



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

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

**ALTERACIÓN DE LA CAPACIDAD FUSOGÉNICA
DEL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE CERDO
POR DAÑOS EN LA TECA PERINUCLEAR**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:
MANUEL BARRIENTOS MORALES.**

Tutor

DRA MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITÉ TUTORAL

DRA MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

DR JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ

MEXICO D.F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS.

A **Manuel y Pablo** por ser lo máximo de mi orgullo y el mayor logro como persona humana; mil disculpas por que para todo hay un método, menos para ser Padre.

A **Virna** gracias por tu amor y comprensión, y apoyarme siempre en todo, aun a costa del sacrificio que siempre representa cada uno de nuestros proyectos.

A mis Padres Manuel y Blanca, por que cada quien a su manera trataron de hacer de mí una persona de bien y estar siempre mi lado.

A mis hermanas **Carolina, Blanca y Reyna**, porque este logro también es de ustedes.

A mis Sobrinos **Enrique, Jaime, Emmanuel, Montserrat, Carolina, Jorge, Alejandro e Irene**, con cariño.

AGRADECIMIENTOS.

A **Dios**, por haberme dado el don de la vida y nunca, nunca, nunca, nunca dejarme solo.

A ***Maria de Lourdes Juárez Mosqueda***, por todo su apoyo en la realización de este proyecto, por su confianza y todo el tiempo que me dedico durante mi programa de estudios.

A ***Maria Elena Trujillo Ortega***, por su desinteresado apoyo, el tener siempre una palabra de aliento y por ser más que un tutor, una amiga.

A ***José Alfredo Medrano Hernández*** por el tiempo dedicado a la realización de este proyecto, los atinados comentarios y el aporte de conocimientos para el mismo

A ***Carlos Galina Hidalgo***, por su valiosa colaboración para la culminación de este proyecto y haberme apoyado desde mis estudios de Maestría. Gracias por su amistad.

A ***Salvador Uribe*** por sus comentarios en la tesis y las observaciones para mejorar la presentación.

A ***Carlos Lamothe Zavaleta*** Director de la FMVZ UV, por todas las facilidades otorgadas durante la realización de mis estudios doctorales

A ***Rodolfo Cánseco Sedano, Belisario Domínguez Mancera, Felipe Montiel Palacios,*** y ***Oscar Zarate Meza***, por su contribución y apoyo en la realización de este trabajo.

A ***Manuel Espinoza Palencia***, por haberme apoyado con todas las dosis de semen utilizadas en este proyecto

A ***Oscar Gutiérrez Pérez*** por todo su desinteresado apoyo durante el trabajo de laboratorio y todos sus consejos en los mismos. Gracias Amigo

A ***Salvador, Dania, Juan Carlos, y Katherine*** por compartir sus conocimientos conmigo y el haber emprendido esta aventura juntos.

A ***Jorge Hernández*** Jefe del laboratorio de Morfología de la FMVZ UNAM, por las todas las facilidades brindadas.

A todos mis alumnos del servicio social, que me apoyaron en la realización de mi trabajo de laboratorio.

Al **CONACYT** por haberme apoyado con una Beca para la realización de mis estudios Doctorales

Este proyecto fue apoyado por **DGAPA-UNAM PAPIIT IN 206506**

INDICE

Tema	Pagina
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.	8
ANTECEDENTES	10
Inseminación Artificial con Semen Porcino Criopreservado	10
Daños por congelamiento.	14
Citoesqueleto.	17
Citoesqueleto de la cabeza del espermatozoides de los mamíferos	20
Importancia de la Teca Peri nuclear en el Proceso de Fertilización	21
Capacitación Espermática y Reacción Acrosomal	26
Fusión de Membranas	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPOTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
MATERIAL Y METODOS	34
Muestras de Semen	34
Evaluación Seminal	34
Congelamiento de Semen	35
Descongelamiento	37
Capacitación Espermática	38
Valoración del estado acrosomal	39
Gradiente de Ficoll	40
Exposición de la Teca Peri nuclear	41
Microscopia electrónica	41
Obtención y Maduración de Ovocitos	42
Fertilización de Ovocitos	44
Valoración de la Capacidad de Fusión	45

Análisis Estadísticos	46
RESULTADOS	47
Morfología de la subestructura de la teca perinuclear.	47
Estabilidad morfológica de la subestructura de la teca perinuclear.	47
Evaluación de la integridad del acrosoma su relación con la integridad de la subestructura de la teca perinuclear.	49
Efecto de la presentación de la reacción acrosomal sobre la estabilidad de la subestructura de la TP.	52
Fusión de Gametos.	55
Discusión	56
Conclusiones	62
BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio fue determinar si las alteraciones de la subestructura de la teca perinuclear (TP) durante el proceso de criopreservación del espermatozoide del cerdo afectan el proceso de fusión de los gametos; determinar si existe relación entre la pérdida de la subestructura y la reacción acrosomal espontánea y si este último proceso se modifica en el espermatozoide criopresevado. Se trabajaron 6 cerdos híbridos, de cada verraco se tomaron dos eyaculados. Cada eyaculado se dividió en dos muestras, una para ser utilizada en fresco y la otra para ser procesada por congelamiento; haciendo un total de 12 eyaculados. Ambas muestras fueron incubadas para inducir tanto la capacitación (espermatozoides usados para la fertilización *in vitro*) o la reacción acrosomal espontánea (espermatozoides usados para la valoración del estado acrosomal y determinación del estado de la subestructura de la teca perinuclear). Para la separación de los espermatozoides con y sin acrosoma las muestras espermáticas fueron separadas en un gradiente discontinuo de Ficoll. La evaluación de la viabilidad y la integridad del acrosoma se realizó empleando la técnica de triple tinción. Para la exposición de la TP ambas muestras fueron tratadas con el detergente no ionico Brij 36-T y procesadas, por tinción negativa, para su observación al microscopio electrónico de transmisión. Para valorar el proceso de fusión se hizo fertilización homóloga, donde cada eyaculado se puso a interactuar con 5 ovocitos madurados *in Vitro*. En cada una de las muestras se observaron 100 células espermáticas para la valoración de la TP y 100 para evaluar la reacción acrosomal espontánea. La morfología de la subestructura fue usada como marcador morfológico de daño sobre la teca perinuclear. El proceso de fusión se valoró empleando 5 ovocitos por eyaculado. Los resultados mostraron que en el semen fresco el 88.3% de los espermatozoides eran vivos con acrosoma integro, mientras que el descongelado el 30.1%; la integridad de la subestructura fue de 93.4 % para los primeros y de 30% para los segundos. Así, previo a la inducción de la reacción acrosomal espontánea el 6.6% de los espermatozoides frescos presentaron daño en la TP y después de dicho proceso se incremento a 51.6% ($P < 0.001$); en tanto que en los congelados-descongelados los valores fueron del 70% y el 82.6% respectivamente ($P > 0.005$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides sin acrosoma en el semen fresco se incremento de 9.1% a 52.5% ($P < 0.001$) después de la reacción acrosomal espontánea; en los espermatozoides descongelados fue de 59.1% y 60.8% respectivamente ($P > 0.005$). El análisis de correlación mostró que existe relación entre el daño en la subestructura de la TP y la pérdida de acrosoma en los espermatozoides obtenidos de la interfase 1 del gradiente de Ficoll (83% de espermatozoides con pérdida de la subestructura y 80% sin acrosoma, $r = 0,9462$, $p = 0,0043$). En tanto la valoración del proceso de fusión mostró mayor porcentaje de ovocitos fusionados en el semen fresco que en el descongelado (datos preliminares). En conclusión, la reacción acrosomal espontánea produce la pérdida de la subestructura de la TP y este daño ocasionado de manera no fisiológica en el semen criopreservado compromete el proceso de capacitación y reacción acrosomal y por lo tanto la fusión del gámeto.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether alterations in the substructure of Perinuclear Theca (TP) during the process of cryopreservation of sperm pig affecting the process of fusion of gametes, determining whether a relationship exists between the loss of the substructure and the spontaneous acrosome reaction and if the latter process was modified in frozen-thawed sperm. It worked 6 hybrid pigs, each took two boar was ejaculates. Each ejaculate was divided into two samples, one for use in fresh and the other to be processed by freezing, making a total of 12 ejaculates. Both samples were incubated to induce both training (sperm used for *in vitro* fertilization) or the spontaneous acrosome reaction (sperm used for the valuation of state acrosome and determination of the status of the substructure of teak perinuclear). For the separation of sperm with and without acrosoma spermatic samples were separated in a batch of Ficoll gradient. The evaluation of the viability and integrity of the acrosome was conducted using the technique of triple staining. For the exposure of the TP both samples were treated with non-ionic detergent Brij 36-T and prosecuted, by staining negative for observation to transmission electron microscopy. To evaluate the process of merger approval was made fertilization, where each ejaculate was to interact with 5 matured oocytes in vitro. In each of the samples were observed 100 cells espermáticas for the valuation of TP and 100 to assess the spontaneous acrosome reaction. The morphology of the substructure was used as a marker of damage on morphological teak perinuclear. The merger process was assessed using oocytes 5 per ejaculate. The results showed that semen in 88.3% of the fresh sperm acrosome were living with integrity, while the frozen-yhawed the 30.1%; integrity of the substructure was 93.4% for the first and 30% for the latter. Thus, prior to the induction of spontaneous acrosome reaction 6.6% of the sperm showed fresh damage in the TP and after that process was increased to 51.6% ($P < 0.001$), while in the frozen-thawed values were 70% and 82.6% respectively ($P < 0.005$). As for the percentage of sperm in the semen without acrosoma fresh increase of 9.1% to 52.5% ($P < 0.001$) after the spontaneous acrosome reaction in thawed sperm was 59.1% and 60.8% respectively ($P < 0.005$). The correlation analysis showed that a relationship exists between the damage in the substructure of the TP and the loss of sperm acrosome in from the 1 interface of Ficoll gradient (83% of sperm with loss of the substructure and 80% without acrosome, $r = 0.9462$, $p = 0.0043$). While the merger process of valuation showed greater percentage of oocytes merged into fresh semen in the thawed (preliminary data). In conclusion, the acrosome reaction produces spontaneous loss of the substructure of the TP and this damage on a non-physiological in semen cryopreservation undertakes the process of training and acrosome reaction and therefore the fusion of gametes.

1. INTRODUCCION

El espermatozoide es severamente dañado durante el proceso de congelamiento y consecuentemente mas del 50% de los espermatozoides sufren alteraciones durante dicho procedimiento (Maldjian *et al* 2005; Ericsson, B. 2000; Carvajal *et al* 2004). La criopreservación (dilución, enfriamiento y congelación) de semen es una buena técnica para almacenar por un largo periodo de tiempo los eyaculados provenientes de animales con un alto valor genético. Sin embargo, esta metodología ocasiona daños en los espermatozoides, particularmente a la membrana plasmática y a las membranas acrosomales (Petrunkina *et al* 2005). El daño en la membrana es similar al que ocurre de manera natural durante la capacitación y la reacción acrosomal (Watson 2000). Esto se explica porque los espermatozoides descongelados se comportan como si hubieran pasado por el proceso de capacitación espermática o reacción acrosomal (Watson 1995). Es decir una subpoblación de los espermatozoides que sobreviven al proceso muestra evidencia de haber sufrido una “criocapacitación” (Bayley 2000). La criocapacitación se refiere a cambios que sufre la célula en sus patrones de motilidad, distribución de calcio, entre otros, que ocurren como resultado del medio usado para la criopreservación y el proceso de descongelación (Watson 1995 y Chatterjee *et al* 2001). En el verraco la criocapacitación se ha sugerido como la responsable de reducir la fertilidad en el semen congelado (Watson 2000; Grenn y Watson 2001, Kaneko *et al* 2003). Asimismo, durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones de los dominios presentes en la membrana de la cabeza espermática de cerdo (James1999), los cambios son semejantes a los que experimenta de manera fisiológica el espermatozoide durante la capacitación.

Otra estructura que es sensible al proceso de criopreservación es la teca perinuclear, principal citoesqueleto de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos, la cual ha

sido relacionada con el mantenimiento de los dominios de la membrana plasmática (Bhur, 1991). En otros trabajos se ha encontrado que la TP del espermatozoide de bovino experimenta daño por el proceso de criopreservación y que entre mayor sea el porcentaje de espermatozoides con la subestructura de la TP ausente, menor es el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (Martínez 2003). En el mismo sentido Arancibia en el 2007, reporta que el espermatozoide del cerdo sufre un daño en la teca perinuclear por el congelamiento y propone que este daño puede relacionarse con fallas en la capacidad reproductiva del semen de dicha especie

Por lo tanto, es conveniente realizar otras investigaciones para determinar que efecto tiene el daño ocasionado por el congelamiento sobre la teca perinuclear en el espermatozoide, sobre eventos importantes durante el proceso de fertilización como son la reacción acrosomal y la fusión de gametos.

2. ANTECEDENTES.

2.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO.

La porcicultura ha mostrado un desarrollo importante en los últimos años gracias a los avances en el mejoramiento de la calidad de la canal, lo cual se ha logrado con base a programas genéticos bien fundamentados. La inseminación artificial (IA) ha tenido un papel fundamental en este incremento. Para tal fin el semen debe ser diluido y conservado; la conservación del semen porcino puede realizarse de 3 formas: fresco, refrigerado y congelado.

El semen fresco se obtiene y se utiliza en la misma explotación, puede conservarse a temperatura ambiente y aplicarse en las 2 o 3 horas subsecuentes. El semen refrigerado es el que se conserva por periodos de 2 a 5 días, a esta se le añade un medio que equilibre la acción de las sustancias que contiene el plasma seminal; el semen refrigerado se puede conservar a dos temperaturas: 5° y 15° C, actualmente la temperatura de conservación más utilizada es la de 15°C. El semen conservado a 5° C necesita de la adición de sustancias crioprotectoras, siendo la más utilizada la yema de huevo y la leche. Los medios comerciales mas utilizados son el Serdiuk y el Katoque, compuestos principalmente de glucosa, bicarbonato de sodio, ácido cítrico y yema de huevo. Además el descenso de temperatura hasta los 5°C se efectúa de manera gradual para evitar el choque térmico (Johanson *et al* 2000).

