



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Evaluación del empleo de nanopartículas para la conservación de
la viabilidad del semen criopreservado de verraco**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Silvia Ramírez Castillo

TUTORA: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Oscar Gutiérrez Pérez

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina, FMVZ,
UNAM.

Dr. Roberto Díaz Torres
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

mayo 2021



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.

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 ésta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. Silvia Ramírez Castillo

DEDICATORIA

A lo largo del tiempo, mi vida se ha llenado de cosas maravillosas y que me gustaría compartir con las personas que son importantes, personas que amo y que siempre me han apoyado en cada uno de mis pasos. Gracias a mi padres Silvia y Manuel, y por supuesto a mis hermanos Francisco y Manuel, porque todos ustedes son un pilar importante tanto en mi formación académica como personal.

Una personita maravillosa que me motivó, me empujó, y que siempre ha representado un reto constante en el día a día, es y siempre será, mi hija Sarah Selene con apenas tres años de vida cambiaste mi mundo. Quiero dedicarte todos mis logros y que ello te represente en un futuro tu propia motivación en la vida para poder alcanzar tus metas. Te amo Sarah, eres toda mi vida.

Gracias Abel Adrián, primero por ser mi compañero de carrera, compañero de laboratorio y compañero de vida. Quiero agradecer el apoyo y el empuje que siempre me das, ya sea con palabras o con el ejemplo en tu propio trabajo. Te amo, y quiero que juntos sigamos acumulando momentos inolvidables con nuestra hija, porque este camino apenas inicia.

Tengo un fuerte agradecimiento y cariño a quienes considero mis amigos y que fueron piezas clave dentro de mi formación en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Gracias doc. Jorge por darme la oportunidad de formar parte de éste equipo de trabajo y por escucharme en los momentos más difíciles de este proceso. Gracias doc. Mario por encaminarme en éste proceso educativo. Gracias doctora Lourdes por aceptarme en su laboratorio, porque usted es un ejemplo a seguir como profesora y como investigadora. Gracias a la doctora Martha por su apoyo en el proceso de mi formación académica y profesional.

Gracias a mis amigos con los que compartí grandes momentos dentro y fuera de la facultad, si hubiera sido en otro momento de mi vida esto no hubier sido posible, los quiero mucho Fabiola (FabiMoon), Lorena, Mariana, Ruy (mi compañero empresario), Sandra, Dani y Aurora.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, la mejor de Latinoamérica. También a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por el apoyo facilitado en el ingreso y trabajo dentro del laboratorio de investigación a cargo de la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.

Mis agradecimientos al equipo que conformó el comité tutorial. Gracias al Dr. Roberto Díaz Torres, Dr. Oscar Gutiérrez Pérez y a mi tutora, la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.

Agradezco al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, coordinador del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina CEIEPP, ubicado en Jilotepec, Estado de México por las facilidades y colaboración en la donación de material biológico.

Agradezco también al Dr. Roberto Díaz Torres por su apoyo en la elaboración de nanopartículas y el apoyo brindado en el uso de las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Además a la Dra. Samantha Jardón Xicotencatl de la FES Cuatitlán por el apoyo en la medición de dichas nanopartículas. También un afectuoso reconocimiento al Dr. Noé Orlando Juárez López responsable del departamento de Genética y Bioestadística por su apoyo en el análisis estadístico.

A los miembros del jurado por sus comentarios y recomendaciones para mejorar el presente trabajo. Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, Dr. Alejandro Córdova Izquierdo, y al Dr. Salvador Uribe Carvajal.

Agradecimiento por el apoyo otorgado, como parte del proyecto financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT con Clave IN219717 como parte del proyecto que lleva como nombre "Evaluación del efecto de la desestabilización de la actina de la teca perinuclear, ocasionada por el proceso de criopreservación del espermatozoide de mamífero, sobre la capacidad fertilizante de la célula".

Agradecimientos al CONACYT por el apoyo económico.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1. Morfo-fisiología de los espermatozoides.....	11
2.1.1. Espermatogénesis	
2.1.2. Morfología del espermatozoide	
2.1.2.1. Cabeza	
2.1.2.2. Pieza media (mitocondrial)	
2.1.2.3. Cola o pieza principal y pieza terminal	
2.1.2.4. Membrana plasmática	
2.1.3. Capacitación espermática y reacción acrosomal	
2.2. Criopreservación.....	18
2.2.1. Transiciones de fases	
2.2.2. Criopreservación en espermatozoides	
2.2.3. Crioprotectores	
2.2.3.1. Trehalosa	
2.3. Nanopartículas.....	29
2.3.1. Nanopartículas poliméricas	
2.3.2. Quitosán	
2.3.3. Nanotecnología y reproducción	
2.3.4. Toxicidad	
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS.....	36

5. OBJETIVOS.....	37
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
6.1. Obtención de las muestras.....	38
6.2. Primera etapa: Elaboración y medición de Nanopartículas poliméricas (NPs).....	38
6.3. Segunda etapa: Pruebas de toxicidad previas a la congelación y durante la refrigeración.....	40
6.4. Tercera etapa: Congelación.....	41
6.5. Descongelación de las muestras.....	45
6.6. Evaluación de la viabilidad espermática.....	46
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
8. RESULTADOS.....	47
9. DISCUSIÓN.....	69
10. CONCLUSIONES.....	75
11. PERSPECTIVAS.....	75
12. REFERENCIAS.....	76

RESUMEN

En la especie porcina, el empleo de semen criopreservado se ha limitado por la baja viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación y por el potencial tóxico del glicerol. Esto se debe a que a diferencia de otras especies son particularmente sensibles al frío y al crioprotector utilizado de forma rutinaria, ocasionando que el 80% de las inseminaciones artificiales se realicen principalmente con semen refrigerado. El uso de nanopartículas poliméricas (NPs) como el quitosán, ha generado una gran expectativa, al funcionar como acarreador de un agente crioprotector como la trehalosa y otorgar una probable capacidad crioprotectora, al observar cierto porcentaje de viabilidad en los espermatozoides de cerdo, sin el uso de un diluyente de congelación. En el presente trabajo se evaluó el empleo de nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y nanopartículas de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) como agente crioprotector en los espermatozoides de cerdo pre y post congelación. El primer paso fue determinar la citotoxicidad de las NPs bajo diferentes condiciones (temperatura, medio y concentración). Se encontró que tanto las NPs-Q como las NPs-QT durante la incubación *in vitro*, pueden dañar la viabilidad espermática, sin embargo el porcentaje de daño dependerá del tamaño de las NPs, concentración de las mismas, tiempo de exposición, medio y temperatura de incubación. Con los resultados *in vitro*, se determinó que en un proceso de congelación, los espermatozoides no deben ser expuestos a una concentración mayor de 40 $\mu\text{l/ml}$ de ambos tipos de NPs en el medio de incubación BTS y el tiempo no debe ser mayor a los 10 minutos, independiente de la temperatura utilizada (37°C, 16°C y 5°C). Los resultados post descongelación obtenidos, mostraron que la viabilidad en los espermatozoides expuestos a las NPs-Q y a las NPs-QT fue de 32% y 34%, respectivamente, siempre y cuando se utilice un diluyente a base de yema de huevo, sin la adición de glicerol. Éstos resultados no fueron mejor que los protocolos utilizados de forma rutinaria, por lo tanto se rechaza la hipótesis planteada al no obtener una mejoría en la técnica con el protocolo descrito en el presente trabajo.

Palabras clave: Crioconservación, trehalosa, quitosán, nanopartículas, toxicidad, espermatozoide y verraco.

ABSTRACT

In porcine species, the use of cryopreserved semen has been limited by the low viability of spermatozoa after thawing and by the toxic potential of glycerol. This is due to the fact that, unlike other species, they are particularly sensitive to cold and to the cryoprotectant used routinely, causing 80% of artificial inseminations to be carried out mainly with refrigerated semen. The use of polymeric nanoparticles (NPs) such as chitosan, has generated great expectations, as it functions as a carrier of a cryoprotective agent such as trehalose and provides a probable cryoprotective capacity, by observing a certain percentage of viability in boar sperm without the use of a freezing diluent without it. In the present work, the use of chitosan nanoparticles (NPs-Q) and chitosan nanoparticles loaded with trehalose (NPs-QT) as cryoprotective agent in pre and post freezing boar sperm was evaluated. The first step was to determine the cytotoxicity of the NPs under different conditions (temperature, medium and concentration). It was found that both NPs-Q and NPs-QT during in vitro incubation can injury sperm viability, however the percentage of damage will depend on the size of the NPs, their concentration, exposure time, medium and incubation temperature. With the in vitro results, it was determined that in a freezing process, the sperm should not be exposed to a concentration greater than 40 μ l / ml of both types of NPs in the BTS incubation medium and the time should not be longer than the 10 minutes, regardless of the temperature used (37°C, 16°C and 5°C). The post-thaw results obtained showed that viability in sperm exposed to NPs-Q and NPs-QT was 32% and 34%, respectively, as long as an egg yolk-based diluent is used, without the glycerol addition. These results were not better than the protocols used routinely, therefore the hypothesis raised was rejected as there was no improvement in the technique with the protocol described in the present work.

Keywords: Cryopreservation, trehalose, chitosan, nanoparticles, toxicity, sperm and boar.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la década de los 60's el descubrimiento del glicerol como agente crio protector permitió desarrollar los primeros protocolos enfocados a la congelación del semen de cerdo, desarrollado por Westendorf en el año de 1975 (en Hezavehei *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha existe una constante búsqueda en el desarrollo de protocolos de congelación para ésta especie, pues al ser particularmente termo sensibles, se obtienen bajos porcentajes de viabilidad después del proceso de congelación-descongelación. Además, el uso de semen descongelado para la inseminación artificial (IA) genera bajos niveles de fertilidad y prolificidad, por ello el uso preferente de semen refrigerado (15-18°C) en un 80% de las IA (Gómez *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2015; Yeste *et al.*, 2017).

Los diluyentes de congelación utilizados hasta el momento, incluyen al glicerol a una concentración no mayor del 3%, ya que la baja actividad de la glicerol quinasa y la generación de metilgloxal como resultado del metabolismo de los espermatozoides de cerdo, causa alteraciones en la principal estructura del citoesqueleto, como lo es la teca perinuclear (Arenas, 2008).

Otro crioprotector de gran interés, capaz de estabilizar proteínas, es la trehalosa, un disacárido no tóxico e impermeable presente intracelularmente en organismos capaces de soportar temperaturas extremas (Chen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2018). El efecto benéfico de la trehalosa ya sea extracelular o intracelular es mejorando la crioprotección en diferentes tipos celulares, como eritrocitos, células mesenquimales, células del sistema inmune y geminales como ovocitos y espermatozoides (Gutiérrez, 2009; Nieves, 2012; Silva *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2018).

Por otra parte, las nuevas herramientas tecnológicas como el uso de diferentes tipos de nanopartículas (NPs) con gran variedad de materiales para su elaboración (Barkalina *et al.*, 2014; Falchi, 2018), han destacado en el área de la reproducción, como por ejemplo, la selección de semen de buena calidad, sexado, o como suplementos para mejorar la conservación de gametos, como por ejemplo las nanopartículas acarreadoras de agentes crio protectores como la trehalosa para mantener la viabilidad de espermatozoides (Ann, 2017; Hill y Li, 2017; Juárez *et al.*, 2018). Éste agente crioprotector como parte de las NPs ha demostrado mantener cierta viabilidad espermática en el cerdo después de la descongelación, sin necesidad de utilizar otro tipo de agente crioprotector (Juárez *et al.*, 2018). Ello abre la ventana de oportunidades en la mejora de los diferentes protocolos de congelación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Morfo-fisiología de los espermatozoides

2.1.1. Espermatogénesis

Las características morfológicas de los espermatozoides se obtienen gracias a un proceso cíclico altamente coordinado llamado espermatogénesis, este proceso se realiza en el epitelio seminífero (**Figura 1**) cuya ciclicidad temporal varía de especie a especie. La duración total de la espermatogénesis es de 4.5 ciclos con un aproximado de entre 30 y 75 días en los mamíferos (Almeida *et al.*, 2006). En el caso particular de los espermatozoides de cerdo la duración de cada ciclo es de alrededor de 9 días, con cuatro ciclos y medio, por lo que la duración total es de 40 días y funcionalmente el proceso completo lo conforman tres fases (Almeida *et al.*, 2006; França *et al.*, 2005):

1.- Espermatocitogénesis: La fase consiste en divisiones mitóticas de las *espermatogonias*, lo que da origen a cuatro tipos celulares: Indiferenciadas tipo A, diferenciadas tipo A, intermedia y tipo B. Ello permite que la producción de espermatozoides siempre sea constante (França *et al.*, 2005).

