



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

**VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE  
CERDO EN PRESENCIA INTRACELULAR DE TREHALOSA**

**TESIS**  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**MAYELI MASSARA NIEVES OSORNO**

TUTOR: MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITÉ TUTORAL: MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA  
JOSE ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

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

**“VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE CERDO EN  
PRESENCIA INTRACELULAR DE TREHALOSA”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA  
**MAYELI MASSARA NIEVES OSORNO**

TUTOR  
**Dra. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA**

COMITÉ TUTORAL  
**Dra. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA  
Dr. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

2012

## **DECLARACIÓN**

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

**MVZ. MAYELI MASSARA NIEVES OSORNO.**

## RESUMEN

Como es sabido el semen porcino es más sensible a los procesos de congelado-descongelado por la toxicidad que presenta el glicerol.

El objetivo de este estudio fue mejorar la viabilidad del semen porcino después del proceso de congelación –descongelación a través de la introducción de trehalosa en el citoplasma del semen porcino por la formación de poros por la toxina de estreptolisina -O (SLO). Primero, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de SLO (0.2 U/ml, 0.6 U/ml, 1 U/ml y 5 U/ml) para determinar la concentración de SLO que permitiera permeabilizar y retener la viabilidad del espermatozoide. Las células tratadas con la concentración de 0.6 U/ml de SLO mostraron el mejor porcentaje de integridad de membrana ( $57.44\% \pm 2.26$ ). Además de que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro valorado por la prueba hipoosmótica - Azul brillante de Coomassie fue mayor en las células tratadas con 0.6 U/ml de SLO ( $63.72\% \pm 1.75$ ), por lo tanto esta concentración de SLO fue seleccionada para introducir la trehalosa (100 mM y 200 mM) en las muestras espermáticas a ser criopreservadas. Después del descongelamiento de la muestra el tratamiento de trehalosa 100 mM mostró  $40.61 \pm 3.08\%$  de espermatozoides con acrosoma íntegro, mientras el control de muestras (tratadas con glicerol 3% para esta criopreservación) solo  $13.61 \pm 3.08\%$  ( $P < 0.05$ ). Sin embargo no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre el tratamiento de 100 mM de trehalosa ( $7.83 \pm 0.76$ ) y el control ( $9.89 \pm 0.76$ ) cuando los espermatozoides vivos con acrosoma íntegro fueron evaluados. A pesar del último resultado la presencia de trehalosa dentro del espermatozoide porcino criopreservado permite conservar vivo el espermatozoide, es decir, las células que sobrevivieron fueron las permeabilizadas (8.51%). En conclusión, la presencia de trehalosa (100 mM) en el citoplasma del espermatozoide de cerdo, incrementó la integridad del acrosoma después del proceso de congelación – descongelación y mantuvo la viabilidad.

**Palabras clave:** trehalosa, estreptolisina O, congelado- descongelado, viabilidad, acrosoma.

## ABSTRACT

As it is known boar semen is more sensitive to the frozen-thawed process because the toxicity that present the glycerol. The aim of this study was to improve the boar semen viability after the frozen – thawed process, this through the trehalose introduction in the cytoplasm of the boar sperm by the formation of pores by the streptolysin-O (SLO) toxin. First, the cells were exposed to different concentrations of SLO (0.2 U/ml, 0.6 U/ml, 1U/ml and 5U /ml) to determinate the SLO concentration that allowed to permeable and to retained the sperm viability. The cells treated with 0.6 U/ml concentration of SLO showed the best membrane integrity percent ( $57.44\% \pm 2.26$ ). Besides, the percentage of living sperm with whole acrosome, valued by the hyposmotic-Coomassie brilliant blue test, was higher in the cells treated with 0.6 U/ml SLO ( $63.72\% \pm 1.75$ ); therefore this SLO concentration was selected to introduce the trehalose (100 mM y 200 mM) in the spermatic samples to be cryopreserved. After the sample thawing, the treatment with 100 mM trehalose showed  $40.61 \pm 3.08\%$  the sperm with whole acrosome, while the control samples (treated with 3% glycerol for its cryopreservation) only  $13.61 \pm 3.08\%$  ( $P < 0.05$ ). However, there were not differences ( $P > 0.05$ ) between 100 mM trehalose treatment ( $7.83 \pm 0.76$ ) and the control ( $9.89 \pm 0.76$ ) when the living sperm with whole acrosome where evaluated. In spite of the last result, the presences of trehalose inside of the cryopreserved boar sperm allowed to conserve alive the sperm; that is the cells that survived were the permeabilised (8.51%). In conclusion the presence of trehalose (100 mM) in the cytoplasm of the boar sperm, increased the acrosome integrity after to the frozen-thawed process to process and maintained the viability.

**Keywords:** trehalose, estreptolysin O, frozen- thawed, viability, acrosome

INDICE	Página
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Morfología espermática externa.....	3
2.1.1 Cabeza .....	3
2.1.2 Pieza de conexión (cuello).....	5
2.1.3 Flagelo.....	6
2.1.3.1 Pieza intermedia (mitocondrial).....	6
2.1.3.2 Pieza principal. ....	7
2.1.3.3 Pieza terminal.....	7
2.2 Membrana plasmática del espermatozoide.....	9
2.3. Capacitación espermática.....	10
2.4 Reacción acrosomal. ....	12
2.5 Criopreservación de semen. ....	13
2.5.1.1. Efectos del cambio de temperatura.....	14
2.5.1.2 Formación de cristales de hielo.....	15
2.5.1.3 Daño estructural inducido por el proceso de congelación. ....	15
2.5.2 Diluyentes de congelación .....	17
2.5.2.1 Crioprotectores .....	18
2.5.2.2 Glicerol .....	18
2.5.2.3 Trehalosa.....	19
2.6 Estreptolisina O (SLO) .....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS .....	26
5. OBJETIVO.....	27
5.1 Objetivos específicos.....	27
6. MATERIAL Y METODOS.....	28
6.1 Colección de semen y valoración seminal .....	28
6.2 Permeabilización .....	29
6.3 Introducción de la Trehalosa.....	29
6.4 Método de congelación.....	29
6.5 Descongelación .....	31
6.6. Valoración de la Motilidad.....	31
6.7 Pruebas de viabilidad espermática. ....	32
6.7.1. Prueba de viabilidad espermática por tinción vital de eosina- nigrosina. ....	32
6.7.2. Prueba hipoosmótica (HOST) en combinación con azul brillante de Coomassie (CBB). ....	32
6.7.3 Prueba de CTC.....	33
7. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	35
8. RESULTADOS .....	37

8.1 Determinación de la dosis permeabilizante de SLO.....	37
8.2 Valoración de la viabilidad después del sellado de los poros.....	37
9. DISCUSIÓN.....	49
10. CONCLUSIONES.....	54
11. PERSPECTIVAS.....	55
12. LITERATURA CITADA.....	56

## LISTA DE CUADROS.

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Medias de mínimos cuadrados y errores estándar del efecto de diferentes concentraciones de la SLO en la permeabilización de la membrana del espermatozoide de cerdo.....	37
<b>Cuadro 2.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar del efecto de la diferentes concentraciones de SLO, después del sellado de los poros producidos en la integridad de la membrana del espermatozoide de cerdo.....	38
<b>Cuadro 3.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal con los poros sellados.....	40
<b>Cuadro 4.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad obtenido, después del sellado de los poros de la SLO.	41
<b>Cuadro 5.</b> Modelo de regresión lineal relacionando permeabilización, integridad de membrana, vivos con acrosoma, muertos con acrosoma, vivos sin acrosoma, muertos sin acrosoma, capacitados, reacción acrosomal y motilidad (%), con la concentración de SLO.....	42
<b>Cuadro 6.</b> Medias y error estándar de espermatozoides viables e integridad del acrosoma antes de congelar y tratados con trehalosa.....	43
<b>Cuadro 7.</b> Medias y error estándar de espermatozoides con membrana íntegra, tratados con trehalosa antes de congelar.....	44
<b>Cuadro 8.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad espermática antes del proceso de criopreservación.	45
<b>Cuadro 9.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro y espermatozoides con acrosoma íntegro al descongelado.....	46
<b>Cuadro 10.</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides con membrana íntegra al descongelado.....	47
<b>Cuadro 11</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad obtenido al descongelado.....	48

## LISTA DE ESQUEMAS.

	Página
<b>Esquema 1.</b> Espermatozoide de cerdo.....	8
<b>Esquema 2.</b> Transducción de señales en el proceso de capacitación espermática.....	12
<b>Esquema 3.</b> Propuestas para el mecanismo de protección de la trehalosa.....	21
<b>Esquema 4.</b> Modelo sugerido para la formación del poro producido por la toxina SLO.....	24

## LISTA DE TABLAS.

	Página
<b>Tabla 1.</b> Efecto de la introducción de trahalosa en diferentes tipos celulares.....	22
<b>Tabla 2.</b> Formulación de diluyentes de congelación.....	30

## LISTA DE GRÁFICAS.

	Página
<b>Gráfica 1</b> Medias de mínimos cuadrados y error estándar del efecto de las diferentes concentraciones de SLO, después del sellado de los poros, en la viabilidad e integridad del acrosoma.....	39

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la criopreservación es el único procedimiento que existe para conservar a los espermatozoides durante largos periodos de tiempo, incluso por tiempo ilimitado (Hernández, 2007). Sin embargo, la utilización de semen congelado de cerdo es aún reducida, así menos de 1% del total de las inseminaciones artificiales son realizadas con semen congelado (Johnson *et al.*, 2000), la razón es debida a la baja supervivencia espermática (30 – 40%) y a una fertilidad menor, comparada con la que se ha obtenido con la utilización de semen fresco (Córdova *et al.*, 2005).

A pesar de esto, el uso de semen congelado presenta ciertas ventajas en comparación con el uso del semen fresco como por ejemplo: a) el establecimiento de bancos de semen, que permitan garantizar la disponibilidad del material germinal en el momento que se requiera; b) disponer de material germinal de machos probados genéticamente, aun cuando el animal ya no exista; c), así como superar las limitaciones de tiempo de viabilidad del semen fresco diluido (Córdova *et al.*, 2005; Hernández, 2007; Grobfeld *et al.*, 2008).

El semen de cerdo a diferencia de otras especies, se caracteriza por ser producido en grandes volúmenes además de presentar una mayor sensibilidad al cambio brusco de temperatura (Johnson *et al.*, 2000; Watson, 1995). Esta sensibilidad ha sido relacionada con la composición fosfolipídica de la membrana plasmática del espermatozoide (Watson, 1995).

Debido a lo anterior, en los últimos años se han desarrollado diversos protocolos para la congelación de semen de cerdo que combinan distintos tipos de diluyentes, crioprotectores, tasas de enfriado o condiciones del proceso de congelación y descongelación (Johnson *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, no ha sido posible abatir la baja fertilidad característica del semen de cerdo descongelado, causada posiblemente por una combinación de efectos en la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación (Medrano y Holt, 1998).

Un diluyente de congelación generalmente incluye un crioprotector no permeable (como yema de huevo o leche), un crioprotector permeable (glicerol, etilenglicol o dimetil

sulfóxido), una sustancia amortiguadora (TRIS, tris-hidroximetil aminometano), uno o más azúcares (glucosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trehalosa) y antibióticos (penicilina, estreptomycin) (Barbas y Mascarenhas, 2009). Siendo el glicerol el crioprotector de elección en la mayoría de las especies, sin embargo se ha demostrado que presenta un efecto tóxico si la concentración excede del 6%. Debido a esto en el proceso de criopreservación de semen de cerdo el porcentaje de inclusión en el diluyente de congelación no debe exceder del 3% (Watson, 1995; Holt, 2000; Gutiérrez, 2009).

En la actualidad se han realizado diversos estudios en los que se ha demostrado que la trehalosa tiene un efecto crioprotector intracelular importante en diferentes tipos celulares; ya que provee estabilización a la membrana plasmática y proteínas (Chen *et al.*, 2001; Wolkers *et al.*, 2001; Eroglu *et al.*, 2002; Eroglu *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2006; Sitaula *et al.*, 2009).

Estas propiedades de la trehalosa como un crioprotector intracelular, abre la posibilidad de estudiar sus efectos en el proceso de congelación – descongelación en el semen de cerdo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Morfología espermática externa.**

La morfología espermática es uno de los parámetros evaluados en los análisis seminales rutinarios de los eyaculados de machos reproductores. Los espermatozoides de mamíferos están formados básicamente por tres zonas con distintas funciones: La cabeza, la pieza de conexión o cuello y el flagelo. Este último a su vez está dividido en tres piezas: Pieza intermedia o mitocondrial, pieza principal y pieza terminal. En la Figura 1 se presenta un esquema y la descripción general de las partes que conforman un espermatozoide (Fouquet y Kann; 1994; Bonet *et al.*, 2000).

#### **2.1.1 Cabeza**

En la cabeza se distinguen las siguientes estructuras:

Acrosoma, es una vesícula secretora, delimitada por una membrana interna y externa (Abou-Haila y Tulsiani, 2000), la cual se dispone sobre el núcleo en forma de capuchón y cubre un 80% de la longitud del núcleo (Bonet *et al.*, 2000). Esta parte de la cabeza que contiene al acrosoma es conocida como la región acrosómica. y se divide en tres segmentos: a) apical, b) principal y c) ecuatorial (Bonet *et al.*, 2000; Pesch y Bergman, 2006).

El contenido acrosomal está formando por enzimas hidrolíticas como acrosina, hialuronidasa, así como hidrolasas y esterases, las cuales son necesarias para la penetración de las células de la corona radiada y la lisis de la zona pelúcida (Pesch y Bergmann, 2006). La biogénesis del acrosoma involucra múltiples fases durante la espermiogénesis en las que se incluye el tráfico vesicular y migración de organelos. La primera fase de formación del acrosoma es conocido como la fase de Golgi, la cual está marcada por la fusión de múltiples gránulos proacrosómicos dentro de un simple gránulo acrosomal que se adhiere al núcleo de la célula (Abou-Haila y Tulsiani, 2000; Moreno *et al.*, 2006). La segunda fase se denomina fase de capuchón, en la cual el gránulo esférico proacrosómico es alargado por la adición de nuevas vesículas provenientes del aparato de Golgi, formándose la vesícula acrosomal (Abou-Haila y Tulsiani, 2000). Esta nueva vesícula se va extendiendo y aplanando sobre la superficie del núcleo y esto ocurre

concomitantemente con la migración del aparato de Golgi al polo opuesto de la célula (Moreno *et al.*, 2006). Durante la tercera fase denominada acrosomal, el núcleo de la espermátida inicia la elongación; pero la forma del acrosoma se alcanza al final de la maduración espermática, ya que condensación del acrosoma y modificaciones intraacrosomales de algunos antígenos son reportados después de la espermiación (Abou-Haila y Tulsiani, 2000). Mucho del citoplasma y organelos son desechados en el cuerpo residual, que es fagocitado y digerido por la células de Sertolli (Moreno *et al.*, 2006). En algunos estudios, de tipo bioquímico y estructural, se provee evidencia de la participación de los dominios citoesqueléticos, donde participa la actina, calmodulina y la  $\alpha$  - espectrina, en la organización del acrosoma. Moreno *et al* (2006), en un estudio realizado en espermatozoide de ratón demostró la evidencia de que los microtúbulos son necesarios para llevar a cabo una biogénesis normal del acrosoma.

El núcleo del espermatozoide de mamífero se encuentra rodeado por una densa capa, la teca perinuclear (TP), también llamada sustancia perinuclear o matriz perinuclear, (Fouquet y Kann, 1994; Barrientos, 2008). Esta es una cápsula fibrosa que se encuentra a manera de un casco, rodeando casi totalmente el núcleo, excepto en el sitio de inserción del flagelo. Su estructura ha sido dividida en dos regiones continuas estructuralmente: la subacrosomal, que se ubica intercalada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, y la postacrosomal, que se extiende distalmente desde el segmento ecuatorial entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear formando una especie de copa o cáliz. Entre ambas regiones se localiza la llamada subestructura de la TP, la cual forma una especie de cinturón que se ubica en la región ecuatorial espermática (Martínez *et al.*, 2006; Barrientos, 2009; Felipe, 2009).

