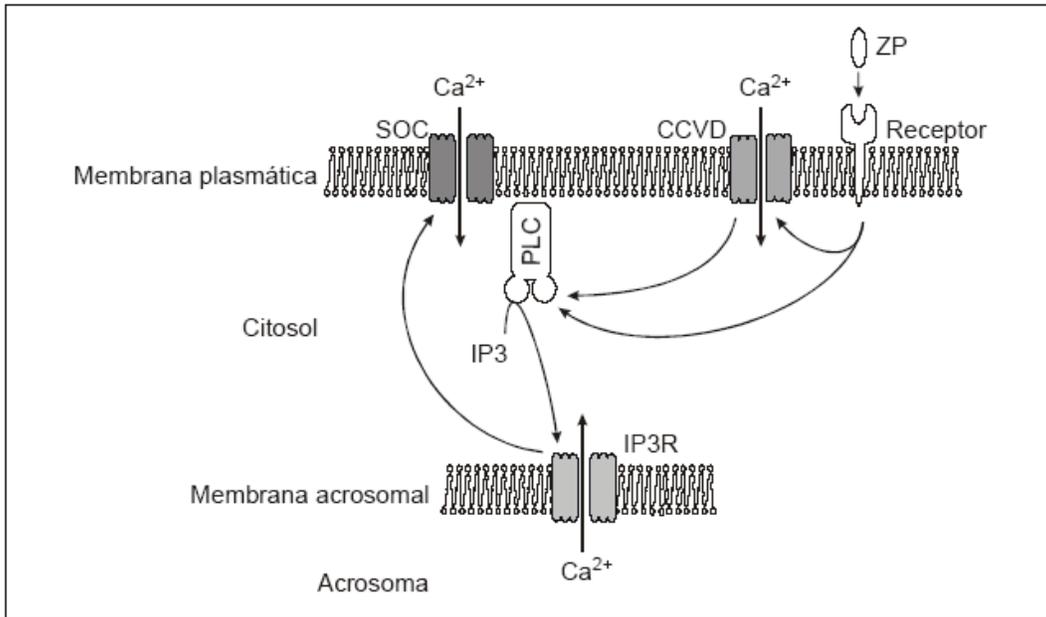


Figura 2. Participación de canales de Ca^{2+} durante la reacción acrosomal en el espermatozoide de los mamíferos. La unión de la glucoproteína de la zona pelúcida (ZP) a su receptor da como resultado: (1) Una despolarización de la membrana y un influjo subsecuente de Ca^{2+} a través de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (CCVD) y, (2) la activación de la fosfolipasa C (PLC) que conduce a la generación de inositol trifosfato (IP_3). Este segundo mensajero activa a sus receptores (IP_3R) en la membrana acrosomal, liberándose Ca^{2+} al citosol desde esta poza intracelular. El vaciamiento de este almacén provoca la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (SOC). El conjunto de estos eventos conlleva a la reacción acrosomal (Félix *et al.*, 2002).

FERTILIZACIÓN

La fertilización es definida como el proceso en el cual la célula espermática y el ovocito se unen para dar origen a la formación de un nuevo ser. Todos los eventos ocurridos durante este proceso se encuentran unidos secuencialmente (Evans y Florman, 2002). El primero de ellos, la habilidad del espermatozoide de fertilizar al ovocito, es adquirida durante el proceso de capacitación durante el tránsito a través del aparato reproductor de la hembra donde pierden factores descapacitantes como mucopolisacáridos y proteínas que son aportados por las glándulas anexas durante la eyaculación (Oliveira *et al.*, 2006). Una vez capacitado, el espermatozoide penetra las células del *cumulus* y entra en contacto con la zona pelúcida del ovocito que induce la RA.

Después de la RA queda expuesto un nuevo dominio de fertilización, como consecuencia de un reacomodo de proteínas en la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide que resulta un requisito indispensable para que pueda llevarse a cabo la interacción de las membranas de los gametos. Esta última involucra un complejo mecanismo de interacciones moleculares (Manandhar y Toshimori, 2001; Alberts., *et al* 2002). Después de que el espermatozoide penetra hacia el espacio perivitelino ocurre la adhesión célula-célula que culmina con la fusión de ambas membranas y la despolarización de la membrana plasmática del ovocito, primer mecanismo inhibitorio de la poliespermia (Evans y Florman, 2002). El incremento en las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ que ocurre después de la fusión, activa el segundo mecanismo antipoliespérmico por exocitosis de los gránulos corticales (reacción cortical) cuyo contenido modifica la conformación de la zona pelúcida evitando la fertilización de espermatozoides adicionales (Evans y Florman, 2002).

La RA junto con la elevación en las $[Ca^{2+}]_i$ se asocia a la salida del arresto meiotico del ovocito y a la expulsión del segundo cuerpo polar, dando lugar a la formación el pronúcleo femenino. La formación del pronúcleo masculino se da como consecuencia de la descondensación del material genético y la sustitución de las protaminas por histonas. Posteriormente ambos pronúcleos se fusionan y pierden sus respectivas membranas, la cromatina se condensa en cromosomas que se alinean en un solo uso mitotico y forman un solo núcleo diploide fenómeno conocido como singamia. En este momento la célula es

referida como cigoto y esta lista para sufrir la primera división mitótica resultando en la formación de dos células diploides donde finalmente se lleva a cabo el desarrollo de un organismo multicelular individual (McGeedy *et al.*, 2002).

CAMBIOS DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN

Durante la criopreservación, los espermatozoides son expuestos a daño durante el proceso de congelado-descongelado. Estos diferentes grados de daño son inducidos por distintos mecanismos en cada fase ya que los espermatozoides se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación que resultan en daño subletal a la célula, con la subsecuente reducción de la viabilidad, donde menos del 50% de los espermatozoides sobrevive a este proceso (Giraud *et al.*, 2000).

El daño durante la criopreservación ha sido atribuido a cambios drásticos en la temperatura (estrés) que llevan a la formación de cristales de hielo, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en la membrana plasmática del espermatozoide, alteraciones en la función metabólica, daño al DNA, toxicidad de los crioprotectores, y estrés osmótico (Watson, 1995).

Sobre-enfriamiento

La sensibilidad de los espermatozoides a la congelación ocurre cuando la temperatura de éstos desciende de la temperatura corporal a una temperatura cercana al punto de congelación (Medeiros *et al.*, 2002). Este fenómeno, ocurre cuando la solución acuosa enfriada lentamente alcanza temperaturas por debajo de su punto de fusión manteniéndose sin embargo en estado líquido.

Se ha propuesto que los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas (Mazur, 1984).

Influencia de factores físicos

Si bien es necesaria una velocidad de enfriamiento adecuada para evitar la congelación intracelular, las propiedades físico-químicas que rigen los eventos a los cuales se encuentra sometida una solución durante la congelación

derivan de la concentración de solutos disueltos en ella (Boiso, 2001). Es decir, el punto de congelación de la solución resulta inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila y García, 1983).

Es sabido que en el medio extracelular la formación de hielo comienza a partir de un núcleo de hielo en crecimiento y que al mismo tiempo existe agua líquida intracelular, esto debido a la barrera física que constituye la MP que detiene el crecimiento de los núcleos de hielo hacia el interior de la célula (Watson, 1995). Sin embargo, esto no garantiza la supervivencia celular. Es decir, la lesión celular crioinducida podría explicarse en función a la formación de hielo intracelular como consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada en combinación con la acción de factores físicos como el estrés osmótico; así la fuerza física aplicada por el frente de hielo en expansión ejerce presión sobre la célula a medida que crece y que resulta en la deformación de la célula, deformación que a bajas temperaturas resultaría letal (Mazur, 1984).

En otras palabras, durante el proceso de enfriamiento y congelación los espermatozoides se encuentran sometidos a cambios drásticos en su medio físico y químico. Inicialmente uno de los fenómenos de mayor relevancia es la formación del primer núcleo de hielo o nucleación entre los -5 y -10 °C (Medeiros et al., 2002). La aparición del primer núcleo ocurre por la presencia de impurezas o partículas suspendidas en la solución conocidas como nucleadores. La formación de este núcleo hexagonal comienza con la adición de moléculas de agua que promueven su crecimiento mediante interacciones electrostáticas a un núcleo de mayor tamaño (Zachariassen y Kristiansen, 2000). Por otra parte a medida que el núcleo de hielo crece, la célula libera calor (calor latente) de fusión, produciendo un aumento transitorio en la temperatura que resulta letal a la célula debido a la recrystalización cuando nuevamente la temperatura disminuye (Viveros *et al.*, 2001).

Efecto solución

A medida que se forman los cristales de hielo, los solutos se excluyen, por lo que el medio extracelular experimentará un aumento en la osmolaridad. Al continuar el sobre-enfriamiento, más moléculas de agua pura se incorporarán al núcleo de hielo. De esta manera la solución en estado líquido será cada vez menor y su osmolaridad mayor formando zonas o canales hiperosmolares,

causando así el llamado “efecto-solución” debido a las modificaciones de las propiedades de la solución en la cual las células se encuentran suspendidas (Watson y Duncan, 1988).