En los años 70s, para la conservación del semen se emplearon diversos diluyentes, sobresaliendo el IVT y el Plisco adicionados con glucosa, bicarbonato de sodio, y con ácido etilendiaminotetracetato disodico (EDTA). También a partir de los 70s se ha utilizado el

diluyente Kiev; y en los años 80s el diluyente BTS (Beltsville Thaw Solution) se convierte en el medio de elección para preservar el semen por periodos cortos de 3 días (Conejo *et al* 1996). En los años 90s se preparan diluyentes más complejos con una mayor capacidad de conservar las condiciones ideales para el espermatozoide. Estos diluyentes son denominados de larga duración y pueden preservar el semen por periodos de hasta 5 días; dentro de los mas importantes se encuentran el MRA, el Androhep y el Reading. Este avance en el tiempo de preservación ha permitido una mayor difusión genética (Conejo *et al* 1997), sin embargo el uso de semen refrigerado se ha limitado a regiones o países donde las distancias son cortas y exclusivamente al intercambio internacional de animales genéticamente superiores. Se ha estimado que el total de inseminaciones en el mundo al año es de 19 millones y de ellas el 99% se realiza empleando semen fresco diluido el mismo día o conservado a 15-20° C durante un periodo máximo de 5 días (Eriksson, B. 2000).

Debido a la disposición de semen porcino refrigerado, a pesar de que el semen congelado ha estado disponible comercialmente desde 1975, este únicamente se usa en una pequeña proporción (<1%), del total de inseminaciones que se realizan en el mundo; limitándose su empleo sobre todo a exportaciones de material genético de un país a otro (Johnson *et al.*, 2000). Una gran ventaja es que la congelación de semen es un procedimiento que permite conservar a los espermatozoides por tiempo indefinido, preservando así la información genética del individuo. El proceso consta de varias etapas, donde sobresalen las siguientes: enfriado, deshidratación celular, congelación-descongelación y rehidratación celular (Ericsson y Rodríguez-Martínez, 2000). Una vez finalizado el procedimiento, Palacios (1994) menciona que se deben mantener las siguientes características y propiedades en el

espermatozoide para que tenga la capacidad de fecundar y transmitir la información genética contenida en su genoma:

1. Actividad metabólica productora de energía para realizar las diversas funciones celulares.
2. Integridad de las proteínas estructurales necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adherirse al ovocito al momento de la fecundación.
3. Preservación de las enzimas acrosomales, útiles para la penetración del espermatozoide en las vestimentas del ovocito.
4. Capacidad de realizar movimiento de manera progresiva.

Para lograr lo anterior diversos protocolos de congelación del semen han sido desarrollados, en los que se ha incluido el estudio de distintas concentraciones de diluyentes, de los crioprotectores, tasa de enfriado, condiciones del proceso de congelación descongelación; además, de la concentración espermática y el método usado para el análisis de los resultados (Johanson *et al* 2000). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, el uso del semen congelado sigue siendo limitado.

Hay que recordar que desde hace varios años, la meta en la tecnología del semen congelado del cerdo es alcanzar (de manera consistente y bajo condiciones de campo), tasas de partos en un rango entre el 65 % a 70 %, usando una variedad de verracos y no más de 3 billones de espermatozoides por dosis, para de este modo permitir el uso racional de los eyaculados (Reed, 1985).

Entre las limitaciones que se han observado para el uso de semen congelado para la inseminación rutinaria, (Johnson 1985, Reed 1985,) se encuentran:

- Niveles de fertilidad menores a los obtenidos con semen fresco.
- 2-3 lechones menos por parto que los producidos con el mismo sistema de semen fresco.
- Dosis con una concentración de células espermáticas mayores que con semen fresco ($5-6 \times 10^9$ contra $2-3 \times 10^9$), lo que repercute en la cantidad de dosis obtenidas por eyaculado.
- Costos elevados por concepto de equipo de laboratorio para realizar el congelamiento.
- Un tiempo realmente corto de vida espermática, entre el descongelamiento y la aplicación del semen.

Por otra parte, la baja fertilidad obtenida por efectos inherentes a la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso congelación descongelación no ha podido ser claramente establecida (Medrano y Holt, 1998).

El semen porcino difiere en muchos aspectos a los de otras especies de animales domésticos. Es producido en gran cantidad y una vez eyaculado es extremadamente sensible a una baja en la temperatura. Por ello el éxito del congelamiento y por lo tanto de la conservación del semen porcino depende en gran medida de los conocimientos que se puedan obtener acerca de los factores que afectan la capacidad de sobrevivir al congelamiento-descongelamiento y los de mantener su capacidad fecundante después del

mismo. Tales factores, pueden ser inherentes a los animales, como diferencias entre los eyaculados, o externos como la composición de los diluyentes, tipo y concentración de los agentes crioprotectores, y métodos para la congelación (Johnson *et al* 2000). Por lo tanto, el problema en la criopreservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a -196°C , sino el de identificar el daño que ocurre durante el proceso congelación-descongelación al pasar la célula por un intervalo de temperatura crítica de -15°C a 60°C , durante la cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriado, tales como conformación de cristales intra y extracelulares, deshidratación y distorsión de la membrana (Palacios 1994).

2.2 DAÑOS POR CONGELAMIENTO EN LA CÉLULA ESPERMÁTICA.

Como se mencionó anteriormente la viabilidad del espermatozoide del cerdo declina drásticamente después de su congelación (Wilmot y Polge, 1977; Johnson *et al.* 1981). Se sabe que la congelación y descongelación daña las células, siendo numerosas las investigaciones que se han realizado para analizar la naturaleza del daño. Algunos investigadores han propuesto a las mitocondrias, los lisosomas y otros organelos como sitios de daño por congelamiento (Mc Ganny *et al.*, 1988). Sin embargo una conclusión general de la mayoría de los estudios es que la membrana plasmática es el sitio primario del daño por congelamiento (Mc Ganny *et al.*, 1988). En el caso del espermatozoide, también se ha utilizado la integridad del acrosoma para predecir la habilidad fertilizante del semen congelado (Buhr, 1989), sin embargo no se ha establecido una relación entre los parámetros de viabilidad obtenidos y el daño acrosomal (Krogenoes, *et al* 1994). Algunos estudios han sugerido que algunos componentes del citoesqueleto son especialmente sensibles a la

temperatura (Watson 2000). En varios tipos celulares se ha observado que el congelamiento les ocasiona despolimerización prematura de los microfilamentos de actina (Watson 2000). En este sentido la teca perinuclear es el principal elemento del citoesqueleto en el espermatozoide de los mamíferos (Longo *et al* 1987). Estudios recientes han demostrado que esta estructura citoesquelética es dañada durante el proceso de descongelación-congelación (Martínez *et al* 2007) y señalan que existe una correlación entre la alteración de esta estructura y la integridad del acrosoma, infiriendo que la alteración podría afectar la viabilidad del semen del bovino criopreservado y apoyan la conclusión de que algunos elementos de la teca perinuclear participan en el anclaje de lípidos para mantener la integridad de membranas (Watson, 2000). Por otro lado, Watson (1996) encontró que el proceso de criopreservación de los espermatozoides de cerdo aparentemente induce un estado equivalente a la capacitación (falsa capacitación), esto se traduce en una modificación en la organización y contenido de lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide. Como resultado del enfriamiento se presentan cambios en la fluidez de la membrana y un incremento en la concentración de calcio intracelular, lo que posiblemente contribuye a reducir la viabilidad de los espermatozoides criopreservados en la especie porcina (Maxwell, y Johanson, 1997).

Por otra parte, la capacidad de regular el volumen celular es crítica durante el proceso de criopreservación, comprobándose que en los espermatozoides del cerdo y del perro el citoesqueleto participa en la regulación del proceso de osmosis. Petrunkina (2004, 2005) hace mención de otras investigaciones en diferentes líneas celulares (células tumorales, leucocitos, ovocitos, y espermatozoides porcinos) en las que se sugiere que el citoesqueleto

juega un papel importante en el envío y transducción de señales que controlan los cambios de volumen, por lo cual un citoesqueleto íntegro es de vital importancia en la funcionalidad y supervivencia celular después del proceso de congelación. En un estudio reciente sobre congelación de espermatozoides de bovino se encontraron cambios estructurales en la teca perinuclear (52.5 ± 2.66) consistentes en alteraciones morfológicas de la subestructura de la teca perinuclear y se concluyó que entre mayor sea el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la teca perinuclear menor será el número de espermatozoides vivos (Martínez, 2003). De la misma manera en el semen del cerdo, se encontró un porcentaje significativo ($P < 0.0001$) de alteraciones de la subestructura, con una diferencia porcentual mayor de 35.6% en los espermatozoides descongelados; en comparación con el semen fresco (Arancibia, 2007). Finalmente se ha señalado, que aunque la criopreservación no produce alteraciones aparentes sobre la morfología del núcleo, si se presentan variaciones significativas en la hidrólisis del DNA al emplear la técnica de Feulgen (en esta técnica cada molécula fijada de reactivo de Schiff, se corresponde con una porción constante y equivalente de molécula de DNA, por lo que permite conocer la cantidad de DNA que contiene una muestra), lo que ha sido interpretada como una pérdida en la funcionalidad espermática y que concuerda con lo reportado por Royere *et al.*(1988), Hamamat *et al.*(1990) y Córdova *et al.*(2002), quienes en sus trabajos mencionan no haber encontrado daño en la estructura de la cromatina nuclear, pero si un fenómeno de retraso en el proceso de descondensación que ellos llaman “sobrecondensación”. Por todo lo anterior, queda claro que la congelación-descongelación es una técnica que provoca alteraciones en estructuras espermáticas bien definidas una de las cuales, el citoesqueleto, ha sido relativamente poco estudiado.

2.3 CITOESQUELETO.

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

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

En todas las células la función primaria de los filamentos intermedios es proporcionar resistencia mecánica (Nogales *et al* 1998). La actina es la principal proteína citoesquelética de todas las células de mamíferos y tiene papeles bien establecidos en la regulación de la forma celular, migración e interacción con la matriz extracelular (Howes *et al* 2001). Además una función común de las estructuras citoesqueléticas de actina consiste en fortalecer o modificar la forma de la membrana plasmática (Alberts *et al* 2002). Por su parte, los microtúbulos participan en un gran número de funciones celulares incluyendo la

mitosis, el posicionamiento de organelos, el transporte intracelular a regiones específicas y la locomoción celular (Malhotra y Shnitka, 1991).

PROTEÍNAS ACCESORIAS.

Las funciones de los filamentos del citoesqueleto dependen de proteínas accesorias, cada tipo (microtúbulos, filamentos intermedios y de actina) contiene un grupo importante de dichas proteínas.

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

La dinámica del citoesqueleto de actina está dada principalmente por la capacidad que tiene la célula para polimerizar y despolimerizar los microfilamentos en respuesta a estímulos extracelulares, los cuales actúan a través de varios receptores celulares que encienden mecanismos para regular la dinámica del citoesqueleto a través de diferentes proteínas como: WASP, Arp2/3 y Cdc42 (Delgado-Buenrostro, 2004). Así, en muchos tipos celulares la estructura del citoesqueleto de actina es regulada por GTPasas de la familia Rho, mientras que las múltiples formas y variadas funciones de la actina dependen de un grupo de proteínas de unión a la actina. Por ejemplo la tropomiosina se une a lo largo de los

filamentos de actina y los convierte en estructuras más rígidas, alterando su afinidad por otras proteínas; la filamina entrecruza los filamentos de actina formando geles laxos; la fimbrina y la α -actina forman haces de actina paralelos; la gelsosina media una fragmentación dependiente de calcio de los filamentos de actina. Además, diversas formas de miosina utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para desplazarse a lo largo de los filamentos de actina llevando una carga (por ejemplo, una vesícula, otro filamento, etc.) (Alberts *et al*/2002).

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

En cuanto a los filamentos intermedios, estos son estructuras muy estables y resistentes a la extracción con amortiguadores desnaturizantes. Tal estabilidad podría indicar que son estructuras poco dinámicas. Sin embargo diversos estudios han demostrado que existe el intercambio dinámico de subunidades y un ensamblaje y desensamblaje. La dinámica de ensamblaje esta modulada por la fosforilación de los filamentos intermedios. Las proteínas de los filamentos intermedios son fosforiladas por un gran numero de cinasas y

generalmente la fosforilación inhibe el ensamblaje de las proteínas de filamentos intermedios, facilitando así el desensamblaje de los mismos (Stewart, 1993).

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

2.4 CITOESQUELETO DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE LOS MAMÍFEROS.

La teca perinuclear (TP), también llamada sustancia perinuclear (SP) o matriz perinuclear es el principal citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos (Bellvé *et al.*, 1992). Esta es una cápsula citoesquelética poco tradicional que cubre al núcleo espermático. La TP es ensamblada durante la espermiogénesis entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, llenando efectivamente la mayor parte del espacio citoplasmático disponible en la cabeza espermática; aunque es estructuralmente continua morfológicamente la TP ocupa 2 regiones de la cabeza espermática:

1. La TP de la región subacrosomal (RSA), la cual se encuentra intercalada entre la membrana acrosomal interna (MAI) y la envoltura nuclear (EN).
2. La TP de la región de la hoja postacrosomal (cáliz) se extiende distalmente desde el segmento ecuatorial entre la membrana plasmática y la EN.

Juárez y Mújica (1999), encontraron que la TP de varias especies de espermatozoides (conejo, borrego, bovino, cerdo y cobayo) presenta una subestructura en la porción apical de la hoja postacrosomal, cuya forma es especie – específica y se encuentra rodeando la cabeza espermática a nivel del segmento ecuatorial. La formación de la subestructura ocurre cuando el espermatozoide transita por el epidídimo.

Funcionalmente, durante la espermiogénesis la TP participa en el ensamblaje y en la formación de la cabeza del espermatozoide (Sutovski *et al.*, 2003).

Por otra parte, la TP se caracteriza por su resistencia a la extracción en detergentes no desnaturalizantes y sales altamente amortiguadoras. Esas características son presentadas por las proteínas citoesqueléticas de células somáticas. La TP esta compuesta por muchas proteínas algunas han sido caracterizadas y otras todavía son desconocidas. Algunas de las proteínas son específicas de la TP y otras tienen una distribución general en las células (Mújica *et al.*, 2003).