Entre algunas de las funciones atribuibles a la TP se encuentran las siguientes: Dar forma a la cabeza del espermatozoide, servir como cemento para mantener unidas a la membrana acrosomal interna con la envoltura nuclear, mantener dominios de membrana y proteger al núcleo de agentes descondensantes. Durante la motilidad es la encargada de brindar la direccionalidad al espermatozoide, además, participa en los procesos de fusión con el óvulo y la descondensación espermática una vez que ocurre la fertilización (Felipe, 2009).

Núcleo, contiene la cromatina altamente condensada (Bonet *et al.*, 2000), su forma es especie - específica y usualmente es aplanada. En el microscopio electrónico

de transmisión, se observa muy electrodensa, debido a que la cromatina se encuentra altamente compactada por las protaminas (Pesh y Bergmann, 2006).

### **2.1.2 Pieza de conexión (cuello).**

Es la región que une la cabeza del espermatozoide al flagelo, va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza intermedia (Fouquet y Kann, 1994; Bonet *et al.*, 2000). En esta región se distinguen:

La placa basal, ubicada en la base del núcleo, y se extiende unos 0.6  $\mu\text{m}$  a lo largo, adherida a la membrana externa de la membrana nuclear (Bonet *et al.*, 2000). Esta estructura junto con el *capitulum*, y la fosa de implantación proveen la unión de la cabeza al flagelo (Fawcett, 1975; Bonet *et al.*, 2000). Por debajo del *capitulum*, se encuentra un centriolo proximal, un remanente del centrosoma bi-centriolar encontrado en las etapas tempranas de las células espermátogénicas haploides (Sutovsky y Manandar, 2006).

Las columnas segmentadas, están compuestas de material fibroso, presentan una forma cilíndrica, parten de los extremos del *capitulum* y se continúan con las fibras densas de la pieza intermedia englobando el axonema (Bonet *et al.*, 2000). El cuerpo basal, sirve como punto de nucleación para el crecimiento de los microtúbulos del axonema (Bonet *et al.*, 2000). El cuerpo basal se deriva de un centriolo a través de un proceso en gran parte desconocido, presenta una configuración de nueve tripletes de microtúbulos, formando un cilindro hueco, el cual se encuentra constituido principalmente por  $\alpha\beta$ -tubulina (Dirksen, 1991; Hoyer - Fender, 2010).

### **2.1.3 Flagelo.**

#### **2.1.3.1 Pieza intermedia (mitocondrial)**

La pieza intermedia de la cola del espermatozoide constituye la porción más ancha del flagelo se extiende desde la parte distal de la pieza de conexión hasta el *annulus* (anillo de Jensen), el cual marca el límite entre la pieza intermedia y la pieza principal, ya que se encuentra en contacto con la última mitocondria de la vaina mitocondrial (Bonet *et al.*, 2000). La importancia de esta estructura es prevenir un desplazamiento caudal de las mitocondrias durante el movimiento del flagelar (Pesch y Bergmann, 2006). Dentro de la pieza intermedia se distinguen las siguientes estructuras principales:

Axonema, es la estructura central de la maquinaria motriz del flagelo del espermatozoide. Se encuentra constituido por nueve dobletes de microtúbulos, los cuales se encuentran alineados en un círculo rodeando a un par central (Fouquet y Kann, 1994; Alberts *et al.*, 2002). Cada doblete de microtúbulos se encuentra unido por medio de brazos de dineína, nexina y al par central por medio de proteínas radiales (Gagnon y Lamirande, 2006; Sutovsky y Manandhar, 2006). La tubulina  $\alpha$  y  $\beta$  son los principales constituyentes de los microtúbulos, siendo importantes para la estructura flagelar y motilidad (Gagnon y Lamirande, 2006).

El axonema se encuentra rodeado por las fibras densas externas, que son, estructuras citoesqueléticas filamentosas, que se encuentran constituidas por nueve columnas. Se extienden a lo largo de la pieza intermedia y del primer tercio de la pieza principal (Bonet *et al.*, 2000). Dentro de sus funciones se encuentra: 1) proteger al espermatozoide del daño las fuerzas ocurridas bajo condiciones fisiológicas como la eyaculación, 2) optimizar la conversión de energía para la motilidad del flagelo (Villegas *et al.*, 1998; Henkel *et al.*, 2005). Por fuera de estas fibras densas se encuentra la vaina mitocondrial, ubicada por debajo de la membrana plasmática y está formada por diversas mitocondrias, dispuestas una tras otra de manera helicoidal alrededor del axonema (Bonet *et al.*, 2000). Las mitocondrias son el generador de energía, usada para la motilidad de los espermatozoides, ya que estas proveen el suficiente abastecimiento de adenosin trifosfato (ATP) obtenido por medio de la fosforilación oxidativa (Kao *et al.*, 2004; Pesch y Bergmann, 2006).

### **2.1.3.2 Pieza principal.**

La pieza principal es el segmento más largo de la cola de espermatozoide, se extiende desde el anillo de Jensen hasta el extremo proximal de la pieza terminal. Contiene principalmente a la vaina fibrosa, la cual es una estructura citoesquelética, ubicada entre la membrana plasmática y las fibras densas que rodean el axonema en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Bonet *et al.*, 2000). Se encuentra compuesta por dos columnas longitudinales unidas a los dobletes del axonema tres y ocho. Esta estructura altamente organizada es la responsable de la motilidad de forma ondulante específica del flagelo espermático. Se dispone entre la membrana plasmática y las fibras densas (Escalier y Albert 2005).

### **2.1.3.3 Pieza terminal.**

La pieza terminal es el último y más corto segmento de la cola del espermatozoide únicamente se encuentra formada por el axonema envuelto por la membrana plasmática (Bonet *et al.*, 2000).

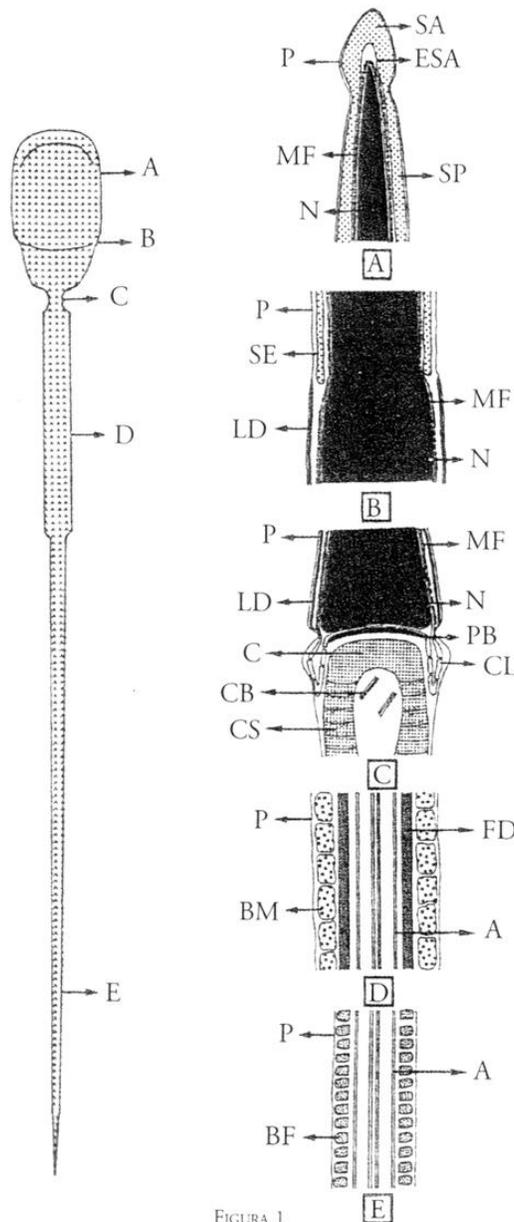


FIGURA 1

Esquema1. Representación de secciones longitudinales a nivel de la cabeza, cuello y cola del espermatozoide de cerdo (Bonnet, 2000)

- A. Cabeza: segmento apical y principal de la región acrosómica (ESA, espacio subacrosómico; MF, material fibroso perinuclear; N, núcleo, P, plasmalema, SA, segmento apical de la vesícula acrosómica; SP, segmento principal de la vesícula acrosómica).
- B. Cabeza: segmento ecuatorial de la región acrosómica (LD, lámina densa postacrosómica MF, material fibroso perinuclear N, núcleo; P, plasmalema; SE, segmento ecuatorial de la vesícula acrosómica).
- C. Cabeza: región postacrosómica. Pieza de conexión o cuello (C, *capitulum*; CB, cuerpo basal; CL, cuerpos laminares; CS, columnas segmentadas; LD, lámina densa postacrosómica; MF, material fibroso perinuclear; N, núcleo; P, plasmalema; PB, placa basal).
- D. Cola: pieza intermedia o región mitocondrial (A, axonema; BM, vaina mitocondrial; FD, fibras densas, P, plasmalema).
- E. Cola: región distal de la pieza principal (A, axonema; BF, vaina fibrosa; P, plasmalema)

## 2.2 Membrana plasmática del espermatozoide.

La membrana plasmática rodea al espermatozoide en su totalidad manteniendo unidos sus componentes intracelulares y debido a sus características semipermeables mantiene el gradiente químico de iones y otros componentes solubles (Silva y Gadella, 2006). (De acuerdo con el modelo del “mosaico fluido”, las membranas espermáticas están compuestas por moléculas lipídicas, proteínas y carbohidratos (Córdova *et al.*, 2001).

La estructura básica de las membranas biológicas está determinada por una bicapa lipídica, pero la mayoría de sus funciones están desempeñadas por las proteínas, por ejemplo, actuando como receptores a señales externas, transporte de moléculas, catalizando reacciones como la síntesis de ATP (Alberts *et al.*, 2002), o su asociación a lípidos específicos o al citoesqueleto para restringir su movimiento y formar dominios en la superficie de las células Nolan y Hammerstedt, 1997).

El mayor componente estructural de la membrana plasmática son los fosfolípidos, se encuentran en un porcentaje del 65 – 70% (Holt, 2000). Son moléculas anfipáticas compuestas por una cabeza hidrofílica y dos cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos. Esta naturaleza anfipática de los fosfolípidos explica la formación de las bicapas (Nolan y Hammerstedt, 1997).

En otros tipos de células incluyendo el espermatozoide, la distribución de los lípidos dentro de la bicapa lipídica es asimétrica. Tanto la fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) predominan en la membrana externa, mientras que la fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) lo hacen en la membrana interna del espermatozoide (Flesch y Gadella, 2000). El principal ácido graso presente en los fosfolípidos de los espermatozoides de mamíferos, es el ácido docohexanóico (22:6) (Parks y Lynch, 1992; Flesch y Gadella, 2000; Córdova *et al.*, 2001), cuya presencia es más del 60% en cerdo, mientras que en el caso del espermatozoide de bovino y gallo se encuentran en un rango del 30 – 40% (Córdova *et al.*, 2001). Por lo que la presencia elevada de este ácido graso, confiere mayor fluidez e inestabilidad a la membrana, motivo por el cual los espermatozoides de cerdo son más sensibles a las bajas temperaturas (Holt, 2000). Otra diferencia notable en cuanto a la composición lipídica de las membranas, entre el espermatozoide de cerdo y bovino son el bajo porcentaje de fosfatidilcolina y alto de fosfatidiletanolamina y esfingomielina en el cerdo (Johnson *et al.*, 2000).

Por otra parte, en el rango de temperatura de 5, - 10 y - 20°C, los lípidos de la membrana plasmática responden a los cambios de temperatura con alteraciones en su fase de estado físico, pasando de un estado líquido a gel, en un proceso denominado “fase de transición” (Holt, 2000).

Otro factor que influye en el comportamiento termotrópico de las membranas es el porcentaje de colesterol. Esta molécula, también presenta un comportamiento anfipático en ambas monocapas de la membrana; la cabeza del grupo hidroxilo es la parte hidrofílica y el resto de su estructura es la parte hidrofóbica. Debido a su estructura no flexible, el colesterol regula la fluidez y estabiliza la membrana (Johnson *et al.*, 2000; Córdova *et al.*, 2001; Gadella, 2008;). En el espermatozoide de bovino el porcentaje de colesterol es alto (0.45%), mientras que para el cerdo es más bajo (0.26 %) (Parks y Linch, 1992; Córdova *et al.*, 2000; Flesch y Gadella, 2000). Su distribución en la membrana plasmática es asimétrica, presentándose en mayor cantidad en la monocapa externa que en la interna, resultando en un aumento de la vulnerabilidad de la membrana interna a las bajas temperaturas (Johnson *et al.*, 2000).

### **2.3. Capacitación espermática.**

Los espermatozoides no son fértiles inmediatamente después de la eyaculación; adquieren la capacidad de fertilizar después de estar en el tracto reproductor de la hembra, por un determinado periodo de tiempo que varía dependiendo de la especie, (Gadella y Visconti, 2006), siendo para la especie porcina un periodo de entre 5–6 horas (Vadnais *et al.*, 2007). Por lo que cambios fisiológicos que se llevan a cabo en el espermatozoide eyaculado para fertilizar son resumidos en un proceso denominado “capacitación” (Gadella y Visconti, 2006; Sheriff y Ali, 2010). Se sabe que la capacitación no es solo un evento, sino una combinación de procesos. Dentro de los eventos implicados en el proceso de capacitación se incluyen el reordenamiento de lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide, flujo de iones que dan como resultado una alteración en el potencial de la membrana espermática, y un incremento en la fosforilación de tirosina de ciertas proteínas involucradas en la inducción de la hiperactivación y reacción acrosomal (Gadella, 2008; Gadella y Visconti, 2006).

El desarrollo de la capacitación *in vitro* empleando diferentes protocolos en diversas especies animales, ha mostrado la importancia de tres elementos:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y

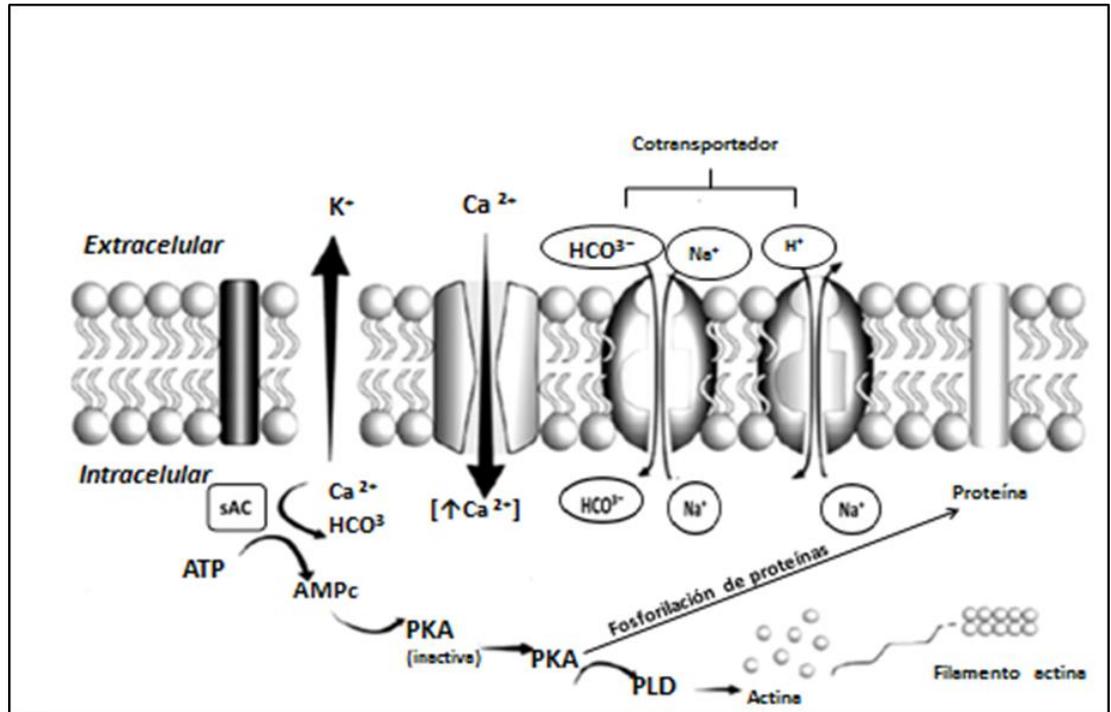
proteínas como la albúmina sérica que puede funcionar como aceptor de colesterol. Este proceso ocurre durante la incubación a temperaturas fisiológicas en la presencia de los elementos antes mencionados y de fuentes energéticas. En el caso del espermatozoide de cerdo la capacitación espermática es dependiente de calcio y bicarbonato pero no parece ser requerida la albúmina, posiblemente debido a la baja proporción de colesterol:fosfolípidos (Vadnais *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2001).