El agua intracelular tenderá a salir para mantener un equilibrio osmótico, y la célula se deshidratará. Si la velocidad de congelación es lo suficientemente lenta, la deshidratación celular será gradual y progresiva y la célula no se congelará. Sin embargo, si el descenso de la temperatura continúa, la deshidratación excesiva dañará a la célula por la acumulación y posteriormente la precipitación de solutos en el interior conocido como “punto eutéctico” provocando cambios en la osmolaridad y alteraciones funcionales de la membrana (Holt y North, 1994; Watson, 1995).

Por el contrario si la velocidad de congelación es muy rápida, se evitará la salida de moléculas de agua del medio intracelular al extracelular pero el interior se sobre-enfriará y la probabilidad de formación de centros de nucleación será alta con la consecuente formación de cristales intracelulares, y daño celular de tipo mecánico (Mazur, 1984; Devireddy *et al.*, 2002).

Mazur (1984) estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego del proceso de criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado lenta o demasiado rápida el estrés de criopreservación aumenta. Es decir, la criosupervivencia depende de una velocidad media de congelación que se puede graficar en forma de campana.

Estrés osmótico

Durante los procesos de criopreservación los espermatozoides son expuestos a variaciones extremas de temperatura y osmolaridad que se ven reflejadas en cambios drásticos en el volumen celular así como a la adición y remoción de crioprotectores (CPAs). El primero de estos cambios ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras permeables y no permeables y posteriormente, cuando la solución es congelada. Por otra parte, cuando la solución es descongelada nuevamente ocurrirán cambios de volumen que afectan directamente la función celular (Wessel y Ball, 2004; Meyers, 2005).

En el caballo la tolerancia osmótica de los espermatozoides aparentemente difiere a la de otras especies, y la habilidad relativa de los espermatozoides a sobrevivir al estrés osmótico se encuentra al parecer relacionada en parte, a la habilidad de estos a sobrevivir al proceso de criopreservación. Basado en recientes reportes, los espermatozoides de equino tienen una tolerancia osmótica limitada (± 300 mOs) (Pommer *et al.*, 2002); la pérdida de motilidad, viabilidad, potencial de la membrana mitocondrial, integridad de la membrana plasmática, son algunas características y estructuras relacionadas con el estrés osmótico (Liu *et al.*, 1998). Estos efectos adversos al parecer persisten aún cuando los espermatozoides regresen a condiciones isosmolares, por consiguiente la capacidad fertilizante disminuye (Holt y North, 1994; Ball y Vo, 2001).

Por esta razón la determinación de la resistencia osmótica, conocida como osmoadaptación (Hohmann, 2002), resulta críticamente necesaria para entender las cualidades biofísicas de los espermatozoides durante el proceso de congelación –descongelación. La capacidad de los espermatozoides de responder ajustando el volumen celular, es determinado por algunos factores como son: la composición bioquímica de la membrana plasmática, permeabilidad al agua, temperatura de transición de los lípidos de la membrana, ATPasas Na^+/K^+ , canales iónicos, así como la relación de colesterol-fosfolípidos. La disponibilidad de colesterol en la membrana puede permitirle una mayor estabilidad en los procesos de extensión y contracción a los cuales se ve sometida durante los procesos de criopreservación y que son regulados también por elementos del citoesqueleto (Medina *et al.*, 2005; Meyers, 2005).

ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA CRIOPRESERVACIÓN

Durante el proceso de criopreservación las fluctuaciones de temperatura y la exposición a agentes crioprotectores inducen diferentes cambios en la estructura y funcionalidad en las células espermáticas. Las razones de la disminución en la viabilidad y potencial fertilizante son diversas. Kelly *et al.*, (1997) sugieren que aunque la motilidad progresiva de semen descongelado sea similar a la de semen fresco no muestra el mismo potencial de fertilidad que el semen fresco y que esta baja fertilidad podría estar íntimamente

relacionada con la pobre capacidad fecundante del semen criopreservado. Esto posiblemente sea consecuencia de cambios similares a la capacitación que ocurren durante el proceso de congelación-descongelación como son: mayor fluidez en la membrana (Neild *et al.*, 2003), y posiblemente mayor fusogenicidad inducida por la salida de colesterol, fosforilación de proteínas (evidentemente con patrones diferentes a los ocurridos durante la verdadera capacitación) y aumento en las concentraciones intracelulares de iones de Ca^{2+} . Condiciones similares a las observadas en la capacitación (Petrunkina *et al.*, 2005). Sin embargo estas modificaciones no son completamente análogas y no deben ser consideradas como una verdadera capacitación sino más bien un salto hacia la capacitación con la omisión del proceso fisiológico (Green y Watson, 2002).

Membrana y citoesqueleto

La MP resulta una de las estructuras más dañadas durante el proceso de criopreservación, ya que es a menudo considerada como el primer sitio de daño a la célula cuando ésta es sometida al proceso de congelación como consecuencia de una serie de eventos traumáticos.

La integridad de la MP es de crucial importancia para el funcionamiento correcto de los espermatozoides (Leeuw *et al.*, 1989; Guthier y Welch, 2005).

Las diferencias en cuanto a la composición de lípidos de la membrana en los espermatozoides han sido propuestas como un factor importante en las diferencias de la capacidad de congelación entre células espermáticas de diferentes especies. Esta especificidad en la composición le confiere a las distintas especies un grado de fluidez distinta durante la transición de fases dependiente de la composición bioquímica de sus membranas y que las hace más o menos aptas a permanecer fluidas al disminuir la temperatura (Maldijan *et al.*, 2005).

En particular los espermatozoides de caballo resultan altamente sensibles al choque por frío, esta sensibilidad se ha atribuido a la composición de fosfolípidos y colesterol, de su membrana. Cuando la temperatura desciende por debajo de la temperatura corporal, los lípidos experimentan una transición de fases que va de un estado líquido cristalino a un estado de gel (forma rígida) (Medeiros *et al.*, 2002; Ricker *et al.*, 2006). Como consecuencia de este

evento, los fosfolípidos de la membrana sufren un desarreglo estructural, dando como resultado la disminución en la fluidez y en la estabilidad y la pérdida de su integridad. Durante esta transición, los fosfolípidos de un mismo tipo se agregan en microdominios y las proteínas integrales de la membrana pueden ser excluidas de estos microdominios cuando se encuentran en fase de gel y algunas veces pueden ser agrupadas de forma reversible (Müller *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2005).

Moran *et al.*, (1992) demostraron que los espermatozoides de caballo son más susceptibles al choque por frío en un rango de temperatura que oscila entre 19° C / 8° C. Por otra parte, algunas de las funciones determinadas por la interacción de la membrana con el citoesqueleto se ven alteradas drásticamente en este rango de temperatura. Kusumi y Sako (1996) proponen que el citoesqueleto juega un papel determinante en la arquitectura de la membrana al intervenir en la formación de dominios en la superficie de la misma, transporte y señalización.

Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio por Martínez *et al.*, (2006) sugieren que la teca perinuclear del espermatozoide de bovino, es dañada por el proceso de criopreservación. Se propuso que el decremento en la viabilidad de semen criopreservado puede ser atribuido no sólo a un daño en la membrana plasmática sino al daño de elementos internos como el citoesqueleto, siendo la teca perinuclear el principal elemento dañado durante este proceso, que resulta en pérdida parcial o total de la subestructura sTP (Martínez *et al.*, 2006).

Por otra parte la actividad de muchas enzimas asociadas a la membrana, se ve reducida, así como la tasa de difusión de proteínas por lateralización dentro del plano de la bicapa, reduciendo de este modo la eficiencia de los procesos relacionados con la difusión (Labbé *et al.*, 1997).

En general la resistencia de los espermatozoides al choque por frío es dependiente de la fluidez de la membrana y determinada por la concentración de colesterol y la relación de ácidos grasos poliinsaturados y saturados. Los espermatozoides de algunas especies como el humano y el conejo presentan una elevada cantidad de esteroides y fosfolípidos que los hace más resistentes al choque térmico “frío” a diferencia de los espermatozoides de otras especies como el equino (Watson, 1981).

Peroxidación lipídica

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen la formación de especies reactivas de oxígeno, conocidas como ROS por sus siglas en inglés, las cuales poseen efectos tóxicos sobre la célula y comprometen su funcionalidad, entre los ROS destacan fundamentalmente: el anión súper óxido (O_2^-), el hidroxilo ($^{\cdot}OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) siendo este último la principal especie reactiva y al que más se ha asociado al daño de espermatozoides de equino (Medeiros *et al.*, 2002; Membrillo *et al.*, 2003).

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas pudiendo causar daño por reaccionar con diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Baumber *et al.*, 2000).

Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos del ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin y Bendich, 1987).