2.5 IMPORTANCIA DE LA TP EN EL PROCESO DE FERTILIZACIÓN.

Entre las posibles participaciones de la TP durante el proceso de fertilización se encontraran las siguientes:

1. Estructuración del núcleo (Bellvé *et al.*, 1992)
2. Mantenimiento de la integridad de la cabeza espermática al proteger y estabilizar estructuras adyacentes (Paranko *et al.*, 1988)
3. Actuar como un cemento entre el núcleo y las estructuras que la cubren (Courtens *et al.*, 1976)
4. Mantenimiento de dominios de la membrana plasmática (Virnatén *et al.*, 1984; More y Bedford, 1978; Yagi y Paranko, 1995)
5. Penetración del espermatozoide a través de las vestimentas del óvulo (Courtens *et al.*, 1976).
6. Protección del DNA espermático (Sutovsky *et al.*, 1997).
7. Activación del ovocito (Kimura *et al.* 1998).
8. Descondensación del material genético (Juárez – Mosqueda y Mújica, 1999).

En relación a las proteínas presentes en la TP, cabe mencionar que se han identificado proteínas específicas de la TP (Longo *et al.*, 1987; (Oko y Maravei, 1994; Lecuyer *et al.*, 2000). Las proteínas y su posible función en la célula espermática se describen a continuación:

A) Mantenimiento de dominios de la membrana plasmática (MP) (Moore y Bedford, 1978; Virtamen *et al.*, 1984; Yagi y Paranko, 1995). La MP del espermatozoide tiene propiedades únicas en la superficie y está organizada en cinco dominios principales, tres de las cuales se encuentran en la cabeza: el anterior, el del segmento ecuatorial y el de la región posacrosomal (Myles *et al.*, 1981; Primakoff y Myles, 1983; Peterson y Russell, 1985;). Se sabe que receptores implicados en el proceso de fertilización están presentes en

los dominios de la membrana plasmática del espermatozoide. Durante la capacitación y la reacción acrosomal ocurren reacomodos específicos de partículas intramembranas quedando localizadas en dominios diferentes (Yanagimachi, 1994). El dominio de membrana de la región ecuatorial del acrosoma, formado durante la reacción acrosomal, es reconocido por la membrana plasmática del huevo para unirse y fusionarse. La posición y la motilidad de proteínas transmembranales están controladas por vínculos entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Mújica *et al.*, 2003). En esta función se ha involucrado a las proteínas actina, espectrina, cilicina I y cilicina II, estas tres últimas específicas de la TP.

Por otra parte antes y después de la reacción acrosomal la integridad estructural de la región ecuatorial de la membrana plasmática y su funcionalidad en el proceso de fusión de gametos, podría depender de la TP (Sutovsky, *et al* 2003). El análisis ultraestructural de espermátides y espermatozoides ha demostrado una estrecha relación entre la TP y las membranas espermáticas en contacto. Apoyando lo anterior, estudios en espermatozoides sonificados muestran que la MAI permanece unida fuertemente a la TP después de dicho tratamiento (Oko y Maravei, 1994). Adicionalmente, se ha sugerido que existe una interacción estructural entre la matriz nuclear y la TP.

Actina (Panarko *et al.*, 1994; Fouquet *et al.*, 1991, 1990; Flanerty *et al.*, 1988; Tamblyin, 1980 y Clarke y Yanagimachi, 1978). Esta proteína ha sido encontrada en la región posacrosomal de la TP en los espermatozoides de toro, conejo y cerdo, no así en humano y hámster (Flanerty *et al.*, 1986). La actina-F ha sido implicada en la estabilización de la subestructura de la TP, ya que la pérdida de actina-F que ocurre durante la reacción acrosomal en el espermatozoide del cobayo ocasiona la pérdida de la subestructura, al igual

que el tratamiento de las células con citocalasina D (un agente desestabilizador de actina-F) (Juárez-Mosqueda y Mújica., 1999).

Espectrina (Yagi y Paranko, 1995; Kann *et al.*, 1993;). Carmatini *et al.*, (1991) encontraron que la espectrina une proteínas a lo largo de la cara nuclear de la membrana acrosomal interna. Esta proteína juega un papel importante en el citoesqueleto de las células somáticas (Juárez-Mosqueda y Mújica., 1999).

Cilicina I y II fueron localizadas por inmunofluorescencia en la región postacrosomal (cáliz) del citoesqueleto de la TP en espermatozoides obtenidos del epidídimo (inmaduros) y maduros del ser humano y del bovino (Hess *et al.*, 1993). Sugiriéndose un papel estructural para ambas cilicinas (Hess *et al.*, 1993).

B) Penetración del espermatozoide a través de las envolturas del óvulo La hoja subacrosomal le confiere un carácter rígido a la porción anterior de la cabeza espermática, que puede ser significativo en la penetración de las vestimentas del óvulo (Yagi y Paranko, 1995).

C) Activación del ovocito. Posterior a la penetración del espermatozoide al huevo, la TP es removida y las proteínas de ésta son liberadas en el citoplasma. Kimura *et al.*, (1998) encontraron que las cabezas espermáticas tratadas con el detergente Tritón X-100 poseen la capacidad de activar al ovocito, mientras que las cabezas espermáticas tratadas con SDS no. La diferencia entre estos dos tipos de cabezas espermáticas es la presencia o ausencia de la TP. Asimismo, encontraron en la cabeza de espermatozoide de ratón, un factor de

activación del ovocito, SOAF (por sus siglas en inglés), el cual se forma durante la transformación de las espermátidas redondas a espermatozoides (Sutovsky *et al.*, 1997). Por otro lado, Sutovsky, *et al.*, (2003), reportaron que estos factores pueden ser liberados de las cabezas de los espermatozoides de mamíferos por un proceso de congelación-descongelación o por extracción química.

El factor de transcripción Stat 4, se encuentra en niveles muy altos en la TP del espermatozoide maduro. (Herrada *et al.*, 1997). La presencia de un potencial factor de transcripción como Stat 4 en la TP puede sugerir que esta estructura tiene otra función además de la estructural. Se ha observado en estudios *in Vitro* que al reducir los puentes disulfuro de la TP se logra extraer la proteína Stat 4 sin ningún rompimiento proteolítico (Herrada *et al.*, 1997).

D) Descondensación del material genético. Juárez-Mosqueda y Mújica, (1999) indicaron que la formación de la subestructura de la TP está aparentemente relacionada con la estabilidad de la TP requerida para la protección de la cromatina espermática. Sutovsky *et al.*, (1997) enfatizaron la importancia de la eliminación de la TP, para la conversión del núcleo espermático dentro del pronúcleo masculino. A este respecto los primeros autores encontraron que la subestructura de la TP permanece en el espermatozoide capacitado, pero el espermatozoide con reacción acrosomal ya no la presenta, y la región de la TP donde se localizaba la subestructura sufre un desarreglo. Los autores sugieren que este evento en el espermatozoide fertilizante podría resultar en una teca débil, principalmente a nivel de la región ecuatorial, lo cual podría facilitar el desensamble de la TP por el citoplasma del ovocito. Adicionalmente Sutovsky *et al* 1997 sugieren que esta desestabilización de la TP

podría permitir la interacción de las microvellosidades del ovocito con esta estructura para su remoción.

E) Protección del ADN espermático. La continuidad estructural de la TP alrededor del núcleo parece tener un rasgo generalizado en los espermatozoides de mamíferos, por lo que se ha propuesto que esta estructura podría proteger al material genético de alteraciones durante el trayecto del gameto por el tracto reproductivo de la hembra (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Anteriormente, Jager y col. (1990) habían señalado que el proceso de congelamiento y descongelamiento causa alteraciones en el interior del espermatozoide (citoplasma?) que permiten que agentes externos, como la heparina, actúen sobre el material genético de la célula. Más recientemente se demostró que una TP intacta puede bloquear la descondensación del núcleo espermático (Sutovsky et al., 1997).

2.6 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSOMAL

La integridad de las membranas de la cabeza espermática es crucial para la fecundación, ya que sólo el espermatozoide con membranas intactas puede sufrir la capacitación (cambios fisiológicos en los espermatozoides y adquisición de su capacidad fertilizante) (Hamano, K., *et al*/1989; Buhr, 1991) y la reacción acrosomal (Yanagimachi, 1981). A esta última algunos autores la consideran como parte del proceso de capacitación espermática, mientras que otros la consideran como una consecuencia de ésta (Buhr, 1991; Knobill y Nelly, 1998; Crabo, 1985). Durante los pasos finales que proceden a la fertilización, las membranas que rodean la cabeza del espermatozoide experimentan considerables cambios estructurales (Buhr *et al.*, 1989) al igual que otras estructuras. Una de ellas es el acrosoma, organelo

derivado del aparato de Golgi, semejante a un lisosoma, que cubre al núcleo en la región apical de la cabeza espermática e indispensable para que el espermatozoide pueda penetrar al óvulo (Abou-Haila y Tulsiani 2000). Por ello cualquier daño en la estructura fina de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide podría interferir con la capacitación, la reacción acrosomal y/o la fusión del espermatozoide con el óvulo (Buhr *et al.*, 1989).

La capacitación y la reacción acrosomal (RA) son dos procesos fisiológicos que el espermatozoide debe sufrir en secuencia previo a la fusión con el óvulo. Bajo condiciones *in vivo*, el espermatozoide eyaculado requiere de un tiempo de permanencia en el tracto genital de la hembra para adquirir la capacidad fecundante (Visconti *et al* 1995). Esta adquisición se conoce como proceso de capacitación. También se le ha definido como el conjunto de cambios o modificaciones estructurales, que le confiere al espermatozoide la habilidad para sufrir la RA y fertilizar al óvulo (Visconti *et al* 1995). La capacitación también se puede alcanzar bajo condiciones *in vitro*, en un medio químicamente definido que contenga albúmina, fuentes energéticas (glucosa o piruvato) y otros componentes de la solución Krebs-Ringer bicarbonato (Haila y Tulsiani, 2000). Durante la capacitación, algunas de las proteínas espermáticas son removidas y modificadas, el espermatozoide desarrolla una hipermotilidad y la membrana plasmática pierde colesterol. Además se conoce que durante la capacitación, en el espermatozoide ocurre un aumento en la concentración de calcio libre intracelular, asimismo en la fluidez de la membrana plasmática y en el metabolismo energético (Yanagimachi, 1994). Estos cambios son el resultado de la remoción de glicoproteínas y/o proteínas adsorbidas en la superficie del espermatozoide eyaculado, la reorganización de moléculas de la superficie y de la pérdida de colesterol. El requerimiento de calcio presumiblemente es un reflejo de la dependencia

de calcio de la adenilato ciclasa espermática. Esto último se ha sugerido debido a que se ha observado que durante la capacitación existe un incremento en los niveles de adenosil monofosfato cíclico (AMPC) y en la fosforilación de proteínas espermáticas. Una de las proteínas activadas durante la capacitación es la fosfolipasa C que cataliza la conversión de fosfatidilinositol trifosfato en diacilglicerol e inositol trifosfato, los cuales han sido involucrados en el incremento de la fluidez de la membrana plasmática y también del aumento en su capacidad fusogénica.

La RA es un proceso de exocitosis del acrosoma que conduce a la liberación de una gran variedad de enzimas hidrolíticas, principalmente acrosina y hialuronidasa, las cuales son esenciales para que el espermatozoide atraviese las envolturas del óvulo. *In vivo*, la RA es inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida (ZP3, en ratón) que actúa como un ligando para uno o más receptores espermáticos. Inmediatamente después de la unión del espermatozoide (receptor) a la ZP (ligando), la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la membrana plasmática que recubre el acrosoma, lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal. De manera particular, la membrana plasmática de la región ecuatorial no participa en la fusión con la membrana acrosomal externa (Flesch *et al.*, 2000). Observaciones de espermatozoides que se mueven a través de las células de la corona radiada, que rodea la zona pelúcida, han mostrado que sólo espermatozoides con el acrosoma intacto son capaces de penetrar la matriz de dichas células (Cherr *et al* 1986). También se ha observado que espermatozoides con reacción acrosomal espontánea no penetran la corona radiada (Florman y Storey, 1982; Yanagimachi, 1994).

También se ha propuesto que la progesterona secretada por las células que rodean al óvulo

(cúmulo ovigero o corona radiada) y que está presente en el fluido folicular, puede ser un inductor de la RA, aparentemente por su capacidad para unirse a receptores de membrana plasmática (Blackmore *et al* 1991; Meizel *et al* 1997; Baldi *et al* 1999). Sin embargo, debido a que se requiere de altas concentraciones de progesterona para inducir la RA y a que la producción de la hormona por el ovocito no es la adecuada para que puedan inducir la reacción acrosomal por sí sola, se ha sugerido un mecanismo por el cual la ZP y la progesterona inducen la RA. Los espermatozoides con RA presentan modificaciones en la membrana plasmática a nivel de segmento ecuatorial y postacrosomal, presentando proteínas involucradas en la fusión de la membrana plasmática con la membrana del óvulo.