2.- Fase meiótica o también llamada espermatocitaria: Los *espermatocitos primarios* (derivadas de las espermatogonias tipo B) y secundarios presentan dos divisiones meióticas que favorece la variabilidad genética (França *et al.*, 2005).

3.- Fase de espermiogénesis: Las *espermátidas indiferenciadas* y con forma esférica sufren cambios morfológicos, dando lugar a la diferenciación celular. En esta fase disminuye el tamaño del espermatocito a solo el 2% de su volumen inicial y da origen al espermatozoide, una vez que se desprende del epitelio de la célula de Sertoli se llama espermatozoide (França *et al.*, 2005).

Adicionalmente, los espermatozoides producidos en los túbulos seminíferos deben someterse a un proceso de maduración epididimal, en donde adquieren su capacidad fertilizante. La maduración incluye la adquisición del **movimiento progresivo**, siendo el cambio más evidente durante la maduración, también se observa la **migración de la gota citoplasmática (GC)** que es desplazada desde el cuello del espermatozoide hasta el anillo que conecta la pieza intermedia con la pieza principal; el residuo corresponde al citoplasma de las células germinales del periodo de espermiogénesis, el mantenimiento del mismo se ha asociado en cerdos y toros con la reducción de la fertilidad, además de relacionarlo con la obtención frecuente de semen de los sementales. La GC se ha propuesto que regula la homeostasis al contener canales de potasio, cloro y agua (França *et al.*, 2005).

También se han identificado cambios proteómicos, en el que se incluyen modificaciones en lípidos y azúcares, lo cual modifica la superficie del espermatozoide, preparándolo para la activación de vías de señalización (Gervasi

y Visconti 2017). Dada las limitadas opciones de síntesis de los espermatozoides, se cree que las proteínas son sintetizadas por el epitelio epididimario y luego incorporadas a los espermatozoides por absorción de proteínas solubles o por transferencia de exosomas llamados epididimosomas (25 a 300nm.) cuyo contenido es proteico, microARN y lípidos; se ha propuesto que los epididimosomas son la principal forma de transferencia de proteínas y otras moléculas a los espermatozoides (França *et al.*, 2005).

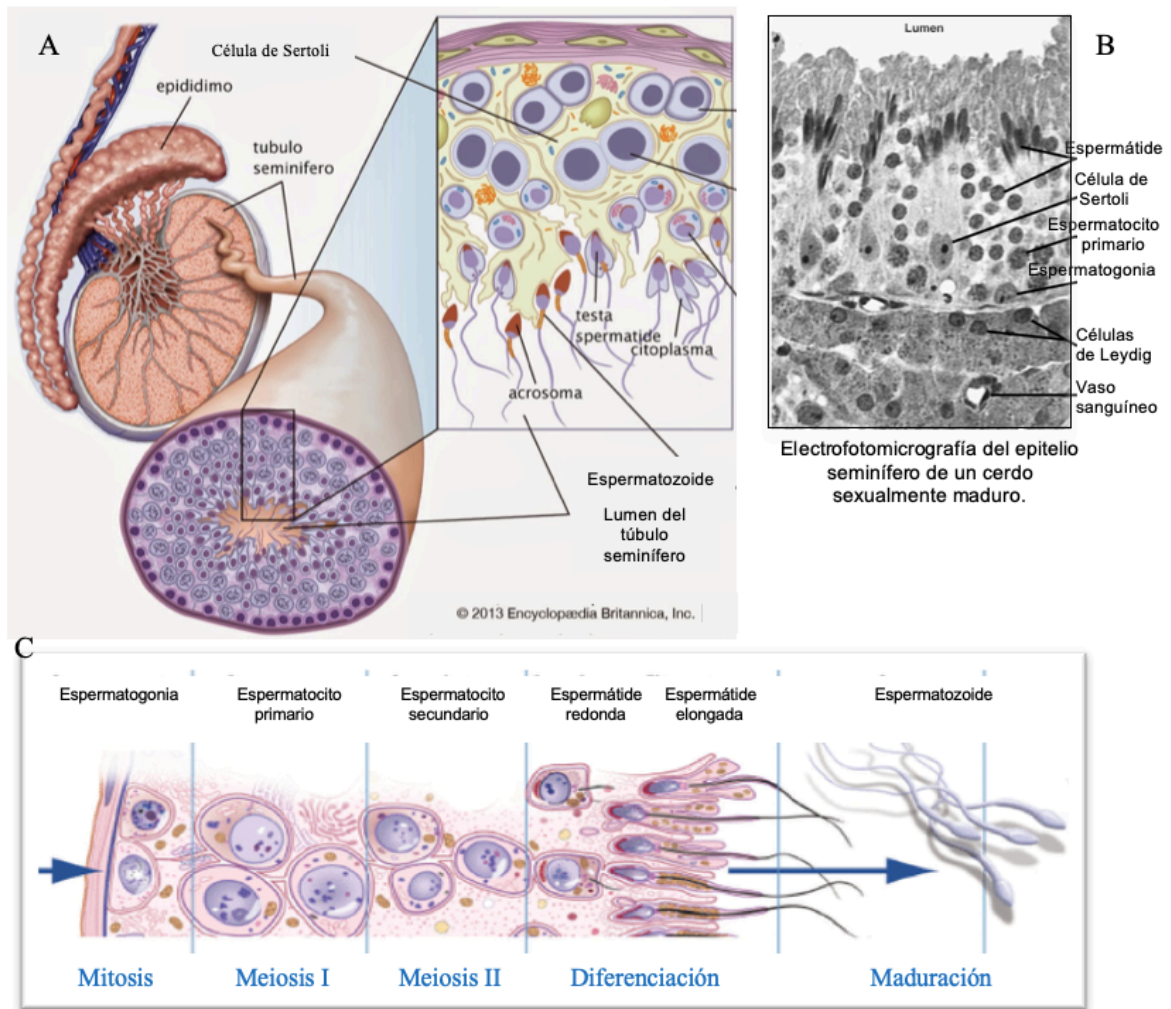


Figura 1: Espermatogénesis. En **A** se muestra la representación esquemática del testículo con una ampliación en uno de los túbulos seminíferos. **B**, electrofotomicrografía de transmisión en donde se puede observar la composición del parénquima testicular de un cerdo sexualmente maduro, se pueden identificar algunas estructuras como la túnica propia, células mioideas peritubulares, lámina basal, el epitelio seminífero con células de Sertoli y células germinales en diferentes etapas de desarrollo y en el compartimento intertubular las células de Leydig. Finalmente en **C** se esquematiza el ciclo de espermatogénesis (Tomado y modificado de França *et al.*, 2005 y Du Plessis *et al.*, 2011).

2.1.2. Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides de cerdo tienen forma de espátula, la cabeza tienen un largo casi del doble de su ancho, de alrededor de $8.5\mu\text{m}$, la pieza media tiene alrededor de $10\mu\text{m}$ de longitud y la cola $30\mu\text{m}$, sin embargo, hay que considerar que dentro de un eyaculado se pueden encontrar diferentes poblaciones de espermatozoides (Hancock, 1955; García *et al.*, 2015).

El espermatozoide está constituido por tres partes principales, cabeza, pieza media (o mitocondrial) y cola. En la **figura 2** se puede observar una representación esquemática de un espermatozoide de cerdo junto con sus diferentes estructuras anatómicas asociadas, como por ejemplo, la membrana plasmática, acrosoma, núcleo, mitocondrias, flagelo, etc. También se esquematiza la diferenciación funcional de la cabeza, distinguiéndose cuatro regiones o dominios: apical, pre ecuatorial, ecuatorial y post ecuatorial (Gadella *et al.*, 2008).

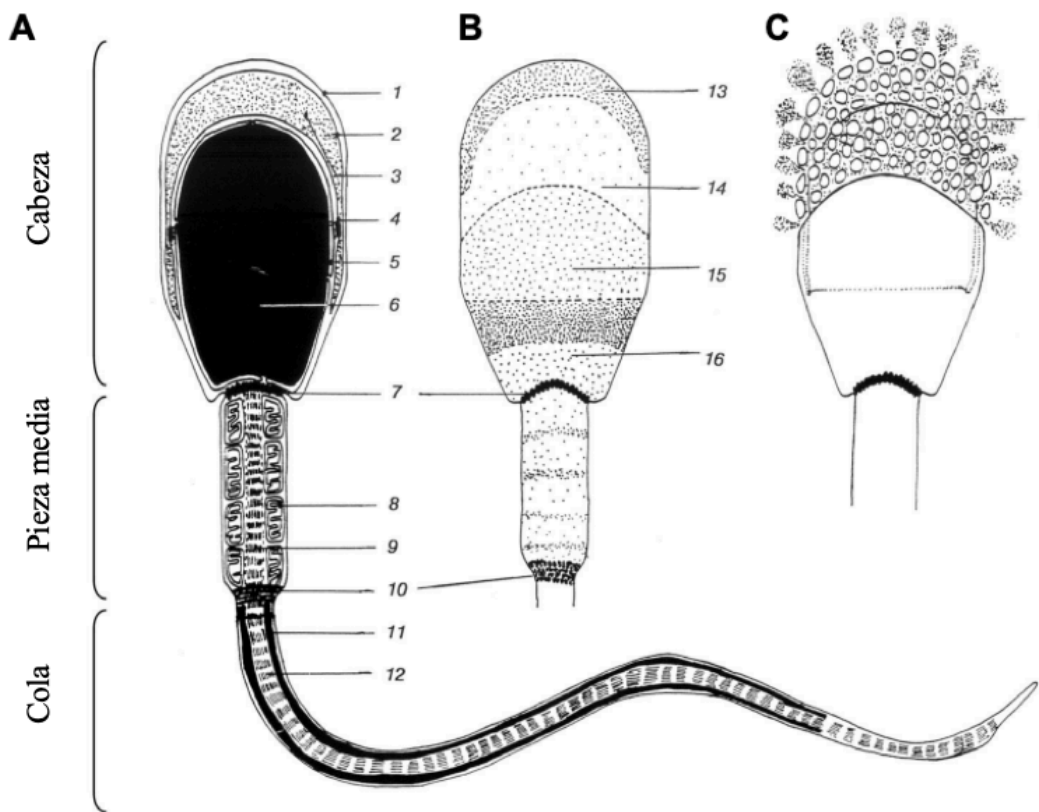


Figura 2: Representación esquemática del espermatozoide de cerdo. (A) corte longitudinal del espermatozoide 1: membrana plasmática, 2: membrana acrosómica externa, 3: matriz enzimática acrosómica, 4: membrana acrosómica interna, 5: envoltura nuclear, 6: núcleo, 7: anillo posterior y cuello, 8: mitocondrias, 9: parte proximal del flagelo, 10: anillo anular, 11: vaina fibrosa, 12: axonema y fibras densas externas. (B) representación de los subdominios del espermatozoide, 13: región apical, 14: pre ecuatorial, 15: región ecuatorial, 16: post ecuatorial, (C) reacción acrosomal, 17: vesículas mixtas formadas durante la reacción acrosomal con múltiples fusiones de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa (Modificado de Gadella *et al.*, 2008).