Durante el proceso de capacitación se inducen varias vías de señalización espermática que llevan a la producción y activación de señalizadores intracelulares, en donde se encuentra el cAMP y la proteína cinasa A (PKA) (Vadnais *et al.*, 2007).

Varios estudios han mostrado que el bicarbonato juega un papel importante en la habilidad del espermatozoide para sufrir la capacitación y la fertilización *in vivo* e *in vitro* (Gadella y Visconti, 2006; Vadnais *et al.*, 2007). Así se ha observado que niveles bajos de bicarbonato son mantenidos en el epidídimo, pero sus niveles son elevados en el útero y el oviducto (> 20mM) donde la capacitación ocurre (Vadnais y Galantino, 2007). No se sabe cómo el bicarbonato entra a la célula; sin embargo existe evidencia del transporte del  $\text{HCO}_3^-$  al interior del espermatozoide a través de un miembro de la familia de los co-transportadores  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  en algunas especies (Gadella y Visconti, 2006).

El incremento citosólico de  $\text{HCO}_3^-$  induce a la Adenil Ciclasa (sC) a sintetizar Adenosin 3',5'- monofosfato cíclico (AMPc), y este a su vez activa a la PKA para fosforilar a varias proteínas blanco (Gadella y Visconti, 2006; Vadnais *et al.*, 2007; Sheriff y Ali, 2010), como la fosfolipasa D (PLD), la cual estimula la polimerización de actina en bovino, humano y cabra; también se ha propuesto que indirectamente la PKA activa a la fosfatidil 4-cinasa para producir fosfatidil inositol 4,5 bifosfato el cual es un cofactor para la activación de PLD (Vadnais *et al.*, 2007) (Esquema 2). De la misma manera la PKA también se ve involucrada en la activación de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la conversión del fosfatidilinositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), los cuales han sido involucrados en el incremento de la fluidez de la membrana plasmática y también en el aumento de su capacidad fusogénica (Flesch y Gadella, 2000; Gadella y Visconti, 2006; Galina y Valencia, 2008). Este incremento en la permeabilidad de la membrana permite un cambio en su potencial de membrana, haciéndose más negativa (hiperpolarización) y estos cambios son los que promueven la activación de los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  favoreciendo la entrada de estos iones y modificando el patrón de motilidad (hiperactivación) (Gadella y Visconti, 2007; Vadnais *et al.*, 2007).



**Esquema 2.** Transducción de señales en el proceso de capacitación espermática, denominada vía dependiente de AMPc/PKA. (Vadnais *et al.*, 2007)

## 2.4 Reacción acrosomal.

Únicamente los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo la reacción acrosomal (RA), también denominada exocitosis acrosomal, la cual es una alteración morfológica terminal del espermatozoide, así como un proceso sincronizado, secuencial y regulado, en el que se da la abertura de cientos de poros de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana espermática, causando la liberación del contenido de la matriz acrosomal y la pérdida de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, lo que le permite al espermatozoide unirse y penetrar la zona pelúcida (ZP), entrar al espacio entre la ZP y la membrana plasmática (MP) del ovocito (espacio perivitelino). En esta zona es donde el espermatozoide se une con la MP ovocito,

posteriormente se da una fusión de ambas membranas y la célula espermática es incorporada al ovocito (Flesch y Gadella, 2000; Xiao- Quian *et al.*, 2009).

La exocitosis ocurre como consecuencia de una señal externa, la cual es transmitida hacia el interior de las células vía segundos mensajeros y /o cambios en la permeabilidad a los iones de la membrana. Como inductores de RA se encuentran ZP y la progesterona. *In vivo*, la RA es inducida por una glicoproteína de la zona pelúcida (ZP3), que es capaz de elevar las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular. Este flujo de calcio es el mecanismo que dispara la RA (Arancibia, 2007); así como la activación de GTPasas (Michaut, *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2000; Xiao- Quian *et al.*, 2009).

Inmediatamente después de la unión del espermatozoide (receptor) a la zona pelúcida (ligando), la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la MP que recubre al acrosoma, lo que resulta en la liberación de las enzimas acrosomales como la acrosina y la hialuronidasa. Sin embargo esta fusión no ocurre en la región ecuatorial de la MP (Flesch y Gadella, 2000). Existen estudios recientes en los que se ha demostrado que la molécula central de este proceso de exocitosis acrosomal son los SNAREs (del inglés soluble N. ethylmaleimide – sensitive factor attachment protein receptor proteins) (Michaut *et al.*, 2000; Xiao- Quian *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2010). En el espermatozoide porcino se han identificado estos SNAREs que son requeridos para formar el complejo SNARE involucrado en la fusión de membranas (Gadella, 2008; Tsai *et al.*, 2010)

## **2.5 Criopreservación de semen.**

La congelación de semen de cerdo representa una alternativa en el manejo reproductivo, ya que favorece: 1) establecimiento de bancos de semen que garanticen la disponibilidad del material genético en el momento que se requiera, 2) disponer de material genético de machos probados genéticamente aun cuando el animal ya no exista, 3) superar las restricciones internacionales en cuanto al transporte de animales vivos y 4) superar el tiempo de viabilidad del semen fresco diluido (Córdova *et al.*, 2005).

Sin embargo, debido a que la viabilidad espermática en el proceso de congelación – descongelación de semen de cerdo disminuye en un 30-40% y la fertilidad obtenida es menor comparada con la de semen fresco (Córdova *et al.*, 2005), únicamente el 1% de

las inseminaciones en la especie porcina a nivel mundial son realizadas con semen congelado – descongelado (Johnson *et al.*, 2000).

La baja de fertilidad del semen criopreservado se debe a factores involucrados en el procedimiento de congelado - descongelado del semen, que afectan la integridad estructural de la membrana plasmática, membrana acrosomal externa y membranas mitocondriales, así como a la teca perinuclear disminuyendo así la funcionalidad espermática (Watson, 1995; Barrientos, 2008)

### **2.5.1 Procesos físicos que contribuyen al daño por congelación.**

Durante el proceso de congelación – descongelación la célula espermática es sujeta a dos diferentes tipos de estrés. El primero se encuentra relacionado con el cambio de temperatura y el segundo surge por la formación y disolución de los cristales de hielo. (Watson, 1995).

#### **2.5.1.1. Efectos del cambio de temperatura.**

Este fenómeno se refiere a la sensibilidad que experimentan los espermatozoides cuando la temperatura decrece por debajo de los 0°C y el agua extracelular comienza a congelarse, mientras que el agua intracelular no lo hace al mismo tiempo. De ahí la importancia de la tasas de enfriamiento, ya que este proceso debe de ser lo suficientemente lento para que el agua pueda salir de la célula y congelarse (Watson, 1995; Flores, 2005).

Esta susceptibilidad al choque por frío es debida a la composición de fosfolípidos, glucolípidos, y colesterol (Watson 1995); lo cual probablemente se encuentra relacionado con la transición de fases de los lípidos de la membrana plasmática (Watson 1995 ; Holt , 2000).

Es decir la disminución rápida de la temperatura en el espermatozoide ocasiona que el movimiento lateral de los fosfolípidos de la membrana se vea restringido, dando lugar a un fenómeno conocido como transición de fases en el cuál los lípidos de la membrana sufren un cambio en su estado físico de un estado fluido a un estado de gel; así la fluidez de la membrana disminuye, se vuelve rígida y poco elástica (Watson, 1995; Holt, 2000;

Flores, 2005; Gutiérrez, 2009), lo que puede resultar en una separación de fases y una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana (Watson, 1995).

#### **2.5.1.2 Formación de cristales de hielo.**

La tasa de congelación modifica la dinámica de la formación de hielo y el compartimiento intracelular o extracelular donde este se forma (Medrano y Holt, 1998). Mientras se disminuye la temperatura por debajo de los  $-5^{\circ}\text{C}$ , se comienzan a formar los cristales de hielo extracelulares de agua pura, logrando que por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no está congelada (Palacios, 1994). Cabe añadir que la formación intracelular de hielo, debe evitarse para reducir el daño celular (Medrano y Holt, 1998). Debido a que la congelación demasiado rápida causa la formación de hielo intracelular, es importante señalar que la tasa de congelación óptima debe ser lo suficientemente lenta para prevenir la formación de hielo intracelular y lo suficientemente rápida para minimizar los efectos perjudiciales a la exposición prolongada de alta concentraciones de solutos, fenómeno conocido como “efecto solución” (Holt, 2000), este último hace referencia a todos los cambios característicos de la solución extracelular cuando se da la formación de hielo extracelular; como sería el incremento de la concentración de solutos del medio (Watson 1995), a lo cual la célula responde con la pérdida de agua y disminución de su volumen, para equilibrar las concentraciones de solutos entre los compartimentos intra y extracelular, sucediendo así la deshidratación celular (Palacios, 1994; Watson 1995; Garzón, 2008).

#### **2.5.1.3 Daño estructural inducido por el proceso de congelación.**

Como se mencionó anteriormente los organelos de la célula espermática se encuentran envueltos por la membrana plasmática, la cual es particularmente vulnerable durante el proceso de criopreservación. Recapitulando, la composición lipídica de la membrana plasmática está relacionada con el choque por frío, ya que los lípidos responden a variaciones de temperaturas con cambios en su estado de fase líquida a gel (transición de fases; Johnson *et al.*, 2000), afectando la fluidez de la membrana y debido a las diferentes temperaturas de transición para los diferentes tipos de lípidos la fase de

separación de la membrana puede ocurrir, perdiéndose así su integridad (Johnson *et al.*, 2000; Holt, 2000; Watson, 1995). Adicionalmente, el proceso de criopreservación también puede afectar la membrana acrosomal externa y las membranas mitocondriales (Watson, 1995).

De manera importante la pérdida de la asimetría de la bicapa lipídica está asociada con un aumento en la fluidez, característico de un espermatozoide capacitado, lo cual provoca una expectativa de vida mucho más corta para el espermatozoide de cerdo (Watson, 1995; Gutiérrez, 2009; Holt, 2000; Johnson *et al.*, 2000); además de que pierde la capacidad para manejar convenientemente los cambios osmóticos asociados a las interacciones agua – soluto, que se dan a través de la cristalización de hielo extracelular y que provoca la salida de agua y la entrada de iones, lo cual ocasiona cambios osmóticos que al no ser regulados adecuadamente pueden dañar a su vez otras estructuras (Watson 1995; Holt 2000; Gutiérrez, 2009, ).

Por otro lado la acción del descenso de la temperatura disminuye la motilidad, lo cual ha sido atribuido a cambios en el transporte activo y en la permeabilidad de la membrana en la región del flagelo. Más aún, estudios realizados en espermatozoides de ratón (Sherman y Liu *et al.*, 1982) y cerdo (Courtens y Paquignon, 1985; Courtens *et al.*, 1989), indican que la reducción en la motilidad puede no ser causada directamente por los eventos en la membrana, si no por daño en el axonema (Watson, 1995). Así, el daño a las diferentes estructuras citoesqueléticas del flagelo son el reflejo de la despolimerización de tubulina que altera la relación de microtúbulos y sus proteínas asociadas, afectando la respuesta celular a estímulos externos, ya que algunos elementos del citoesqueleto se propone participan en la activación de diversas cascadas de señalización involucradas en la motilidad (Gutiérrez, 2009).

Por otra parte, la disminución en la motilidad también se ha asociado al daño en la estructura interna de la mitocondria, en espermatozoides de cerdo (Courtens y Paquignon, 1985; Courtens *et al.*, 1989) debido a que tanto la fosforilación oxidativa como el transporte de protones se llevan a cabo en esta estructura y es probable que la producción de adenosin trifosfato (ATP), se vea reducida (Watson, 1995).

El núcleo, es otra estructura que había sido considerada como resistente al proceso de congelación y descongelación, sin embargo estudios recientes en espermatozoide de cerdo 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. (Royere *et al.*, 1988; Watson, 1995).

Por otro parte estudios realizados en espermatozoides de cerdo por Barrientos (2008); Arancibia (2007) y Gutiérrez *et al.*, (2011), se demuestra que la TP, es otra estructura que resulta ser afectada, ya que después del proceso de criopreservación el porcentaje de espermatozoides con TP alterada fue de 70%, debido a que en el proceso de congelación y descongelación la actina-F se ve afectada.

### **2.5.2 Diluyentes de congelación.**

Entre las características físico –químicas más deseables que deben de tenerse en cuenta al elegir un diluyente esta un mantenimiento del pH y la osmolaridad adecuada, así como su capacidad protectora para evitar el daño de las células espermáticas por el proceso de congelación – descongelación (Barbas y Mascarenhas, 2000). De manera general los diluyentes de congelación para los espermatozoides incluyen un crioprotector no permeable como la leche y la yema de huevo, un crioprotector permeable como el glicerol, etilenglicol o dimetil sulfóxido, (DMSO) uno o más azúcares como glucosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trehalosa, antibióticos como penicilina, estreptomina y además pueden estar clasificados con o sin amortiguador (Tris o Test) (Barbas y Mascarenhas, 2000; Gutiérrez, 2009).

Un punto importante a tomar en cuenta en relación al uso de crioprotectores permeables antes de su aplicación es la concentración en que estos aditivos pueden aplicarse a los medios de congelación, ya que ello se relaciona con su toxicidad lo cual puede jugar un papel importante del daño criocelular (Gutiérrez, 2009).

En la actualidad se sabe que existe una correlación entre la concentración usada de los crioprotectores y el daño por congelación, atribuido entre otras cosas por sus efectos osmóticos sobre las concentraciones molares del diluyente que resulta en un daño a la membrana ( Watson, 1995).

### **2.5.2.1 Crioprotectores**

El empleo de agentes crioprotectores es con la finalidad de incrementar la sobrevivencia de la células a las bajas temperaturas a la que son sometidas las células durante el proceso de criopreservación, esto lo logran mediante el reordenamiento en las proteínas y lípidos de la membrana lo que resulta en la deshidratación celular por incremento en la fluidez de la misma y por lo tanto en una menor formación de cristales de hielo intracelular (Holt 2000; Barbas y Mascarenhans, 2009).

Muchos agentes crioprotectores han sido utilizados en la congelación de semen de cerdo; sin embargo no han dado buenos resultados como el glicerol. Dentro de estos compuestos se encuentran el exitriol, xilitol adonitol acetamida y DMSO, en bajas concentraciones, los cuales han mejoraron la motilidad de los espermatozoides de cerdo pero la proporción de acrosomas intactos se ha visto disminuida (Johnson *et al.*, 2000).

### **2.5.2.2 Glicerol**

El glicerol ha sido usado extensivamente para la protección de espermatozoides de cerdo y en general es el crioprotector de elección para la criopreservación de semen de mamíferos. Sin embargo el espermatozoide de cerdo ha presentado una mayor sensibilidad que las otras especies domésticas (Watson1995; Johnson *et al.*, 2000; Holt, 2000; Barbas y Mascarenhans, 2009).