La interacción del radical $^{\cdot}OH$ con el material genético modifica el ADN pudiendo generar mutaciones. Los radicales libres han sido asociados a procesos como son la inducción de apoptosis neuronal por daño oxidativo. Los ROS inducen daño a los fosfolípidos de la membrana y del ADN en espermatozoides humanos y están implicados en la infertilidad masculina. La producción de ROS y el daño al ADN es mayor en espermatozoides inmaduros con gota citoplasmática y anomalías morfológicas de la cabeza (Ollero *et al.*, 2001).

La peroxidación lipídica asociada a ROS provoca una disminución de la motilidad, la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial del espermatozoide (Baumber *et al.*, 2000).

Los ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio en su producción y la degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002). El estrés oxidante causado por el H_2O_2 provoca un mal funcionamiento en las mitocondrias y conduce a muerte celular (Liu *et al.*, 2000). La interrupción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial o la inhibición de la misma, predispone a una formación de radicales libres, además de reducir la motilidad y capacidad de fusión de los espermatozoides con los ovocitos. La peroxidación lipídica es

un ejemplo del estrés oxidativo en membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. La peroxidación es seguida de procesos degenerativos y apoptóticos (Donoghue y Donoghue, 1997; Aitken *et al.*, 1998).

En el equino, se ha sugerido que una de las causas de la disminución de la fertilidad espermática es la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, esto debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que poseen los que lo hacen más susceptibles (Aurich *et al.*, 1997).

Alteraciones al ADN

Las fallas en la integridad y estabilidad estructural del ADN de espermatozoide de caballo se han asociado con la reducida fertilidad del semen fresco y descongelado. (Kenney *et al.*, 1995). En el caso del caballo, la tasa de desnaturalización de la cromatina del espermatozoide es superior en semen de caballos sub-fértiles en contraste con caballos fértiles (32% vs 16%) (Neild *et al.*, 2005).

La habilidad del DNA espermático a resistir al estrés ha sido relacionada en gran parte a la cantidad de puentes disulfuro y la relación o proporción de diferentes protaminas asociadas con el ADN (Love *et al.*, 1999).

En estudios realizados por Love *et al.*, (2002) mediante ensayos de integridad de cromatina utilizando la técnica de naranja de acridina por citometría de flujo y fluorescencia descritas previamente (Love y Kenney, 1999), demostraron que aparentemente la integridad de ésta no es dependiente de la temperatura ni del tiempo de almacenaje. Sin embargo, algunos otros factores con los que se ve relacionada la célula espermática durante los procesos de criopreservación son: la concentración de plasma seminal, diluyentes del semen, tipo de antibióticos y especies reactivas de oxígeno inducidas por distintos factores, todos ellos pudiendo afectar en forma directa la habilidad del ADN para resistir procesos estresantes. Estos factores contribuirían a su desestabilización y posteriormente una posible desnaturalización asociadas a una disminución en la fertilidad. Por consiguiente al someter las células al proceso de criopreservación todos los factores antes mencionados provocan daño al ADN al desestabilizarlo (Watson, 1995).

CRIOPROTECTORES CELULARES

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, resulta necesaria la adición de agentes crioprotectores que alteren el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales ocurren los procesos de criopreservación (Boiso, 2001).

La habilidad de un componente como medio efectivo de criopreservación depende de su capacidad de proteger a la célula del daño por congelación sin resultar tóxico para ésta. Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo el uso de estos crioprotectores produce daños importantes sobre las estructuras celulares como la membrana y el citoesqueleto (Stornelli *et al.*, 2005).

Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas, teniendo como fin general mantener la viabilidad celular.

Los crioprotectores han sido clasificados en 2 grupos importantes según la permeabilidad de la membrana a los mismos. En el primer grupo se encuentran las sustancias que poseen bajos pesos moleculares o crioprotectores penetrantes, que protegen a la célula de lesiones inducidas por tasas de congelación lenta; los más utilizados han sido: glicerol, etilenglicol, y dimetil sulfóxido (DMSO). El segundo grupo lo forman las sustancias de alto peso molecular o crioprotectores no permeables que son efectivos cuando se utilizan en protocolos con velocidades rápidas de congelación. Los azúcares como la rafinosa, la trehalosa y la sacarosa, han sido utilizados exitosamente en este tipo de congelación (Liu *et al.*, 1998; Patist y Zoerb, 2005).

Los crioprotectores no permeables son usados para remover osmóticamente el agua intracelular, reemplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento, para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación y la estabilización de las membranas y proteínas (Medina *et al.*, 2005). El uso de este tipo de crioprotectores en el semen del caballo se ha limitado al glicerol pero se observaron efectos tóxicos en la célula espermática. Al igual que otras células, los espermatozoides de caballo no son capaces de sobrevivir al proceso de congelación sin un medio crioprotector. Por consiguiente, surge la

necesidad de evaluar otros crioprotectores que pudieran ser menos tóxicos (Squires *et al.*, 2004).

Los azúcares han sido utilizados a menudo como crioprotectores no permeables, solos o en combinación con crioprotectores permeables (Lillford y Holt., 2002).

La habilidad de criopreservación de diferentes azúcares como la trehalosa, la rafinosa y la fructosa ha sido probada en espermatozoides de toro y carnero (Squires *et al.*, 2004).

Por otra parte, la microinyección de trehalosa intracelular en ovocitos de humano demostró su acción protectora, ya que aumenta los porcentajes de ovocitos recuperados en comparación con los métodos convencionales de congelación (Eroglu *et al.*, 2002). Esto corrobora que existen opciones de crioprotectores extracelulares e impermeables como la trehalosa que tienen una forma distinta de proteger a la célula y que no tienen efecto citotóxico alguno.

Adicionalmente, utilizando metil celulosa en combinación con trehalosa y acetamida como criopreservador en espermatozoides se observó un mayor porcentaje de motilidad espermática al descongelar por la acción crioprotectora de estos azúcares (Dalimata y Graham, 1997).

Squires *et al.*, (2004) reportaron que los espermatozoides de caballo congelados en un diluyente a base de yema de huevo y leche descremada (SMEY) adicionado con una concentración de trehalosa (9mM) evitaba una baja en la motilidad progresiva en los espermatozoides post descongelados, concluyendo que los azúcares como agentes crioprotectores minimizan el daño celular en el proceso congelación-descongelación.

El glicerol

El glicerol ha sido el crioprotector más utilizado para la congelación de células; sus propiedades fueron reportadas por Polge *et al.*, (1949). Sin embargo a pesar de su relativa eficacia, éste resulta tóxico para los espermatozoides (Clark *et al.*, 2003). También tiene un efecto anticonceptivo en las hembras. En caballos se ha comprobado que disminuye la fertilidad del semen cuando se incluye glicerol en los diluyentes para semen fresco, refrigerado o congelado (Squires *et al.*, 2004).

Cuando los espermatozoides de caballo son adicionados con crioprotectores permeables, como el glicerol, disminuye la motilidad y se altera el potencial de la membrana mitocondrial (Ball y Vo, 2001).

Los efectos tóxicos del glicerol sobre la integridad espermática han sido demostrados ya que afecta directamente la polimerización de actina la cual es esencial para que las células espermáticas lleven a cabo sus funciones normales (Liu *et al.*, 1999).

Por consiguiente, existen evidencias que los crioprotectores interfieren con la polimerización de actina (Vincent *et al.*, 1990) induciendo serias alteraciones durante la criopreservación. Holt y North, (1991) sugieren que la adición de crioprotectores pudiera influir en el estado del citoesqueleto y/o en la interacción de este con la membrana plasmática durante o después de la criopreservación.

La rápida remoción de crioprotectores permeables (CAPs) resulta en un choque hiposmótico cuando son puestos en condiciones isosmóticas o cuando entran en contacto con fluidos del aparato reproductivo. Esto se ve reflejado en una rápida disminución de motilidad, integridad de membrana e integridad del potencial de membrana mitocondrial (Pommer *et al.*, 2002).

La trehalosa

Durante los procesos de congelación-descongelación la remoción de agua por deshidratación a menudo resulta en alteraciones en la estructura y función de la membrana plasmática al eliminar los puentes de H^+ formados por el agua con la región polar de los fosfolípidos, incrementando el empaquetamiento de las regiones polares y no polares. De esta manera aumenta la posibilidad de formar interacciones de Van der Waals (Crowe *et al.*, 1987) y como consecuencia de estas modificaciones una posible alteración estructural.