2.1.2.1.- Cabeza

Está constituida por tres estructuras principales, el acrosoma, la teca perinuclear y el núcleo. El acrosoma es una vesícula que se localiza por encima del núcleo en forma de capuchón conformando la región acrosómica, dividida en tres segmentos: 1) apical, 2) principal y 3) ecuatorial (Bonet, 2000; Pesch y Bergman, 2006). El contenido acrosomal está constituido por docenas de proteínas cuya función final es la interacción con el ovocito (Foster y Gerton, 2016). Las diferentes proteínas presentes en el acrosoma se pueden agrupar en proteasas, glicosidasas y proteínas de unión (Buffone, Foster y Gerton, 2008), algunos ejemplos de enzimas acrosomales que facilitan la penetración de la corona radiada y de la zona pelúcida son la acrosina, la hialuronidasa, la hidrolasa y las esterases (Pesch y Bergman, 2006).

El núcleo del espermatozoide se encuentra rodeado por la teca perinuclear (TP) también llamada sustancia perinuclear o matriz perinuclear (componente del citoesqueleto). Se divide en dos regiones, la subacrosomal ubicada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y la región postacrosomal que se extiende desde el segmento ecuatorial entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear en forma de copa (Martínez *et al.*, 2006; Barrientos *et al.*, 2009). La TP da forma a la cabeza del espermatozoide, mantiene la unión entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear, además de mantener los dominios de membrana y proteger al núcleo de la descondensación. El núcleo contiene al ADN altamente empaquetado gracias a las protaminas que sustituyen a las histonas durante la espermatogénesis (Arenas *et al.*, 2010).

2.1.2.2.- Pieza media (o mitocondrial)

El flagelo es una estructura móvil especializada compuesta por microtúbulos y proteínas asociadas. El movimiento se produce por la flexión de la parte central (axonema). El axonema se organiza en nueve dobletes de microtúbulos en forma circular junto con un par central, las moléculas de dineína forman puentes entre los dobletes con los microtúbulos vecinos a lo largo de toda la circunferencia, cuando se activa el dominio motor de las dineínas al intentar desplazar al doblete adyacente obliga a los otros a deslizarse, sin embargo la presencia de nexina entre los dobletes impide el desplazamiento y ello desencadena un movimiento de flexión (Alberts *et al.*, 2016). El movimiento es adquirido en el tránsito por el epidídimo, pero el movimiento después del eyaculado consiste en un bateo simétrico de la cola, permitiendo el desplazamiento en forma progresiva (Olivera *et al.*, 2006).

La pieza media o intermedia es la porción del flagelo en donde las mitocondrias están ubicadas en la parte distal de la pieza de conexión hasta el anillo de Jensen, esta última estructura evita el desplazamiento de las mitocondrias hasta la pieza principal (Bonet *et al.*, 2000). Las mitocondrias están ubicadas por debajo de la

membrana plasmática de forma helicoidal del axonema conformando la vaina mitocondrial.

Por debajo de las mitocondrias se ubican las fibras densas que se extienden a lo largo de la pieza media y el primer tercio de la pieza principal, permitiendo una mayor protección, por debajo se localiza el axonema (Bonet *et al.*, 2000). Las mitocondrias son consideradas la “planta de energía” de la célula, tienen un papel clave en la homeostasis celular y motilidad de los espermatozoides. Los espermatozoides de mamíferos suelen tener entre 50 y 75 mitocondrias (Barbagallo *et al.*, 2020).

Se ha sugerido que los espermatozoides exhiben una versatilidad en el metabolismo utilizando, ya sea la vía glucolítica anaeróbica o la fosforilación oxidativa o una combinación de ambas vías para la producción de energía, ello depende del sustrato disponible en el tracto genital de la hembra. La vía glucolítica es importante para la hiperactivación, la motilidad lineal se induce por la actividad mitocondrial en condiciones de glucosa baja (Barbagallo *et al.*, 2020). El consumo de energía para el espermatozoide son las fuentes externas como lactato, piruvato, citrato, glicerol y triglicéridos, en el caso de los espermatozoides de cerdo la vía glucolítica es muy activa y la absorción es a través de receptores transmembranales (GLUT1) distribuidos en la cabeza y cola; sus mitocondrias tienen crestas delgadas y cortas, lo que podría indicar poca eficiencia en proveer energía (Rodríguez y Bonet 2016).

2.1.2.3.- Cola o pieza principal y pieza terminal

La pieza principal corresponde al segmento más largo del flagelo del espermatozoide, el cual se extiende desde el anillo de Jensen hasta el extremo proximal de la pieza terminal; contiene la vaina fibrosa como parte del citoesqueleto, fibras densas y axonema. Finalmente la pieza terminal, corresponde a la porción distal de la cola, y se encuentra conformada únicamente por el axonema y membrana plasmática asociada (Bonet *et al.*, 2000)

2.1.2.4. Membrana plasmática

La membrana plasmática de los espermatozoides está constituida por una bicapa fosfolipídica anfipática, además de los fosfolípidos, dentro de sus diferentes componentes se encuentran proteínas y colesterol. Los lípidos de membrana no están distribuidos aleatoriamente sino que existe una asimetría en donde se puede observar que la fosfatidilserina (FS) y la fosfatidiletanolamina (FE) se encuentran predominantemente en la capa interna (citosólica), mientras que los glicolípidos, la fosfatidilcolina (FC) y la esfingomielina (EM) se ubican en la capa externa de la bicapa de la membrana, además los diferentes tipos de proteínas también están

organizadas de forma asimétrica (Gadella *et al.*, 2008). Los espermatozoides, al poseer escaso material citoplasmático mantienen casi un contacto directo entre las diferentes membranas subyacentes, así como con estructuras del citoesqueleto (Gadella *et al.*, 2008).

De manera muy particular, en la membrana del espermatozoide existe un alto contenido de FE, FC, difosfatidilglicerol, esteroides y lípidos neutros representando un 70-80%. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de membrana pueden variar según el tipo celular, por ejemplo el principal ácido graso presente en los fosfolípidos de espermatozoides de mamíferos es el ácido docohexanoico (22:6) presentándose en más del 60% en el cerdo, mientras que en el bovino únicamente está en un 30% (Córdova *et al.*, 2001); por otra parte el espermatozoide del cerdo presenta un bajo porcentaje de fosfatidilcolina, pero alto en fosfatidiletanolamina y esfingomielina (Nieves, 2012).

La arquitectura lipídica de la membrana plasmática tiene un papel importante en el proceso de capacitación, ya que durante la capacitación existe un aumento en la fluidez, gracias a la redistribución del colesterol en la región apical y posterior de la cabeza. El colesterol es importante en la formación de balsas lipídicas (rafts) o también llamados microdominios de membrana. Las balsas favorecen las interacciones específicas entre proteína-proteína al concentrarlas en lugares específicos, por ejemplo en los espermatozoides de cerdo la caveolina-1 y la flotilina-1 están restringidas a la región acrosómica anterior. Así, las balsas lipídicas al concentrar moléculas de señalización y excluir otras, pueden favorecer interacciones específicas que resulten en la actividad de cascadas de señalización, todo ello necesario para la capacitación (Gestel *et al.*, 2005).

2.1.3. *Capacitación espermática y reacción acrosomal*

La capacitación corresponde a un evento de maduración en el tracto reproductor femenino cuyas características fueron descritas por Chang y Austin desde el año de 1951 (en Gervasi y Visconti 2017). Gracias a ello, se han desarrollado medios de capacitación *in vitro* para el entendimiento del mismo y mejorar a su vez las técnicas de fertilización asistida, ya que ello ha facilitado y esclarecido algunos de los mecanismos de señalización asociados (Gervasi y Visconti 2017).

Los espermatozoides después de la eyaculación no cuentan con la capacidad de fertilizar, por lo que tienen que llevar a cabo una serie de cambios que les permitan adquirir la capacidad fertilizante, el tiempo requerido para que se lleve a cabo por especie es variable, en el caso de los espermatozoides de cerdo es alrededor de 5 a 6 horas y en los trabajos *in vitro* se observó que es dependiente de Ca^{2+} y HCO_3^- (Vadnais, Galantino-Homer y Althouse, 2007).

Los cambios moleculares observados durante la capacitación se pueden observar en modificaciones de la membrana, generando una disminución de la estabilidad membranal y una mayor permeabilidad, favoreciendo a su vez la pérdida de colesterol, proteínas y de carbohidratos (Vadnais, Galantino-Homer y Althouse, 2007; Gilbert, 2010), lo que favorece el desenmascaramiento de los sitios de reconocimiento para las proteínas de la zona pelúcida (Arenas, 2010; Gilbert, 2010). Además existen cambios en la fosforilación de proteínas, iniciando con una hiperpolarización de la célula por la salida de iones de K^+ , permitiendo que los canales de calcio y bicarbonato se abran, favoreciendo la activación en la producción de AMPc (Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico); el ingreso de bicarbonato y la eliminación de colesterol disminuye la estabilidad membranal, por lo que se activa la vía sAC-cAMP-PKA (proteína quinasa A), ello incluye la alteración de cuatro fosfolípidos principales FE, FS, EM, y FC (Gilbert, 2010). También se ha descrito que el aumento de Ca^{2+} activa directamente sAC (adenilato ciclasa soluble) y regula los eventos de capacitación dependientes de AMPc (Vadnais, Galantino-Homer y Althouse, 2007).

El incremento de bicarbonato (HCO_3^-) intracelular activa a la sAC para producir AMPc, ello a su vez, estimula a la PKA para fosforilar sustratos proteicos. También se ha descrito que el aumento de Ca^{2+} activa directamente sAC y regula los eventos de capacitación dependientes de AMPc (Vadnais, Galantino-Homer y Althouse, 2007). La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se ha relacionado con la capacitación y la motilidad hiperactivada en los espermatozoides de mamíferos. La PKA fosforila a la fosfolipasa D (PLD), la cual estimula la polimerización de actina, además activa a la fosfolipasa C (PLC), quien cataliza la conversión de fosfatidilinositol trifosfato (IP_3) en diacilglicerol (DAG) e IP_3 , involucrados en el incremento de la fluidez de la membrana plasmática y aumento de la capacidad fusogénica. Estos cambios también modifica el patrón de motilidad espermática (Vadnais, Galantino-Homer y Althouse, 2007).

La motilidad del espermatozoide se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por la interacción de ligandos específicos y por la glucosa presente en el líquido seminal y tracto reproductor femenino. En condiciones *in vitro* ligandos como la progesterona, factor de atracción y activación espermática (SAAF, por sus siglas en inglés sperm activating and attracting factor) que induce la entrada de Ca^{2+} , el péptido activador de espermatozoide (PAS) y el péptido atrial natriurético (PAN), generan un aumento transitorio de GMPc (guanosin mono fosfato cíclico), de AMPc y la activación de guanilil ciclasa ligada a membrana (GCm) o soluble (GCs). La GCm se activa por la unión del péptido PAS a su receptor o por el aumento en la concentración de GMPc y la GCs se activa por el óxido nítrico (ON) producido por la óxido nítrico sintasa, por consecuencia se abren los canales de K^+ dependientes de GMPc, provocando la salida de K^+ generando hiperpolarización, éste cambio en el potencial de membrana activa al intercambiador Na^+/H^+ , la salida de H^+ induce la alcalinización del citosol y la activación de la dineína. La activación de la movilidad flagelar se da por fosforilación y defosforilación de proteínas en tirosinas mediadas por PKA dependiente de AMPc, la subunidad catalítica de la

PKA posee una estructura aparentemente ligada a los microtúbulos del axonema, ya que se ubica cerca del brazo de dineína, así la PKA se fija en el dominio de algunas proteínas relacionadas con la activación y relacionadas a ser fosforiladas, como las hexoquinasas, AKAP (proteína de anclaje de la quinasa A) y la glucógeno sintasa-quinasa (Olivera *et al.*, 2006).

El movimiento del flagelo se presenta por la activación de los ensamblajes complejos de regulación de la dineína. El ATP se requiere para el deslizamiento entre los brazos y los microtúbulos, su hidrólisis rompe la unión entre el microtúbulo B y la dineína garantiza el movimiento, simultáneamente se dan fenómenos de fosforilación y defosforilación en la unión del brazo externo del microtúbulo A y del microtúbulo B del brazo adyacente. En tanto el par central de microtúbulos con dominio AKAP dirige el plano de inclinación flagelar (Olivera *et al.*, 2006).