La concentración del glicerol en el espermatozoide de cerdo debe ser menor al 3%, dado que resulta tóxico para la célula ya que afecta la viscosidad citoplasmática, la transducción de señales a través de la membrana, y la utilización de ATP; además de que disminuye considerablemente la fertilidad de los espermatozoides por un deterioro en el acrosoma probablemente debido al estrés osmótico que produce (Watson 1995; Holt 2000). Cabe mencionar que en un estudio realizado por Arenas (2008) en espermatozoides de cerdo se encontró que el glicerol, aún a bajas concentraciones (2%), afecta directamente a la teca perinuclear; ya que esta fue alterada en el 96% de las muestras analizadas a 30 min postratamiento con el crioprotector.

Diferentes teorías han tratado de explicar la toxicidad del glicerol, una de ellas se refiere al estrés osmótico producido por el mismo crioprotector, ya que debido a su introducción o remoción causa cambios en el de volumen osmótico (Watson, 1995).

Se sabe que el glicerol es metabolizado por el espermatozoide de diferentes especies como: ovino, bovino, porcino y caprino, donde estimula el consumo de oxígeno. Aunque por otro lado el espermatozoide de cerdo tiene la capacidad de oxidarlo hasta CO<sub>2</sub> (Jones *et al.*, 1992). Además de que interfiere con el balance entre la síntesis y utilización de ATP, dando como resultado una inapropiada activación de fosfolipasas y proteasas (Holt, 2000).

Una teoría que apoya lo anteriormente mencionado es la conversión metabólica del glicerol a un compuesto tóxico (metilglioxal), que es producto de reacciones no oxidativas que se llevan a cabo durante la glucólisis anaerobia a partir del glicerol. Durante su metabolismo el glicerol es convertido en dihidroxiacetona y esta es convertida en metilglioxal, el cual es conocido por ser un potente inhibidor metabólico, relacionado con la inhibición de la respiración celular (Arenas, 2008).

### **2.5.2.3 Trehalosa**

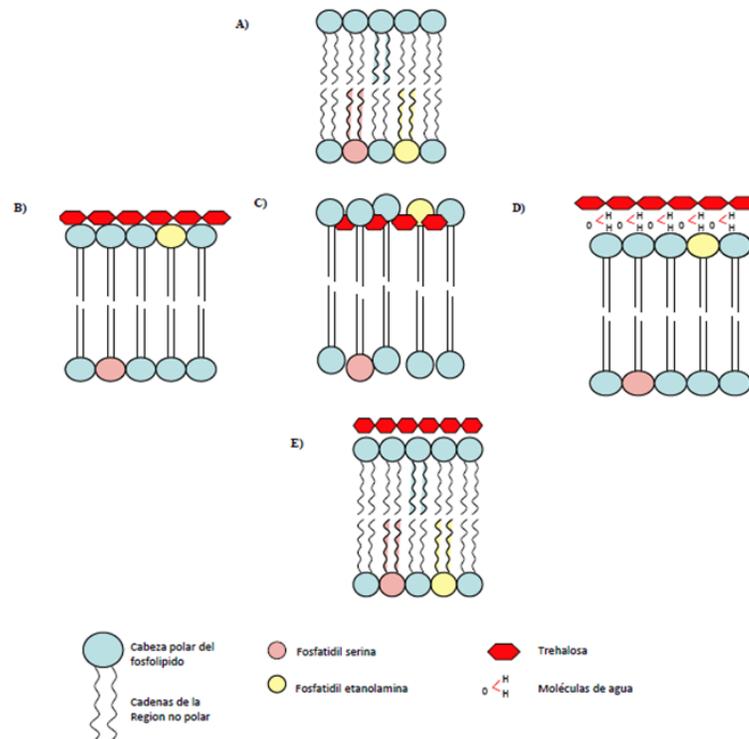
Como se mencionó anteriormente los azúcares como la lactosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa y dextrosa son empleados como crioprotectores no permeables ya que no son capaces de difundirse a través de la membrana plasmática, por lo que actúan creando una presión osmótica que induce a la deshidratación de la célula y favorecen la baja incidencia de formación de cristales de hielo. Estos azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática, estabilizando su conformación e incrementando por lo tanto la sobrevivencia a la criopreservación (Barbas y Mascarenhans, 2009)

La trehalosa fue primero descrita por Wiggers en 1832 como un azúcar desconocido presente en el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*), un hongo patógeno que produce una toxina letal para los humanos y más tarde fue encontrada en los capullos o pupas de escarabajo *Larinus maculata* de nombre común “trehala” lo cual inspiró al químico Berthelot para designarlo como trehalosa. Este disacárido está compuesto por dos moléculas de glucosa  $\alpha$ -D-glucopiranosil- (1,1)- $\alpha$ -D- glucopiranósido. El enlace  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa anulando su poder reductor (Mascorro *et al.*, 2005).

En la naturaleza una gran variedad de organismos, incluyendo algunas ranas, nemátodos, tardígrados, larvas de camarón, insectos, bacterias, levaduras y

algunos tipos de plantas, tienen la capacidad de sobrevivir a la congelación y a condiciones de extrema desecación (Chen *et al.*, 2001; Eroglu *et al.*, 2002; Eroglu *et al.*, 2003; Mascorro *et al.*, 2005). Estudios en organismos anhidrobiontes han revelado una serie de cambios internos tanto bioquímicos como fisiológicos que permiten a estos organismos sobrevivir a estas condiciones de extrema desecación. Uno de estos cambios es la acumulación de grandes cantidades internas de azúcares o mezcla de azúcares como trehalosa, sacarosa o rafinosa, que pueden estar presentes en un rango del 20 al 50% del peso del organismo; y de esta manera estabilizar las membranas lipídicas y la configuración de las proteínas (Crowe *et al.*, 1998; Crowe y Crowe, 2000; Chen *et al.*, 2001; Eroglu *et al.*, 2002; Eroglu *et al.*, 2003).

Existen tres teorías que tratan de explicar el mecanismo por medio del cual la trehalosa es capaz de estabilizar una gran diversidad de biomoléculas (Esquema 4): a) reemplazando moléculas de agua, por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la trehalosa y las cabezas fosfolipídicas de la bicapa lipídica, (Wolkers *et al.*, 2001; Mascorro *et al.*, 2005; Elliot *et al.*, 2006; Sitaula *et al.*, 2009) ; b) la formación de una capa que atrapa las moléculas de agua cercanas a la superficie biomolecular y c) el mantenimiento de la estructura de las proteínas y lípidos por medio de la formación de una matriz de alta viscosidad para prevenir la transición de fases o la cristalización (Crowe *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2006; Jain y Roy, 2009). Siendo a través de estos mecanismos que la trehalosa mantiene la integridad de las membranas biológicas, protege y estabiliza las proteínas. Esto último es debido a que al reemplazar las moléculas de agua forma una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su actividad. En otras palabras, la capacidad de la trehalosa para proteger a las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas



**Esquema 3.** Propuestas para el mecanismo de protección de la trehalosa .A) Esquema de membrana antes de la congelación; B) Mantenimiento de la estructura biomolecular al envolverla con una película de alta viscosidad que mantiene su conformación; C) Protección indirecta al reemplazar las moléculas de agua por puentes de hidrógeno; D) Formación de una capa que atrapa las moléculas agua por puentes de hidrógeno; E) Membrana que permanece intacta al descongelado (Gutiérrez, 2009).

Si bien la adición de la trehalosa (100 mM) en los medios empleados para la congelación de semen, resultan en mejor resistencia de la membrana plasmática después del proceso de congelación–descongelación (Gutiérrez, 2009), los resultados no superan a los del glicerol en cuanto a la viabilidad del semen.

Recientemente, se han realizado estudios (Tabla 1) para introducir la trehalosa en diferentes tipos de células como: ovocitos de humanos (Eroglu *et al.*, 2002), ovocitos de ratón (Eroglu *et al.*, 2003), macrófagos de ratón (Elliot *et al.*, 2006); algunos investigadores introducen a este azúcar por microinyección y otros por el uso de proteínas formadoras de canales o mediante la despolarización de la membrana citoplasmática. En el caso de ovocito de humano se encontró que la presencia de 150mM

de manera intracelular de trehalosa y 500 mM de trehalosa extracelular, aumenta el porcentaje de sobrevivencia hasta un 66% a -60° C; mientras que en el grupo control la tasa de sobrevivencia a -15° C fue de 13% con su posterior degeneración a -60°C. (Eroglu *et al.*, 2002). En los ovocitos de ratón se encontró que la microinyección de 150mM de trehalosa no es detrimental para el desarrollo de cigotos y esta concentración, se encuentra dentro del rango encontrado de este de azúcar en los organismos anhidrobiontes (Eroglu *et al.*, 2003).

Tabla 1. Efecto de la trehalosa de manera intracelular.					
Especie	Tipo de célula	Trehalosa mM	Protocolo de valoración	Conclusiones	Autor
HUMANO	Ovocito	150 intracelular y 500 extracelular	Integridad de la membrana. Cambios volumétricos.	Concentración puede ser efectiva en la criopreservación.	Eroglu <i>et al.</i> ; 2002
RATÓN	Ovocitos	100 intracelular	Cambios volumétricos	150mM, no es detrimental para el desarrollo	Eroglu <i>et al.</i> ; 2003
	Cigoto	100,150 ,200 Intracelular			
BOVINO	Espermatozoide	200 intracelular 200 extracelular	Integridad de la membrana	Incrementó la integridad acrosomal, pero no la motilidad	Sitaula <i>et al.</i> ; 2009.

## 2.6 Estreptolisina O (SLO)

La estreptolisina O (SLO) es una toxina formadora de poros, es una proteína de 69 kDa producida por el grupo de los estreptococos del grupo A, es oxígeno-lábil y una representante de la familia de las citolisinas producida por las bacterias Gram positivas. Además de su interés patogénico, la SLO ha sido reportada como una herramienta ideal en la permeabilización de células. (Yamamoto *et al.*, 2001).

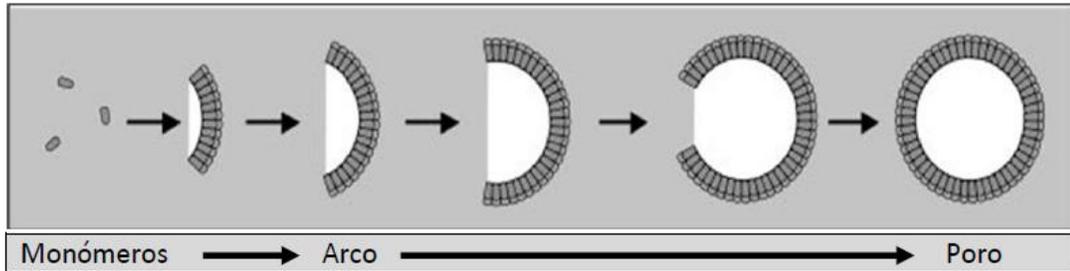
La SLO es tóxica para las células eucariotas, debido a su afinidad por el colesterol, pero a dosis controladas, para la permeabilización de células vivas, ha probado ser útil para la introducción de moléculas exógenas al citoplasma de las células (Barry *et al.*, 1993; Fawcett *et al.*, 1998). En el caso del espermatozoide la SLO ha sido utilizada para estudiar los mecanismos que regulan algunos procesos fisiológicos de la célula espermática como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad (Johnson *et al.*, 1999; Azamar *et al.*; 2007).

La SLO permeabiliza a las células al interactuar con el colesterol de la membrana plasmática, así los monómeros de SLO difunden en el plano de la membrana formando dímeros que actúan como puntos de cristalización para formar complejos que crecen en arcos y después en anillos, que son los poros que permiten el acceso continuo de moléculas al medio intracelular sin estropear a la membrana (Figura 4) (Heuck *et al.*, 2003). Los poros pueden tener un diámetro que puede ser mayor de 30 nm, por lo que teóricamente permiten el paso de moléculas grandes a través de la membrana (Fawcett *et al.*, 1998).

Adicionalmente, ya que el contenido de colesterol en la membrana plasmática es mucho menor que el de la superficie de la misma, se ha mencionado que es poco probable que la SLO tenga efectos significativos en la desestabilización de las membranas. Sin embargo, también se menciona que la sensibilidad a la SLO varía entre las especies y el tipo celular, debido a que poseen diferente contenido de colesterol (Fawcett *et al.*, 1998).

La acción de la SLO es extremadamente rápida, llegándose a presentar la permeabilización en cuestión de minutos, pero además se ha demostrado que, dependiendo de la selección correcta de la dosis, la permeabilización de las células con SLO es reversible por la adición del colesterol no esterificado (Wannemaker, 1983), por la

adición de suero fetal o por la adición de calcio al medio de incubación (Walev *et al.*, 2001).



**Esquema 4.** Modelo sugerido para la formación del poro producido por la toxina SLO. En este modelo las moléculas de la toxina se insertan dentro de la membrana como dímero o pequeños monómeros para iniciar la formación de un pequeño poro (Heuck *et al.*, 2003).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Debido a la capacidad de la trehalosa para mantener la integridad de las membranas biológicas y de proteger y estabilizar a las proteínas, la presente investigación pretende mantener la viabilidad del espermatozoide en la especie porcina, después del proceso de congelación – descongelación, mediante la inclusión de la trehalosa de manera intracelular por medio de la toxina formadora de poros estreptolisina O (SLO). En especies como la equina, ovina, roedores (ratón, conejo), *Elephas maximus* ( elefante) y la porcina, para disminuir el daño ocasionado por la congelación sobre la integridad espermática se han empleado a este azúcar de manera extracelular, obteniendo una mejoría en cuanto a la integridad acrosomal en más de un 35%. En otros tipos celulares como, ovocitos de ratón y humano, empleado este azúcar de manera intracelular se han logrado porcentajes de viabilidad adecuados (superiores al 60%) al descongelado.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si en otros tipos celulares los efectos crioprotectores de la trehalosa se deben a que se encuentra en el citoplasma, su introducción en el espermatozoide del cerdo mediante la formación de poros por medio de la estreptolisina O (SLO), permitirá mantener la viabilidad de los mismos después del proceso de congelación-descongelación.

## **5. OBJETIVO**

Introducir la trehalosa en el citoplasma del espermatozoide de cerdo, a través de la formación de poros con SLO, para tratar de mantener la viabilidad del semen de cerdo después del proceso de criopreservación.

### **5.1 Objetivos específicos.**

- Producir poros en la membrana del espermatozoide de cerdo, mediante el empleo de la SLO y valorar su viabilidad.
- Introducir la trehalosa al citoplasma del espermatozoide de cerdo, mediante la apertura y posterior sellado de los poros producidos por la SLO y valorar de la viabilidad celular.
- Criopreservar a los espermatozoides de cerdo, permeabilizados y tratados con trehalosa, manteniéndolos en nitrógeno líquido para su posterior valoración de viabilidad al descongelado.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Colección de semen y valoración seminal

Se obtuvieron 18 eyaculados de tres sementales diferentes pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los eyaculados se recolectaron por medio de la técnica de la mano enguantada, colectando únicamente la fracción rica en espermatozoides, la cual se filtró a través de doble gasa estéril. La motilidad progresiva fue determinada de la siguiente manera: se colocó una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C y se colocó un cubreobjeto, se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40x, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0-100%. Los eyaculados con menos del 80% de motilidad progresiva o más de 20% de morfoanomalías fueron descartados. Para su transporte al laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, los eyaculados fueron diluidos en una relación 1:1 en diluyente comercial (IMV USA 870 XT-R®).

A su llegada al laboratorio, se calculó la concentración espermática por conteo en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando la siguiente fórmula: Donde 21 es el factor de dilución (25µl de semen diluido en 500µl de Tritón X-100 al 0.1% diluido en PBS), 10,000 está dado por la dimensión de la cámara y 5, es el número de cuadros contabilizados.