2.7 FUSIÓN DE MEMBRANAS.

Además de la secreción de enzimas, la reacción acrosomal trae como consecuencia la exposición de un nuevo dominio de membrana en el espermatozoide. Por lo que este proceso es necesario para que el espermatozoide adquiriera la capacidad para fusionarse con el ovocito (Kaji y Kudo, 2004). Normalmente, el espermatozoide que ha logrado cruzar las células del cúmulo ovigero y la zona pelúcida, que rodean al ovocito, es el que interactúa con la membrana plasmática del mismo, trayendo como resultado la fusión de gametos. La fusión del gameto se da en la membrana plasmática del segmento ecuatorial del espermatozoide, es decir en el nuevo dominio formado entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática de la región posterior de la cabeza (Yanagimachi y Noda 1970, Bedford *et al* 1979). De las moléculas involucradas en el reconocimiento y fusión espermatozoide/óvulo localizadas en la región ecuatorial postacrosomal de los espermatozoides con RA, se encuentran las proteínas de la familia CRISP 1 (por sus siglas

en inglés, cysteine-rich secretory protein) y de la familia ADAMS (por sus siglas en inglés, a desintegrin and a metalloprotease domain) (Evans 2002). En el caso de las proteínas CRISP 1, se han observado en el segmento ecuatorial de espermatozoides de rata con reacción acrosomal. En los eyaculados de caballos, humanos y *monos rhesus* también se han detectado proteínas de la familia CRISP en la región de la cabeza (Rochwerger and Cuasnicu, 1992, Hayashi *et al* 1996, Schambony *et al* 1998, Sivashanmugam *et al* 1999). De hecho, el tratamiento del espermatozoide de rata con anticuerpos anti CRISP inhibe la fertilización de los ovocitos de la misma especie. (Cuasnicu 1984 y 1990). Adicionalmente la CRISP 1, obtenida del epidídimo de rata, puesta a interactuar con los ovocitos de ratonas y ratas logró reducir la fecundación de los mismos (Rochwerger *et al* 1992, Cohen *et al* 2000). Por otra parte, las proteínas de la familia ADAMS, fertilinas α y β y ciritestina, han sido involucradas en el proceso de adhesión de membranas a través del uso de anticuerpos monoclonales contra estas proteínas (Primakoff *et al* 1987). Los anticuerpos contra estas proteínas interactúan con el espermatozoide y logran inhibir la fertilización (Primakoff *et al* 1987, Hardy *et al* 1997, Yuan *et al* 1987). También la creación de formas recombinantes de fertilinas α y β y ciritestina se unen a la membrana del ovocito de ratona, logran inhibir el proceso de adhesión y asimismo la fertilidad se ve reducida (Evans *et al* 1997, 1998, Bigler *et al* 2000, Zhu *et al* 2000, Takahashi *et al* 2001, Wong *et al* 2002, Eto *et al* 2002, Zhu and Evans 2002). Se cree que la localización adecuada de estas moléculas en la(s) región (es) del espermatozoide que participan en la fusión con la MP del óvulo, puede garantizar que se lleven a cabo de manera secuencial todos los pasos de la fertilización. Por lo que la ausencia de una de estas moléculas en la región adecuada (ecuatorial o postacrosomal) de los espermatozoides con RA, puede alterar de manera

importante el proceso de fertilización (Sánchez, 2002). Las microvellosidades del ovocito rodean al espermatozoide previo a la fusión de gametos, por lo que se sugiere estas estructuras, al igual que el segmento ecuatorial de los espermatozoides tienen moléculas involucradas en el proceso de fusión de membranas. En el ovocito las moléculas que se han visto frecuentemente involucradas en el proceso de interacción de membranas son un miembro de la familia de las tetraspaninas, CD9, y las integrinas. El primer indicio de que la CD9 participan durante la fertilización, fue obtenida a partir de un experimento donde se utilizaron anticuerpos anti CD9 (Chen *et al* 1999). En este trabajo se encontró que el anticuerpo anti-CD9 inhibió la adhesión y fusión subsiguiente del espermatozoide-ovocito. Consistentemente con esto, se encontró que la CD9 está distribuida en toda la superficie del ovocito excepto en la región adyacente al huso mitótico (Kaji y Kudo 2004).

Como se mencionó las microvellosidades interactúan con la membrana plasmática y eventualmente también lo hace con la TP, por lo que se ha sugerido que la unión de las microvellosidades a la TP y su posterior remoción son un paso inicial en el proceso de fertilización de los mamíferos (Sutovsky *et al* 1997).

Finalmente, se ha encontrado que la inyección intracitoplasmática directa del espermatozoide (ICSI), es muy difícil en el bovino, cuya TP es muy gruesa y resistente a la extracción (Perreaut *et al*. 1984). Posiblemente esta característica de la TP le confiere de una mayor capacidad fertilizante al espermatozoide congelado de esta especie, en comparación con las otras especies de mamíferos.

JUSTIFICACION

La disminución de los parámetros reproductivos obtenidos con semen porcino congelado puede ser atribuida a los daños reportados en la integridad estructural de la célula espermática. El efecto que pudieran tener los daños a estructuras como la TP sobre la fisiología del espermatozoide no han sido del todo estudiadas, por lo tanto el presente trabajo se justifica por que es necesario saber más acerca del efecto del daño en la TP durante el congelamiento sobre el proceso de la fertilización.

HIPÓTESIS.

Si la teca perinuclear es dañada por el procedimiento de congelación-descongelación se verá comprometido el proceso de fusión del gameto con el óvulo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si durante el proceso de criopreservación del espermatozoide del cerdo, alteraciones de la TP afectan el proceso de fusión de los gametos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Confirmar el daño causado por el congelamiento en la subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide del cerdo
2. Valorar el proceso de reacción acrosomal espontánea *in Vitro* pre y post descongelamiento del semen del cerdo.
3. Determinar si durante el proceso de capacitación o reacción acrosomal *in Vitro* se ve afectada la estabilidad de la teca perinuclear
4. Estimar si existe una correlación entre alteraciones de la subestructura y la pérdida del acrosoma en los espermatozoides capacitados *in vitro* con reacción acrosomal espontánea.
5. Valorar el proceso de fusión antes y después del descongelamiento del espermatozoide del cerdo empleando fertilización homóloga.
6. Determinar si existe asociación entre el porcentaje de subestructuras alteradas y el porcentaje de fertilidad de los espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS DE SEMEN.

Se trabajaron 6 cerdos híbridos de la Granja San Antonio ubicada en el Municipio de Tlaxicoyan, Estado de Veracruz, México. De cada verraco se tomaron dos eyaculados. Cada eyaculado se dividió en dos muestras, una para ser utilizada en fresco y la otra para ser procesada por congelamiento; haciendo un total de 12 eyaculados. Ambas muestras fueron incubadas para inducir tanto la capacitación (espermatozoides usados para la fertilización *in vitro*) o la reacción acrosomal espontánea (espermatozoides usados para la valoración del estado acrosomal y determinación del estado de la subestructura de la teca perinuclear). Quedando los grupos experimentales como sigue:

Tratamiento 1: Espermatozoides frescos.

Tratamiento 2: Espermatozoides frescos con reacción acrosomal espontánea.

Tratamiento 3: Espermatozoides congelados.

Tratamiento 4: Espermatozoides congelados con reacción acrosomal espontánea.

Tratamiento 5: Fertilización homóloga *in vitro* con espermatozoides frescos capacitados.

Tratamiento 6: Fertilización homóloga *in vitro* con espermatozoides descongelados capacitados.

2. EVALUACIÓN SEMINAL.

Las muestras de semen fueron obtenidas de 6 verracos, 2 eyaculados por animal, por medio de la técnica de la mano enguantada, obteniendo solo la fracción rica de los eyaculados. Inmediatamente se evaluaron las características macro y microscópicas del eyaculado. La motilidad en masa se evaluó colocando una gota del eyaculado sobre un portaobjetos y se observó al microscopio de luz con el objetivo 10X, empleando para la valoración una

escala de 0 (la mas baja) y 5 (la mas alta); la motilidad individual se evaluó mezclando una gota de semen y una gota de solución salina fisiológica en un portaobjetos y observando la muestra al microscopio de luz con el objetivo 40X, haciéndose la valoración en incrementos del 5%. Sólo se emplearon los eyaculados con movimiento rectilíneo progresivo $\geq 70\%$. Los eyaculados fueron diluidos en una relación 1:1 en diluyente MR-A®, atemperado a la misma temperatura a la que fueron obtenidas la muestras. Posteriormente la temperatura se bajó gradualmente hasta alcanzar 18°C, manteniéndolos a esta temperatura hasta el procesamiento de las muestras. Para el conteo espermático 50 μ l de semen diluido fueron adicionados en 1 ml de Triton X-100 al 0.1% diluido en PBS, unas gotas de esta solución fueron colocadas en una cámara de Neubauer y se procedió a contar 5 cuadros, los 4 de la esquina y el del centro, empleando la siguiente fórmula para calcular la concentración: $FD \times N \times 10\,000 \times 5 = \text{número de células por ml}$; donde N es el factor de dilución (21), N el número de células contadas y 5 el número de cuadros. Los espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración de 600×10^6 células/ml.

3. CONGELAMIENTO DE SEMEN.

El semen fue procesado de acuerdo con el método descrito por Westendorf y col., (1975) y modificado por Bwanga y col., (1990). Este se procesó en laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, usando la siguiente metodología:

Componentes de los diluyentes.

Para el procedimiento de congelación de semen los diluyentes, fueron preparados el mismo día de su uso y eran los siguientes:

Diluyente A.

- 1) Dextrosa 2.5 g.
- 2) Yema de huevo 10 ml
- 3) Agua bidestilada cbp 50 ml

Diluyente B.

- 1) Dextrosa 2.5 g.
- 2) Yema de huevo 10 ml
- 3) Glicerol 5 ml.
- 4) Agua bidestilada cbp 50 ml.

Preparación.

Diluyente A.

En una servilleta se colocó la yema del huevo y con un movimiento de sube y baja se retiró la mayor cantidad de clara. En un matraz de 125 ml se colocaron 2.5 g de dextrosa, 10 ml de yema de huevo y se complementó con agua bidestilada cuanto baste para 50 ml.

Enseguida se mezclaron los ingredientes.

Diluyente B.

El diluyente se preparó manera similar al diluyente A, solo que éste fue adicionado con 5 ml de glicerol.

Técnica de congelamiento.

Una vez elaborados los diluyentes A y B se dejaron reposar 10 minutos. A continuación se centrifugaron 10 ml de cada diluyente por separado (400 g x 15 minutos), los sobrenadantes fueron recuperados, colocados en tubos separados previamente identificados, y la pastilla fue descartada. El diluyente A se equilibró a la temperatura que se recibió el semen.

Para el congelamiento, las muestras fueron centrifugadas a 800 g durante 10 minutos y resuspendidas en el diluyente A, a la misma concentración (600×10^6 células/ml), y se dejaron equilibrar hasta alcanzar 5°C , lo cual se alcanzó en promedio a los 90 minutos. Enseguida el diluyente B, atemperado a 5°C , fue adicionado hasta alcanzar una concentración de 300×10^6 células/ml; el procedimiento se realizó en una cámara fría a 5°C , el volumen total de diluyente adicionado fue agregado en 4 fracciones crecientes en lapsos de 10 minutos cada una. Inmediatamente el semen fue envasado en pajillas francesas de 0.5 ml y sellados con plastilina no tóxica. Una vez selladas las pajillas fueron colocadas en vapores de N_2 líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos (las pajillas se colocaron a 4 cm de separación del N_2 líquido), una vez transcurrido este tiempo las pajillas se sumergieron en el N_2 líquido (-196°C) hasta su uso 15 días después.

4. DESCONGELACIÓN

La descongelación del semen se realizó introduciendo las pajillas en baño María a 39°C durante 30 segundos, una vez descongeladas se procedió a realizar la evaluación de la motilidad progresiva como se describió en el paso 1, y se dejaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

5. CAPACITACIÓN Y/O REACCIÓN ACROSOMAL ESPONTÁNEA.

Tanto la capacitación de los espermatozoides para la fertilización homóloga *in vitro*, como la reacción acrosomal espontánea, se realizó en los espermatozoides frescos y descongelados. Para retirar los diluyentes las muestras fueron lavadas tres veces por centrifugación-resuspensión (800 g por 3 minutos) en solución salina fisiológica (NaCl 154 mM). Después del último lavado la pastilla espermática se resuspendió en medio Tyrode completo (TALP, ver Tabla 1) a una concentración de 25×10^6 /ml incubándose a 38° C en atmósfera húmeda con 5% CO₂; a las dos horas de incubación una parte de las células (capacitadas) fueron tomadas y utilizadas para la fertilización *in vitro*, y el resto de las células se dejó incubar por 2 horas más para que presentaran la reacción acrosomal espontánea.

Tabla 1. Medio Completo TALP pH 7.4

Reactivo	Concentración	P.M.(FW)	g/ l	g/ 100ml	g/ 25 ml
NaCl	116mM	58.4	6.774	0.677	0.169
KCl	3.1mM	74.56	0.231	0.023	0.006
MgSO ₄	0.4mM	246.5	0.099	0.010	0.002
NaH ₂ PO ₄	0.3mM	136.091	0.041	0.004	0.001
Glucosa	5mM	180.02	0.900	0.090	0.023
Lactato de Na*	21.7mM	112.1	2.433	0.243	0.061
Piruvato de Na*	1mM	110	0.110	0.011	0.003
Hepes	20mM	238.3	4.766	0.477	0.119
BSA*	3 mg/ml		3.000	0.300	0.075
Kanamicina	100 µg/ml		0.100	0.010	0.003
Rojo fenol	20 µg/ml		0.020	0.002	0.001
CaCl ₂	4.5 mM	111	0.500	0.050	0.012
NaHCO ₃	15 mM	84.02	1.26	0.126	0.032

El hepes se adicionó a 20°C y a un pH de 7.6. Una vez mezclados estos ingredientes se congeló y se almacenara hasta su uso.

* Estos componentes se adicionan el día del uso y la BSA se debe hacer a un pH de 7.4

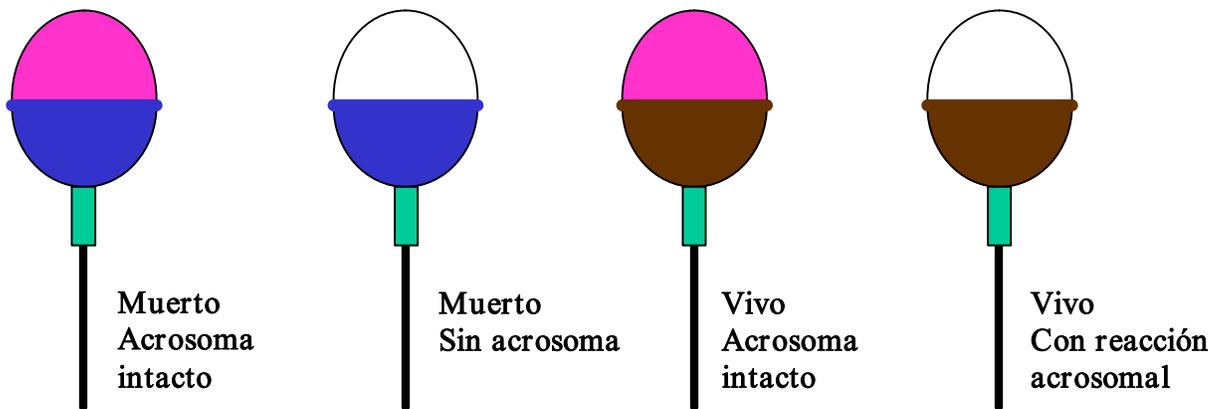
6. VALORACIÓN DEL ESTADO FISIOLÓGICO.