Una vez que los espermatozoides se han capacitado, pueden llevar a cabo la reacción acrosomal, cuyo proceso involucra la fusión de la membrana citoplasmática externa, con la membrana acrosomal externa de la zona apical de la cabeza del espermatozoide, liberando las enzimas almacenadas (exocitosis) y ello permitiendo el paso a través de la zona pelúcida (Olivera *et al.*, 2006). Es decir, al existir una fusión de la membrana plasmática y la acrosomal en varios sitios formando vesículas mixtas que se desprenden, ello permite la liberación del contenido acrosomal a medida que el espermatozoide penetra la zona pelúcida (Arenas *et al.*, 2010). La molécula central en el proceso de exocitosis son los SNAREs (del inglés soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor proteins), en el caso particular del espermatozoide de cerdo el complejo SNARE involucra la fusión de membranas (Gadella, 2008).

2.2 Criopreservación

La técnica de crioconservación tiene como objetivo mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, por lo que los diferentes protocolos dependerán de las propiedades físico-químicas de cada célula (Ávila *et al.*, 2006; Baust *et al.*, 2017). En general se han clasificado diferentes técnicas para la crioconservación, en especial para los espermatozoides (Hezavehei *et al.*, 2018):

1.- Congelación lenta: Es un método cuyo periodo de congelación involucra 2 ó 3 pasos por un periodo de 2 a 4 horas de forma manual o automática.

2.- Congelación rápida: Es un método en donde las pajillas con los espermatozoides y la solución crioprotectora se exponen a vapores de nitrógeno líquido durante 10 min antes de sumergirlos en el tanque de nitrógeno.

3.- Congelación ultra-rápida: También llamado vitrificación, es un método alternativo sin el uso de crioprotectores permeables, se sumerge directamente en nitrógeno líquido

4.- Liofilización: Es un método de conservación en el que no se requiere el nitrógeno líquido, los espermatozoides pueden mantenerse a 4°C y transportarse a temperatura ambiente, sin embargo los espermatozoides recuperados son inmóviles por lo que se requiere de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) para una fertilización exitosa.

La velocidad de enfriamiento seleccionada, dependerá del tipo celular, pueden enfriarse más allá de su punto de congelación en equilibrio antes de que se forme hielo, esto se llama **sobre enfriamiento**.

La **nucleación** representa el cambio de agua líquida a hielo. El agua en el sistema se separa y forma hielo, lo que aumenta la concentración de solutos. Durante, la formación de hielo extracelular, los solutos se concentran en la aún fase líquida, por lo que el agua sale de la célula para restablecer el equilibrio osmótico. Así, si las células se enfrían demasiado rápido se deja menos tiempo para que el agua salga y se forma hielo intracelular, causando un daño irreparable al formarse el hielo intracelular (**Figura 3**). Por otro lado, si se enfría demasiado lento, la célula se deshidrata. Este aumento en la concentración de soluto tanto dentro como fuera de la célula se ha denominado “efecto de solución” (Ávila *et al.*, 2006; Baust *et al.*, 2017).

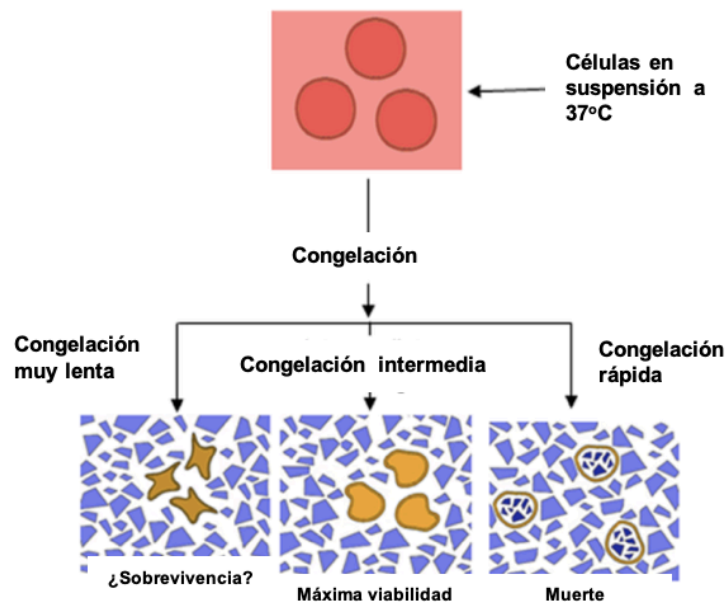


Figura 3: Efecto del enfriamiento a diferentes velocidades sobre la supervivencia celular. En la imagen superior se muestra a las células en suspensión antes de ser sometidas a un proceso de congelación. En las tres imágenes inferiores se muestra una representación del efecto en el tiempo de congelación. En la imagen inferior izquierda se puede apreciar que si la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, las células se deshidratan por el efecto de los solutos presentes en el medio de congelación, por lo tanto se compromete la supervivencia. En la imagen inferior derecha si la velocidad de congelación es demasiado rápida, el agua dentro de las células formará cristales y con ello la ruptura y muerte celular. Finalmente en la imagen inferior central, es el tiempo de congelación ideal según el tipo celular y representaría la máxima viabilidad (modificado de Baust *et al.*, 2017).

El almacenamiento a bajas temperaturas ralentiza, pero no detiene todas las reacciones bioquímicas celulares hasta que desciende por debajo de la transición vítrea (T_g) del agua que es -140°C, por lo que a -20 o -80°C aún hay reacciones bioquímicas dando como resultado un daño celular ya que las reacciones no están reguladas y son incompletas dando lugar a una acumulación de compuestos tóxicos como los radicales libres, subproductos del metabolismo anaeróbico (Ávila *et al.*, 2006).

2.2.2. Transiciones de fase

El enfriamiento altera la estructura y conformación de biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), estos cambios pueden ser irreversibles y deteriorar la función celular. Bajo condiciones fisiológicas la membrana plasmática está en una fase fluida (cristalina líquida) con un desorden conformacional que cuenta con dominios ordenados como son las “balsas” enriquecidas con colesterol y esfingolípidos. Se sabe que el contenido del colesterol en la membrana afecta el comportamiento de la fase supracero y la tolerancia osmótica. Todo ello modifica la velocidad durante la transición de fases en el enfriamiento, además de ser modificable con la utilización de crioprotectores (Sieme *et al.*, 2015).

La fluidez y el empaquetamiento de la bicapa está determinada por las cadenas de acilo, la longitud corta reduce la tendencia a interaccionar entre sí por fuerzas de Van der Waals, las torceduras que resultan en los dobles enlaces de lípidos insaturados dificultan el empaquetamiento de las cadenas de acilo, aumentando la fluidez de la membrana y con una temperatura por debajo de la transición de fase, la bicapa está en un estado de gel. La fluidez de la membrana se puede modificar según los tipos de fosfolípidos, colesterol y la temperatura a la cual se exponen, como se puede ver en la **figura 4** (Sieme *et al.*, 2015).

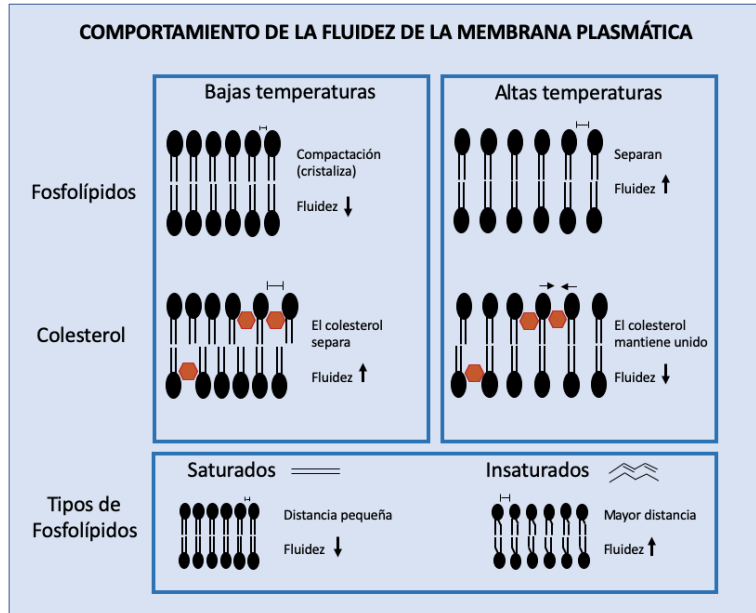


Figura 4: Esquematización del comportamiento de la fluidez de la membrana plasmática asociado a dos componentes estructurales (fosfolípidos y colesterol). Los círculos negros representan a la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos y los ácidos grasos asociados se representan como dos líneas rectas (ácidos grasos saturados) y las dos líneas negras con una pequeña flexión representa a las ácidos grasos poliinsaturados. Además se puede observar al colesterol inserto en la representación esquemática de la membrana plasmática como un hexágono de color café, lo cual favorece la rigidez de la membrana.

2.2.2. Criopreservación en espermatozoides

La criopreservación de los espermatozoides fue introducido en los años 60s como una forma de preservar la fertilidad, el logro fue realizado por Polge al descubrir las propiedades crioprotectoras del glicerol en el año de 1949 (en Hezavehei *et al.*, 2018), y fue considerada desde entonces la mejor técnica para la criopreservación de espermatozoides en diferentes especies. En el año de 1951 se reportó la congelación en espermatozoides de bovinos, en 1953 en humanos, en 1957 en cerdos y caballos, y en el año de 1967 en borrego (en Hezavehei *et al.*, 2018). Sin embargo hasta la década de los setenta se lograron inseminaciones exitosas en cerdas con semen congelado y posteriormente se describieron los métodos para la congelación que hasta la fecha se siguen considerando. La técnica de Westendorf de 1975 y la descrita en Estados Unidos por Pursel y Johnson en 1976 (en Williams *et al.*, 2015), utilizaron diluyentes a base de yema de huevo y al glicerol como agente crioprotector, junto con concentraciones elevadas de azúcares (Williams *et al.*, 2015; Yeste, 2016).

Los protocolos de congelación para la especie porcina, han establecido que es más eficiente una congelación lenta (aproximadamente 4-6 horas) y una descongelado rápido utilizando baño maría a 37°C (Gutiérrez, 2009; Nieves, 2017). Sin embargo ésta tecnología no se utiliza de forma rutinaria al tener bajos resultados en fertilidad y prolificidad, 10-20% y 1-2 lechones, respectivamente, ello debido a que los espermatozoides de cerdo son especialmente termo sensibles, lo que ha dificultado el desarrollo de protocolos más eficientes de congelación (Gómez *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2015; Yeste *et al.*, 2017).

El uso preferente de semen refrigerado (15-18°C) para la inseminación artificial en el cerdo representa alrededor del 80% de las inseminaciones (Yeste *et al.*, 2017), por lo que se han desarrollado diferentes tipos de diluyentes. Un diluyente se puede definir como aquella solución que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides, para ello los componentes de los diluyentes deben contener sustratos energéticos, un sistema tampón, estabilizadores de membrana y antibióticos (puede ser neomicina, penicilina o estreptomina) (Cuenca y Avellaneda, 2017). En la **figura 5** se muestra un resumen de los diferentes tipos de diluyentes y sus componentes.

Composición (g/L)	Corta duración (1-3 días)			Larga duración (> 4 días)					
	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	MRA	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
Glucosa	3	60	37	11.5	+	11.5	11.5	25 ^a	26
Citrato de Sodio	24.3	3.7	6.0	11.7	+	11.65	11.65	6.90	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	+	2.35	2.35	2.25	2.4
Bicarbonato de sodio	2.4	1.2	1.25	1.25	+	1.75	1.75	1.00	1.2
Cloruro de Potasio	0.4		0.75		-		0.75		
Acetil cisteína	0.05								
Hepes									9.0
BSA				5.0	+			3.00	2.5
Tris				6.5	-	5.5	5.5	5.65	
Citrato				4.1	-	4.1	4.1	2.00	
Cisteína				0.1	+	0.7	0.7	0.05	
Trehalosa							1		
PVA							1		
Acetato de potasio					+				
MOPS					+				
mOsm	290	380	330	240	290	275	300	282	309
pH		7.2	7.2		6.9			6.9	6.8

Figura 5: Composición en (g/L) de los diferentes componentes de los diluyentes de refrigeración de uso comercial que se utilizan para el semen de cerdo (IVT, Kiev, BTS, Zorlesco, MRA, ZORPVA, Reading, Modena y Androhep). Los diluyentes de refrigeración para su mantenimiento se pueden clasificar según el tiempo que pueden mantener viables a los espermatozoides (por un periodo corto y largo) (Modificado de Gadea, 2003; Cuenca y Avellaneda, 2017).