Por otra parte el daño ocasionado a la célula ha sido atribuido no sólo a los cambios en el estado físico de los fosfolípidos de la membrana sino también a la desnaturalización de proteínas sensibles al proceso de congelación (Lins *et al.*, 2004). No obstante, algunos organismos como: insectos, crustáceos, mohos, esporas y levaduras expuestos a dichas condiciones de estrés, acumulan componentes crioprotectores (azúcares) en respuesta al estrés térmico (fenómeno conocido como cryptobiosis) (Tibbett *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004) y previenen el deterioro y la alteración de la membrana durante el estado de deshidratación o estrés. Uno de estos componentes es la trehalosa un disacárido de glucosa no reductor (α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranososa) encontrado en altas concentraciones (~80-90%) dentro de la hemolinfa de los insectos (Aboagla y Terada, 2003) y (~10-60%) en algunos organismos capaces de sobrevivir en condiciones extremas de temperatura y deshidratación (anhidrobiosis) (Kaushik y Bath, 2003; Oku *et al.*, 2005).

Estabilización de las estructuras celulares por trehalosa

Recientemente la trehalosa ha sido objeto de mucho interés como un excelente crioprotector y estabilizador de estructuras biológicas durante los procesos de congelación y deshidratación (Crowe *et al.*, 2001; Lillford y Holt, 2002).

Actualmente existen distintas explicaciones del porqué de la alta eficiencia bioprotectora de la trehalosa. Dentro de éstas se encuentra su alta transición de temperatura (T_g), así como su alto punto de fusión en solución (T_f) (Chen *et al.*, 2000). El radio de hidratación de la trehalosa le confiere gran flexibilidad entre los dos monómeros de glucosa que forman el disacárido permitiendo la interacción por puentes de H con proteínas y fosfolípidos de las membranas celulares y al mismo tiempo por el rompimiento del enlace tetrahédrico de los

hidrógenos que enlazan al agua reduciendo así la cantidad congelable (Cerruti *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2002; Aso y Yoshioka, 2005). Finalmente la alta viscosidad de la mezcla binaria de solución trehalosa-agua estabiliza macromoléculas (Magazu *et al.*, 1998; Sampedro *et al.*, 2002).

Las propiedades particulares de la trehalosa le han dado un amplio rango de aplicaciones a este disacárido que incluyen la estabilización de proteínas (Kaushik y Bath, 2003), membranas (Wolfe y Bryant, 1999), liposomas (Aso y Yoshioka, 2005), ovocitos (Eroglu *et al.*, 2002), alimentos (Patist y Zoerb, 2005) y como aditivo en la conservación de células espermáticas de diversas especies animales como equinos (Squires *et al.*, 2004), caprinos (Elkheir y Terada, 2004), bovinos (Chen y Brockett, 1993), gacelas (Garde *et al.*, 2003), e incluso en la conservación de órganos completos (Chen *et al.*, 2004).

Algunas evidencias experimentales proponen distintas hipótesis sobre la interacción crioprotectora de la trehalosa con las biomoléculas en distintos ambientes y condiciones estresantes (Lins *et al.*, 2004).

La primera de estas hipótesis (reemplazo de moléculas de agua) sugiere que la habilidad para estabilizar membranas es el resultado de fuertes interacciones mediadas por la formación de puentes de hidrógeno entre la trehalosa y la región polar de los fosfolípidos (Liu *et al.*, 1998) y/o con las proteínas en la superficie de las membranas celulares. Cuando sustituye al agua previene la fusión entre bicapas y la pérdida de la conformación nativa al evitar el desajuste conformacional y posicional del estado deshidratado, manteniendo de esta forma la estructura de las membranas (Crowe *et al.*, 2001; Kaushik y Bhat, 2003; Sampedro y Uribe, 2004; Patist y Zoerb, 2005).

La segunda hipótesis (retención de agua estructural) sugiere que las moléculas del azúcar interactúan con la superficie de la bioestructura conteniendo los residuos de agua (agua no congelable) asociadas con la superficie de las bioestructuras. Así la estructura se mantiene debido a la formación de una malla protectora que evita la deshidratación total (Lins *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004).

Finalmente, la hipótesis de la vitrificación (inmovilización mecánica) sugiere que durante el estrés por congelación, deshidratación o exposición a agentes desnaturizantes, la trehalosa forma una matriz altamente viscosa que embebe a las membranas o proteínas; formando una especie de vidriado amorfo conocido como vitrificación (Wolfe y Bryant, 1999). Así se evita formar cristales de hielo (Chen *et al.*, 2000). Este mecanismo posiblemente es responsable de la habilidad crioprotectora pues la alta viscosidad de un medio agua-trehalosa estabiliza de manera importante los fosfolípidos de la bicapa y las proteínas, al inhibir la vibración intramolecular. En este sistema se evita la pérdida de la conformación nativa de las macromoléculas pues la viscosidad las empaqueta, limitando de esta manera la pérdida de su estructura nativa (Cerrutti *et al.*, 2000; Sampedro *et al.*, 2002; Tibbett *et al.*, 2002).

La existencia de estas hipótesis no quiere decir que éstas sean mutuamente excluyentes es decir: la vitrificación puede ocurrir simultáneamente con una interacción directa por puentes de hidrógeno o bien atrapando residuos de agua que permiten la correcta conformación de las bioestructuras (Pereira *et al.*, 2004). En la siguiente figura se indican (a), (b) y (c)

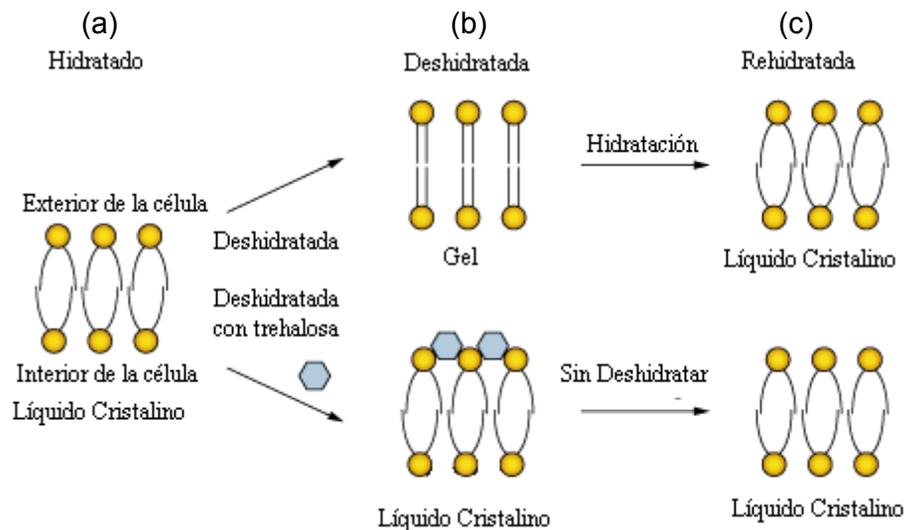


Figura 3. Hipótesis del efecto de la trehalosa sobre la estabilidad de los fosfolípidos de las membranas durante la transición de fases. (a) membrana en condiciones fisiológicas normales antes de la congelación, (b) membrana intacta durante la transición por la acción crioprotectora de la trehalosa, (c) membrana en conformación rígida o gel durante la disminución de la temperatura (Patist y Zoerb, 2005).

HIPOTESIS

Si un medio de congelación a base de trehalosa protege las estructuras de proteínas y membranas, entonces será capaz de mejorar la viabilidad y la integridad de las células espermáticas de caballo en comparación con los diluyentes de congelación que contienen glicerol.

OBJETIVO GENERAL

Valorar la capacidad crioprotectora de la trehalosa sobre la viabilidad de los espermatozoides de caballo y relacionarla con la motilidad progresiva y la integridad de la membrana y del acrosoma.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar la concentración óptima de trehalosa en un diluyente para congelación.
- Valorar los efectos de las diferentes concentraciones de trehalosa sobre la viabilidad, motilidad, la integridad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma del espermatozoide criopreservado.
- Determinar el daño post-congelado sobre la motilidad, integridad del acrosoma y membrana plasmática sobre el estado fisiológico del espermatozoide de caballo.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

La D-(+)-Trehalosa dihidrato, el glicerol, la albúmina sérica bovina (BSA) el HEPES, el Piruvato y el DL-acido láctico fueron de Sigma-aldrich. El EDTA (Sal Disódica), la Glucosa, el KCl el NaHCO_3 y el NaHPO_4 fueron de J.T.Baker. La Penicilina Sódica Cristalina Boheringer Ingelheim (México).

Obtención y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron 10 eyaculados de 10 caballos de entre 6 y 15 años, mediante la técnica de vagina artificial, sobre maniquí. La vagina modelo colorado se atemperó con agua a $45-50^\circ\text{C}$, y se lubricó con un lubricante a base de agua (no espermicida) carboximetil celulosa, Se utilizó un filtro de nylon de $60\mu\text{m}$ en los vasos colector graduado con la finalidad de obtener eyaculados libres de la fracción de gel.

Los eyaculados obtenidos fueron procesados y evaluados mediante distintos ensayos que se realizaron en fresco y posteriormente al descongelado.