Esta se realizo tanto a espermatozoides frescos como en los descongelados antes y después del proceso de reacción acrosomal espontánea. Para la valoración se utilizó el método de Talbot y Chacón (1981). A continuación se describe la metodología:

- A. Colocar en un tubo 100 μ l de semen, previamente lavado por centrifugación-resuspensión (400 g por 3 minutos) en solución salina fisiológico, a una concentración de 35×10^6 células/ml y adicionar 100 μ l de azul tripán al 2% en PBS, e incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- B. Lavar la muestra espermática en PBS por centrifugación-resuspensión, hasta que desaparezca el colorante.
- C. Fijar las células adicionando 0.5 ml glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato (1 mM, pH 7.4). Incubar 30 minutos a 4 °C.
- D. Centrifugar a 250 g por 8 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de PBS, centrifugar a 250 g por 8 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender en PBS en el volumen original.
- E. Colocar una gota de la suspensión en un portaobjetos, preparar un frotis y dejarlo al aire hasta que seque.
- F. Incubar los frotis con Café Bismack al 8% en agua desionizada, pH 1.8 (HCl 2 N), a 37 °C durante 15 minutos.
- G. Enjuagar con agua y escurrir.
- H. Incubar con Rosa de Bengala al 0.8% en amortiguador Tris 0.1 M, pH 5.3. a temperatura ambiente por un minuto.
- I. Enjuagar y montar las muestras para su evaluación al microscopio de luz.

Interpretación:

- i. Cabeza rosa- región postacrosomal azul: espermatozoides muertos con acrosoma intacto.
- ii. Cabeza blanca-región postacrosomal azul: espermatozoides muertos sin acrosoma.
- iii. Cabeza rosa-región postacrosomal café: espermatozoides vivos con acrosoma intacto.
- iv. Cabeza blanca-región postacrosomal café: espermatozoides vivos con reacción acrosomal



7. GRADIENTE DE FICOLL

Se utilizó un gradiente discontinuo de Ficoll para separar a los espermatozoides capacitados (con acrosoma) de los capacitados con RA espontánea (sin acrosoma) y con ello determinar el efecto de estos eventos sobre la estabilidad de la teca perinuclear. Es decir, espermatozoides con y sin acrosoma fueron separados después de la capacitación y

reacción acrosomal espontánea. El gradiente discontinuo se realizó, colocando 1 ml de cada una de las siguientes concentraciones de Ficoll 2.5%, 5% y 10% en un tubo de ensaye., quedando la mayor concentración en el fondo del tubo, sobre el gradiente se colocó 1ml de la muestra espermática a una concentración de 25×10^6 células/ml. Las muestras se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Los espermatozoides encontrados en interfase 2.5-5% (gradiente 1) fueron recuperados al igual que los encontrados de la interfase 5%-10% (gradiente 2). Ambas muestras fueron divididas en dos partes, una para ser procesada para la valoración de las células por triple tinción y la otra para exponer la superficie de la teca perinuclear y valorar la integridad de la misma.

8. EXPOSICIÓN Y VALORACIÓN DE LA TECA PERINUCLEAR.

Para exponer la TP en las células espermáticas se utilizó el detergente Brij 36-T. Para el tratamiento los espermatozoides fueron lavados en solución salina (NaCl 154 mM) y la concentración fue ajustada a 35×10^6 células/ml. A las muestras se les adicionó el Brij 36-T (1.2% concentración final) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Inmediatamente después al tratamiento con Brij los espermatozoides fueron fijados en fijador de Karnovsky (1965) por 20 minutos a temperatura ambiente y procesada para su observación al microscopio electrónico.

9. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las muestras fijadas en Karnovsky fueron lavadas dos veces por centrifugación-resuspensión (400 g por 3 minutos) en PBS y dos veces en agua destilada y resuspendida en esta última en su volumen inicial. Después las muestras espermáticas fueron adsorbidas en

rejillas de cobre de 200 mesh cubiertas con membranas de soporte colodión-carbón. Para ello, con la cara cubierta de la rejilla se tocó la superficie de una gota de la suspensión espermática, se esperaron entre 5 y 10 minutos para que los espermatozoides quedaran adheridos a la membrana. Con el filo de un papel filtro se retiró el exceso de muestra y se dejaron secar. Las células fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 0.02% en solución acuosa durante tres minutos y se enjuagaron pasando la rejilla en una gota de agua destilada. Las rejillas fueron colocadas sobre papel filtro en cajas de Petri y se cubrieron para permitir que secaran. El procedimiento de las muestras se realizó en el departamento de Morfología de la FMVZ de la UNAM y las muestras se observaron en la Unidad de Microscópica Electrónica de la misma Facultad, empleando un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM-9, operado a 50 kV

10. OBTENCIÓN Y MADURACIÓN DE OVOCITOS.

Con el fin de evaluar si el daño en la teca ocasionado durante el proceso de congelación-descongelación compromete el proceso de fusión del gameto, espermatozoides frescos y descongelados previamente capacitados durante dos horas se pusieron a interactuar con ovocitos maduros de la misma especie. Se fertilizaron 10 ovocitos por cada muestra de eyaculado (5 con semen fresco capacitado y 5 con semen descongelado capacitado), obteniendo al final 120 ovocitos fertilizados para esta valoración (60 fertilizados con semen fresco y 60 fertilizados con semen descongelado). Los ovocitos se obtuvieron y maduraron bajo el siguiente protocolo:

- 1) Los ovarios fueron obtenidas de cerdas recién sacrificadas en el rastro de Vargas,

Municipio de Veracruz, Ver., y transportados en solución salina a 37° C al laboratorio de Fertilización in vitro de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana

- 2) Al llegar al laboratorio los ovarios fueron colocados en cajas de Petri y lavados con solución salina, a 37° C, tres veces (Selles y col 2003).
- 3) Posteriormente con ayuda del microscopio estereoscópico se puncionaron los folículos de 3 a 5 mm de diámetro, para ello se usó una jeringa estéril con aguja calibre 21 (aguja verde 21 x 32). El líquido folicular obtenido se colocó en cajas de Petri llevando con él a los ovocitos.
- 4) Para la maduración solo se seleccionaron los ovocitos que mostraron una capa de células foliculares compacta, empleando para este fin una pipeta Pasteur alargada, con diámetro ligeramente superior al del ovocito.

Tabla 2. Medio de Maduración para ovocitos de cerda
TCM 199 2.5 mM
Hepes 2.5 mM
Cisteína 100 µg/ml
Fluido folicular porcino* 10% (v/v)
Suero de bovino neonato 10% (v/v)
Piruvato 0.91 mM
<u>Suplementos:</u>
FSH 0.5 µg/ml
LH 0.5 µg/ml
Gentamicina 50 µg/ml
<i>El fluido folicular porcino será obtenido en el laboratorio por punción folicular y filtrado, para su almacenamiento y utilización.</i>

- 5) Los ovocitos seleccionados fueron colocados en una gota de 60 μ l de medio de maduración suplementado (Ver tabla 2)
- 6) Se colocaron 10 ovocitos por micro gota de medio de maduración (60 μ l), cubierta con aceite mineral y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂.
- 7) Después de 22 horas de incubación, los ovocitos fueron transferidos a un medio fresco de maduración sin suplementación hormonal, lavados en dos ocasiones e incubados nuevamente por un tiempo de 22 horas (Funahasi y Day 1993) bajo las mismas condiciones

10. VALORACION DE LA MADURACIÓN DE LOS OVOCITOS.

Los ovocitos maduros se seleccionaron en base a su integridad, presencia de las células de la granulosa semiexpandida, zona pelúcida nítida y/o presencia del cuerpo polar.

10. FERTILIZACIÓN *IN VITRO*.

Para retirar la zona pelúcida, los ovocitos maduros seleccionados fueron colocados en cajas de cultivo de plástico estériles de 4 pozos; cada uno con 60 μ l de medio de cultivo TALP (suplementado con piruvato de sodio 0.25 μ M, BSA libre de ácidos grasos 6 mg/ml, y gentamicina 50 mg/ml) y se les adicionó hialuronidasa al 0.1% en TALP durante 2 minutos. Inmediatamente, se les adicionó tripsina al 0.025% durante 3 minutos, después de este lapso se transfirieron a una gota con inhibidor de tripsina al 0.15%. Enseguida, los ovocitos se lavaron con TALP y se incubaron en gotas de 60 μ l del mismo medio a 37° C en cámara húmeda con un ambiente de 5% de CO₂ por 4 hrs, en presencia de espermatozoides capacitados.

11. VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FUSIÓN.

Para la evaluación de la fusión, se utilizaron 5 ovocitos fertilizados con semen fresco y 5 con semen descongelado por cada eyaculado obtenido, obteniendo al final 60 ovocitos por tratamiento. Para ello las muestras fueron tratadas para su observación por microscopia electrónica para lo cual los ovocitos fertilizados se fijaron en glutaraldehído al 3% (v/v) en PBS, durante una hora. Enseguida se retiró el amortiguador lavando 3 veces las muestras en PBS por centrifugación-resuspensión (2500 rpm por 3 minutos), posteriormente se posfijaron con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en PBS durante 2 dos horas. Las muestras fueron lavadas 3 veces con agua desionizada filtrada e incluidas en agarosa; para ello se mezclaron 50 μl de agarosa y 50 μl de agua destilada colocándose los ovocitos y se dejó que solidificara la agarosa. Para la deshidratación, las muestras incluidas en agarosa fueron colocadas en tubos y tratadas con concentraciones crecientes de alcohol etílico (30, 50, 70, 80 y 90% y dos pasos del alcohol al 100%), el tratamiento en cada paso fue de 10 minutos, excepto los de 100% que fueron de 20 minutos cada uno. Las muestras deshidratadas fueron infiltradas en resina de Spurr. Se obtuvieron cortes finos seriados de cada ovocito fertilizado, los cuales se montaron en rejillas de cobre, teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados al microscopio electrónico de transmisión (Sánchez 2002).

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

1. Para evaluar el daño de la estabilidad morfológica de la teca perinuclear, se utilizó un análisis de diferencia de medias. Donde los tratamientos fueron: semen fresco, semen fresco capacitado con RA espontánea, semen descongelado y semen

descongelado capacitado con RA espontánea y la variable dependiente fue el estado de la subestructura.

2. Para valorar la integridad del acrosoma en las diferentes muestras de semen se utilizó un análisis de diferencia de medias. Donde los tratamientos fueron: semen fresco, semen fresco capacitado con RA espontánea, semen descongelado, y semen descongelado capacitado con RA espontánea y la variable dependiente fue el estado del acrosoma.
3. Para determinar si había relación entre el daño en la subestructura de la teca perinuclear y la presencia o ausencia de acrosoma, espermatozoides capacitados y espermatozoides capacitados con RA, respectivamente, se hizo un análisis de correlación

RESULTADOS.

1. Morfología de la subestructura de la Teca perinuclear.

La morfología de la subestructura fue usada como marcador morfológico de daño sobre la teca perinuclear. La figura 1A muestra una cabeza espermática con la subestructura íntegra, la cual se encontró localizada en la parte apical de la región postacrosomal de la TP con un arreglo continuo en forma de grecas; la figura 1B muestra la cabeza de un espermatozoide con la subestructura ausente mientras que la figura 1C muestra una cabeza espermática con la subestructura alterada, en la cual se presentó la pérdida en la continuidad de las grecas de la misma.

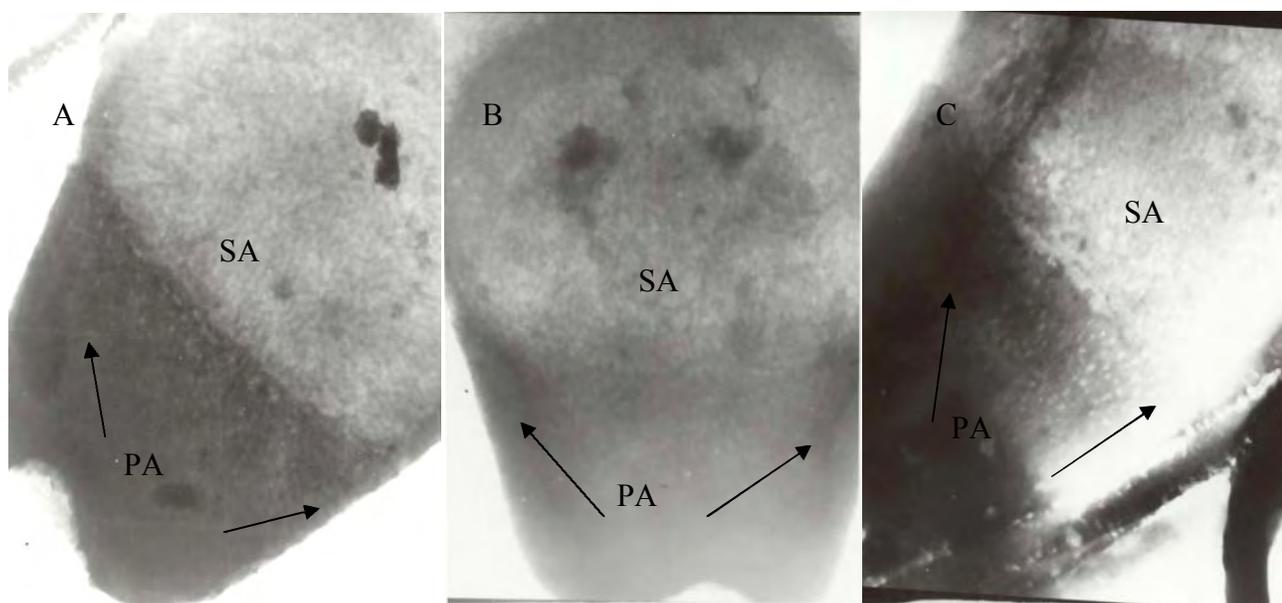


Figura 1. Micrografía Electrónica de Espermatozoide de Cerdo con la TP expuesta (20000X). A: cabeza de un espermatozoide, mostrando la subestructura íntegra. B: la cabeza de un espermatozoide mostrando la ausencia de subestructura. C: espermatozoide con la subestructura alterada. SA: región subacrosomal. PA: región postacrosomal.