Se sabe que la presión osmótica presente en los espermatozoides de cerdo está entre 290-300mOsm, pero pueden tolerar rangos de 240-380mOsm (Gadea, 2003), de hecho, en un rango de 250 a 290mOsm no se ve afectada ni la motilidad, ni la viabilidad, pero en condiciones hipo e hiperosmóticas existe una disminución del ATP y a pesar del retornar a condiciones isotónicas después de una incubación de 10 minutos, las células no recuperan la motilidad (Gilmore *et al.*, 1996).

En general, se puede decir que la criopreservación, permite el almacenamiento a largo plazo de germoplasma, mejora el transporte y la exportación del semen, la preservación de material con alto valor genético de animales en peligro de extinción y la disminución de enfermedades (Gutiérrez, 2009; Hezavehei *et al.*, 2018; Pezo *et al.*, 2020).

2.2.3. Lesiones por congelación

La congelación induce lesiones en las membranas celulares y organelos por la formación de hielo intracelular, existiendo un aumento en la aparición de especies reactivas de oxígeno, desencadenando el detrimento en la viabilidad espermática, éste desequilibrio induce a la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana y alteraciones en la localización de proteínas; afectando todo ello el potencial de fertilización (Hezavehei *et al.*, 2018; Pezo *et al.*, 2020). Por otra parte, el estrés osmótico también genera cambios en el citoesqueleto, en especial en la actina (Ragoonanan *et al.*, 2010). Por ello se menciona que el descenso de la temperatura y una curva de deshidratación celular adecuados reducen los daños criogénicos,

para ello se utilizan diferentes crioprotectores, tanto permeables como no permeables, considerando la especie y tipo celular (Pezo *et al.*, 2020).

Las crio lesiones afectan la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, el acrosoma, el núcleo, la función mitocondrial y la motilidad (**Figura 6**). La criotolerancia según Parks y Lynch (1992) esta directamente relacionada con la composición de la membrana plasmática, específicamente la proporción de colesterol y fosfolípidos, ya que existe evidencia relacionada al uso de espermatozoides de varias especies, donde los espermatozoides de toro tienen mayor resistencia a la congelación en comparación con el verraco atribuible a una mayor proporción de colesterol, ya que mientras el toro presenta 0.45 el verraco 0.26, además de menor proporción de proteínas / fosfolípidos, donde el bovino presenta 0.80 contra 1.26 del verraco (en Yeste *et al.*, 2017). Aunado a lo anterior, también la elevada cantidad de fosfolípidos insaturados en la membrana del espermatozoide del verraco, generan la pérdida de la permeabilidad selectiva, interrumpiendo la homeostasis y haciéndolos más vulnerables durante la congelación (Yeste *et al.*, 2017).

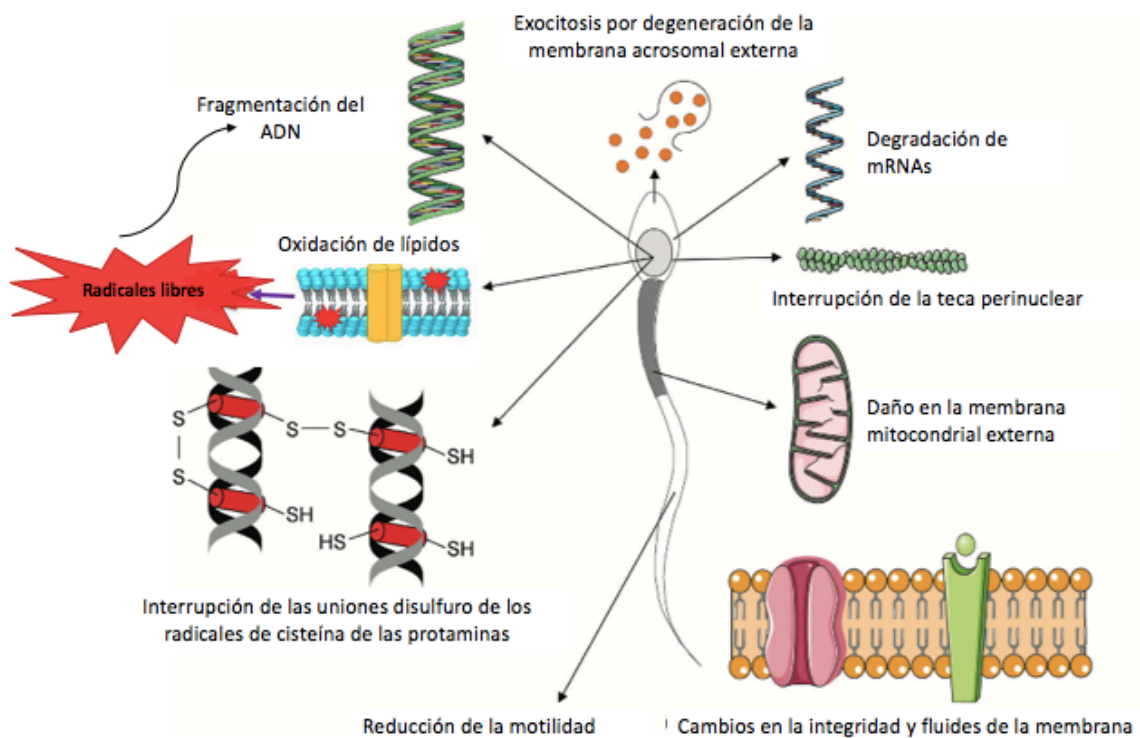


Figura 6: Esquema de las principales lesiones generadas por la crioconservación de los espermatozoides de cerdo. La crioconservación modifica la localización de nucleoproteínas (protamina e histonas) favoreciendo la ruptura de puentes disulfuro. También genera daños en la membrana mitocondrial externa generando un incremento de especies reactivas de oxígeno. Existe una alteración de la teca perinuclear, contribuyendo a la redistribución y relocalización de proteínas, alterando a su vez el patrón de fosforilación en proteínas. Al mismo tiempo se ha descrito que la congelación genera un evento llamado criocapacitación, lo cual genera exocitosis del acrosoma, limitando la vida útil del espermatozoide para la inseminación artificial (Tomada y modificada de Yeste *et al.*, 2017).

Todos los efectos dañinos sobre los espermatozoides ayudan a explicar en parte las bajas tasas de fertilidad, además, se ha visto que existen diferencias individuales en la supervivencia de los espermatozoides que van del 25 al 60%, de hecho cada eyaculado exhibe una criotolerancia única. Se han tratado de identificar marcadores de congelación en las proteínas del plasma seminal que regulan el estrés osmótico y térmico, aunque los mecanismos aún se desconocen, entre las proteínas relacionadas se encuentra la proteína de choque térmico 90, proteínas de unión a acrosina, trisafosfato isomerasa. Además, la actividad enzimática de la acrosina en espermatozoides frescos se han relacionado con la resistencia a la congelación (Yeste *et al.*, 2016).

También se ha descrito que el semen de cerdo puede variar con respecto a su composición, y que ello permite clasificarlos como buenos o malos congeladores (Yeste, 2016), lo que podría estar relacionado a que los componentes de líquido seminal se modifican según el periodo en el que se realiza las recolectas, así como lo describió Fraser *et al.* (2016), al observar que durante el periodo de primavera-verano los espermatozoides son más susceptibles a la peroxidación lipídica, independiente de la edad, además durante el otoño-invierno presenta niveles más altos de proteínas y antioxidantes en el plasma seminal. Todos estos datos nos muestran que para realizar un método de criocongelación efectivo, es necesario considerar diferentes variables, lo que ha llevado al desarrollo de una gran variedad de protocolos para lograr mejorar la viabilidad espermática, pero a la fecha, sin resultados evidentes (Fraser *et al.*, 2016).

2.2.4. Crioprotectores

Para poder crio conservar diferentes tipos celulares se requiere el uso de agentes crioprotectores (Stewart y He, 2019), los cuales no previenen los cambios de fase de la membrana de líquido a gel, lo que implica que no reemplazan las moléculas de agua que interactúan con las cabezas de los fosfolípidos al congelarse. Akhoondi (2012) y Oldenhof (2013), mencionan que los crioprotectores disminuyen la tasa de deshidratación durante la congelación y permiten que la deshidratación continúe hasta llegar a temperaturas bajo cero, lo que ayuda a las células a responder osmóticamente durante la formación de hielo extracelular, disminuyendo la probabilidad de formar hielo intracelular (en Sieme *et al.*, 2015). En estudios con modelos de liposomas realizados por Oldenhof (2013), revelaron que los protectores permeables como el glicerol estabiliza las membranas, previniendo la fuga de los solutos intra liposomales inducidos por la congelación, mientras que los disacáridos no permeables y la yema de huevo no lo hacen (Sieme *et al.*, 2015).

Oldenhof (2013) además menciona que la yema de huevo, usada a menudo en los diluyentes de congelación, no afecta las propiedades del estado vítreo ni estabiliza las membranas durante la congelación y descongelación, que más bien sus efectos protectores probablemente se pueden atribuir según Bergeron y

Manjunath (2006) a la transferencia de lípidos y colesterol entre la yema y los lípidos de la membrana espermática (en Sieme *et al.*, 2015).

1.- Crioprotectores permeables: Se introducen a la célula, reduciendo la concentración de electrolitos disminuyendo el grado de contracción osmótica a bajas temperaturas según Mazur (1984), como por ejemplo el glicerol, el dimetil sulfóxido (DMSO), el dimetil acetamida, el propilen glicol o el etilen glicol, sin embargo, concentraciones altas son potencialmente tóxicas (Yeste *et al.*, 2017, Hezavehei *et al.*, 2018). Hasta el momento el glicerol se utiliza como parte de los agentes crioprotectores para semen de cerdo en un porcentaje no mayor al 3%, ya que es potencialmente tóxico al generar cambios estructurales en la teca perinuclear y acumularse en un derivado tóxico conocido como metilglioxal (Arenas, 2008).

2.- Crioprotectores no permeables: No pueden penetrar la membrana plasmática, por lo que su efecto es a nivel extracelular, induciendo deshidratación de la célula y por lo tanto disminuye la cantidad de cristales de hielo intracelular; ejemplo de ellos son azúcares como la rafinosa, lactosa, fructosa, glucosa, y trehalosa (Hezavehei *et al.*, 2018). Los sacáridos aumentan la tonicidad del medio de congelación, estabilizando las proteínas y la bicapa lipídica mediante la interacción específica, modulando la fluidez y estabilidad de la membrana durante el proceso de congelación. Tanto la sacarosa como la trehalosa se han utilizado en medios de congelación ultrarrápida (vitrificación) en espermatozoides de mamíferos con efectos positivos (Pezo *et al.*, 2020).

2.2.4.1. Trehalosa

La trehalosa es un disacárido (342Da) formado por un enlace 1,1 glucosídico de dos moléculas de D-glucosa, es considerado un azúcar no reductor por lo que le confiere mayor estabilidad, no tóxico, y presente en organismos capaces de resistir los cambios de temperatura extrema como el frío y la desecación, por ejemplo, las levaduras, nemátodos, tardígrados y algunos insectos (Chen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2018; Stewart y He 2019).

Dadas las características benéficas de la trehalosa, se ha utilizado ampliamente como crioprotector no permeable en diferentes tipos celulares (Silva *et al.*, 2015); como por ejemplo, en células dendríticas (Shinde *et al.*, 2019), eritrocitos, células mesenquimales, células de la granulosa ovárica (Zheng *et al.* 2018); en especial en los espermatozoides de cerdo se ha descrito que la trehalosa adicionada a una concentración de 250mM en los diluyentes de crio conservación, ha logrado disminuir el porcentaje empleado de glicerol al 1% y mejorar la viabilidad en un 42.25% \pm 4.24 y la integridad acrosomal se mantiene en un 70% después de la descongelación (Gutiérrez, 2009).