$\text{No. de espermatozoides} \times 21 \times 10,000 \times 5 = \text{concentración de espermatozoides por ml.}$
--

La determinación del número de espermatozoides anormales se realizó de manera simultánea durante el conteo en el hematocitómetro.

## **6.2 Permeabilización**

Los espermatozoides fueron resuspendidos en PBS a una concentración de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml y fueron expuestos a diferentes concentraciones de estreptolisina O (SLO): 0.2, 0.6, 1.0 y 5.0 U de SLO e incubados por 5 min a 37°C (Johnson *et al.*, 1999). Después de este tiempo se valoró la viabilidad de las muestras espermáticas en cada una de las diferentes concentraciones de SLO (Gutiérrez, 2009). Como muestra control los espermatozoides fueron incubados sin la toxina SLO. Para su uso la SLO fue reconstituida en 1 ml de PBS–DTT 4mM (Hernández *et al.*, 2000).

Una vez determinada la concentración de SLO que permeabilizó la membrana espermática y mantuvo la viabilidad del espermatozoide de cerdo se procedió con el siguiente objetivo que fue la introducción de trehalosa.

## **6.3 Introducción de la Trehalosa**

Se manejaron dos tratamientos de trehalosa / PBS 100 mM y 200 mM (Eroglu *et al.*, 2002; Eroglu *et al.*, 2003); los cuales para su incorporación al medio intracelular del espermatozoide fueron adicionados al mismo tiempo que la toxina SLO.

Para la reconstitución de la membrana plasmática, los espermatozoides fueron lavados en PBS y posteriormente resuspendidos brevemente (2 min) en 5% de BSA / PBS; enseguida los espermatozoides fueron procesados para su criopreservación. Muestras alícuotas fueron tomadas para valorar la viabilidad espermática antes del proceso de congelación.

## **6.4 Método de congelación**

Para el grupo control se congelaron espermatozoides utilizando al glicerol como crioprotector. Se siguió el protocolo a dos tiempos: refrigeración y glicerolización (etapa en la que se agrega de manera gradual al diluyente B) (Gutiérrez, 2009). Para este procedimiento los diluyentes fueron preparados el mismo día de uso y son los siguientes:

<b>Tabla 2. Formulación de diluyentes de congelación.</b>		
<b>Ingrediente</b>	<b>Diluyente A</b>	<b>Diluyente B</b>
<b>Dextrosa (g)</b>	0.399	0.399
<b>Yema de huevo (20%) ml</b>	1	1
<b>Gentamicina (ml)</b>	0.05	0.05
<b>Glicerol (3%) ml</b>	-	0.3
<b>Agua desionizada cbp (ml)</b>	5	5

Ambos diluyentes se colocaron en tubos de ensaye de 10ml para centrifugarlos a 800 g (1500rpm) por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y la pastilla fue desechada. Posteriormente se midió el pH de cada diluyente ajustándolo entre 6.8 y 7.4 con hidróxido de sodio 1M.

Para retirar el diluyente, el semen fue centrifugado a 800 g (1500rpm) por 10 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue reconstituida a una concentración de  $600 \times 10^6$  espermatozoides /ml suavemente en el diluyente A. Seguido de esto la muestra fue colocada en un enfriador a una temperatura de 16°C por una hora y media. Pasado el tiempo de estabilización se procedió al tiempo de refrigeración, en el cual la muestra estabilizada a 16 °C se llevó al refrigerador a una temperatura de 4 °C por 2 horas (para esto las muestras fueron colocadas en un recipiente con agua a 16°C, envuelto en varias capas de gasa, con el fin de evitar el descenso brusco de la temperatura). El diluyente B fue puesto a 4° C al mismo tiempo que las muestras diluidas en el diluyente A, con el fin de que se encontraran a la misma temperatura al momento de su mezcla. La temperatura de 4°C se alcanzó aproximadamente en hora y media pero el semen se dejó estabilizando por dos horas. A la temperatura de 4° C se inició el periodo de congelación, para esto el diluyente B se agregó de manera creciente y gradual dividiéndolo en cuatro tiempos: primero se agregó el 5, 10,15 y 20% del diluyente B con un periodo de diferencia entre cada adición de 10 min. Este paso es gradual para disminuir el estrés osmótico atribuido al glicerol sobre el espermatozoide de cerdo (Gutiérrez, 2009).

Una vez agregado el glicerol el semen se almacenó en pajillas de 0.5ml a una concentración final de  $300 \times 10^6$  espermatozoides. Cada pajilla fue sellada con alcohol polivinílico, para ser expuestas a vapores de nitrógeno (-130 a -150°C) durante 20 minutos.

Para su exposición a los vapores de nitrógeno se utilizó una caja de poliuretano, colocando las pajillas sobre una gradilla de metal para tubos de ensayo, la cual se colocó sumergida en nitrógeno líquido dejando una distancia entre las pajillas y el espejo de nitrógeno de 18 a 20cm. Después las pajillas fueron sumergidas en el nitrógeno líquido, previa colocación en los gobeletes plásticos y almacenadas en tanque de nitrógeno líquido (-196°C) (Gutiérrez, 2009).

Para los espermatozoides permeabilizados y tratados con trehalosa, el diluyente de congelación a utilizar fue el TCF (200mM Tris, 77mM ácido cítrico y 61mM Fructosa), el cual ya ha sido utilizado en trabajos de congelación de semen de cerdo (Hu *et al.*, 2008), pero excluyendo la yema de huevo y el glicerol, dado que en este proyecto se trata de valorar el efecto crioprotector de la trehalosa de manera intracelular, llevando a cabo la misma metodología anteriormente descrita (Gutiérrez, 2009).

### **6.5 Descongelación**

Se realizó en baño María a 37° C por 30 segundos, inmediatamente después el contenido de las pajillas fueron colocadas en tubos de ensayo, previamente reconstituido con un diluyente de larga duración BTS, en un volumen 1:6 y mantener por 10 min a temperatura de 37 ° C y poder aplicar los protocolos de evaluación (Gutiérrez, 2009).

### **6.6. Valoración de la Motilidad.**

Para valorar el porcentaje de motilidad al descongelado, se tomaron muestras alícuotas con una concentración de  $35 \times 10^6$  espermatozoides/ ml de cada una de las muestras descongeladas. La cual fue valorada por observación directa al microscopio óptico, se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos, atemperado a 37 °C y se colocó un cubreobjetos. La motilidad fue expresada como el porcentaje de motilidad progresiva, como una fracción del número total de los espermatozoides móviles+ inmóviles (Sitaula *et al.*, 2009).

## **6.7 Pruebas de viabilidad espermática.**

Para la valoración de la viabilidad espermática se realizaron las siguientes pruebas:

### **6.7.1. Prueba de viabilidad espermática por tinción vital de eosina- nigrosina.**

La tinción vital de eosina- nigrosina, sirve para valorar la integridad de la membrana, fue descrita por Dott y Foster (1972) y modificada por Bamba (1988), para ello las muestras fueron lavadas por centrifugación (800g x 10 min), el sobrenadante fue retirado y la pastilla fue resuspendida en PBS. Posteriormente se diluyeron 1:8 con la tinción de eosina- nigrosina (eosina amarilla 0.67g, nigrosina 5g, 40ml de una solución de glucosa al 5% y agua desionizada c.b.p 100 ml), a 37°C por 5min. Transcurrido este tiempo se realizó un frotis en portaobjetos a 37°C, se dejaron secar al aire y finalmente se montaron con resina y cubreobjetos para el conteo posterior de 100 células espermáticas, diferenciando entre vivos (no teñidos) y muertos (parcial o totalmente teñidos) (Gutiérrez, 2009).

### **6.7.2. Prueba hipoosmótica (HOST) en combinación con azul brillante de Coomassie (CBB).**

Muestras alícuotas de  $35 \times 10^6$  espermatozoides, fueron lavadas por centrifugación (800 g por 10 min), para retirar el diluyente. El frotis testigo se realizó de la manera siguiente: se tomaron 100 µl de semen más 100 µl de paraformaldehído al 4% (fijador) por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente fueron lavadas las muestras 2 veces con PBS a 2500 rpm por 3 minutos, después se reconstituyeron en 100 µl de cloruro de amonio (50 mM en PBS), se realizó un frotis con 20 µl y se dejó secar al aire. Mientras que para el frotis prueba se tomaron 100 µl de semen más 100 µl de solución hipoosmótica (0.5 ml de citrato de sodio al 1.46 % y 0.5 ml de fructosa al 2.7%) y se incubaron por 60 minutos a 37 ° C, después se agregaron 200 µl de paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se reconstituyeron en 100 µl de cloruro de amonio, y finalmente se realizó un frotis con 20 µl y se dejó secar al aire. Ambos frotis se tiñeron por inmersión en Azul brillante de Coomassie (Azul de Coomassie 0.55 g, metanol 12.5 g, ácido acético 2.5 ml, agua bidestilada c.b.p. 125ml) por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el

tiempo los frotis fueron sumergidos en un vaso copplin con a agua destilada para remover el exceso de colorante y se dejaron secar al aire. Una vez secas se montaron con resina y cubreobjetos para su posterior conteo de 200 células por laminilla. La combinación de la prueba de HOST y la tinción CBB se realiza buscando una mejor valoración, de los resultados al aportar información sobre el estado funcional del flagelo e integridad acrosomal (Gutiérrez, 2009).

La interpretación de la prueba de HOST, se considera positiva (membrana funcional) cuando los flagelos se encuentran doblados, enrollados en ovillo o en látigo (Gutiérrez, 2009).

La CCB interpreta la integridad acrosomal como: integra (acrosoma bien definido e intensamente teñido), dañada (acrosoma difusamente teñido, con pérdida de continuidad y /o pérdida de material) y ausente (ausencia definitiva del acrosoma) (Gutiérrez, 2009)

### **6.7.3 Prueba de CTC.**

El estado de capacitación del espermatozoide usualmente es valorado con la clortetraciclina (CTC), un antibiótico fluorescente. La CTC es usada para detectar  $Ca^{2+}$  presente en la superficie de la membranas (Silva y Gadella, 2006). El procedimiento a seguir fue el siguiente:

La muestra de semen se lavó por centrifugación en PBS (pH 7.4) a 800g por 3 minutos dos a tres veces hasta dejar solo la pastilla con los espermatozoides, los cuales fueron reconstituidos en PBS a una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por ml. Posteriormente se adicionó 100  $\mu$ l de la solución CTC (750  $\mu$ M CTC, Cisteína 5 mM, 130 mM de NaCl en buffer Tris – HCl 20 mM pH 7.8) a 100  $\mu$ l de semen y se incubó por 30 segundos en la oscuridad. La muestra se fija con 22  $\mu$ l de glutaraldehido al 1 % (w/v en Tris HCl 0.5 M, pH 7.4) por 10 a 15 minutos. Posteriormente se colocaron en una laminilla 10  $\mu$ l de la muestra y se le agregó una gota de glicerol: PBS (9: 1) se mezcló y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave, sellando los bordes con barniz de uñas. Las laminillas fueron observadas al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x, con el filtro azul. Se contaron 100 espermatozoides y se determinó el porcentaje de presentación de los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide con la clasificación utilizada por Kaneto *et al* (2002):

- Patrón F: mostrando fluorescencia uniforme en toda la cabeza, lo que indicará espermatozoides no capacitados con el acrosoma intacto;
- Patrón B: con una banda libre de fluorescencia en la región post acrosomal que indicará espermatozoides capacitados con el acrosoma intacto;
- Patrón RA: con la cabeza libre de fluorescencia o con una pequeña banda de fluorescencia en la región ecuatorial, que indicará reacción acrosomal.

## 7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para realizar los análisis de resultados se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems 2003, SAS/ STAT User's Guide, Release 9.0, Inst. Inc, Cary NC, USA).

El objetivo general de la investigación fue determinar el efecto de la trehalosa en el citoplasma del espermatozoide de cerdo, a través de la formación de poros con la SLO, para mantener la viabilidad del semen de cerdo después del proceso de criopreservación. Para ello se probaron cinco tratamientos de toxina SLO, los cuales se pueden observar en los Cuadros 1 - 6. Estos tratamientos fueron aplicados a nueve eyaculados, obtenidos de tres diferentes sementales, considerando cada eyaculado como unidad experimental. Una vez obtenido el tratamiento de la toxina SLO, que permeabilizó y mantuvo la viabilidad del semen de cerdo, fue realizada una segunda parte del experimento, en donde se aplicaron dos tratamientos de Trehalosa a nueve eyaculados obtenidos de tres diferentes sementales.

Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó un análisis de la varianza para un diseño de un solo criterio de clasificación ( $Y_{ij} = \mu + \tau_j + \xi_{ij}$ ), se probaron las estructuras de covarianza de los datos de cada variable: Componentes de varianza (VC), Simetría Compuesta (CS), Autoregresiva (AR1) y No estructurada (UN), y se seleccionó la mejor de acuerdo a los criterios de información de Akaike (AIC) y el criterio Bayesiano de Swarz (BIC) según el valor mínimo obtenido.

Para probar los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza del modelo, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett respectivamente.

En el caso de las variables que no cumplían con las suposiciones de distribución normal, como vivos sin acrosoma, muertos sin acrosoma, reacción acrosomal y motilidad al descongelado, se recurrió a la estadística no paramétrica, aplicando la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos medias independientes.

En el análisis de comparaciones múltiples de medias, utilizando variables continuas, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples denominada Diferencia Honesta Significativa, también conocida como Prueba de Tukey. Asimismo, se usó la prueba ajustada de Tukey (Adjusted Tukey, SAS) cuando se compararon medias de Mínimos Cuadrados (LSMEANS).

Antes de realizar el experimento se establecieron dos niveles de confianza ( $\alpha$ ), considerando como significativa una diferencia entre un par de medias cuando el nivel de probabilidad fue de  $P < 0.05$  y altamente significativa si fuera  $P < 0.01$ .

Para analizar los resultados de las variables: Porcentaje de permeabilización (%), integridad de membrana (%), vivos con acrosoma (%), muertos con acrosoma (%), se utilizó un análisis de polinomios ortogonales.

Para establecer relaciones causa-efecto se utilizó un modelo de regresión lineal simple por medio del modelo  $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \xi_i$ , con el PROC GLM (modelo lineal general) de SAS, estimando los coeficientes ( $\beta$ 's) para las variables permeabilización, integridad de la membrana, vivos con acrosoma, muertos con acrosoma, capacitados y motilidad.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Determinación de la dosis permeabilizante de SLO.

En el Cuadro 1, se observa el porcentaje de espermatozoides permeabilizados a diferentes concentraciones de SLO, los resultados obtenidos indican que existe diferencia ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos, ya que el tratamiento control (41.44%) mostró menor número de espermatozoides permeabilizados. A pesar que la concentración de 5 U/ml proporcionó un mayor porcentaje de espermatozoides permeabilizados (65.55%), este tratamiento no fue diferente ( $P > 0.05$ ) al resto de las concentraciones de SLO.

Por otra parte, los valores reales de espermatozoides permeabilizados en los diferentes tratamientos fue de 26.75%, 31.59%, 38.42% y 41.17% para 0.2 U/ml, 0.6 U/ml, 1U/ml y 5U/ml de SLO respectivamente; esto descartando el número de espermatozoides muertos (teñidos) que se observaron en el tratamiento control.

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados y errores estándar del efecto de diferentes concentraciones de la SLO en la permeabilización de la membrana del espermatozoide de cerdo.			
Tratamiento U /ml SLO	Eyaculados (n)	Espermatozoides permeabilizados (%)*	Permeabilización real (%)
0	9	41.44 <sup>b</sup>	--
0.2	9	57.11 <sup>a</sup>	26.75
0.6	9	59.94 <sup>a</sup>	31.59
1	9	63.94 <sup>a</sup>	38.42
5	9	65.55 <sup>a</sup>	41.17

E. E. M = 2.30

\*Literales diferentes en columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )

### 8.2 Valoración de la viabilidad después del sellado de los poros.

Para la reconstitución de la membrana plasmática, los espermatozoides fueron lavados en PBS para retirar el exceso de toxina y posteriormente fueron resuspendidos en BSA al 5% en PBS. Para valorar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo después de dicho proceso se llevó a cabo la tinción de eosina-nigrosina.