Evaluación de las muestras

La evaluación inicial se realizó con muestras de los eyaculados en fresco, esta valoración se determinó inmediatamente después de obtenido el eyaculado el volumen total del semen mediante una probeta graduada 100 ml y atemperada a 37°C . Posteriormente en el semen fresco y descongelado se determinó la motilidad total (MT) y progresiva (MPr) las cuales se evaluaron con dos criterios distintos, en porcentaje MT y en escala 1-5 la MPr. La concentración espermática se calculó diluyendo $25\mu\text{l}$ de semen en $500\mu\text{l}$ de solución Triton X-100 al 0.1 % en PBS. Depositando una gota sobre el hematocitometro (cámara de Neubauer) y contando 5 cuadrantes de la cámara. El número de células se determina mediante la fórmula: $\text{FD} \times \text{No de Cel espermáticas} \times 10,000 \times 5$. Donde FD es el factor de dilución (21); No de células contadas por 5 cuadrantes de la cámara; 10,000 dado por la dimensión de la cámara; 5 el número de los cuadrantes contabilizados.

Únicamente se utilizaron los eyaculados con una concentración de 60×10^6 células/ml y una motilidad mayor al 50% (Vidament *et al.*, 2001).

Proceso de congelación

El semen se mesclo 1:1 a 37°C con el diluyente de centrifugación (a base de leche descremada en polvo 2.4gr o 30ml de leche líquida descremada marca San Marcos light, 0.9 gr de glucosa, 7 gr de sacarosa, pH 6.8, y aforado con agua destilada a 100 ml a una temperatura de a 37°C). Una vez diluido el semen se realizó la centrifugación en tubos de 15 ml; colocando al fondo de éstos 3 ml del diluyente de congelación para evitar el apelmazamiento de la pastilla, se centrifugaron las muestras a 600g x 12 min con la finalidad de retirar el plasma seminal total. Después de la centrifugación se retiró manualmente el sobrenadante con pipetas Pasteur y se reconstituyó la pastilla a una concentración de 400×10^6 células/ml con los diluyentes de congelación (A, B y C). El diluyente de congelación A fue base de leche descremada marca San Marcos 3ml, trehalosa 100 mM, EDTA 4.02 mM, 1% de glicerol, penicilina sódica cristalina, agua destilada 6ml, pH 6.8. El diluyente de congelación B fue a base de leche descremada marca San Marcos 3ml, trehalosa 500 mM, EDTA 4.02 mM, 1% glicerol, penicilina sódica cristalina, agua destilada, pH 6.8. El diluyente C fue empleado como control y fue a base de 4% de yema de huevo, 3.5% de glicerol, leche descremada en polvo 2.4gr o 30ml de leche líquida descremada marca San Marcos light, 0.9 gr de glucosa, 7 gr de sacarosa, pH 6.8, y aforado con agua destilada a 100 ml a una temperatura de a 37°C (Vidament et al., 2001). Finalmente se realizó el envasado del semen en pajillas francesas de 0.5 ml, rotuladas, con fecha, nombre del semental, y tipo de diluyente utilizado, a una concentración final de 200×10^6 células/ml el sellado de las pajillas se realizó con alcohol polivinílico.

Congelación

Las pajillas de 0.5 ml fueron expuestas a vapores de nitrógeno en una rejilla de congelación con 5 puntos de contacto con la pajilla, a 4-5 cm sobre el nitrógeno líquido, durante 12 min y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -196°C (Vidament *et al.*, 2001).

Descongelación

La descongelación del semen se realizó utilizando el protocolo propuesto por Squires *et al.*, (2004) para pajillas de 0.5ml; exponiéndolas a baño María a una temperatura de 37°C durante 30 segundos, posteriormente se evaluó la motilidad al microscopio de luz con un aumento de 10x y 40x. Para la eliminación del diluyente las muestras fueron lavadas diluyendo en PBS pH 7.4 a 600g por 12 min para su posterior evaluación según el ensayo correspondiente.

Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal por triple tinción

Los porcentajes de viabilidad espermática e integridad acrosomal se realizaron empleando la técnica de triple tinción descrita por Talbot y Chacón (1981).

Una vez lavadas las muestras (frescas y descongeladas) fueron resuspendidas en una solución de PBS a una concentración de 35×10^6 cel/ml a las cuales se les agregó azul de tripan al 2% v/v en amortiguador PBS y se incubaron durante 15min a una temperatura de 37°C . Después, las muestras se centrifugaron a 600g por 10min, se resuspendieron y lavaron por lo menos 2 veces en PBS hasta retirar el exceso de colorante.

Cada muestra se fijó en glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato al 0.1M a un pH 7.4 durante 60min a una temperatura de 4°C . Enseguida las muestras fueron lavadas con agua desionizada para retirar el fijador (amortiguador de cacodilatos); una vez reconstituida la pastilla a una concentración de 50×10^6 se realizó el frotis sobre un porta objetos y se dejó secar al aire. Una vez seco el frotis, la laminilla se incubó en café Bismack durante 40 min a una temperatura de 37°C y se lavó con agua destilada. Nuevamente se dejó secar y después se expuso en rosa de bengala al 0.8% en amortiguador Tris 0.1M, pH 5.3 por 30min. Nuevamente se lavaron las

laminillas con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez seca la laminilla se montó con resina para su lectura al microscopio.

Se utilizaron los siguientes criterios de evaluación:

- 1) Cabeza rosa-azul muerto acrosoma intacto
- 2) Cabeza blanca-azul muerto sin acrosoma
- 3) Cabeza rosa-café vivo acrosoma intacto
- 4) Cabeza blanca-café muerto sin acrosoma

Evaluación de la viabilidad mediante tinción eosina-nigrosina

Esta tinción de vitalidad descrita por Dott y Foster (1979) fue utilizada para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos. En esta técnica la eosina es tomada por el espermatozoide muerto cuando la permeabilidad de la membrana pierde su continuidad y selectividad, por lo mismo aparecen teñidos de rojo. Se tomaron alícuotas de las muestras 20µl en fresco y descongelado respectivamente y se mezcló con 20µl de eosina-nigrosina sobre un portaobjetos donde se realizó el frotis. Posteriormente se dejó secar al aire a temperatura de cuarto y se montó con resina para su lectura al microscopio.

Se contaron 200 espermatozoides en cada muestra.

Evaluación de la integridad acrosomal mediante azul de Coomassie

Se utilizó la técnica descrita por Larson y Miller (1999) con azul de Coomassie G-250. Donde los espermatozoides teñidos con una coloración azul fueron clasificados como espermatozoides con acrosoma integro.

Las muestras de semen en fresco o descongelado fueron lavadas con PBS mediante centrifugación 600g x 12 min con la finalidad de retirar el plasma o el diluyente. La pastilla se resuspendió a una concentración de 100×10^6 células/ml; la muestra se fijó en una solución de paraformaldeido al 4% a pH 7.4 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas 2 veces en PBS con la finalidad de retirar el fijador. Por último se reconstituyó la pastilla en cloruro de amonio 50mM en PBS. Posteriormente se tomó una gota 20µl y se realizó un frotis sobre un portaobjetos y se dejó secar al aire; una vez secos se sumergieron en el azul de Coomassie durante 10 min y se lavaron sumergiéndolos en un Koplín con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Finalmente se montó la laminilla con resina para su lectura al microscopio.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando la prueba ANOVA y con un comparativo de medias por T de Student mediante el paquete estadístico JMP 5.01^a (SAS. Institute Inc.) ANOVA fue utilizada para evaluar diferencias estadísticas entre los tratamientos con diferentes diluyentes de congelación. Donde los puntos evaluados incluyeron motilidad espermática total, viabilidad e integridad acrosomal.

RESULTADOS

Valoración de la motilidad espermática

En la tabla 1 se presentan los resultados para los parámetros evaluados en cada eyaculado recién obtenidas. En promedio el número de espermatozoides vivos fue de 87.8 ± 9.1 % mientras que el volumen fue de 58.30 ± 20.8 ml, y la concentración espermática fue de $203.40 \pm 8 \times 10^6$ células/ml. El número de espermatozoides normales fue de 91.80 ± 3.3 y la motilidad progresiva y total fue de 71.00 ± 8.8 y 4.20 ± 0.4 , respectivamente.

Tabla 1. Valores obtenidos para los parámetros evaluados en cada muestra antes del proceso de criopreservación.

MUESTRA	VIVOS (%)	VOLUMEN (ml)	MORFOLOGIA NORMAL (%)	MOTILIDAD TOTAL (%)	MOTILIDAD PROG. (Escala 1-5)	CONCENTRACIÓN (Millones/ml)
1	84	60	90	70	4	140
2	65	40	95	60	4	230
3	85	80	97	70	4	90
4	92	30	90	60	4	172
5	93	53	92	80	5	300
6	90	70	96	80	4	300
7	95	40	88	80	4	172
8	93	80	89	80	4	130
9	90	40	89	60	4	350
10	91	90	92	70	5	150
Promedio	87.8 ± 9.1	58.30 ± 20.8	91.80 ± 3.3	71.00 ± 8.8	4.20 ± 0.4	203.40 ± 86

Después del proceso de criopreservación, se observó un decremento considerable de la motilidad total en los espermatozoides (Cuadro1), las muestras congeladas en glicerol presentaron el mayor porcentaje de motilidad (28.5 ± 2.3) mientras que la menor motilidad fue observada en las muestras con 500mM de trehalosa ($0.5\pm 0.34\%$); a la concentración de 100mM se obtuvo un porcentaje de motilidad de 10.7 ± 0.90 . Por otra parte en cuanto a motilidad progresiva las muestras congeladas con el diluyente a base de trehalosa 100mM mostraron mayor vigor al compararlas con los espermatozoides congelados con glicerol al 3.5% (datos no mostrados).