El efecto benéfico de la trehalosa en organismos que presentan anhidrobiosis [estado reversible en donde disminuye el metabolismo inducido por la desecación y

reanudado tras la rehidratación (Horikawa *et al.*, 2009)] esta relacionado a la ubicación de ella, la cual esta de forma intracelular, sin embargo éste disacárido no es sintetizado por células de mamíferos, además de ser naturalmente impermeable por lo que no puede atravesar la membrana plasmática, por ello la búsqueda de utilizar diferentes técnicas para lograr la liberación intracelular de la trehalosa. Por ejemplo, se sabe que la internalización de la trehalosa en los espermatozoides de cerdo mediante la generación de poros en la membrana mejora la integridad acrosomal en un 27% en comparación con los crioprotectores de rutina como el glicerol a una concentración del 3% (Nieves *et al.*, 2017). Por ello la internalización de la trehalosa (**Figura 7**) ha llevado a los investigadores a generar diferentes técnicas para lograrlo (**Cuadro 1**), en la siguiente tabla se muestra un resumen de las diferentes técnicas que hasta el momento se han utilizado (Stewart y He 2019):

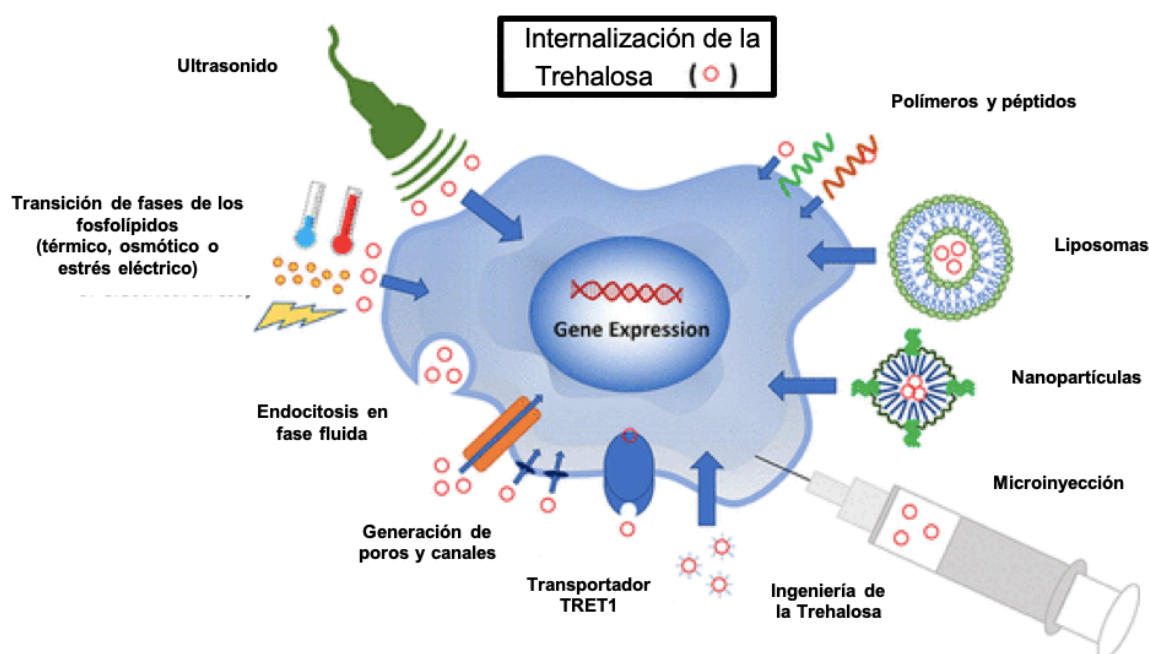


Figura 7: Esquema de las diferentes técnicas utilizadas para la internalización de la trehalosa con el objetivo de mejorar la resistencia a cambios extremos de temperatura. El esquema muestra la posible internalización por inyección intracitoplasmática, generación de poros temporales en la membrana plasmática, o utilizar mecanismos propios de la célula como la endocitosis favorecida por la temperatura o por moléculas de tamaño muy pequeño como las nanopartículas elaboradas con polímeros, péptidos o liposomas. También se puede observar que se ha buscado favorecer la expresión de genes para la síntesis de trehalosa (Stewart y He 2019).

Cuadro 1: DIFERENTES FORMAS DE ENTREGA INTRACELULAR DE LA TREHALOSA PARA MEJORAR LA VIABILIDAD (Tomado y modificado de Stewart y He 2019).		
Técnica	Objetivo	Características y ejemplos
Transición de fases de los fosfolípidos	Objetivo: Aumentar la permeabilidad de la membrana durante la transición de fases utilizando estrés térmico, osmótico y eléctrico. Ventajas: Control de la concentración de trehalosa	Estrés térmico: Se utiliza una alta concentración de trehalosa durante el enfriamiento, las membranas pierden la permeabilidad selectiva y se difunden gracias al gradiente de concentración. Estrés osmótico inducido: Se logra deshidratando a la célula en soluciones hipertónicas y después en soluciones hipotónicas ricas en trehalosa alcanzando concentraciones intracelulares de 43.2mM por ejemplo en glóbulos rojos sin embargo hay pérdida de la viabilidad (Zhou <i>et al.</i> 2008). También se usa la

	<p>utilizada y aumenta la permeabilidad.</p> <p>Desventajas: La permeabilidad no es específica, toxicidad y pérdida de la estabilidad de la membrana.</p>	<p>capacidad celular para regular el volumen por la activación de canales con soluciones hipotónicas por ejemplo un medio de 100mOsm la permeabilidad aumenta a carbohidratos monoméricos sin alcanzar concentraciones altas de trehalosa.</p> <p>Estrés eléctrico inducido: También conocida como electroporación o electroinyección para elevar la permeabilidad de forma transitoria con hasta 100mM en periodos cortos de incubación (10-15min) sin embargo disminuye la viabilidad.</p>
Endocitosis en fase líquida	<p>Objetivo: Favorecer la endocitosis con la generación de vesículas.</p> <p>Ventaja: Aprovecha el proceso de absorción natural.</p> <p>Desventaja: Tiempos de incubación largos y cargas pequeñas de trehalosa</p>	<p>El proceso involucra la incubación de las células con la presencia de altas dosis de concentración extracelular de trehalosa, por ejemplo Wolkers <i>et al.</i> (2001) mostraron que la carga de trehalosa en plaquetas humanas con una incubación de 37°C alcanza el 60% después de 4 horas de incubación con una concentración molar de 15mM mejorando la recuperación después de la liofilización en un 88%. Oliver <i>et al.</i> (2004) observó que las células madre mesenquimales humanas absorben la trehalosa dependiendo de la temperatura, el tiempo de incubación y concentración logrando una carga de 20-30mM en el citoplasma.</p>
Expresión génica	<p>Objetivo: Que la célula sintetice de forma endógena a la trehalosa.</p> <p>Ventaja: Expresión endógena de la trehalosa.</p> <p>Desventaja: Los vectores pueden ser tóxicos además de generar modificaciones genéticas en la célula.</p>	<p>Esta técnica se logra con la transfección de genes que se encuentran en organismos anhidrobióticos, por ejemplo la <i>Escherichia coli</i> sintetiza a la trehalosa por el locus <i>otsA/B</i>, esta secuencia codifica <i>otsA</i> (trehalosa 6- fosfato sintasa) que cataliza la síntesis de trehalosa 6-fosfato y <i>otsB</i> (trehalosa 6 fosfato fosfatasa) que cataliza la formación de trehalosa según Kaasen <i>et al.</i> (1994).</p> <p>En estudios de García de Castro <i>et al.</i> (2000) la transfección de los genes a líneas celulares de fibroblastos de ratón después de un choque térmico alcanzó un máximo de 80mM de trehalosa, disminuyendo drásticamente a las 30h sin embargo no sobreviven a la desecación ni lioconservación.</p>
Generación de poros y canales	<p>Objetivo: Generar poros en las membranas para permitir la internalización de la trehalosa gracias al gradiente de concentración.</p> <p>Ventaja: Es un proceso reversible y se puede controlar la concentración de la solución con trehalosa.</p> <p>Desventaja: La permeabilidad <u>no es específica</u>, uso de proteínas bacterianas y se pueden activar de mecanismos apoptóticos y necrosis.</p>	<p>Se utiliza un agente poroso derivado de una endotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> modificada llamada α-hemolisina, en estudios de Torner y colaboradores mostraron concentraciones de trehalosa intracelular de hasta 0.5M durante una hora de exposición en fibroblastos y queratinocitos y permitió la crioconservación como único crioprotector con una viabilidad del 80 y 70% respectivamente. Sin embargo, para la utilización es necesario la eliminación de las proteínas para un uso clínico y evitar una respuesta inmune no deseada (en Eroglu, 2002).</p> <p>También se ha descrito que la utilización de estreptolisina O (SLO) cuya toxina producida por estreptococos se puede utilizar para generar poros en la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo, permitiendo la probable internalización de la trehalosa a 100mM ello mejorando la integridad del acrosoma después de proceso de crioconservación (Nieves, 2012).</p> <p>También se ha probado con la activación de receptores transmembranales como el P2X7 (también llamado P2Z) con el fin de generar poros no selectivos que permitan la entrada de moléculas pequeñas, éste es un receptor purinérgico, es decir que se abren ante la presencia de ATP extracelular y se cierran con la adición de magnesio. Se encuentran distribuidos en diferentes células y tejidos. Elliot <i>et al.</i> (2006) lograron concentraciones de hasta 50mM en macrófagos de ratón, ello mejorando la supervivencia en condiciones de deshidratación y humedad, sin embargo el incremento de la trehalosa resulta en disminución de la viabilidad.</p>
Transportador TRET1	<p>Objetivo: Transporte selectivo de trehalosa.</p> <p>Ventaja: Es un transportador específico de la trehalosa.</p> <p>Desventaja: Requiere modificaciones genéticas de la célula.</p>	<p>Se ha observado que en larvas de <i>Polypedilum vanderplanki</i> durante el estrés ambiental de desecación y rehidratación acumulan alrededor del 20% de su masa seca con trehalosa, por lo que se ha aislado un gen que codifica a un transportador de trehalosa llamado TRET1 y al ser expresado en ovocitos de ratón permitió el transporte específico y bidireccional a través de la membrana (en Stewart y He 2019).</p> <p>En estudios por Chakraborty <i>et al.</i> 2012 (en Stewart y He 2019) encontraron que el TRET1 en ovario de hámster chino mejora la tolerancia a la desecación y en particular mejora la viabilidad en el proceso de crioconservación.</p>
Micro-inyección	<p>Objetivo: Introducción de una cantidad específica de trehalosa en células de mamíferos.</p>	<p>Se ha logrado en experimentos de Eroglu <i>et al.</i> (2002) cargar ovocitos humanos (~100µm) con trehalosa, revelando una supervivencia después de la crioconservación, sin embargo el enfoque se limita y no se puede utilizar en células más pequeñas de 20µm.</p>