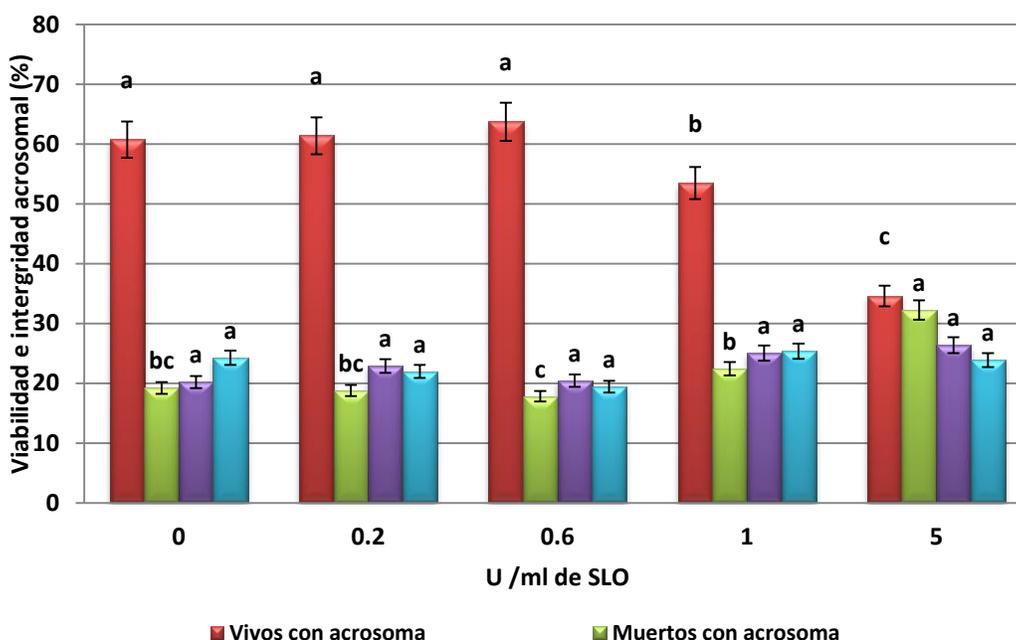
El porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana, se muestra en el Cuadro 2, en donde se observó que la concentración de 0.6 U/ml de SLO obtuvo un valor mayor (57.44%) de los espermatozoides que recibieron las concentraciones de 0.2 U SLO/ml y 1 U SLO/ml con 56.44% y 48.77%, aunque sin diferencia estadística. De manera importante no se encontró diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) con el tratamiento control. Por otra parte el número de espermatozoides viables después del sellado de los poros con BSA 5% fue menor para la concentración de 5 U/ml de SLO, obteniéndose una diferencia ( $P < 0.05$ ) en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo el porcentaje de espermatozoides permeabilizados-vivos fue mejor para la concentración de 0.6 U/ml de SLO.

**Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados y error estándar del efecto de la diferentes concentraciones de SLO, después del sellado de los poros producidos en la integridad de la membrana del espermatozoide de cerdo.**

Tratamiento U /ml SLO	Eyaculados ( n)	Espermatozoides con membrana íntegra (%)	Permeabilizados - Vivos (%)
0	9	52.55 <sup>a</sup>	--
0.2	9	56.44 <sup>a</sup>	6.89
0.6	9	57.44 <sup>a</sup>	8.51
1	9	48.77 <sup>a</sup>	0
5	9	39.27 <sup>b</sup>	0
<b>E. E. M = 2.26</b>			

\*Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )  
Error estándar de la media (E.E.M)

En la Gráfica 1, se observan los resultados obtenidos cuando fue aplicada la prueba HOST/CBB, de la tasa de espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro tratados con 0.6 U /ml de SLO ( $63.72 \pm 1.75$  %) fue mayor en comparación con los demás tratamientos, sin embargo no existió diferencia con los tratamientos de 0.2 ( $61.39 \pm 1.75$  %) y el tratamiento Control ( $60.77 \pm 1.75$  %). En contraste los tratamientos con un menor número de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro fueron los de 1 U SLO y 5 U SLO, obteniendo ( $53.5 \pm 1.75$  %) y ( $34.61 \pm 1.75$  %) respectivamente; existiendo una diferencia ( $P < 0.05$ ) entre ambos y también con el Control, 0.2 U/ml y 0.6 U/ml de SLO.



**Gráfica 1.** Efecto de las diferentes concentraciones de SLO, después del sellado de los poros, en la viabilidad e integridad del acrosoma. Las barras representan medias de mínimos cuadrados  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Medias con distinto superíndice en las barras, son diferentes ( $P < 0.05$ ).

Valores sometidos a la prueba de Tukey: Vivos con acrosoma y muertos con acrosoma

Valores sometidos a la prueba de Kruskal – Wallis: Vivos sin acrosoma y muertos sin acrosoma

En cuanto al mayor porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma íntegro fue obtenido por el tratamiento de 5 U/ml de SLO con  $32.27 \pm 1.87 \%$ , mientras que la concentración que obtuvo un menor número de espermatozoides muertos fue la de 0.6 U/ml de SLO con  $17.83 \pm 1.87 \%$ , ( $P < 0.05$ ). Sin embargo y a pesar que la dosis de 0.6 U/ml de SLO proporcionó un menor número de espermatozoides muertos, no se encontró diferencia con las demás dosis de 0.2 U/ml de SLO y el tratamiento Control ( $18.80 \pm 1.87 \%$  y  $19.22 \pm 1.87 \%$ )

En el caso del porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma, los resultados para los diferentes tratamientos Control, 0.2, 0.6, 1 y 5 U/ml de SLO, no se generaron diferencia ( $P > 0.05$ ) y fueron siguientes (20.22, 22.88, 20.44, 25.05, 26.38  $\pm$  39.4%) respectivamente. De igual manera el porcentaje de espermatozoides muertos con

acrosoma, no genero diferencia ( $P>0.05$ ) en ningún tratamiento; los resultados obtenidos para el Control, 0.2, 0.6, 1 y 5 U /ml fueron los siguientes (24.27, 22,19.44, 25.38, 23.88  $\pm$  39.4).

El porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal, obtenidos por medio de la tinción de CTC, se muestran en el Cuadro 3, en donde se observa que el porcentaje de espermatozoides capacitados permaneció constante en todos los grupos, sin diferencia ( $P=0.34$ ). De la misma manera el número de espermatozoides con reacción acrosomal fue bajo para todos los tratamientos, no encontrándose diferencia en ninguno ( $P=0.29$ ).

**Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal con los poros sellados.**

Tratamiento U /ml SLO	Eyaculados (n)	Capacitados *	Reacción acrosomal **
0	9	6.66	2.66
0.2	9	6.88	3.22
0.6	9	7.22	2.66
1	9	8.11	3.66
5	9	8.11	4.11
<b>E. E. M</b>		0.62	39.4

Error estándar de la media (EEM)

\* Los valores sometidos a la prueba de Tukey

\*\* Valores sometidos a la prueba de Kruskal - Wallis

En el Cuadro 4, se muestran el valor de motilidad progresiva (%) por tratamiento después del sellado de los poros, el cual fue mejor para los tratados con 0.2 U/SLO y 0.6 U/ml de SLO, obteniendo 65.86% y 63.45% respectivamente en comparación con el Control (59.27%), encontrándose diferencia ( $P<0.05$ ) únicamente entre los tratamientos de 0.2 U/ml y Control, sin embargo no difieren ( $P>0.05$ ) de los tratados con 0.6 U/ml 1 U/ml y 5 U/ml de SLO.

**Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad obtenido, después del sellado de los poros de la SLO.**

Tratamiento U /ml SLO	Eyaculados (n)	Porcentaje de motilidad
0	9	59.27 <sup>b</sup>
0.2	9	65.86 <sup>a</sup>
0.6	9	63.44 <sup>a b</sup>
1	9	60.61 <sup>a b</sup>
5	9	60.57 <sup>a b</sup>
		<b>EEM = 1.32</b>

Literales diferentes por columna indican diferencia (P < 0.05)

Error estándar de la media (E. E. M)

De acuerdo a los resultados obtenidos la concentración de SLO a utilizar para permeabilizar a los espermatozoides e introducir la trehalosa fue la de 0.6 U/ml, ya que fue la concentración que mostró un mayor número de espermatozoides permeabilizados – vivos después del proceso de sellado de los poros.

Para determinar la existencia de relación entre las características de viabilidad espermática, se realizó un análisis de regresión lineal, el cual arrojó efectos significativos (P < 0.05) al establecer una relación positiva (R<sup>2</sup> = 0.22) entre el porcentaje de permeabilización, integridad de la membrana (R<sup>2</sup>= 0.42), de espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro (R<sup>2</sup>= 0.77) y muertos con acrosoma (R<sup>2</sup>= 0.75), con la presencia de SLO (Cuadro 5). En el resto de las variables no existieron relaciones causa efecto significativas (P > 0.05)

El análisis muestra que el 22% de la variación en el porcentaje de permeabilización espermática puede ser explicada por la presencia de la SLO. Mientras que el porcentaje de integridad de la membrana, el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma y el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma su variación fue del: 42, 77 y 75%, respectivamente. Sin embargo, no se encontró una relación lineal en el porcentaje de espermatozoides capacitados y motilidad fue muy bajo (0.05 y 0.025 %) respectivamente.

**Cuadro 5. Modelo de regresión lineal relacionando ( %) permeabilización, (%) integridad de membrana, (%) vivos con acrosoma, (%)muertos con acrosoma, (%) vivos sin acrosoma, (%) muertos sin acrosoma, (%) capacitados, (%) reacción acrosomal, (%) motilidad con la concentración de SLO.**

Tratamiento	Variable (%)	Modelo	R <sup>2</sup>	P
SLO	Permeabilización	$\hat{y} = 53.8 + 2.7$	0.22	0.001
	Integridad de membrana	$\hat{y} = 55.2 - 3.2$	0.42	0.0001
	Vivos con acrosoma	$\hat{y} = 62.3 - 5.5$	0.77	0.0001
	Muertos con acrosoma	$\hat{y} = 36.6 + 5.5$	0.75	0.0001
	Capacitados	$\hat{y} = 7.07 + 0.2$	0.05	0.123
	Motilidad	$\hat{y} = 62.47 - 0.3$	0.025	0.295

### 8.3 Efecto de la introducción de trehalosa.

**Cuadro 6. Medias y error estándar de espermatozoides viables e integridad del acrosoma antes de congelar y tratados con trehalosa.**

Tratamiento mM de trehalosa	Eyaculados (n)	Vivos con acrosoma *	Muertos con acrosoma *	Vivos sin acrosoma **	Muertos sin acrosoma **
0	9	80.83 <sup>a</sup>	18.44 <sup>b</sup>	11.55	12.05
100	9	54.55 <sup>b</sup>	43.33 <sup>a</sup>	14.77	15.5
200	9	57.88 <sup>b</sup>	41.61 <sup>a</sup>	15.66	14.44
<b>E. E. M</b>		2.29	2.13	23.81	
<b>Polinomios ortogonales de tratamientos</b>					
<b>Efecto lineal</b>		0.0001	0.0001		
<b>Efecto cuadrático</b>		0.0001	0.0001		

Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )

Error estándar de la media (EEM)

\*Valores sometidos a la prueba de Tukey

\*\* Valores sometidos a la prueba de Kruskal - Wallis

Los resultados del número de espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro evaluados por la prueba dual HOST/CBB se muestran en el Cuadro 6, donde se puede observar que para los tratamientos de 100 mM y 200 mM de trehalosa fueron 54.55 % y 57.88 % respectivamente, sin diferencia ( $P > 0.05$ ) entre ambos. Sin embargo comparando estos resultados con los del semen fresco (control), se obtuvo diferencia ( $P < 0.05$ ) ya que los resultados obtenidos con los tratamientos de trehalosa fueron menores. En cuanto al número de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, se vio aumentado en los espermatozoides tratados con trehalosa 100 mM y 200 mM, obteniéndose 43.33 % y 41.61 % respectivamente, sin diferencia entre ambos, pero sí con el grupo control ( $P < 0.05$ ). El porcentaje de espermatozoides vivos sin acrosoma y muertos sin acrosoma, permaneció constante y sin diferencia entre los tres grupos.

Además de comparar los tratamientos, se recurrió a la técnica de polinomios ortogonales, para conocer la naturaleza de la respuesta de las variables de vivos con acrosoma y muertos con acrosoma, encontrándose un efecto lineal ( $P = 0.0001$ ) y cuadrático ( $P = 0.0001$ ) en ambas variables, lo cual indica que la presencia de la

trehalosa tiene un efecto constante, llegando hasta un punto en el cual empieza a decrecer.

El porcentaje de espermatozoides con la membrana íntegra, se muestra en el Cuadro 7, en el que también se observa que existe una diferencia estadística significativa ( $P=0.0001$ ) entre los tratamientos de trehalosa 100 mM y 200 mM (59.33 % y 59.77 % respectivamente), con el semen control (74.66 %), es decir el número de espermatozoides con la membrana íntegra fue menor para los grupos experimentales tratados con trehalosa. Por otro lado no se obtuvo diferencia ( $P>0.05$ ) entre ambos tratamientos de trehalosa 100 mM y 200 mM. En cuanto a la naturaleza de la respuesta de esta variable se encontró un efecto lineal ( $P = 0.0001$ ) y cuadrático ( $P = 0.001$ ), lo cual indica que la presencia de la trehalosa tiene un efecto constante, llegando hasta un punto en el cual empieza a decrecer.

<b>Cuadro 7. Medias y error estándar de espermatozoides con membrana íntegra, tratados con trehalosa antes de congelar.</b>		
<b>Tratamiento mM de trehalosa</b>	<b>Eyaculados (n)</b>	<b>Espermatozoides con membrana íntegra (%)</b>
<b>0</b>	9	74.66 <sup>a</sup>
<b>100</b>	9	59.33 <sup>b</sup>
<b>200</b>	9	59.77 <sup>b</sup>
		<b>EEM = 1.73</b>
<b>Polinomios ortogonales</b>		
<b>Efecto lineal</b>		0.0001
<b>Efecto cuadrático</b>		0.001

Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )  
Error estándar de la media (EEM)

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de motilidad espermática, después de la adición de la trehalosa y sellado de los poros, se muestran en el Cuadro 8. Donde se puede observar que ambos tratamientos de trehalosa 100 mM y 200 mM, obtuvieron porcentajes inferiores, 58.46 y 36.25 respectivamente, al semen fresco (control), siendo la concentración de 200mM, la que obtuvo el porcentaje de motilidad más bajo, existiendo una diferencia significativa entre todos los grupos ( $P < 0.05$ ). También se encontró un efecto lineal ( $P = 0.001$ ), indicando que el porcentaje de motilidad, entre los niveles sucesivos de la trehalosa permanece constante.