Dado que el diluyente de glicerol al 3.5% estaba adicionado con yema de huevo (3%), al probar el efecto de la adición de este componente al diluyente a base de trehalosa 100mM, los resultados en tres experimentos mostraron que la adición mejoro el porcentaje de motilidad en la células al descongelado llegando a ser en promedio igual (28.5 ± 2.3) al obtenido en las muestras procesadas con glicerol.

Cuadro 1. Porcentajes de motilidad total en semen fresco y en los espermatozoides congelados-descongelados con los diluyentes a base de trehalosa (100mM, 500mM) y glicerol al 3.5%.

	Fresco	100mM	500mM	Glicerol 3%
Motilidad	71.00 ± 2.7^a	10.7 ± 0.90^b	0.5 ± 0.34^c	28.5 ± 2.3^d

* Literales diferentes por línea muestran diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Evaluación de la vitalidad con eosina-nigrosina

Mediante la tinción vital eosina-nigrosina se evaluó el efecto de la trehalosa sobre la viabilidad espermática después de la congelación y se comparó con los resultados obtenidos con el diluyente tradicional a base de glicerol.

El análisis de los datos mostró un índice elevado de viabilidad en los espermatozoides congelados con el diluyente de trehalosa 100mM, ya que del conteo de 200 células 100.6 ± 4.5 se encontraron vivas, en contraste sólo 78.5 ± 4.5 y 63.1 ± 4.5 se encontraron vivas con los diluyente adicionado con glicerol al 3% o trehalosa 500mM, respectivamente. Estos resultados fueron estadísticamente significativo ($P < 0.05$), correspondiendo el porcentaje mas alto de viabilidad a la trehalosa 100mM.

Cabe mencionar que durante la evaluación de la viabilidad con la tinción de eosina-nigrosina en las muestras congeladas con glicerol al 3.5 % se observó un tercer patrón de tinción donde sólo la región subacrosomal se tiño, las células que presentaron este patrón fueron clasificadas como no viables (muertas).

Cuadro 2. Número de células vivas en el semen fresco y en las muestras congeladas-descongeladas bajo cuatro tratamientos (100mM y 500mM de trehalosa, glicerol al 3.5 %, y 100mM de trehalosa+yema de huevo 4%).

	Trehalosa				
	Fresco	100mM	500mM	100mM + Yema huevo	Glicerol 3.5 % (control)
Vivas (numero de células)	182.1 ± 4.5^a	100.6 ± 4.5^b	63.1 ± 4.5^c	98.6 ± 4.5^b	78.5 ± 4.5^d

*Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre cada uno de los tratamientos.

Tinción de eosina-nigrosina.

Valoración de viabilidad por triple tinción

La viabilidad espermática también fue evaluada mediante la técnica de triple tinción, ésta se contabilizó independientemente de la integridad acrosomal de los espermatozoides, es decir con o sin acrosoma. El número de células vivas en el semen fresco fue de 180.7 de un total de 200, mientras que para 100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3.5 % fue de 94.9, 66.4 y 87.9 respectivamente; a pesar de que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre las muestras congeladas con trehalosa 100mM y glicerol al 3.5 %, se observó una ligera superioridad numérica que favorece a los espermatozoides congelados con el diluyente trehalosa 100mM (Cuadro 3). Por otra, parte al comparar los resultados de esta técnica con los eosina-nigrosina, los datos numéricos obtenidos fueron similares (Cuadro 4).

Cuadro 3. Número de espermatozoides vivos en semen fresco y en el semen congelado-descongelado bajo los tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%).

	Fresco	Trehalosa		Glicerol 3% (control)
		100mM	500mM	
Espermatozoides vivos (triple tinción)	180.7±6.2 ^a	94.9±6.2 ^b	66.4±6.2 ^c	87.9±6.2 ^b

*Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P < 0.05$).
Técnica de triple tinción: Azul tripan, rosa de bengala y café Bismark.

Adicionalmente, contrario a la evaluación con eosina-nigrosina donde existió una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos de 100mM y glicerol al 3.5 %, con el ensayo realizado por triple tinción no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre estos tratamientos.

Cuadro 4. Comparación entre las técnicas de valoración vital mediante T pareada

Muestra	N	Técnica TT	Técnica E-N	Valor P
Fresco	10	182.1±8.2	180.7±6.2	0.663
Trehalosa				
100mM	10	100.6±9.4	94.9±20	0.317
500mM	10	63.1±15	66.4±21	0.654
Glicerol	10	78.5±20	87.9±25	0.314

N=Numero de Muestras, TT= Triple Tinción, E-N= Eosina-nigrosina

Valoración de la integridad acrosomal

La valoración de la integridad acrosomal de los espermatozoides se realizó en semen fresco y descongelado. En el caso de la integridad acrosomal total (vivos y muertos) para las muestras en fresco, de 200 células contadas, la integridad fue de 185 ± 6.84 . Aunque en las muestras evaluadas después de la criopreservación mostraron un decremento en la integridad acrosomal, se encontró un alto número de células con acrosoma intacto, estadísticamente significativo ($P < 0.05$), en las muestras congeladas con el diluyente de trehalosa 100mM (143.7 ± 6.8); no así en el caso del tratamiento con el diluyente a base de glicerol donde la integridad acrosomal disminuyó significativamente (91.5 ± 6.8 células) siendo estadísticamente similar ($P > 0.05$) a lo observado con el diluyente trehalosa 500mM (88.2 ± 6.8 células) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de espermatozoides con acrosoma integro en semen fresco y en el semen congelado-descongelado bajo los tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%).

	Fresco	Trehalosa		Glicerol 3.5% (control)
		100mM	500mM	
Integridad acrosomal	185 ± 6.8^a	143.7 ± 6.8^b	88.2 ± 6.8^c	91.5 ± 6.8^c

*Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P < 0.05$)
Técnica triple tinción: Azul tirpan, café bismarck, rosa de bengala.

Valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides vivos

La valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides vivos antes y después del proceso de criopreservación fue similar a los resultados obtenidos para la integridad acrosomal total, sin embargo el número de células disminuyó (Cuadro 6). Donde nuevamente se encontró que la mejor integridad acrosomal favorece a los espermatozoides criopreservados en el diluyente de trehalosa 100mM (76 ± 5.4 células), con diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los otros diluyentes. Entre los diluyentes de glicerol (47.8 ± 5.4 células) y trehalosa 500mM (35 ± 5.4 células) no existió diferencia significativa ($P > 0.05$).

Cuadro 6. Número de espermatozoides vivos con acrosoma integro en semen fresco y en el semen congelado-descongelado bajo los tres tratamientos (100mM, 500mM de trehalosa y glicerol al 3%).

	Fresco	Trehalosa		Glicerol 3.5% (control)
		100mM	500mM	
Integridad acrosomal	173 ± 5.4^a	76 ± 5.4^b	35 ± 5.4^c	47 ± 5.4^c

*Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P < 0.05$).
Técnica triple tinción: Azul tirpan, café bismarck, rosa de bengala.

Valoración de la integridad acrosomal por integridad azul de Coomassie

Los resultados arrojados de la valoración de la integridad acrosomal mediante el empleo de este colorante mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento de trehalosa 100mM contra los tratamientos de glicerol 3.5 % y trehalosa 500mM; nuevamente en estos dos últimos tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), coincidiendo con los resultados obtenidos mediante triple tinción. La trehalosa a una concentración de 100mM mantuvo la integridad acrosomal por encima de los diluyentes glicerol 3.5 % y trehalosa 500mM (Cuadro/).

Cuadro 7. Número de espermatozoides con acrosoma integro en el semen fresco y en el semen congelado-descongelado en trehalosa 100mM, 500mM y glicerol al 3%, mediante la evaluación con azul de Coomassie.

	Fresco	Trehalosa		Glicerol 3.5 % (control)
		100mM	500mM	
Integridad acrosomal	190±4.76 ^a	147±4.76 ^b	83.6±4.76 ^c	83.6±4.76 ^c

*Literales diferentes por línea indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

DISCUSIÓN

En esta investigación encontramos que la adición de 100mM de trehalosa en un medio para congelación de semen de caballo incremento de forma significativa la integridad acrosomal de los espermatozoides al descongelado. Sin embargo, el porcentaje de motilidad observado fue muy bajo y similar a lo observado por otros investigadores (Gadella *et al.*, 2003).