	<p>Ventaja: Introducción directa y controlada de la trehalosa en células de gran tamaño.</p> <p>Desventaja: No es práctico para muchos tipos celulares.</p>	
Polímeros y péptidos	<p>Objetivo: Fabricar complejos proteicos que faciliten la interacción y penetración de la membrana plasmática.</p> <p>Ventaja: Carga elevada de trehalosa.</p> <p>Desventaja: Permeabilidad inespecífica con tiempos elevados de incubación y alta toxicidad.</p>	<p>Los polímeros se han investigado para facilitar la interacción con las membranas plasmáticas al utilizar polímeros anfipáticos con grupos laterales de ácido carboxílico débilmente ionizable y cadenas hidrófobas. El biopolímero de interés es la PP50 compuesta de poli L-lisina isoftalmida (PLP) biodegradable injertada con L-fenilalanina. En glóbulos rojos se ha visto una tolerancia a la desecación y crio-sobrevivencia, aunque sigue siendo menos efectivo que los crioprotectores convencionales como el DMSO (en Stewart y He 2019).</p>
Liposomas	<p>Objetivo: Utilizar vesículas cargadas con trehalosa para facilitar la interacción e internalización con la célula.</p> <p>Ventaja: Biocompatible con las membranas celulares.</p> <p>Desventaja: Cargas pequeñas de trehalosa y baja estabilidad.</p>	<p>Se utiliza la formación de liposomas, cuya estructura esférica está compuesta por una bicapa lipídica que puede ser utilizado como vehículo ya que puede contener a la trehalosa, gracias a la biocompatibilidad con las células ello las ha colocado como estructuras seguras para internalizarlas de forma segura al citosol, sin embargo únicamente son capaces de contener cargas micromolares, alrededor de 15mM y ello podría ser suficiente para proporcionar cierta protección contra las criolesiones en glóbulos rojos, sin embargo aún no son datos concluyentes (en Stewart y He 2019).</p> <p>También se ha descrito que mejora la criopreservación si se utiliza a los liposomas cargados con trehalosa y trehalosa extracelular y bajas concentraciones de DMSO en células de condón umbilical (Motta <i>et al.</i> 2014).</p>
Nanopartículas	<p>Objetivo: Elaborar partículas en un rango de 100nm cargadas con trehalosa.</p> <p>Ventaja: Transporte específico de altas cantidades de trehalosa utilizando el proceso de endocitosis sin modificación de la célula.</p> <p>Desventaja: Tiempos largos de incubación.</p>	<p>La investigación en el campo de la nanotecnología ha despertado interés cuya aplicación va desde la seguridad alimentaria o hasta la medicina. Las nanopartículas se han investigado como vehículos de fármacos para la administración de quimioterapia, gracias a ello éste enfoque se ha utilizado para la carga de trehalosa y lograr altas concentraciones de trehalosa intracelular. Zhang <i>et al.</i> (2010) desarrollaron nanocápsulas de hidrogel sintetizadas a partir de Pluronic F-127, permitiendo la liberación de trehalosa en el citoplasma con temperaturas de 37 y 22°C en fibroblastos con hasta 0.3M con incubaciones de 40min. Sin embargo el proceso de síntesis es complejo y largo. Por ello los mismo investigadores mejoraron la nanoconstrucción mediante el uso de quitosano como agente reticulante.</p>

De esta forma, el avance en el desarrollo de diferentes enfoques para la introducción de la trehalosa en las células, ha generado una variedad de ensayos, siendo atractivo entre ellos el mediado por nanopartículas. Ello debido a que este procedimiento podría ofrecer la ventaja de eliminar a los crioprotectores con alto nivel de toxicidad como lo es el DMSO (Dimetilsulfóxido) o el glicerol (Stewart y He 2019), ya sea para su empleo en los espermatozoides o en otros tipos celulares.

2.3 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) desde el punto de vista de la física son consideradas con un tamaño menor a 100nm, aunque se pueden encontrar con mayor tamaño (Rakhi *et al.*, 2014; Falchi *et al.*, 2018). En particular para las nanopartículas poliméricas se consideran con un tamaño inferior a 1000nm, generalmente están en un rango de 10 a 500nm (Gómez, 2014).

Las NPs pueden ser elaboradas con una gran variedad de materiales, como metales, polisacáridos y proteínas (**Cuadro 2**) (Barkalina *et al.*, 2014; Rakhi *et al.*, 2014; Falchi *et al.*, 2018). Dependiendo de ello, se pueden clasificar en cuatro grupos: metales, polímeros, compuestos naturales y materiales nano estructurados requiriendo diferentes técnicas según el grupo (Hill y Li, 2017).

Cuadro 2: Algunos de los nanomateriales utilizados en la biomedicina (modificado de Barkalina <i>et al.</i> , 2014).				
Clase	Subclase	Material	Estructura	Descripción
Orgánicos	Lípidos	Fosfolípidos	Liposomas	Nanoesfera cerrada compuesta por una bicapa de fosfolípidos
			Micelas	Monocapa de fosfolípidos
	Polímeros	Lípidos sólidos	Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN)	Nanoesfera compuesta por un núcleo lipídico estabilizado por surfactantes o polímeros
		Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	Nanopartículas	Estructura con formas variadas, pueden ser menores a 100nm
		Poli-L-ácido láctico (PLA)		
	Quitósán			
Inorgánicos	Metales	Oro	Nanopartículas	
		Plata		
		Platino		
		Cadmio		
	Semiconductores	Selenio	Puntos cuánticos	Nanocristales semiconductores con propiedades ópticas
	Carbón	Carbón	Fullerenos	Nanoesferas huecas, formadas por átomos de carbón que forman una jaula
Nanotubos			Estructura cilíndrica menor a 100nm	
Otros		Mesosporus silica	Nanopartículas	Estructura con varias formas con un diámetro de poros de 2 a 50nm

Las NPs elaboradas con compuestos naturales son materiales que provienen de la naturaleza como por ejemplo polímeros o proteínas naturales, ello las hace más biocompatibles y biodegradables; además las nanopartículas naturales y nanoestructuradas comparten muchas ventajas y pueden servir como la única unidad de funcionamiento o portadores de medicamentos o nutrientes, sin embargo, podrían provocar toxicidad si no se diseñan adecuadamente en los sistemas biológicos (Hill y Li 2017).

2.3.1. Nanopartículas poliméricas

Según el método de elaboración existen dos tipos de nanopartículas poliméricas, las nanoesferas y las nanocápsulas. Las **nanoesferas** son sistemas matriciales en donde el fármaco está disperso en una matriz polimérica. Los polímeros biodegradables liberan el fármaco a través de difusión por poros en la matriz, por

degradación o erosión del polímero. En contraste, las **nanocápsulas** van a liberar su contenido depende de su naturaleza química (Gómez, 2014; Urrejola *et al.*, 2018).

Existen diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas que permiten el encapsulamiento de moléculas hidrófobas e hidrofílicas. Los métodos más utilizados son el de emulsión/evaporación, doble o múltiple emulsión, de difusión emulsificación y el método de nano precipitación. En la fabricación de algunas nanopartículas se utilizan componentes tóxicos que deben ser eliminados, limitando con ello su aplicación en experimentos con organismos vivos (Urrejola *et al.*, 2018).

2.3.2. Quitosán

El quitosán o quitosano (2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa) es un polisacárido natural (Expósito 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) obtenido a partir de la quitina, siendo un material biológicamente compatible, mucoadhesivo, con actividad bactericida, antioxidante, y de fácil elaboración para la obtención de nanopartículas poliméricas. Por ello ha sido utilizado para la administración de fármacos e ingeniería de tejidos (Kean y Thanou, 2010; Valadez, 2017; Schimpf *et al.*, 2019).

El quitosán se puede obtener con diferentes grados de desacetilación (DD) y diferentes pesos moleculares, lo que se ha relacionado con su capacidad citotóxica, encontrándose que el quitosán con un peso molecular menor a 10KDa y grado de DD del 40% al 60% no presenta toxicidad, también se ha descrito que tanto para células pancreáticas, fibroblastos y tejido pulmonar no existe toxicidad utilizando un peso molecular de 2 a 20KDa con 85-90% DD. (Kean y Thanou, 2010; Schimpf *et al.*, 2019). En el caso de espermatozoides se sabe que los oligos de quitosán no afectan la motilidad, morfología de la membrana, ADN y hasta existe una disminución de los radicales libres cuando son incubados durante una hora (Schimpf *et al.*, 2019).

Debido a su carácter catiónico y sus propiedades gelificantes, el quitosano se utiliza en la industria farmacéutica para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (Rodríguez *et al.*, 2010), por lo que es usado como un vehículo de moléculas, protegiéndolas y liberándolas de forma controlada. Por ejemplo, en las células epiteliales, las microesferas de quitosano son sistemas que mejoran y promueven la absorción de fármacos hidrosolubles a través de las membranas epiteliales. Para su elaboración se han descrito diferentes métodos, algunos de ellos se mencionan a continuación:

1.- Reticulación en emulsión (agua/aceite): En éste método el monómero es emulsificado bajo agitación en una fase continua donde no es soluble. En este proceso la solución de quitosán en ácido acético es mezclada en parafina líquida, utilizando un surfactante y se utiliza un agente reticulador como el glutaraldehído, el

cual estabiliza los polisacáridos en la fase de aceite, después se filtran con un hidrocarburo (n-hexano) y lavado con alcohol (Núñez, 2013; Valadez, 2017).

2.- Precipitación: Este método utiliza una solución de quitosán en un ambiente ácido, el cual es rociado (con una compresora de aire) con metanol o etanodiamina, el cual formará pequeños gotas membranosas, las cuales son separadas y purificadas por filtración y centrifugación (Valadez, 2017).

3.- Polimerización y nucleación homogénea: Se aplica cuando el monómero es soluble en la fase continua, la nucleación y polimerización ocurre directamente en esta fase, formando cadenas primarias llamadas oligómeros. Tanto las micelas como las gotas actúan como reservas de monómeros durante el crecimiento de la cadena polimérica, cuando alcanzan una longitud se precipitan y forman partículas primarias, se estabilizan por las moléculas de surfactante provistas de micelas (Rangasamy, 2011).

4.- Gelificación iónica: Este método involucra la mezcla de dos fases acuosas, una es el polímero como el quitosán y la otra fase contiene tripolifosfato. En éste método las cargas positivas del grupo amino del quitosán, interactúan con las cargas negativas del tripolifosfato, formando coacervados de tamaño nanométrico. Los coacervados se forman por la interacción electrostática entre las dos fases, sin embargo la gelación iónica implica la transición del material de líquido a gel (Nagavarma *et al.*, 2012).

2.3.3. Nanotecnología y reproducción

Los trabajos encaminados en el área de la reproducción utilizando como herramienta a las nanopartículas, se han enfocado en diferentes aspectos, como la purificación y selección de espermatozoides de alta calidad, efectos antioxidantes de las NPs, efectos tóxicos, capacidad de internalización en experimentos *in vitro* y su aplicación para la crio conservación (Falchi *et al.*, 2018).

En el caso de las NPs de óxido de hierro recubiertas con lectinas se han utilizado para la purificación y clasificación de espermatozoides de humano, toro y cerdo, al exponerlos a un campo magnético. Con este mismo procedimiento se pueden detectar defectos en la membrana, por ejemplo la presencia de ubiquitina, o biomarcadores de anexina V (Hill y Li 2017, Falchi, 2018).

Por otra parte, las propiedades antioxidantes de las NPs son consideradas valiosas, ya que se ha propuesto que al utilizarlas en la criopreservación podrían disminuir el estrés oxidativo. Por ejemplo las NPs de óxido de Cerio (CeO₂) pueden capturar especies reactivas de oxígeno, favoreciendo la protección de las membranas celulares y el ADN (Falchi *et al.*, 2018).

Las NPs de “mesoporus silica” (MSNP) están siendo probadas y utilizadas en diferentes especies domésticas; en especial para realizar sexado de espermatozoides en búfalos, carneros, cabras, cerdo, perro, gato, venado, delfín y humanos (Barkalina *et al.*, 2016, Falchi *et al.*, 2018).

En el tratamiento de infecciones, el uso de NPs pueden tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas, gracias a que pueden generar lisis de la pared microbiana, al penetrar en las células y generar una acción pro oxidante e inducir la apoptosis, o por la capacidad de suministrar fármacos. También las NPs son capaces de inducir alteraciones metabólicas, al aumentar la producción intracelular de radicales libres (Falchi *et al.*, 2018).

Las NPs de óxido de zinc, en células germinales testiculares de ratón ejercen una acción citotóxica dependiente de la dosis, afectando la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, resultando ser mas sensibles a la toxicidad en comparación con la espermatogonia y los espermatoцитos. Se reporta estrés oxidativo y disfunción del metabolismo energético y que el daño es reversible. (Falchi *et al.*, 2018).