<b>Cuadro 8. Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad espermática antes del proceso de criopreservación.</b>		
<b>Tratamiento mM de trehalosa</b>	<b>Eyaculados (n)</b>	<b>Porcentaje de motilidad</b>
<b>0</b>	9	81.55 <sup>a</sup>
<b>100</b>	9	58.46 <sup>b</sup>
<b>200</b>	9	36.25 <sup>c</sup>
		<b>EEM = 1.22</b>
<b>Polinomios ortogonales</b>		
<b>Efecto lineal</b>		0.001
<b>Efecto cuadrático</b>		0.732

Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )

Error estándar de la media (EEM)

#### 8.4 Viabilidad al descongelado.

Los resultados del porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro se muestran en el Cuadro 9. En donde el porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro fue mayor para los espermatozoides tratados con 100 mM de trehalosa (7.83 %) en comparación con los tratados con 200 mM de trehalosa (6.05 %), sin embargo no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre ambos tratamientos. Únicamente se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos del grupo control (9.89 %) y el tratamiento de 200mM de trehalosa. Los resultados de la prueba del grado del polinomio indican que los efectos lineales fueron significativos ( $P= 0.001$ ), es decir que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro se incrementa linealmente a medida que se adicionan mayores cantidades de trehalosa.

**Cuadro 9. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro y espermatozoides con acrosoma íntegro al descongelado.**

Tratamiento mM de trehalosa	Eyaculados (n)	Espermatozoides vivos con acrosoma íntegro	Espermatozoides con acrosoma íntegro
0	9	9.89 <sup>a</sup>	13.61 <sup>b</sup>
100	9	7.83 <sup>a b</sup>	40.61 <sup>a</sup>
200	9	6.05 <sup>b</sup>	33.27 <sup>a</sup>
E. E. M		0.76	3.08
<b>Polinomios ortogonales de tratamientos</b>			
Efecto lineal		0.001	0.0001
Efecto cuadrático		0.884	0.0002

Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )

Error estándar de la media (E. E. M)

Sin embargo, al realizar el conteo total de espermatozoides con acrosoma íntegro, (Cuadro 9), se notó un aumento notable en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro tratados con 100 mM y 200 mM (40.61 % y 33.27 %) respectivamente ya que el número de células con acrosoma íntegro llegó a ser mayor del doble al de los espermatozoides tratados con 3% de glicerol (control), encontrándose una diferencia

significativa ( $P < 0.05$ ) entre el Control (13.61 %) y los tratados con trehalosa, pero no entre ambos tratamientos de trehalosa.

El efecto lineal ( $P = 0.0001$ ) y cuadrático ( $P = 0.0002$ ), fueron significativos, lo cual indica que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro se incrementa linealmente hasta alcanzar un máximo y posteriormente mantenerse y empezar ligeramente a descender en la medida que se adicionan mayores cantidades de trehalosa.

El porcentaje de espermatozoide con la membrana íntegra, se muestran en el Cuadro 10 y se puede observar que ninguno de los tratamientos de 100 mM y 200 mM de trehalosa superó el porcentaje de células viables, obtenido con el diluyente de congelación con 3% de glicerol (Control) ya que obtuvieron 17.44 % y 17.11 %, respectivamente, mientras que el grupo control proporciono 19.77 %, encontrándose una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Sin embargo no se encontró una diferencia entre ambos tratamientos de trehalosa 100 mM y 200 mM.

El efecto lineal fue significativo ( $P = 0.008$ ), indicando que el porcentaje de motilidad, entre los niveles sucesivos de la trehalosa permanece constante.

**Cuadro 10. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de espermatozoides con membrana íntegra al descongelado.**

Tratamiento mM de trehalosa	Eyaculados (n)	Espermatozoides con membrana íntegra (%)
0	9	19.77 <sup>a</sup>
100	9	17.44 <sup>b</sup>
200	9	17.11 <sup>b</sup>
		<b>E. E. M = 0.65</b>
<b>Polinomios ortogonales</b>		
<b>Efecto lineal</b>		0.008
<b>Efecto cuadrático</b>		0.224

Literales diferentes por columna indican diferencia ( $P < 0.05$ )

Error estándar de la media (E. E. M)

Respecto a la motilidad observada en los espermatozoides obtenidos con los tratamientos de trehalosa de 100 mM y 200 mM a pesar de que en las pruebas anteriores se muestra que están viables, la motilidad observada fue escasa (9.5 %) para ambos grupos , mientras que el grupo control mostró una motilidad del 23 % (Cuadro 11).

<b>Cuadro 11 Medias de mínimos cuadrados y error estándar del porcentaje de motilidad obtenido al descongelado.</b>		
<b>Tratamiento U.I /ml SLO</b>	<b>Eyaculados (n)</b>	<b>Porcentaje de motilidad</b>
0	9	23
100	9	9.5
200	9	9.5
		<b>EEM = 23.81</b>
<b>P = 0.0001</b>		

Valores sometidos a la prueba de Kruskal - Wallis.

## 9. DISCUSIÓN

La trehalosa ha sido aplicada en los procesos de criopreservación en diversos tipos celulares como eritrocitos, liposomas, bacterias, larvas, espermatozoides (Lynch y Slater, 2011). Son varios los mecanismos por los cuales se propone que la trehalosa tiene efectos crioprotectores, estos incluyen la formación de una capa protectora que estabiliza las biomoléculas de las membranas, así como una obstrucción en la formación de cristales de hielo (Crowe et al., 1998; Chen et al., 2001; Elliot et al., 2006; Jain y Roy, 2009).

En el presente trabajo se demostró que la presencia intracelular de trehalosa a una concentración de 100 mM mantuvo de manera notable la integridad del acrosoma en los espermatozoides permeabilizados y criopreservados de cerdo, en comparación con el grupo control que contenía 3% de glicerol, llegando esta diferencia a ser de más del 27% después del proceso de congelación – descongelación, favoreciendo a los espermatozoides tratados con 100 mM de trehalosa. Estos resultados concuerdan con los reportados en espermatozoides de cerdo 35 % (Gutiérrez et al., 2009), conejo 53 % (Dalimata y Graham, 1997), carnero 75% (Aisen et al., 2002), perro 29% (Yildiz et al., 2007), caballo 73% (Ramírez, 2008), y elefante 72 % (Saragusty et al., 2008), en los cuales la trehalosa fue adicionada al medio de congelación.

Los resultados de la prueba dual HOST /BBC, permitieron demostrar que la trehalosa (100 mM) fue introducida en los espermatozoides permeabilizados y que fue capaz de mantener a los espermatozoides de cerdo vivos y con acrosoma íntegro aún en ausencia de otro crioprotector en el diluyente de congelación. Con lo cual se puede inferir que la trehalosa de manera intracelular es capaz de estabilizar las membranas biológicas y proteínas, antes y después del proceso de congelación – descongelación.

Así mismo, este mismo tipo de espermatozoides fueron capaces de mantener la membrana íntegra (Cuadro 10). Si bien el número de espermatozoides fue reducido ello se debió al bajo porcentaje de espermatozoides permeabilizados obtenidos (Cuadro 1), lo cual se encuentra relacionado con el tipo de célula a permeabilizar y por la cantidad de colesterol presente (Hu et al., 2008).

En los espermatozoides de bovino, Sitaula et al (2009), empleando trehalosa (200 mM) de manera intracelular y extracelular, pero liofilizando a las células, mostraron 40%

de sobrevivencia de las células, sin embargo en dicho estudio no se mostró el porcentaje de célula permeabilizadas.

Por otra parte, se ha señalado que para que la trehalosa tenga un efecto crioprotector significativo debe encontrarse tanto intra como extracelularmente, ya que en un estudio realizado en ovocitos de humano por Eroglu et al (2002) encontraron que la concentración de 150 mM de manera intracelular de trehalosa y 500 mM extracelular, aumenta el porcentaje de sobrevivencia hasta un 66% a  $-60^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, en otro estudio realizado por el mismo autor pero en ovocitos de ratón llegó a la conclusión de que la presencia de trehalosa a una concentración de 100 mM y 150 mM únicamente de manera intracelular provee una remarcable protección frente al estrés asociado al proceso de congelación y que no altera la división celular y el desarrollo de blastocistos. Con el mismo objetivo en otro estudio realizado en eritrocitos de humano por Lynch y Slater (2011) se establece que una concentración de 200 mM de trehalosa incrementa la criosobrevivencia. Sin embargo, en el presente estudio sólo las células con el crioprotector presente en la parte interna se mantuvieron viables, aunque no descartamos que su empleo de manera extracelular mejore la viabilidad. Si bien en este estudio el porcentaje de motilidad en los espermatozoides tratados con trehalosa (100 mM y 200 mM) al descongelado resultó ser escaso y por lo tanto no pudo ser valorada de manera subjetiva, una propuesta razonable es pensar que fue debido al número limitado de células permeabilizadas obtenidas ( $25 \times 10^6$  de  $300 \times 10^6$  del total de células criopreservadas). No se descarta la posibilidad de que el escaso movimiento podría deberse entre otras cosas a un aumento en la viscosidad del citoplasma, causado por la misma trehalosa, ya que esta es una de las propiedades que ofrece para proteger a las biomoléculas (Jain y Roy 2009).

El número elevado de células muertas obtenidas en este estudio, aún en el grupo control, pudo ser debido al efecto de las repetidas centrifugaciones realizadas durante el proceso de permeabilización y sellado de los poros producidos por la SLO, ya que se le realizó el mismo manejo a todos los tratamientos, y se ha señalado que durante este procedimiento se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionan daño en la membrana celular irreversible, a través de una peroxidación lipídica (Membrillo et al., 2003; Rijsselaere et al. 2002).

En cuanto a la permeabilización de las células, el análisis de regresión indicó que sólo el 22% de permeabilización es explicada por la presencia de SLO (Cuadro 5),

obteniendo un porcentaje bajo (Cuadro 1), lo cual difiere de manera notable con el estudio realizado por Johnson et al. (1999) en espermatozoides de ratón, ya que utilizando la dosis de 0.6 U/ml de SLO obtuvo 80% de células permeabilizadas. Otros dos experimentos realizados en espermatozoides de humano por Yunes et al., (2000) y otro por parte de Michaut et al., (2000), refieren un 100% de espermatozoides permeabilizados. Esto último difiere con los resultados obtenidos por Johnson et al., (1999), quienes reportan 25% de células muertas en el grupo control, el cual es mucho menor comparado con el porcentaje de este tipo de células obtenido en este estudio, y que posiblemente se deba a un procedimiento de manejo diferente en el estudio realizado por Johnson et al., (1999), de investigadores. Aunque otro factor involucrado en el porcentaje tan bajo de permeabilización, podría ser atribuido al tipo de célula, ya que como se mencionó la SLO es una toxina que se une al colesterol presente en la membrana plasmática de la célula (Hu et al., 2008). En el caso del espermatozoide de cerdo se reporta que la proporción molar de colesterol: fosfolípidos es baja (0.12 - 0.20) (Córdova et al., 2001; Cross, 1998), comparada con la del espermatozoide de humano que es de 0.83 y las células nucleadas que se encuentran en un rango que va de 0.4 a 0.8 (Cross, 1998). Tampoco debemos descartar el tiempo de exposición a la SLO, ya que en los experimentos realizados por Walev et al. (2001), Yunes et al. (2000) y Michaut et al. (2002), el tratamiento de las células fue de 15 min, sin embargo el tiempo de exposición empleado por nosotros coincide con el de Johnson et al. (1999) y Fawcett et al. (1998), ya que en este último trabajo realizado en miocitos de rata, se encontró que a medida que aumenta el tiempo de exposición a la toxina el porcentaje de células muertas aumenta y el de permeabilizadas - selladas se ve disminuido. Por lo cual podría pensarse que es mejor el tiempo de exposición a 5 min que el utilizado por Walev et al. (2001), Yunes et al. (2000) y Michaut et al. (2002), ya que en estos estudios no se realizó el sellado de los poros para valorar su viabilidad. Si bien en el presente estudio el mayor número de espermatozoides permeabilizados fue con la concentración de 5 U/ml de SLO, el análisis de regresión (Cuadro 5), demuestra que a medida que aumenta la concentración de la SLO en el medio, la viabilidad espermática disminuye, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Fawcett et al. (1998) y Walev et al. (2001) en un estudio empleando células THP.

Hasta el momento no existen reportes en donde se permeabilicen espermatozoides con SLO con su posterior sellado de los poros, por lo cual comparando

nuestros resultados con los de otros trabajos en diferentes tipos celulares, encontramos, que existió una diferencia muy notoria en cuanto al porcentaje de células permeabilizadas y satisfactoriamente selladas. Fawcett et al., (1998) en miocitos de rata, con las concentraciones de 0.2U /ml de SLO y 0.6 U /ml de SLO, obtuvieron 50% y 25%, de células permeabilizadas y satisfactoriamente selladas, respectivamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Walev et al., (2001) en células THP. Lo cual se relaciona con el tipo celular a tratar debido a la proporción de colesterol presente en la célula.

Para el sellado de los poros producidos por la SLO, Walev et al., (2001), enfatizan que la presencia de  $Ca^{2+}$  es indispensable, sin la necesidad de añadir SFB, o partes del suero como la BSA, lo que difiere de manera importante con la metodología realizada por Fawcett et al., 1998, ya que en su estudio el sellado de los poros, se realizó por medio de la adición de SFB al 5%; y la presente investigación coincide con esto último, ya que nosotros utilizamos la adición de BSA al 5%. Sin embargo para valorar esta discrepancia realizamos un pequeño experimento, en el que los espermatozoides fueron tratados con  $Ca^{2+}$ , SFB 5% y BSA 5%, no encontrándose diferencia alguna entre estos tres tratamientos, pero si un incremento en el número de espermatozoides sin acrosoma en los grupos de espermatozoides tratados con calcio (datos no mostrados).

Para determinar que la permeabilización por parte de la SLO estuvo limitada a la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, la integridad del acrosoma fue valorada por medio de la prueba HOST/CBB y CTC, no encontrando una diferencia entre los espermatozoides permeabilizados y el grupo control. Esto cual concuerda con los datos obtenidos por Johnson et al; (2000) en espermatozoides de ratón; ya que el 75% de los espermatozoides permeabilizados mantuvo el acrosoma. Con esto se deduce que la exposición de 5 min a la SLO no es suficiente para inducir la reacción acrosomal en el espermatozoide y queda limitada a la membrana plasmática.

Ya que en el presente estudio se empleó BSA al 5% para el sellado de los poros producidos por la SLO, se realizó la prueba de CTC para valorar el estado de capacitación del espermatozoide (Kaneto et al., 2002; Garzón, 2008). La BSA promueve la capacitación del espermatozoide actuando como un aceptor del colesterol y favoreciendo su eflujo de la membrana plasmática, lo que resulta en una disminución de la proporción de colesterol: fosfolípidos que contribuye a un incremento de la fluidez de la membrana, seguido de un incremento de la permeabilidad iónica (Vadnais et al., 2007). Nuestros resultados mostraron que el empleo de la BSA, no produjo ningún efecto sobre

la fisiología del espermatozoide. En cuanto al porcentaje de motilidad obtenido después del sellado de los poros (Cuadro 4), las concentraciones de 0.2 y 0.6 U/ml de SLO presentaron 65.86% y 63.44% de espermatozoides motiles, respectivamente, siendo estos porcentajes superiores a los del grupo control (59.27%). Y si bien el número de espermatozoides permeabilizados fue bajo, estos resultados nos sugieren que la SLO no fue tóxica a estas dosis para las células, ya que las no permeabilizadas se mantuvieron móviles.

Finalmente, uno de los efectos más notables en los espermatozoides permeabilizados y tratados con trehalosa (100 mM y 200 mM) antes de congelar (Cuadro 6), fue la capacidad de este azúcar para estabilizar a las membranas y proteínas (Gutiérrez, 2009), ya que una gran parte de estos espermatozoides a pesar de estar muertos seguían conservando el acrosoma íntegro. Por lo anterior más estudios son necesarios para tratar de lograr un mayor número de espermatozoides vivos, antes de ser sometidos al proceso de permeabilización con la SLO, y con ello demostrar sin lugar a duda que la introducción de la trehalosa mantiene la viabilidad del semen después del proceso de criopreservación.