La presencia de trehalosa 100mM no redujo el número de espermatozoides muertos después del descongelado ($P < 0.05$). En el espermatozoide de bovino empleando 200mM de trehalosa en el medio de congelación Wolders *et al.*, (1997) tampoco se encontró ninguna mejora en la viabilidad. De igual forma en el espermatozoide de caballo al utilizar una concentración de 9mM no se observó un aumento en la viabilidad (Squires *et al.*, 2004), de manera similar empleando una concentración de 100mM de trehalosa en el espermatozoide de diferentes gacelas no se encontró mejora en la viabilidad espermática (Garde *et al.*, 2003). Contrario a los resultados anteriores, en el espermatozoide de ratón si se reportó una mejora de la viabilidad utilizando 300mM de trehalosa.

Respecto al efecto detrimental sobre la viabilidad al emplear 500mM de trehalosa, esto posiblemente pueda deberse al incremento en la molaridad de medio. Respecto a esto último, un decremento importante de la viabilidad en los espermatozoides de caballo a sido reportada como resultado de su limitada tolerancia al estrés osmótico (Ball y Vo, 2001). Se ha reportado que cuando el espermatozoide se somete a ambientes hiperosmolares la membrana plasmática permanece intacta sin embargo durante el proceso de descongelación la célula no es capaz de mantener la integridad de la misma (Pommer *et al.*, 2002).

La disminución de la motilidad observada en este estudio al utilizar trehalosa es contrario a lo reportado para esta misma especie por Squires *et al.*, (2004) quienes observaron una 66 % de motilidad total al utilizar una concentración menor de trehalosa (9mM). Garde *et al.*, (2003) empleando una concentración de 300mM encontró una disminución en la calidad de la motilidad espermática en el espermatozoide de diferentes especies de gacela, resultados similares a los encontrados por nosotros. Por otra parte la adición de este azúcar en el caso del espermatozoide de bovino no mostró ninguna modificación en comparación con el uso de glicerol Woelders *et al.*, (1997). Sin

embargo en el espermatozoide de ratón la adición de 300mM en un medio de congelaron si fue capaz de mantener un alto grado de motilidad al descongelado de las células (61%) (Sztein *et al.*, 2001).

Se ha reportado que la trehalosa tiene un efecto protector directo sobre proteínas u organismos menos complejos como las levaduras, tal y como lo proponen Sampedro *et al.*, (2002). Por lo que la baja en la motilidad posiblemente podría deberse a un efecto hiperosmótico de la tehalosa sobre el medio de congelación. A este respecto diversas investigaciones reportan que un aumento en la molaridad del medio interviene negativamente en la motilidad espermática (Pommer *et al.*, 2002). Adicionalmente, otras investigaciones han reportado que la trehalosa eleva la viscosidad del medio, lo que influye negativamente en la motilidad espermática (Kausihik y bath *et al.*, 2003).

A pesar de que solamente se hayan realizado tres ensayos, la adición de yema de huevo al diluyente conteniendo trehalosa 100mM mejoro el porcentaje de motilidad. Se ha reportado que las lipoproteínas de baja densidad presentes en la yema de huevo disminuyen la molaridad del medio. Posiblemente una hipótesis es que este efecto se deba a la precipitación de algunos componentes del diluyente suplementado con yema de huevo (Moussa *et al.*, 2002).

En presente estudio se encontró que la utilización de la trehalosa a una concentración de 100mM estabiliza de manera importante el acrosoma obteniendo un mayor número de células con el acrosoma integro al descongelado, por lo que podemos inferir que el efecto benéfico de la trehalosa durante los procesos de criopreservación se basa en mantener la integridad del acrosoma ya que como estructura necesaria para la fertilización.

Estos resultados concuerdan con a los obtenidos por (Gutiérrez *et al.*, 2007 comunicación personal) en semen de cerdo. De igual manera, Pereira *et al.*, (2004) relacionan la estabilización de la membrana durante la transición de fases a la interacción que ejerce la trehalosa con las proteínas y fosfolípidos de la membrana y esto pudiera estar relacionado directamente a la estabilización del acrosoma

En el caso del diluyente control a base de glicerol 3% se observó una disminución de la integridad acrosomal posiblemente relacionada con la

desestabilización de la membrana resultados similares a los reportados por (Buhr *et al.*, 2001). Otras investigaciones proponen que el glicerol incluido en los diluyentes de congelación a altas concentraciones aumentan el daño causado directamente sobre el acrosoma durante la criopreservación estos resultados concuerdan con lo propuesto por Liu *et al.*, (1999) donde observaron que el daño inducido a las células espermáticas es reflejo de la toxicidad del glicerol ya que a altas concentraciones interviene con la dinámica celular al interferir con la polimerización de actina (Vincent *et al.*, 1990).

Por otra parte, la evacuación del diluyente de trehalosa 500mM mostró un decremento de la viabilidad y de la integridad espermática posiblemente relacionado a la reducida tolerancia al estrés osmótico de los espermatozoides de caballo (Ball., 2001).

En el caso de los resultados obtenidos sobre el mantenimiento de la integridad acrosomal para del diluyente de glicerol éstos pudieran explicarse como un efecto de éste al alterar la membrana plasmática y el mantenimiento de la integridad acrosomal en espermatozoides descongelados, Esto ha sido demostrado por investigaciones realizadas en espermatozoides de cerdo por (Buhr *et al.*, 2001) donde demostró que elevadas concentraciones de glicerol alteran la dinámica de dominios específicos de la cabeza del espermatozoide. Los resultados observados relacionados al daño estructural observado en el acrosoma y la membrana al descongelado en la utilización del diluyente de 0.5M fueron las muestras donde se obtuvieron los resultados menos favorables similares en las otras pruebas de valoración por lo que podríamos asumir que la posible causa de esta pérdida de integridad acrosomal sea consecuencia de lo propuesto anteriormente.

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que la trehalosa durante los procesos de criopreservación tiene habilidad de estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide y mantener su integridad acrosomal necesaria para llevar a cabo exitosamente la fertilización, esto siempre y cuando no se rebasen los límites de tolerancia osmótica de las células.

La criopreservación afecta negativamente la viabilidad y la estructura de los espermatozoides

El glicerol y la trehalosa a altas concentraciones aumentan el daño causado por la criopreservación

A bajas concentraciones la trehalosa inhibe la motilidad de los espermatozoides congelados y además aumenta la viabilidad e integridad de las células

La adición de yema de huevo a un diluyente a base de trehalosa con una concentración baja de glicerol aumenta la motilidad de los espermatozoides y mantiene elevado el número de células integra y viables.

REFERENCIAS

- Aboagla EM, Terada T, Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm Membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69: 1245-1250.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defect in sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia. *J. Androl* 1989; 10: 214-220.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. *The Molecular Biology of the Cell*. 2002: 4th Edition, Garland science.
- Amann and Pickett. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 1987; 7:145-171. Review.
- Aurich JE, Schöner U, Hoppe H, Aurich C, Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 1997; 48: 185-192.
- Aurich C. factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:65-75.
- Arancibia S, Juarez M, Montaldo H, Gutierrez C, Treujillo M, Hernandez G. Morphological perinuclear theca alterations are related to acrosome loss in cryopreservation boar spermatozoa. *J Medwell* 2007;49-56.
- Aso Y and Yoshioka S. Effect of freezing rate on physical stability of lyophilized cationic liposomes. *Chem Pharm Bull* 2005; 53: 301-304.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl* 2000; 21: 895-902.
- Ball BA and Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl*. 2001; 22:1061-1069.
- Ball BA, Baumber J, Sabeur K. Role of reactive oxygen species on normal function of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002; 58: 299-300.
- Barry A, Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility viability and mitochondrial membrane potential. *J Andol* 2001; 22: 1661-1069.
- Bavister BD. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res* 1989; 23: 139-158.

- Boiso I. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2001; 18: 1-20.
- Buhr, Fiser, Baliley Curtis. Cryopreservation in different concentrations of glicerol Alters boar sper and their membranes. J Androl 2001; 22: 961.969
- Cerrutti P, Segovia de Huergo M, Galvagno M, Schebor C, Buera MP. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical of external matrices. Appl Microbiol Biotechnol 2000; 54: 575-580.
- Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of organ preservation solutions in Kyoto university. Yonsei Medical Journal 2004; 45: 1107-1114.
- Chen T, Fowler A, Toner M. Supplemented phase diagram of the trehalosa-water binary mixture. Cryobiology 2000; 40: 277-282. Review.
- Chen Y, Foote H, Brockett C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and Blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology 1993; 30: 423-431.
- Clark GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. Reprod Fertil Dev 2003; 15: 377 – 381.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell W. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. J Biochem 1987; 242: 1-10.
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsyetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalosa myth revisited: introduction to a symposium on stabization of cells in the dry state. Cryobilogy 2001; 43: 89-105. Review.
- Dalimata AM and Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalosa and methyl cellulose. Theriogenology 1997; 48: 831-41.
- Dean S, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. Archives of Biochemistry and Biophysics 1999; 365 (2): 289-298.
- Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MH, Bischof JC, Roberts KP. Cryopreservation of equine sperm: Optimal coling rates in presence and absence of cryoprotective agens determined using differential sacanning clorimetry. Biol Reprod 2002; 66: 222-231.
- Donoghue AM, Donoghue DJ. Effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Poultry Sci. 1997; 76: 1440-1445.
- Eroglu A, Toner M, Thth T. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. Fertil Steril 2002; 77: 152-158.