2. Estabilidad morfológica de la subestructura de la teca perinuclear.

Esta valoración se realizó en los espermatozoides frescos, frescos capacitados con RA espontánea, descongelados y descongelados capacitados con RA espontánea.

Tabla 3. Porcentaje promedio de espermatozoides con subestructura dañada en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FRESCO	6.6 ^a	3.0	1.7
FRESCO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	51.6 ^b	7.6	4.4
DESCONGELADO	70 ^c	4.5	2.6
DESCONGELADO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	82.6 ^c	2.5	1.4

Literales diferentes indican diferencias de medias ($P < 0.01$)

En promedio los espermatozoides frescos presentaron el menor porcentaje de daño sobre la subestructura de la TP (6.6 %), mientras que el porcentaje mayor se presentó en los espermatozoides capacitados con RA espontánea (82.6%). El análisis estadístico entre medias indicó diferencias significativas entre los espermatozoides frescos contra el resto de las muestras ($P < 0.01$); también hubo diferencia entre los espermatozoides frescos capacitados con RA espontánea y los espermatozoides descongelados capacitados con RA espontánea; no habiendo diferencias entre los descongelados (Tabla 3).

3. Evaluación de la integridad del acrosoma su relación con la integridad de la subestructura de la teca perinuclear.

Para valorar el acrosoma y el estado fisiológico de los espermatozoides en los diferentes tratamientos se utilizó la técnica de triple tinción (ver material y métodos). En la figura 4 se presentan los patrones observados según el estado fisiológico de los espermatozoides.



Figura 4. Microscopía de luz de un frotis de espermatozoides de cerdo mostrando los patrones de tinciones valorados con la técnica de triple tinción. (a) Espermatozoide vivo con acrosoma íntegro, (b) espermatozoide vivo con reacción acrosomal, (c) espermatozoide muerto acrosoma íntegro y (d) espermatozoide muerto con reacción acrosomal.

En la tabla 4 se muestran los promedios de espermatozoides sin acrosoma para cada uno de los tratamientos.

Tabla 4. Porcentaje de espermatozoides sin acrosoma en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	ERROR ESTANDAR
FRESCO	9.1 ^a	3.7	1.5
FRESCO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	52.5 ^b	7.6	4.4
DESCONGELADO	59.1 ^b	10.2	4.4
DESCONGELADO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	60.8 ^b	9.6	3.7

Literales diferentes indican diferencias de medias ($P < 0.01$)

Los resultados mostraron que los espermatozoides frescos presentaron el porcentaje más bajo de pérdida de acrosoma (9.1%), mientras que después de la capacitación y RA espontánea el porcentaje se incremento a 52.5, siendo muy similar a este último porcentaje lo observado para las muestras descongeladas (59.1%) y en estas mismas después de la capacitación y reacción acrosomal espontánea (60.8%). Encontrándose diferencia estadística entre los frescos ($P < 0.01$) y el resto de los tratamiento, en tanto que entre los otros tratamientos no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$).

Al hacer la comparación entre el estado que guardó el acrosoma y la subestructura de la teca perinuclear para cada uno de los diferentes tratamientos, no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre el porcentaje de células con la subestructura de la TP dañada y las que presentaron el acrosoma ausente en las muestras provenientes de semen fresco, en el fresco capacitado con reacción acrosomal espontánea y en semen descongelado, no así en los

espermatozoides descongelados capacitados con reacción acrosomal espontánea; siendo este tratamiento el único donde se observó diferencia entre ambos promedios de daño ($P < 0.01$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación entre los porcentajes de daño sobre la subestructura de la TP y la ausencia de acrosoma en las muestras espermáticas bajo diferentes condiciones.

	Fresco (%)	Fresco capacitado con RA espontánea (%)	Descongelado (%)	Descongelado capacitado con RA espontánea (%)
Subestructura de la TP dañada	6.6 ^a	51.6 ^a	70.0 ^a	82.0 ^a
Espermatozoides sin acrosoma	9.1 ^a	52.5 ^a	59.1 ^a	60.8 ^b

Literales diferentes entre columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Por otra parte, al evaluar el estado fisiológico de este tipo de muestras se encontró que del total de espermatozoides frescos sin acrosoma antes y después del proceso reacción acrosomal espontánea el 6.6% y 48.1% respectivamente eran vivos, mientras que en los descongelados los porcentajes fueron de 46.3 y 41.5 también respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del estado fisiológico (vivos o muertos con y sin acrosoma) de los espermatozoides por tratamiento.

TRATAMIENTO	VIVOS CON ACROSOMA	VIVOS CON REACCIÓN ACROSOMAL	MUERTOS CON ACROSOMA	MUERTOS CON REACCIÓN ACROSOMAL
FRESCO	88.3^a (DS 8.0, EE 3.2)	6.6^c (DS 4.2, EE 1.7)	2.5^c (DS 4.1, EE 1.7)	2.5^c (DS 2.7, EE 1.1)
FRESCO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	45.6^b (DS 12.7, EE 5.2)	48.1^b (DS 9.4, EE 3.8)	1.8^c (DS 2.9, EE 1.2)	4.5^c (DS 3.0, EE 1.2)
CONGELADO	34.8^b (DS 9.4, EE 3.8)	46.3^b (DS 14.7, EE 6.0)	6.0^c (DS 3.7, EE 1.5)	12.7^c (DS 6.3, EE 2.6)
CONGELADO CAPACITADO CON RA ESPONTANEA	30.1^b (DS 8.4, EE 3.4)	41.5^b (DS 15, EE 6.1)	9.0^c (DS 3.7, EE 1.5)	19.3^b (DS 10.6, EE 4.3)

Diferentes literales entre columnas y líneas indican diferencias estadísticas. (P<0.01). DS: desviación estándar; EE: error estándar.

4. Efecto de la presentación de la reacción acrosomal sobre la estabilidad de la subestructura de la TP.

Para determinar si existían alteraciones morfológicas en la subestructura de la TP, producto de la capacitación o de la RA, y por ende si esta se relacionaba con la pérdida del acrosoma, espermatozoides frescos fueron incubados en un medio de capacitación hasta presentar RA espontánea y después fueron centrifugados en un gradiente discontinuo de Ficoll, para separar a los espermatozoides con y sin acrosoma (capacitados y capacitados con reacción acrosomal, respectivamente). Los primeros fueron obtenidos mayormente en la interfase 5-10% (gradiente 2) (79%) y los segundos en la interfase 2.5%-5% (interfase 1) (80%) (Tabla 6). Al evaluar la subestructura de la TP de los espermatozoides obtenidos en ambos gradientes, se encontró que en el primero se presentó el mayor porcentaje (81) de daño en

la subestructura de la TP, mientras que en el segundo la mayor parte de las subestructuras estuvieron intactas (83%) (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de espermatozoides con la subestructura de la TP intacta o alterada; con y sin acrosoma obtenidos del gradiente discontinuo de Ficoll.

	GRADIENTE 1 (2.5 A 5%)	GRADIENTE 2 (5-10%)
<i>STP INTACTA (%)</i>	19 ^a	83 ^b
<i>STP AUSENTE (%)</i>	81 ^a	17 ^c
<i>CON ACROSOMA (%)</i>	21 ^a	80 ^b
<i>SIN ACROSOMA (%)</i>	79 ^a	20 ^c

^a no hay correlación; STP: subestructura de la TP.

^b $r = 0,9462$ | $p = 0,0043$,

^c $r = 0,9462$ | $p = 0,0043$

Al comparar los valores se encontró que en gradiente 2 existió una correlación entre los espermatozoides que mantuvieron la subestructura de la TP intacta y el acrosoma integro y entre aquellos que mostraron la subestructura ausente y los que presentaban reacción; no así entre los espermatozoides obtenidos en el gradiente 1.

Adicionalmente, se realizó análisis del estado fisiológico de los espermatozoides (vivos con acrosoma integro, vivos con reacción acrosomal, muertos con acrosoma integro y muertos con reacción acrosomal) separados en el gradiente de Ficoll y la relación de dicho estado con la presencia o ausencia de la subestructura de la TP, los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación del Estado fisiológico y del estado de la subestructura, en semen fresco y fresco capacitado con reacción acrosomal espontánea.

	Vivos acrosoma integro (%)	Vivos con RA (%)	Muertos acrosoma integro (%)	Muertos con RA (%)	Subestructura de la TP INTACTA (%)	Subestructura de la TP AUSENTE (%)
Ficoll Gradiente 1	16.7 ^a	56.6 ^b	8.3 ^c	18.4 ^a	22.9 ^a	77.1 ^b
Ficoll Gradiente 2	56.0 ^b	16.3 ^a	20.0 ^a	7.7 ^c	75.0 ^b	25.0 ^a

Literales diferentes entre columnas y/o filas indican diferencia estadística (P<0.01)

En el gradiente 1 se encontraron diferencias entre el estado fisiológico de los espermatozoides evaluados, presentándose con más frecuentes los vivos con RA (56.6%), siendo estos diferentes estadísticamente entre los demás; no habiendo diferencia entre el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma integro (16.7%) y los muertos con RA (18.4%), mientras que los muertos con acrosoma integro (8.3%) fueron estadísticamente diferentes (P<0.05) con los demás. En este gradiente también hubo diferencia (P<0.05) entre el porcentaje de espermatozoides con la subestructura ausente y los que la conservaron intacta. En el gradiente 2 se observó con mayor frecuencia espermatozoides vivos con acrosoma integro (56.0%) mientras que en menor porcentaje los muertos con RA (7.7%), ambos fueron diferentes del resto (P<0.05); no se encontró diferencia entre los espermatozoides vivos con RA (16.3%) y los muertos con acrosoma integro (20.0%) (P>0.05). También existió diferencia entre los espermatozoides con presencia o ausencia de la subestructura (P<0.05) en este gradiente.

6. Fusión de Gametos.

En relación a este punto los resultados son parciales ya que faltan por observar al MET la mayor parte de las muestras obtenidas con esta finalidad.

En la figura 5 se presenta el corte de un ovocito fertilizado con semen fresco observándose un espermatozoide sufriendo la RA al contacto con la ZP pelúcida, la cual no fue digerida con el tratamiento dado para tal fin.

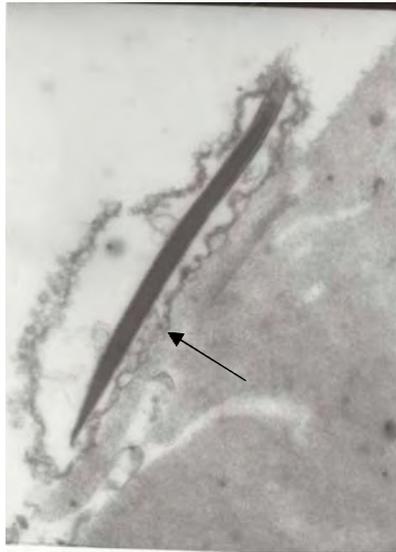


Figura 5. Microscopía electrónica de la cabeza espermática, interactuando con la ZP del ovocito. La flecha indica el sitio de interacción entre la ZP y la membrana plasmática del óvulo (12000X)

La figura 6 corresponde a uno de los cortes seriados de un ovocito fertilizado con semen descongelado en el cual no se observó la interacción de algún gameto masculino.

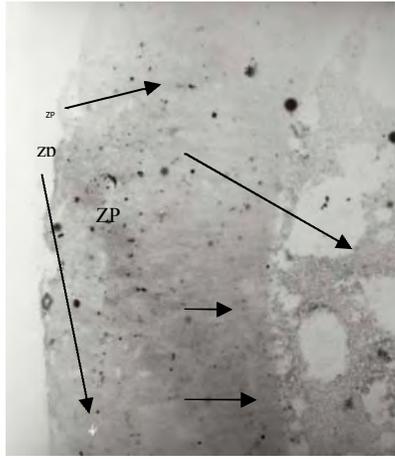


Figura 6. Microscopia electrónica de un ovocito de cerda maduro fertilizado con semen descongelado. Las flechas indican la presencia de gránulos corticales (4400X)

DISCUSIÓN.

El entendimiento de la respuesta del espermatozoide al proceso de criopreservación es de vital importancia para comprender los factores que afectan la sobrevivencia de la célula. En este estudio se retomo el daño que sufre la subestructura de la TP con la finalidad de

relacionar las alteraciones que sufre la misma con la baja en la fertilidad del semen de cerdo criopreservado.

La subestructura al igual que en otros trabajos se utilizó como marcador morfológico para evaluar la integridad de la teca perinuclear (Ellis, *et al.*, 2002, Gutiérrez-Pérez, 2006 y Martínez, *et al.* 2007). Al evaluar la morfología de la subestructura se encontró que esta presentó la forma característica de grecas como fue descrito por Arancibia *et al.* (2007). Anteriormente se había propuesto que dicha subestructura presentaba la forma de “pestañas” (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999), sin embargo en nuestro estudio no se observó, lo que apoya la propuesta de que esta morfología se presenta en muy bajo porcentaje en el espermatozoide de cerdo criopreservado por lo que puede ser considerada en si como una alteración de la misma (Arancibia *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos apoyan lo reportado previamente por Arancibia *et al.* en el espermatozoide del cerdo y por Martínez *et al.* (2006) en el espermatozoide del bovino, de que el proceso de criopreservación ocasiona daños en la estabilidad de la TP.

Por otra parte, tomando como modelo a los espermatozoides frescos, encontramos que la incubación de los espermatozoides en un medio de capacitación, para inducirles la RA espontánea, incrementó el porcentaje de espermatozoides con daño en la subestructura. Este hallazgo ya había sido reportado en el espermatozoide capacitado con RA de cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999). Por lo que posiblemente este sea un evento común en el espermatozoide de los mamíferos que se propone sea uno de los pasos en los que proteínas de la TP participen en el proceso de fertilización, ya sea para que el espermatozoide sea introducido al citoplasma del ovocito por la interacción de esta con las microvellosidades del mismo o para que los agentes descondensantes puedan penetrar al núcleo para descompactar el DNA espermático (Sutovsky *et al.*, 2003).