El porcentaje de motilidad progresiva observada en los espermatozoides permeabilizados y tratados con trehalosa (100 mM y 200 mM), comparados con el semen fresco (control), fue inferior. Lo anterior el resultado del bajo porcentaje de espermatozoides permeabilizados - vivos (Cuadro 2), aunque de la misma forma no hay que descartar el incremento de la viscosidad producida por la trehalosa o al cambio hiperosmótico producido por el azúcar, ya que un aumento en la molaridad del medio interviene de manera negativa en la motilidad del espermatozoide (Sitaula et al., 2009; Ramírez, 2008) y esto podría ser la causa de que la concentración de 200mM de trehalosa fue la que proporcionó un menor porcentaje de motilidad (Jain y Roy, 2009; Crowe et al., 1998). Por lo anterior habría que llevar a cabo más pruebas para descartar las demás hipótesis.

## 10. CONCLUSIONES

1.- La presencia de trehalosa de manera intracelular en el espermatozoide mantuvo la viabilidad del semen de cerdo durante el proceso de congelación – descongelación.

2.- La adición de trehalosa a una concentración de 100 mM al medio intracelular, presenta un efecto protector importante, ya que mantuvo la integridad del acrosoma al descongelado en más de un 27%, comparado con el diluyente de congelación con glicerol al 3%.

3.- El porcentaje de permeabilización producido por la SLO, es dependiente de la concentración a utilizar, debido a que mayor concentración, mayor es el número de células permeabilizadas; así como del tipo de célula (germinal o somática).

4.- La viabilidad después del proceso de permeabilización producido por la SLO en los espermatozoides de cerdo, disminuye a medida que la concentración de SLO aumenta.

## 11. PERSPECTIVAS

1.-Estandarizar la técnica de permeabilización reversible por medio del uso de la SLO, llevando a cabo ciertas variaciones como modificar el medio de incubación, ya que en la presente investigación se realizó en PBS y podría experimentarse con MJB (109 mM NaCl, 25 mM HEPES, 25 mM Lactato de sodio, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, , 5.6 mM Glucosa, 5 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM piruvato de Na<sup>+</sup>) (Johnson et al., 1999) omitiendo el CaCl<sub>2</sub> y NaHCO<sub>3</sub>, Medio Basal Tyrode (116.73 mM NaCl, 2.80 mM KCl, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.56 mM Glucosa (García et al., 2005).

2.-Realizar otro tipo de tinciones que nos proporcionen una mejor información acerca del estado de viabilidad de la muestra, como serían una tinción dual con yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína, así como también la prueba de fragmentación de ADN.

3.- Adicionar al medio de congelación 3.3 mM de KCl, para favorecer la motilidad al descongelado (Gutiérrez, 2009).

4.- Valorar qué cantidad de trehalosa está presente en el interior del espermatozoide de cerdo, la cual podría ser cuantificada por medio de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión) o valorada por medio de la tinción de Amarillo Lucifer.

5.- Una vez estandarizada la técnica de permeabilización con el uso de la SLO y habiendo determinando la presencia de trehalosa en el citoplasma de los espermatozoides y que esta mantenga su viabilidad al descongelado, los resultados esperados al usar esta metodología en programas de inseminación artificial tendrían que ser iguales o superiores a los obtenidos con semen refrigerado debido a que los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que la trehalosa es capaz de mantener a los espermatozoides vivos y con acrosoma íntegro.

## 12. LITERATURA CITADA

1. Abou-Haila A y Tulsiani DR. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jul 15; 379(2):173-82. Review.
2. Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 2002 Apr 15;57(7):1801-8
3. Alberts B, Honson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. El citoesqueleto. *Biología molecular de la célula*. 4ª edición. España: Omega 2002.
4. Arancibia SK. Valoración de la integridad de la teca perinuclear de los espermatozoides criopreservados de cerdo (tesis de doctorado) México, D.F: FMVZ UNAM, 2007.
5. Arenas NM. Efecto de distintas concentraciones de glicerol sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo (tesis de licenciatura). México, D.F: FMVZ UNAM, 2008.
6. Azamar Y, Uribe S, Mujica A. F-Actin Involvement in Guinea Pig Sperm Motility. *Molecular Reproduction and Development* 2007.74:312- 320.
7. Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin – nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29: 1245 – 1251.
8. Barbas J.P y Mascarenhas R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Banking*. 2009.10 (1): 49 – 62.
9. Barrientos MM. Alteración de la capacidad fusogénica del espermatozoide criopreservado de cerdo por daños en la teca perinuclear (tesis de doctorado) México, D.F: FMVZ UNAM, 2008.
10. Barry EL, Gesek FA, Friedman PA. Introduction of antisense oligonucleotides into cells by permeabilization with streptolysin O. *Biotechniques*. 1993 Dec; 15(6):1016-8, 1020.
11. Bonet SM, Briz M, Pinart E, Sancho S, García – Gil N, Badia E. Morfología espermática del porcino. Instituto de estudios Catalanes de la Universidad de Barcelona, 2000: 49 – 59.
12. Cabib E, Leloir L. The biosíntesis of trahalose- phosphate *J. Biol. Chem* 1958. 231: 259-275.

13. Chen T, Acker JP, Eroglu A, Cheley S, Bayley H, Fowler A, Toner M. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology*. 2001 Sep; 43(2):168-81.
14. Córdova A, Pérez JF, Lleó B, García Artiga C, Martín Rillo S. In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod Domest Anim*. 2001 Aug; 36(3-4):199-202.
15. Córdova I.A, Córdova JS, Córdova JA, Pérez J, Rillo M. Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas. *Ciencia Ergo Sum*. 2005.12 (3) 271 – 274.
16. Córdova IA, Hernández PE, Fernández RF, Saltijeral OJ, Gutiérrez PJ, Martín RS, García AC, Lleo CB. Congelación del semen de verraco. 1a ed. México: UAM- Xochimilco CBS 2001.
17. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*. 1998 Jul; 59(1):7-11.
18. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*. 1998; 60:73-103.
19. Crowe JH, Crowe LM. Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. *Nat Biotechnol*. 2000 Feb; 18(2):145-6.
20. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 1997 Oct 1; 48(5):831-41.
21. Dirksen RE. Centriole and basal body formation during ciliogenesis revisited. *Biol Cell*. 1991; 72(1-2):31-8.
22. Elliott GD, Liu XH, Cusick JL, Menze M, Vincent J, Witt T, Hand S, Toner M. Trehalose uptake through P2X7 purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology*. 2006 Feb; 52(1):114-27.
23. Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. . Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 2003 Apr; 46(2):121-34.
24. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril*. 2002 Jan; 77(1):152-8.
25. Escalier D, Albert M. New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity. *Fertil Steril*. 2006 Jul; 86(1):219.e1-9. Epub 2006 Jun 5
26. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*. 1975 Jun; 44(2):394-436.

27. Fawcett JM, Harrison HM, Orchard CH. A method for reversible permeabilization of isolated rat ventricular myocytes. *J. Exp Physiol.* 1998. May; 83(3): 293 – 303.
28. Felipe P Y: Dinámica del citoesqueleto de actina en espermatozoides epididimales, frescos y descongelados de bovino (tesis de doctorado). México, D.F: FMVZ UNAM. 2009.
29. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 10; 1469(3):197-235.
30. Flores GF. 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 maestría). Estado de México, Cuautitlán Izcalli: FESC UNAM, 2005.
31. Fouquet JP y Kann ML. 1994. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biol Cell.* 1994; 81(2):89-93. Review.
32. Gadea J. *Mundo Ganadero* 2004. Año 15, No 169 Pag 60 –62
33. Gadella BM y Visconti PE. Regulation of capacitation. *The sperm cell.* New York: Cambridge University, 2006: 134-158.
34. Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol.* 2008; 52(5-6):473-80. Review
35. Gagnon C y Lamirande E. Controls of sperm motility. *The sperm cell.* New York: Cambridge University, 2006: 108-133.
36. Galina C y Valencia J, editores. Reproducción de animales domésticos. 3ª ed. México: Limusa, 2008: 137-145.
37. García del Moral Raimundo. *Laboratorio de Anatomía Patológica.* 1ª Edición. Interamericana McGraw-Hill. Madrid España. 1993.
38. García M, Aparicio H.M, , Núñez I.M, García –Marín L.J, Gila M.C, y Peña V F. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology* 2005 (63) 795–805.
39. Garzón PC. Desarrollo y validación de una prueba de estrés osmótico precongelación para predecir la criosupervivencia de semen de cerdo (tesis de maestría). Estado de México, Cuautitlán Izcalli: FESC UNAM, 2008.
40. Grobfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70: 1225 – 1233.
41. Gutiérrez PO, Juárez MML, Mota D, Trujillo ME. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on

sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology*. 2011 Feb; 62(1):32-9.

42. Gutiérrez PO. Valoración in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol (tesis de doctorado) México, D.F: FMVZ UNAM, 2009.

43. Henkel R, Maass G, Schuppe HC, Jung A, Schubert J, Schill WB. Molecular aspects of declining sperm motility in older men. *Fertil Steril*. 2005 Nov; 84(5):1430-7.

44. Hernández GEO, Lecona VAN, Escobar HJ, Mújica A. Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000 May;46(1):43-58

45. Hernández MM. Criopreservación Espermática en la Especie Porcina: Variabilidad Individual (tesis de doctorado). España: Universidad de Murcia, 2007.

46. Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins. *The journal of biological chemistry*. 2003. August Vol. 278, No. 33, Issue of 15, pp. 31218–31225.

47. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000 Aug 18; 62(1-3):3-22.

48. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000 Jan 1; 53(1):47-58.

49. Hoyer- Fender S. Centriole maturation and transformation to basal body. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Apr; 21(2):142-7. Epub 2009 Jul 10.

50. Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci* 2009. May; 112(1-2):107-18. Epub 2008 Apr 24

51. Hu XQ, Ji SY, Li YC, Fan CH, Cai H, Yang JL, Zhang CP, Chen M, Pan ZF, Hu ZY, Gao F, Liu YX. Acrosome formation-associated factor is involved in fertilization. *Fertil Steril*. 2010 Mar 15; 93(5):1482-92.

52. Huo LJ, Yue KZ, Yang ZM. 2002. Characterization of viability, mitochondria activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fertil Dev*. 2002; 14(7-8):509-14.

53. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*. 2009 Jan; 18(1):24-36.

54. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000 Aug 18; 62(1-3):143-72
55. Johnson LR, Moss SB, Gerton GL. Maintenance of motility in mouse sperm permeabilized with streptolysin O. *Biol Reprod.* 1999 Mar; 60(3):683-90.
56. Jones AR, Chantrill LA, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1992 Jan; 94(1):129-34.
57. Kaneto M, Harayama H, Miyake M, Kato S. Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci.* 2002 Oct 16; 73(3-4):197-209
58. Kao SH, Chao HT, Liu HW, Liao TL, Wei YH. Sperm mitochondrial DNA depletion in men with asthenospermia. *Fertil Steril.* 2004 Jul; 82(1):66-73.
59. Larson JI, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 1999. Apr; 52(4):445-9.
60. Lynch AL, Slater NK. Influence of intracellular trehalose concentration and pre-freeze cell volume on the cryosurvival of rapidly frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 2011 Aug;63(1):26-31
61. Martínez OC, Juárez-Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66 (2006) 1969 – 1975.
62. Mascorro GJO, Avonce N, Iturriaga G. Biotecnología de la Trehalosa en Plantas. *Revista Chapingo. Serie Horticultura,* 2005 Julio – diciembre, 11/ 002/ 193 – 202. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México.
63. Medrano A y Holt W. V. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado – descongelado. *Arch. Zootec.* 1998. 47: 319 – 327.
64. Membrillo OA, Córdova IA, Hicks GJ, Olivares-Corichi IM, Martínez TV, Valencia MJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Una Revisión. Interciencia.* 2003. Dec, 28 (12)
65. Michaut M, Tomes CN, De Blas G, Yunes R, Mayorga LS. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 29; 97(18):9996-10001.

66. Moreno RD, Palomino J, Schatten G. Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Dev Biol.* 2006 May 1; 293 (1):218-27.
67. Mouritsin OG y Jorgensen K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chemistry and Phys.* 1994.
68. Nolan JP y Hammerstedt RH. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 1997 Jul; 11(8):670-82.
69. Palacios, AA. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Vet. Mex* 1994; 25(3) 207- 210.
70. Palma Ramos Alejandro. Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomyces madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Mycetozoa Dermatitis* *Dermatología Rev Mex* 2005. 49:51-58
71. Parks JE y Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, Bull, Stallion and Rooster Sperm Membranes. *Cryobiology.* 1992 Apr; 29(2):255-66.
72. Pesch S y Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 2006. 37, 597-612.
73. Ramírez VF. Estudio del efecto crioprotector de un medio de congelación a base de trehalosa sobre la viabilidad del espermatozoide del caballo (tesis de maestría) México, D.F: FMVZ UNAM, 2008.
74. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology.* 2002 Apr 1; 57(6):1669-81.
75. Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res.* 1988 Sep; 21(1):51-7.
76. Saragusty J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2009 Oct; 115(1-4):255-66.
77. Sheriff DS y Ali EF. Perspective on plasma membrane cholesterol efflux and spermatozoal function. *J Hum Reprod Sci.* 2010 May; 3(2):68-75.
78. Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006 Mar 15; 65(5):958-78.

79. Sitaula R, Elmoazzen H, Toner M, Bhowmick S. Desiccation tolerance in bovine sperm: A study of the effect of intracellular sugars and the supplemental roles of an antioxidant and chelator. *Cryobiology*. 2009; 58 : 322-330.
80. Stephens D y Pepperkot R. The many ways across the plasma membrane. *Perspective* 2001. 98 (8): 4295 – 4298.
81. Sutovsky P y Manandhar G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The sperm cell*. New York. Cambridge University, 2006: 1-30.
82. Sztejn J. M, Noble K, Farley J. S, and Mobraaten L. E. Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. *Cryobiology* 2001 41, 28–39
83. Thompson KA, Richa J, Liebhaber SA, Storey BT. Dialysis addition of trehalose/glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young. *J Androl*. 2001 Mar-Apr; 22(2):339-44.
84. Tsai PS, Garcia-Gil N, van Haeften T, Gadella BM. How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. *PLoS One*. 2010 Jun 18; 5(6):e11204.
85. Vadnais ML, Galantino-Homer HL, Althouse GC. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl*. 2007 May-Jun; 53(3):109-23.
86. Villegas J, Henkel R, Folch H, Sánchez R, Schill WB, Miska W. Production and characterization of monoclonal antibodies to the major protein of boar outer dense fibers. *J Reprod Immunol*. 1998 Oct; 40(1):81-91.
87. Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva A, Aktories K, Bhakdi S. 2001. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13; 98(6):3185-90. Epub 2001 Mar 6.
88. Wannamaker LW. Streptococcal toxins. *Rev Infect Dis*. 1983 Sep-Oct; 5 Suppl 4:S723-32.
89. Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7(4):871-91.

90. Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology*. 2001 Mar; 42(2):79-87.
91. Xiao-Qian Hu, Shao-Yang Ji, Yin-Chuan Li, Cui-Hong Fan, Huan Cai, Jun-Ling Yang, Chun-Ping Zhang, Min Chen, Zhi-Fang Pan, Zhao-Yuan Hu. Acrosome formation-associated factor is involved in fertilization, *Fertility and Sterility*, Volume 93, Issue 5, Pages 1482-1492.
92. Yamamoto I, Kimoto H, Taketo Y, Taketo A. Mutational and comparative analysis of streptolysin O, an oxygen-labile streptococcal hemolysin. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001 Dec; 65(12):2682-9.
93. Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, Han YJ, Sugawara A, Morohaku K, Nakazato F, Konno T, Yoshida M, Sato E. Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). *Anim Reprod Sci*. 2007 Nov; 102(1-2):165-71.
94. Yildiz C, Kaya A, Aksoya M T and Tekeli. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 2000 Sep 1; 54(4):579-85.
95. Yunes R, Michaut M, Tomes C, Mayorga LS. Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biol Reprod*. 2000 Apr; 62(4):1084-9.