Evans JP and Florman HM. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Fertil Suppl* 2002; 4: 57-63. Review.

Félix R, Treviño LC, Hernández VA. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva* 2002; 21: 89-95.

Foote RH. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *American Society of Animal Science* 2002; 1: 1-10.

Garde J, García A, Gutiérrez A, Vázquez I. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med Vet* 1992; 9 (2).

Garde JJ, Soler AJ, Cassienello J, Crespo C. Sperm cryopreservation in three species of engered gazelles (*Gazella Cuvieri*, *G. dama*, *Mhorr*, and *Drocas Neglaceta*). *Biol Reprod* 2003; 69: 602-611.

Giraud M, Motta C, Boucher D, Grizard G. membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 2160-2164.

Green CE and Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *J Reprod* 2002; 122: 889-898.

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

Haila AA, Tulsiani D. Mammalian sperm acrosome formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 379: 173-182.

Harrison RAP. Capacitation mechanism and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 581-594.

Holt WV and North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in criopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1994; 51: 414-424.

Holt WV and North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J Reprod* 1991; 91: 451-461.

Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiology and molecular biology reviews* 2002; 66: 300-372.

Juárez-Mosqueda ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de nivel Doctorado. CINVESTAV, I.P.N., México 2000.

Juhász J, Nagy P, Kulcsár M, Huszenicza GY. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion. *Acta Vet. Brno* 2000; 69: 247-250. Review.

Kaushik JK and Bath R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer. *J Biol Chem* 2003; 29: 26458-26465.

Kenney RM, Everson DP, Garcia MC, Love CC. Relationships between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biol Reprod Mono* 1995; 1:647-53.

Kusumi K and Sako Y, Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *J Biophys* 1993; 65(5): 2021-2040.

Kusumi K and Sako Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 1996; 8: 566-574.

Labbé C, Crowe LM, Crowe JH. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. *Criobiology* 1997; 34: 176-182.

Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij A. Cold-induced ultrastructural changes in bull boar sperm plasma membranes. *J Reprod.* 1989; 138:171-182.

Liford PJ and Holt ChB. *In vitro* uses of biological cryoprotectants. *The Royal Society* 2002; 357: 945-951.

Lins RD, Pereira CS, Hünenberg PH. Trehalose-Protein Interaction in aqueous solution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2004; 55: 177-186.

Liu DY, Martic M, Clarke GN, Dunlop ME, Baker HWG. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod* 1999;5:941-949.

Liu Z, Foote RH, Brockett CC. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 1998; 37: 219-230.

Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62-1745-1753.

Love CC and Kenney RM. Scrotal Heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease on protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 1999; 60: 615-620.

McGeady TA, Quinn PJ, Fitz ES, Ryan MT. *Veterinary Embryology*. Blackwell Publishing 1st Edition 2006; 3: 17-23.

Mckinnon A and Voss J. *Equine reproduction*. Lea and Febiger, 1st Edition 1993; 80:715-714.

Machlin LJ and Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of on the oxidant nutrients. *J Faseb* 1987; 1: 441- 445.

Magazu S, Maisano G, Middendorf HD, Migliardo P, Musolino AM, Villari V. α, α -Trehalose- water solutions. II. Influence of hydrogen bond connectivity on transport properties. *J Phys Chem* 1998; 102: 2060-2063.

Maldijan A, Pizza F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition uring cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005; 63:411-42.

Manandhar and Toshimori. Exposure of sperm head equatorin after acrosome reaction and its fate after fertilization in mice. *Biol Reprod* 2001; 65: 1425-1436.

Martinez CO, Juarez MML, Hernandez J, Valencia J. Cryopresevation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 2006; 66:1969-75.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247:125-142.

Mazur P, Leivo SP, Chu EH, A two-factors hypotesis of freezing injury. *Experimental Cell Research* 1972; 71:345-355.

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology* 2002;57:327-344.

MedinaVM, VelascoYM, Cruz PE. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev Col Cienc Pec* 2005; 18: 34-48.

Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma in the criopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63(9): 2372-2381.

Moore^a AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 2005; 51:241-249.

Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. Determination of temeperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 38: 999-1012.

Morel D, Equine artificial insemination. CABI publishing, 1st Edition 1999; 4:78-189.

Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Anton M. low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002;57:1695-1706.

Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A. stability of transbilayer phospholipids asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. J Cell Sci 1999; 112: 11-20.

Meyers SA. Spermatozoal response to osmotic stress. Anim Reprod Sci 2005; 85: 57-64.

Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbander B, Agüero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology 2003; 59:169-1705.

Oku K, Kurose M, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tujisaka Y, Okabe A, Sakaurai M. Combined NMR and quantum chemical studies on the interaction between trehalosa and dienes to the antioxidant function of trehalosa. J Phys Chem 2005; 109: 3032-3040.

Oliviera M, Ruiz T, Tarazonal A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Rev. Colm. Cienc. Pecua 2006; 19:1-13.

Ollero M, Guzmán E, Lopez MC, *et al.* Characterization of subsets of human spermatozoa at diferent stages of naturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. Hum. Reprod 2001; 16:1912:1921.

Parks JE, Arion JW, Foot RH. Lipids of plasma membrane outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. Biol Reprod 1987; 37: 1249-1258.

Patist A and Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids and Surface 2005; 40: 107-113.

Peknicova J, Moos J, Mollova M, Srsen V, Capkova J. Changes in immunochemical localization of acrosomal and proteins in boar spermatozoa during capacitation and induced acrosome reaction. Anim Reprod Sci 1994; 35: 255-271.

Pereira CS, Lins RD, Chandrasekhar I, Freitas LC, Hünenberg PH. Interactions of disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: A molecular dynamics study. J Biophys 2004; 86: 2273-2285.

Petrunkina AM, Gröpper B, Petersen ET, Günzel AR. Volume regulatory fuction and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. Theriogenology 2005; 63: 1390-1406.

Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. Theriogenology 2002; 58: 1373-1384.

Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Mayers SA. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectans. Biol Reprod 2006; 74: 359-365.

Roa-Espitia AL. Participación de la calmodulina (CaM), calreticulina (CRT) y de proteínas que se asocian a CaM y a CRT en la reacción acrosomal de los espermatozoides del cobayo. Tesis de nivel Maestría en Ciencias. CINVESTAV, I.P.N., México 2004.

Samper and Morris. Currents methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 1998; 49: 895-903.

Sampedro JG, Cotés P, Muños- Clares RA, Fernández and Uribe. Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* protection by trehalose. *Biochimica et biophysica acta* 2002; 1544: 64-73.

Sampedro JG and Uribe S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 2004; 256/257: 319-327.

Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell WMC, Evans G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil Dev* 2002; 14: 225-233.

Singh JP, Babcock DF, Lardy HA. Increased Calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J* 1978; 172: 549-556.

Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 1056-1065.

Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 2005; 25: 28-35.

Talbot and Chacon. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zoo* 1981; 215: 201-208.

Tibbett M, Sanders FE, Cairney JWG. Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.) *Mycorrhiza* 2002; 12: 249-255.

Vincent C, Pruleiere G, Pajot E, Champion E, Garnier V, Reynard JP. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology* 1990; 27:9-23.

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

Vyt, Maes, Dejonckheere, Castryck, Van Soom. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Dom Anim* 2004; 39: 8-12.

Watson PF. The effects of cold shock on sperm cells membranes. In: effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press 1981: 189-218.

Watson PF and Duncan AE. Effect of salt concentrations and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 1988; 25: 131-142.

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

Wessel M and Ball B. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 147-156.

Wevar VC, Torretta, Forchetti O. Evaluación de dos técnicas de congelación de semen porcino. *Arch. Latinoam. Prod. Anim* 1997; 5: 448-449.

Woelders H, Matthijs, Engel E. Effects of trehalosa an sucrose, osmolality of the freesing medium and cooling rate on viability and intacness of bull sperm after freezing an thawing. *Cryobiology* 1997; 35: 93-105.

Wolfe J and Bryant G. Freezing, Drying, and/ or vitrification of membrane-solute-water system. *Cryobiology* 1999; 39: 103-129. Review.

Wright WW, Baez JC, Vanderkooi JM. Mixed trehalose/sucrose glasses used for protein incorporation as studied by infrared and optical spectroscopy. *Analyti Biochem* 2002; 307: 167-172.

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