Para valorar si el estado del acrosoma se relacionaba con la integridad de la subestructura de la TP, en este estudio se hizo la separación de los espermatozoides con y sin acrosoma, confirmando que existe una relación entre la estabilidad de ambas estructuras. Es decir si la subestructura de la TP se mantiene intacta el espermatozoide conserva el acrosoma, mientras que si ésta se encuentra dañada el acrosoma se pierde. Trabajos anteriores han puesto de manifiesto que fallas en la diferenciación de la TP producen espermatozoides sin acrosoma (espermatozoides de “cabeza redonda”) (Escalier, 1990). Más aún, Longo *et al.* (1987) han sugerido que las proteínas de la TP pueden contribuir a la asociación núcleo-acrosoma proporcionando una especie de cemento intermembranoso.

En cuanto al semen descongelado diversos estudios señalan que el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma aumenta después del proceso (Fiser *et al.*, 1993; Green y Watson, 2001; Petrunkina, *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007), lo cual concuerda con nuestras observaciones ya que después del proceso de criopreservación el porcentaje pasó de 9.1 a 59.1; cabe mencionar que de este último porcentaje el 46.3% se mantiene vivo. De manera tradicional, por ser un método sencillo y rápido, la motilidad de los espermatozoides, antes y después de su congelación, ha constituido el parámetro de elección para determinar el grado de integridad celular y por lo tanto la fertilidad del semen para IA, sin embargo dicha valoración no es la más adecuada ya que nuestros datos muestran que casi la mitad de las células que se conservan vivas y posiblemente motiles no conservan su potencial fertilizante ya que los espermatozoides con RA (sin acrosoma) no podrán interactuar con el óvulo. Crister *et al.* (1987) reportan que espermatozoides descongelados motiles no mantienen la capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco.

Por otra parte, el proceso de capacitación no aumento el porcentaje de espermatozoides con RA en el semen descongelado. Diversas investigaciones han señalado que posiblemente las alteraciones en la célula espermática que conducen a la “criocapacitación” o falsa capacitación se deban a la perdida de la selectividad de la membrana plasmática ocasionada por la salida o migración de proteínas y fosfolípidos de la misma y con ello el incremento en la concentración de calcio y sodio en la célula ((Green y Watson, 2001; Maxwell y Jonson, 1997; Makiko *et al.*, 2002). Otros investigadores han señalado el hecho de que alteraciones del citoesqueleto en el espermatozoide del cerdo comprometen el proceso de osmosis (Petrunkina *et al.*, 2005). Nuestros resultados apuntan a que posiblemente ambos fenómenos se deben a las alteraciones que presenta el espermatozoide sobre la TP. Posiblemente el daño sobre la TP, ocasionado en el espermatozoide criopreservado, involucre a otras proteínas no solamente a las de la subestructura, lo cual pudiera estar interfiriendo con la capacitación y/o la RA. Recientemente, en el espermatozoide criopreservado de cerdo, demostramos que el proceso de criopreservación modifica el patrón de localización de la actina (Martel 2006), el cual concuerda con la modificación que sufre esta proteína después del proceso de capacitación y reacción acrosomal (Catellani y Ceresa, 1992, 1993; Delgado-Buenrostro, 2004); también en la misma especie mostramos que este cambio en la localización de actina retrasa el proceso de descondensación del núcleo espermático (Gutiérrez, 2006). Adicionalmente, la actina-F ha sido implicada en la estabilización de la subestructura de la TP en el espermatozoide del cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Nosotros inferimos que el proceso de congelación-descongelación puede resultar en cambios en los microfilamentos (actina-F) que forman parte de la PT, lo que podría estar interfiriendo de alguna forma en el espermatozoide durante la capacitación. Cabe mencionar que en este tipo de células

(descongeladas e incubadas para inducir la RA espontánea), el porcentaje de daño presente en la subestructura de la TP y la pérdida de acrosoma no presentaron una relación, lo que posiblemente se deba a lo mencionado. En otro tipo de células se ha establecido plenamente que algunos componentes del citoesqueleto son especialmente sensibles a la temperatura, específicamente estas sufren una despolimerización prematura de los microfilamentos de actina (Watson 2000).

Durante el proceso de fertilización la interacción de membranas entre el óvulo y el espermatozoide conduce a la integración de las mismas para generar un embrión diploide. La fusión espermatozoide-óvulo en los mamíferos se inicia a nivel de la región ecuatorial de la cabeza espermática (Bedford et al., 1979; Yanagimachi, 1994). Se ha sugerido que la integridad estructural de la membrana en esta región y por lo tanto de su competencia funcional para participar en la fusión depende de la presencia de lámina externa de la PT, que se encuentra localizada inmediatamente por debajo de la membrana en esta región de la cabeza espermática (Breitbart et al., 2005). Previamente se había encontrado que la TP del espermatozoide criopresevado del cerdo sufre daños en su subestructura, localizada precisamente por debajo del segmento ecuatorial de la cabeza (Arancibia et al., 2007), lo cual fue corroborado en nuestro estudio. Nuestros resultados obtenidos hasta el momento por microscopía electrónica para valorar el proceso de fusión entre los gametos, señalan que los espermatozoides criopreservados no son capaces de fertilizar a los óvulos. Sin embargo faltan por observar varias muestras y una vez realizada la observación, hacer el análisis estadístico para establecer si existe una relación entre las alteraciones de la TP y el porcentaje de fertilización observado. Por otra parte cabe señalar que existen reportes en el bovino de la interacción entre la membrana plasmática del óvulo y la TP (Breitbart et al., 2005).

En conclusión nuestro trabajo apoya a lo que se ha reportado, en el sentido de que la congelación induce cambios similares a los que ocurren durante la capacitación (Green y Watson, 2001 Maxwell y Jonson, 1997), y esto sugiere que la baja fertilidad en el semen criopreservado puede ser parcialmente debido a este fenómeno de crio-capacitación o reacción acrosomal espontanea (Watson, 2000; Green y Watson, 2001).

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio se observó que la criopreservación del semen porcino afecta la integridad de la subestructura y que este daño se puede relacionar con la reacción acrosomal. También se ha observado en este estudio que el proceso de congelamiento

compromete el proceso de reacción acrosomal *in vitro*. Asimismo la reacción acrosomal *in vitro* compromete la estabilidad de la subestructura de la teca perinuclear. Debido a que no hay estudios previos concernientes a el efecto de la criopreservación sobre la reacción acrosomal y la integridad de la subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide porcino, este trabajo aporta información importante que pudiera usarse para futuras investigaciones sobre si el daño en la integridad de la teca perinuclear puede afectar otras funciones espermáticas y si tiene un papel mayor en el proceso de decremento en la viabilidad espermática.

BIBLIOGRAFÍA.

Abou-Haila, A and Tulsiani, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and

function. Archives of Biochemistry and Biophysics. 379: 173-182 (2000)

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

Allen, C.A. and Green, D.P.L. Monoclonal antibodies wich recognize equatorial segment epitopes presented de novo following the A23187- induced acrosome reaction of guinea pigs sperm. Journal of Cell Science 108: 767-777. (1995)

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology 21:1-7. (2000)

Baldi, E.; Luconi, M., Bonaccorsi, L., Maggi, M., Francavilla, S., Gabriele, A., Properzi, G. And Forti, G. Nongenomic progesterone recptor on human spermatozoa: Biochemical aspects and clinical implications. Steroids 64: 143-148 (1999).

Bedford; J.M., Moore; h.D. and Franklin, L.E. Significance of the equatorial segment of the acrosome og the spermatozoon in eutherian mammals. Experimental Cells Research. 119:119-126 (1979).

Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS, Barth AH. The perinuclear matrix as structural element of the mouse sperm nucleus. Biology of Reproduction; 47: 451-456 (1992)

Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M., Almeida, E., Osburne,L., and White, J. Sequence-specific ineraction between the desintegrin domain of mouse ADAM2 (fertilin β) and murine eggs: role of the $\alpha 6$ integrine sub unit. Journal of Biology and Chemistry 275:11576-11584 (2000).

Blackmore, P., Neulen, J., Lattanzio, F. and Beebe, S.J. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. Journal of Biology Chemical 266: 18655-18659. (1991).

Breitbart H, Naor Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Review Reproduction* 4:151-159. (1999)

Breitbart H, Spungin B. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molec Human Reproduction* 3:195-202. (1997)

Brewis IA, Wong, CH. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Review Reproduction*;4:135-142. (1999)

Brucker C, Lipford GB. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Human Reproduction Update*;1:51-62. (1995)

Buhr MM, Curtis EF, Somnapan Kakuda N. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31:224-238. 8(1994)

Buhr. M.M.. Effects of sperm preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Research*. 23:441-449 (1989)

Bwanga CO, Einarsson S, Rodríguez-Martínez H. Cryopreservation of boar semen II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Veterinaria Scandinave* 32: 455-461 (1991).

Bwanga, C.O. Cryopreservation of boar semen. Studies on freezing, packaging and fertilizing capacity. Thesis. Swedish University of Agriculture Sciences. Faculty of Veterinary Medicine. Uppasala, Sweden pp 13-113. (1990)

Bwanga, C.O. Cryopreservation of Boar semen: I.A literature review. *Acta Veterinary Scandinave* 32:431-453 (1991).

Bwanga, C.O., Einarsson, S. and Rodriguez-Martinez, H. b. Cryopreservation of Boar semen: II Effecy of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini, maxi straws and plastic bags. *Acta Veterinary Scandinave* 32:455-461 (1991^a)

Bwanga, C.O., Einarsson, S. and Rodriguez-Martinez, H. Freezing of boar semen in plastic bags and straws. *Reproduction in Domestic Animals* 26:117-125 (1991^b).

Bwanga, C.O., Hofmo, P.O., Grevle, I.S., Einarsson, S. and Rodriguez-Martinez, H. In vivo fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi straws. *Journal of Veterinary Medicine A.* 38:281-286 (1991^c).

Bwanga, C.O., Ekwall, H. and Rodriguez-Martinez, H. Cryopreservation of Boar semen: III Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing/thawing. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32:463-471 (1991^d).

Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Effect of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *Journal of Andrology* ;25:389-396. 17 (2004)

Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Molecular Reproduction Developments* 59:451-458. (2001)

Chen T, Bhowmick S, Sputtek A, Fowler A, Toner M. The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology*; 44: 301-306. (2002)

Chen, M.S., Tung, K., Coonrod, S. Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P., Herr, J., and White, J. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *PNAS* 96:11830-11835 (1999)

Cherr, G., Lambert, H., Meizel, S., and Katz, D. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Developments in Biology* 114:119-131 (1986).

Cohen, D., Ellerman, D., and Cuasnicu, P. Mammalian sperm egg fusion: evidence that

epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biology of Reproduction*. 63:462-468 (2000)

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

Córdova IA, Gutiérrez JF. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5ml straws. *Theriogenology*; 57: 2119-2128 (2002).

Courtens JL, Courot M, Flechon JE. The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *Journal of Ultrastructure Research*. 57: 54-64. (1976)

Coy P.; Gadea, J.; Romar, R.; Matas, C. y Garcia, E. Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pelucida hardening, and in vitro development in the pig. *Reproduction* 124. 279-288 (2002).

Cremades T, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Abaigar T, Vazquez JM, Martinez EA. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology* ;26:610-618 (2005)

Crister, J.K., Huse-Benda, A.R., Aaker, D.D., Arneson, B.W., Ball, G.D. Cryopreservation of human spermatozoa. Post-Thaw chronology of motility and zona-free hamster ova penetration. *Fertility Sterility* 47: 980-984 (1987)

Cuasnicu, P., Conesa, D., and Rochewerger. Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. In Alexander, N.J. Griffing, D. Speiler, J.M. and Waites, G.M.H. (eds) *Gamete interaction: Prospects for immunocontraception*. Wiley-Liss New York, USA, pp 143-153 (1990).

Cuasnicu, P., Gonzales-Echeverria, M., Piazza, A. Cameo, M. And Blaquier, J. Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *Journal of*

Reproduction and Fertility. 72:467-471 (1984).

damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology ;21:1-7. 6 (2000)

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

Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoa. In: The Physiology of Reproduction, Knobil E, Neill JD (Eds.), Raven Press, NY, , pp. 29-77.(1994)

Eriksson Bengt. Cryopreservation of boar semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Swedish. 2000

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

Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H., Puzon-McLaughlin, W. Zhang, X., Sheppard, D., Engvall, E. And Takada, Y. Functional clasification of ADAMS based on a conserved motif for binding to integrin $\alpha 9\beta 1$; implications for sperm-egg binding an other cell interactions. Journal of Biology and Chemistry. 277:17804-17810 (2002)

Evans, J.P. Schultz, R.M. Kopf, G.S. Roles of the disintegrin of mouse fertilins and in fertilization. Biology of Reproduction 59: 145-152. (1998)

Evans, J.P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Human Reproduction Update 4:297-311 (2002)

Evans, J.P., Kopf, G.S., and Schultz, R.M. Characterization of the binding of recombinat mouse sperm fertlin β subunitit to mouse eggs: evidence for ahesive activity via an egg $\beta 1$

integrin-mediated interaction. *Developments in Biology*. 187:79-93 (1997)

Flaherty SP, Winfrey VP, Olson GE. Localization of actin in human, bull, rabbit, and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anatomy Records*;221:599-610. (1988)

Flesch, F., Gadella, B. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimistry et Biology Acta*, 1469: 197-235 (2000).

Flores GH) Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino. Tesis de Nivel Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. Fes-C UNAM, México (2005).

Florman, H.M. and Storey, B.T. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Developments in Biology*. 91:121-130 (1982).

Fouquet, J.P. and Kann, M.L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biology Cellular* 81:89-93 (1994.)

Fraser, L., Adeydeera, L.R. and Niwa, K. Ca²⁺ Regulation Mechanism that modulate bull sperm capacitation an acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analisis. *Molecular Reproduction and Development* 40:233.241 (1995)

Friend, D.S., Orci, L., Perrelet, A. and Yanagimachi, R.. Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Journal Cell Biology* 74:561-577 (1977)

Funahashi, H.; and Day, B.N. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pigs oocytes in vitro. *Journal Reproduction and Fertility* 98: 179-185. (1993).

Funahashi, H.; y Day, B.N. Advances in vitro production of porcine embryos. *Journal of*

Reproduction and Fertility. 52: 271-283 (1997).

Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl*;26:396-404. (2005)

Grant, S.A.; Long, S.E.; y Parkinson, T.J. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100: 477-483 (1994).

Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*;122: 889-898. (2001)

Haila, A., Tulsiani, D. Mammalian sperm acrosome Formation, contents and function. *Archives Biochemistry and Biology* 379 No, 2, July 15 173-182 (2000).

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

Hall S.M, Evans J, Haworth S.G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*;9:106-114. (1993)

Hamamah S, Royère D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction and Nutrition Development*; 30: 59-64 (1990).

Hamano, S., Naito, K., Fukuda, Y. And Tyoda, Y. In vitro capacitation of boar eyaculated spermatozoa: Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspensión. *Gametes Research*. 24:483-489 (1989)

Hardy, C., Clarke, H., Nixon, B., Grigg, J., Hinds, L. And Holland M. Examination of the immunocontraceptive potential of recombinat rabbit fertilin subunits in rabbit. *Biology of Reproduction*. 57:879-886. (1997)

Hayashi, M., Fujimoto, S., Kirchoff, C., Ishibashi, T., and Kasahara, M. Characterization of human glycoprotein with apontetnial role in sperm –egg fusion: cDNAcloning, inmmunohistochemical ocalization, and chromosomal assignment of the gene(AEGL1) Genomics. 32:367-374 (1996).

Herrada, G. Wolgemuth, D. The mouse transcription factor Stat 4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. Journal of Cell Science. 110: 1543-1553 (1997).

Hess H., Heid H, and Franke, W.W.. Molecular characterization of mammalian calicin, a basic protein of the esperm head cytoskeleton. Journal of Cell and Biology 122:1042-1052 (1993)

Hofmo, PO and Almlid, T. Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. Proc. 2nd Int. Conf. On Boar Semen Preservation . Belsville, M.D. U.S.A. pp 111-122 (1991).

Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. Theriogenology 53: 47-58 (2000).

Jager S, Wijchman J, Kremer J. Studies on the descondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. Journal Experiments Zoology;256:315-322. (1990)

Johnson L.A.. Fertility results using frozen boar espermatozoa 1970-1985. In Johnson L.A., Larsson K. (Eds), Deep Freezing og Boar Semen, SLU uppsala, Sweden, pp.199-220. (1985)

Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; and Maxwell, W.M.C.. Storage of boar semen. Animals Reproduction Science. 62,143-172. (2000)

Johnson, L.L., Katz, D.F. and Overstreet, J.W.. The movement characteristics of rabbit

spermatozoa before and after activation. *Gamete Research* 4:275-282 (1981)

Juarez-Mosqueda L. And Mújica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal Guinea Pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology* 128: 225-236 (1999.)

Juárez-Mosqueda, M.L, Omega, M.C.; Hernandez, J. Valencia, J. Cryopreservation alters perinuclear theca. *Theriogenology*.(2006) En prensa

Kaji, K. And Kujo, K. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*. 127: 423-429 (2004).

Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Kaneko M, Harayama H, Miyade M, Kato S. Capacitation like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reproduction Science*;73:197-209. (2003)

Karnovsky, M. A formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electronic microscopy. *Journal of Cellular and Biology*. 27: 137A (1965)

Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A.C.F. and Yanagimachi, H.. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biology Reproduction* 58:1407-1417. (1998)

Knobil, E. and Neill J.D.. The physiology of reproduction Raven Press. N.Y. U.S.A pp.135- 185 (1998)

Koehler , J.. Media induced alterations of membrane associated particles of guinea pig sperm tail. *J. Ultrastructur. Res.* 51:106-118 (1975)

Koehler J. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *Journal of Ultrastructural Research*; 33: 598-614. (1970)

Koehler, J. Lectins as probes of spermatozoa surface. *Archives of Andrology* 6:197-217

(1981).

Korley R, Pouresmaeili F, Oko R. Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent. *Biology of Reproduction* 57:1426-1432. (1997)

Lalli, M. And Clermont, Y. Structural changes in the head component of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am. Journal Anatomy* 160:419-434 (1981)

Locksley E, Yang H, Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 25:178-185. (1988)

Longo F.J, Cook S. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa species: relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Molecular Reproduction Developments*; 28:380-393. (1991)

Longo F.J, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids. A novel class of cytoskeletal elements. *Journal of Cellular Biology*;105: 1105-1120. (1987)

Longo, F.J. and Chen D.Y. Development of surface polarity in mouse eggs. *Scanning Electron Microscopy*. 2:703-716 (1984)

Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*;63:411-421.(2005)

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

Martínez Oropeza, C.O. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide del bovino. Tesis de Licenciatura. FMVZ UNAM (2003)

- Maxwell W.M, Johnson LA.** Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction Development* 46:408-418. (1997)
- Maxwell W.M.C., and Johnson L.A.** Membrane status spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48: 209-219. (1997)
- Mazur P.** Basic concepts in freezing cells. In: Deep freezing of boar semen. Johnson and Larsson (Ed.) Swedish Univ. of Agri. Sci., Uppsala, pp. 91-111 (1985).
- Mazur, P., Leivo, S.P., Chu, E.H.** A two factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cells Research*. 71: 345-355 (1972)
- Mazur, P.** Cryobiology: The freezing of biological system. *Science* 168:939-949 (1970)
- Mc Donald, C.** Endocrinología veterinaria y Reproducción. 4ta edición. Interamericana McGraw-Hill, México. (1991).
- Mc Ganny, L., Yang, H. And Walterson, M.** Manifestation of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology*. 25:178-185. (1988)
- Medrano A, Holt W.V.** Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado descongelado. *Archivos de Zootecnia*; 47: 319-327. (1998)
- Meizel, S., Turner, K.O., and Nuccitelli, R.** Progesterone triggers a wave of increased free calcium during human sperm acrosome reaction. *Developments in Biology*. 182:67-75.
- Miyazaki, S. And Kudo, A.** The gamete fusion process is defective in eggs of CD9 deficient mice. *Nature Genetics*. 24:279-282 (2000)
- Mújica A, Navarro-García F, Hernández-González EO, Juárez-Mosqueda M.L.** Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technology*; 61:76-87. (2003)
- Myles, D.G.** Molecular mechanism of sperm-egg membrane binding and fusion in

- mammals. *Developments of Biology* 158: 35-45 (1993)
- Niemann, H. y Rath, D.** Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 41: 73-78 (2001)
- Nogales E., Wolf SG., and Downing KH.** Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203. (1998)
- Oko R., Maravei D.** Protein composition, distribution and possible role of perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*; 50: 1000-1014 (1994).
- Oko, R. and Clermont, Y.** Origin and distribution of perforatorial proyeins during spermatogenesis of the rat: and immunocytochemical study. *Anatomy Records* 230:489-501. (1991)
- Oko, R. and Morales, C.R.** A novel testicular protein, with requence similarities to a family of lipid binding proteins is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Developments in Biology* 166:235-245 (1994)
- Olson G.E, Noland T.N., Winfrey V.P, Garbers D.L.** Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *Journal of Ultrastructure Research* 85: 204-218. (1983)
- Omega M.C., Juárez-Mosqueda M.L., Hernández J, Valencia J.** Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*; 66:1969-1975. (2006)
- Palacios A.A.** Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Veterinaria México*; 25: 207-210. (1994).
- Parks, J.E., Grahan, J.K** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222. (1992).
- Parnako, J. Longo, F. Pott, J., Krohne, G. and Franke, W.W.** Widespread occurrence of calcin, a basic cytoskeletal protein of sperman cell, in diverse mammalian species.

Differentiation. 38:21-27 (1988)

Patist A, Zoerb H. Preservation mechanism of trehalose in food and biosystems. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*; 40:107-113 (2005).

Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P.: The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology Cellular*, 92: 255-266 (2000).

Perrault, S.D., Wolf, R. and Airkin, B.. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vitro. *Developments in Biology*. 101:160-167. (1984)

Petrunkina A.M., Gröpper B, Trópfel-Petersen, Günzel-Apel A.R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*; 63: 1390-1406 (2005).

Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction*; 127: 105-115 (2004).

Pursel, V.G. and Johnson, L.A. Boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40:99-102. (1975)

Reed, H.C.B. Current use of frozen boar semen- future need of frozen boar semen. I: Deep freezing of boar semen (Johnson, L:A & Larsson, K, eds). *Swedish University Agriculture Science Uppsala*, 255-237. (1985).

Renard, P., Dumont, E., Griveau, J:F., Callegari, J:P and Lannou, D. An overall lipoperoxidation is not involved in the loss of boar sperm motility during storage under anaerobic conditions. *Reproduction in Domestic Animals* 31:251.252. (1996)

Reyes R, Flores A.J.C., Merchant L.H.M., Delgado N.M. Nucleons II: Cryopreservation and metabolic activity. *Archives of Andrology*; 47: 23-29. (2001)

Roca J, Gil M.A., Hernandez M, Parrilla I, Vazquez J.M., Martinez E.A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*; 25:397-405. (2004)

Rochwerger, L. Cohen, D. and Cuasnicu, P. Mamalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for sperm protein that mediate gamete fusion. *Developments in Biology* 153:83-90 (1992).

Rochwerger, L., and Cuasnicu, P. Redistribuition of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro capacitation. *Molecular Reproduction Developments*31: 34-41.

Royère D, Hamamah S, Nicolee JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gametes Resarch*; 21: 51-57 (1988).

Sánchez Gutiérrez M. Participación de la actina -f en la formación del dominio de la membrana plasmática, del espermatozoide del cobayo, involucrando en el reconocimiento y fusión con la membrana plasmática del óvulo durante la fertilización. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. (2002)

Saunders K.M., Parks J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*; 61:178-187. (1999)

Schambony, A., Hess, O., Gentzel, M., and Topfer-Petersen, E. Expresion of CRISP proteins in the male equine genital tract . *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 53:67-72 (1998).

Selles, E.; Gadea, J.; Romar, R.; Matás, C.; Ruiz, S. Análisis in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and predict the subsequent

fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 66-72. (2003.)

Sivashanmugan, P., Richardson, R., Hall, S., Hamil, K., French, F. And O’Rand, M. Cloning and charecterization of androgen-dependent acidic epididymal glycoprotei/CRISP1-like protein from the monkey, *Journal of Andrology*. 20:384-393 (1999)

Skoufias D.A. and Scholey J.M. Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Current Opinion in Cell Biology*; 5:95-104. (1993)

Spungin B, Margalit I, Breitbart H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cells Science* 108:2525-2535. (1995);

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

Sutovsky, P., Oko, R. Hewitson, L. and Schatten, G. The removal of sperm perinuclear theca and its association with bovine oocyte surfrace during fertilization. *Developments in Biology* 188: 75-84 (1997)

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

Takahashi, Y., Bigler, D. Ito, Y., and White, J. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouseADAM3 and murine eggs:role of the β 1 associated proteins CD9, Cd81 and CD98. *Mollecular of Biology Cells*. 12:809-820

Tartaglione C.M., Ritta M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictorsof in vitro fertility of frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology* 62:1245-1252

Vázquez, J.M.; Martínez, E.; Pastor, L.M.; Roca, J.; Matas, C.; Calvo, A. Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: New lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Act of Histochemistry*. 98:93-100. (1996)

Virtamen, I., Badley, R.A Pasivuo, R. And Letho, V.P. Distinct cytoskeletal domains reveled in sperm cell. *Journal of Cells Biology* 99:1083-1091 (1984)

Visconti, G., Bailey, G., Lecler, P., Connors, S., Pan, D. Kopf, G. Capacitation of mouse spermatozoa. *Development*. 121: 1139-1150 (1995).

Wasserman P.M., Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Natural Cell Biology*; 3:E59-E64. (2001)

Wasserman P.M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* ; 96:175-183. (1999)

Waters, S.I., and White, J.M. Biochemical and molecular charecterization of bovine fertilin and (ADAM 1 and ADAM 2): a candidate sperm-binding/fusion complex. *Biology of Reproduction* 56:1245-1254. (1997)

Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of sperrnatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility Developments*, 7: 871-891. (1995)

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animals Reproduction Science*; 60-61: 481-492. (2000)

Watson, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 31:135-140. (1996)

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopresrved semen. *Animal Reproductions Science* 60-61:481-492 (1996)

Weitze, K.F, Rath, D. and Leps H. Influence of volume/surface of plastic packages upon freeze-thaw rate fertility of boar semen. Proc. 11th int. Congr. Anim Reprod & AI Dublin, EIRE 3:312 (1988).

Westwendorf, P., Ritcher, L. and Treu, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Laborund Besamugsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletenverfahren. Dtsch. Tieraertzl. Wochensschchr. 82:261-267 (1975).

Wilmut, I. And Polge, C. The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20,5 and 79°C. Journal of Reproduction 38:105-113 (1977).

Wong, G., Zhu, X., Prater, C., Oh, E., and Evans, J. Analysis of fertilin α (ADAM1)-mediated sperm-egg cel adhesion during fertilization and identification of an adhesion-mediating sequence in the desintegrin-like domain. Journal of Biology and Chemistry. 276: 24937-24945.

Yagi, A. and Paranko, J. Actin, α -actinin, and spectrin with specific association with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. Anatomy Records 241:77-87 (1995)

Yamashita M, Yamagata K, Tsumura K, Nakanishi T, Baba T. Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucida. Journal and Reproduction Developments; (2006) In press.

Yanagimachi, R.. Mammalian Fertilizatio. In the "Phisiology of Reproduction 2nd edition. Raven Press. New York pp 189-371 (1994)

Yanagimichi, R. And Noda, Y.D. Physiological changes in the postnuclear cap region of mamalian seprmatzoa : a necessary preliminary to emembrane fusion between sperm and egg cells. Journal of ultrastructure Research 31:486-493.

Yanagimichi, R. Mechanisms of fertilization in mammals, in fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York, pp. 81-182 (1981)

Yuan, R., Primakoff, P. And Myles, D. A role for the desintegrin domain of cyrestestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. Journal of Cells Biology 137:105-112 (1997)

Zeng, W.X., Terada, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. Journal of Andrology 22:111-118. (2001)

Zhu, X., and Evans, J. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, $\alpha4/\alpha9$ integrins $\alpha6$ integrins and CD9 in the interaction of the fertilin β (ADAM2) desintegrin domain with the mouse egg membrane Biology of Reproduction. 66:1193-1202. (2002).

Zhu, X., Bansal, N., and Evans, J. Identification of key functional amino acids of the mouse fertilin β (ADAM2) desintegrin loop for cell-cell adhesion during fertilization. Journal of Biology and Chemistry. 275:767-7683