Otros trabajos relacionados con la congelación y el uso de las NPs se encuentran a las NPs elaboradas con Óxido de Zinc (ZnONPs), quienes no ocasionan cambios en la motilidad, ni generan reacción acrosomal después de una hora de incubación a 37°C, mantienen la integridad de la cromatina y previenen la peroxidación de lípidos durante el proceso de crioconservación (Ann *et al.*, 2017).

Otro material utilizado para la crioconservación del semen de verraco han sido las nanopartículas poliméricas de quitosán (NPs-Q) o de quitosán como vehículo de la trehalosa (NPs-QT), encontrando que las NPs-Q mantienen la viabilidad de entre 21% y 25% sin necesidad de adicionar un medio de conservación como la yema de huevo y el glicerol utilizando una concentración de 100µl/ml en un medio buffer como es el PBS (Juárez *et al.*, 2018). Abriéndose de posibilidad de que las nanopartículas poliméricas de quitosán puedan ser utilizadas como agente crioprotector y como vehículo de otros crioprotectores como la trehalosa.

2.3.4. Toxicidad

Hasta el momento se sabe poco sobre los efectos adversos de las nanopartículas en la salud reproductiva, sin embargo el interés ha generado un aumento en su utilización, ya que representan una herramienta potencial para la entrega de moléculas. Las NPs biocompatibles se han utilizado para la entrega selectiva de fármacos, proteínas, ADN o cualquier tipo de molécula. Se sabe que la toxicidad está asociada al tamaño y a los agentes de recubrimiento como por ejemplo grupos funcionales o carga superficial. La toxicidad genera estrés oxidativo, inflamación y daño en el ADN (Das *et al.*, 2016). Por ejemplo las nanopartículas de sílice con un

tamaño de 70nm si afectan la espermatogénesis por estrés oxidativo, daño mitocondrial y apoptosis al activar caspasa 3 (Das *et al.*, 2016).

Los diferentes factores involucrados en la toxicidad de las nanopartículas se pueden clasificar de la siguiente forma (Das *et al.*, 2016):

1.-Tamaño: Un tamaño “pequeño” puede facilitar el ingreso de las NPs, sin embargo puede aumentar su toxicidad. Por ejemplo las NPs de oro (AuNPs) con un tamaño de 10-20nm a dosis de 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ causa toxicidad por estrés oxidativo, apoptosis, necrosis e inhibición del crecimiento de las espermatogonias (Das *et al.*, 2016). Otro ejemplo son las NPs de plata (AgNPs) quienes generan una reducción mayor en el recuento espermático si se utilizan con un tamaño de 20nm en contraste con las de un tamaño mayor (200nm) (Gromadzka *et al.*, 2012).

2.- Composición química: Para la elaboración de las NPs se utilizan agentes que pueden favorecer su internalización según su naturaleza química, por ejemplo las nanopartículas con óxido de titanio de 21nm (TiO₂NP) son más tóxicas que las nanopartículas de plata (AgNP) de 20nm sobre las células testiculares (Asare *et al.*, 2012) al inducir peroxidación lipídica y daño oxidativo en el ADN (en Das *et al.*, 2016).

3.- Agentes de recubrimiento y superficie: Los agentes de recubrimiento de la superficie de las NPs facilita su absorción, como lo describió Zhang y Cols., (2015) al mencionar que los agentes catiónicos de recubrimiento son más tóxicos en comparación con los de superficie aniónica o neutros. Además los agentes de recubrimiento de bajo peso molecular muestran menor toxicidad en comparación con su análogo (Das *et al.*, 2016).

La internalización de las nanopartículas están mediadas por diferentes mecanismos, de los cuales se asocian al tamaño y características fisico-químicas de las nanopartículas, así como el tipo celular al que son expuestas (**Figura 8**). Por ejemplo, en macrófagos se ha descrito que la entrada de NPs con un tamaño de 100nm recubiertas por dextrano es por endocitosis dependiente de receptores y que partículas más pequeñas (20nm) son captadas por pinocitosis (Kunzmann *et al.*, 2011). En el caso de los espermatozoides al contener escaso citoplasma, los diferentes mecanismos de internalización serían por endocitosis mediada por pinocitosis, por canales iónicos, o por mecanismos osmóticos (Das *et al.*, 2016).

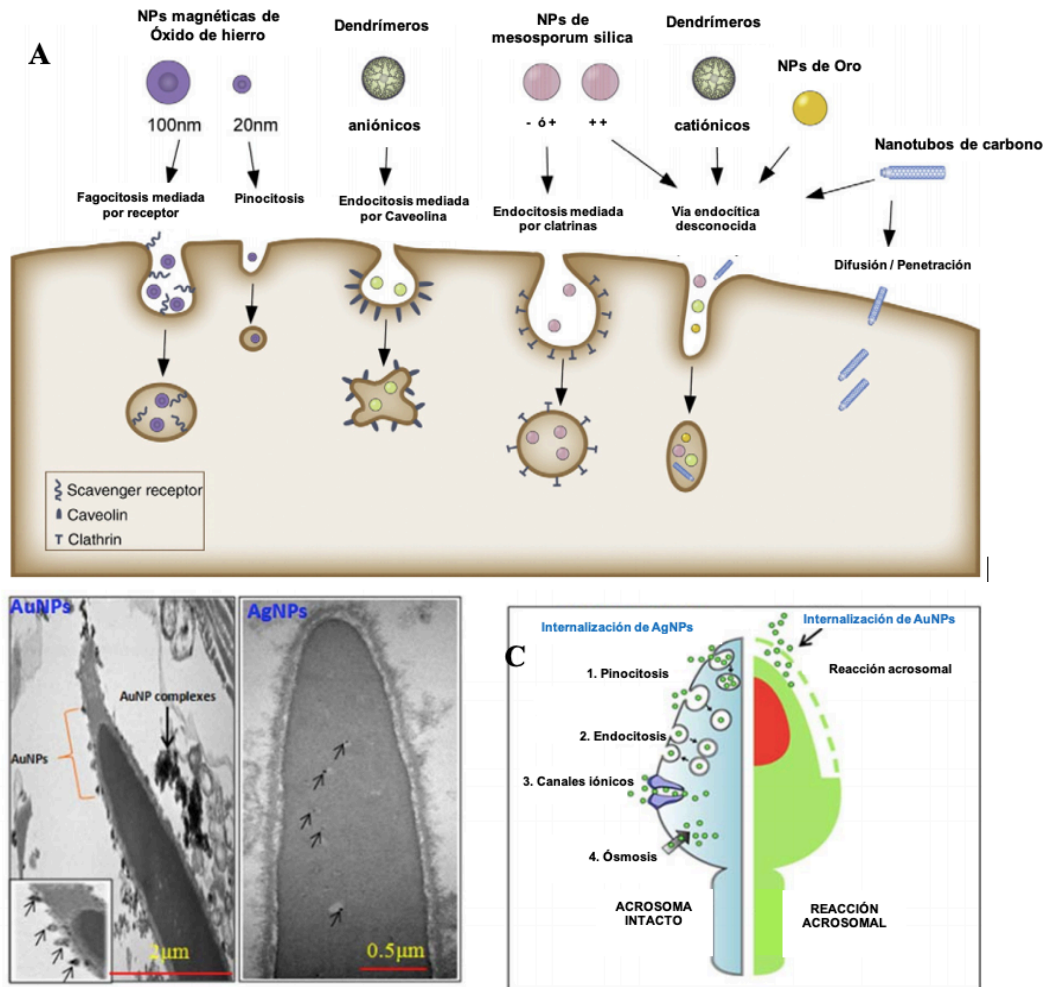


Figura 8: (A) Se muestran las diferentes vías de internalización (fagocitosis, pinocitosis, mediado por caveolas o clatrina y difusión) (modificado de Kunzmann *et al.*, 2011), (B) Electrofotomicrografías de un espermatozoide de ratón, en la imagen de la izquierda se pueden observar a las nanopartículas de oro en la periferia de la membrana plasmática y en la imagen de la derecha a las nanopartículas de plata en la región acrosomal. (C) Se esquematizan los diferentes mecanismo probables de internalización de las nanopartículas en los espermatozoides (modificado de Das *et al.*, 2016).

Se puede concluir que la toxicidad de las NPs está representada por dos mecanismos, el primero por su capacidad internalizante y el segundo, por el estrés oxidativo y la reducción molecular de oxígeno que ocasionan (Das *et al.*, 2016). En especial los materiales inorgánicos como el oro o el zinc generan estrés oxidativo, y daño en el ADN (Das *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento la información existente sobre los efectos tóxicos de las NPs no son concluyentes, pues existen controversias entre los resultados para un mismo compuesto (Das *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La crioconservación de semen de verraco aún significa una limitante tecnológica importante para ser utilizada en la reproducción de esta especie. Esto demanda que se desarrollen enfoques que permitan utilizar nuevas alternativas, por ejemplo, el empleo de nanopartículas, con el objetivo de otorgar mayor crio resistencia a las células y generar una mejora en la viabilidad espermática sometida al proceso de congelación-descongelación. De manera particular las nanopartículas poliméricas de quitosán, además de ser fácilmente elaboradas, parecen tener cierta actividad crioprotectora, ya que se ha descrito que tienen un efecto positivo en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides de cerdo sin la adición del crioprotector utilizado de forma rutinaria como es el glicerol, e inclusive hasta libre de yema de huevo. Además, el quitosán puede servir como acarreador de moléculas crioprotectoras, como por ejemplo la trehalosa. El uso de la trehalosa como parte del diluyente de rutina, ha permitido mejorar la técnica de congelación ya que se ha observado que tiene efectos benéficos en la sobrevivencia espermática.

Sin embargo, para contribuir en la mejora de los protocolos de congelación en donde se ha utilizado a éste tipo de nanopartículas, es importante conocer y evaluar las propiedades citotóxicas de las nanopartículas de quitosán y de quitosán cargadas con trehalosa. Por ello el presente trabajo tiene como objetivo hacer una evaluación del empleo de nanopartículas para la conservación de la viabilidad del semen criopreservado de verraco.

4. HIPÓTESIS

Se sabe que los espermatozoides de cerdo pueden mantener cierto porcentaje de viabilidad usando como único agente crioprotector a las NPs de quitosán y a las NPs de quitosán cargadas con trehalosa en un medio buffer, por lo que si se logra identificar los factores asociados a una probable toxicidad de las mismas, ello permitiría hacer más eficientes los protocolos de congelación al evitar el deterioro en la viabilidad espermática.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el empleo de nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y nanopartículas de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) como agente crioprotector en los espermatozoides de cerdo pre y post congelación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la citotoxicidad de las nanopartículas poliméricas de quitosán (NPs-Q) y de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) para el mantenimiento de la viabilidad celular.
- Valoración del efecto de la adición de las NPs-Q y de las NPs-QT, en el medio de criopreservación, sobre la viabilidad espermática en las etapas previas a la congelación.
- Valoración del efecto de la adición de las NPs-Q y de las NPs-QT, en el medio de criopreservación, sobre la viabilidad espermática después de la congelación.
- Medición de NPs elaboradas de quitosán (NPs-Q) y de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en tres etapas: 1.- Elaboración y medición de las NPs-Q y NPs-QT, 2.- Pruebas de toxicidad en etapas previas a la congelación y durante la refrigeración, y 3.- Congelación de los espermatozoides empleando NPs-Q y NPs-QT.

6.1. Obtención de las muestras

Se obtuvieron veinte eyaculados de siete sementales sexualmente maduros, pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de 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 con una doble gasa estéril. Los eyaculados se diluyeron 1:1 (Vol:Vol) en medio Androhep® y se transportaron al laboratorio de investigación del Departamento de Morfología de la FMVZ-UNAM, en una caja de poliuretano. Una vez en el laboratorio se evaluó la concentración espermática, motilidad, viabilidad e integridad acrosomal (las tres últimas valoraciones se realizaron en la mayoría de las pruebas de toxicidad y después de la congelación (ver el punto 6.6).

La concentración espermática se calculó por conteo con hematocitómetro (cámara de Neubauer), con un factor de dilución de 21 (25µl de semen diluido en 500µl de Tritón X-100 al 1% diluido en PBS), 10,000 por la dimensión de la cámara y 5 por el número de cuadros contabilizados, empleando la siguiente fórmula:

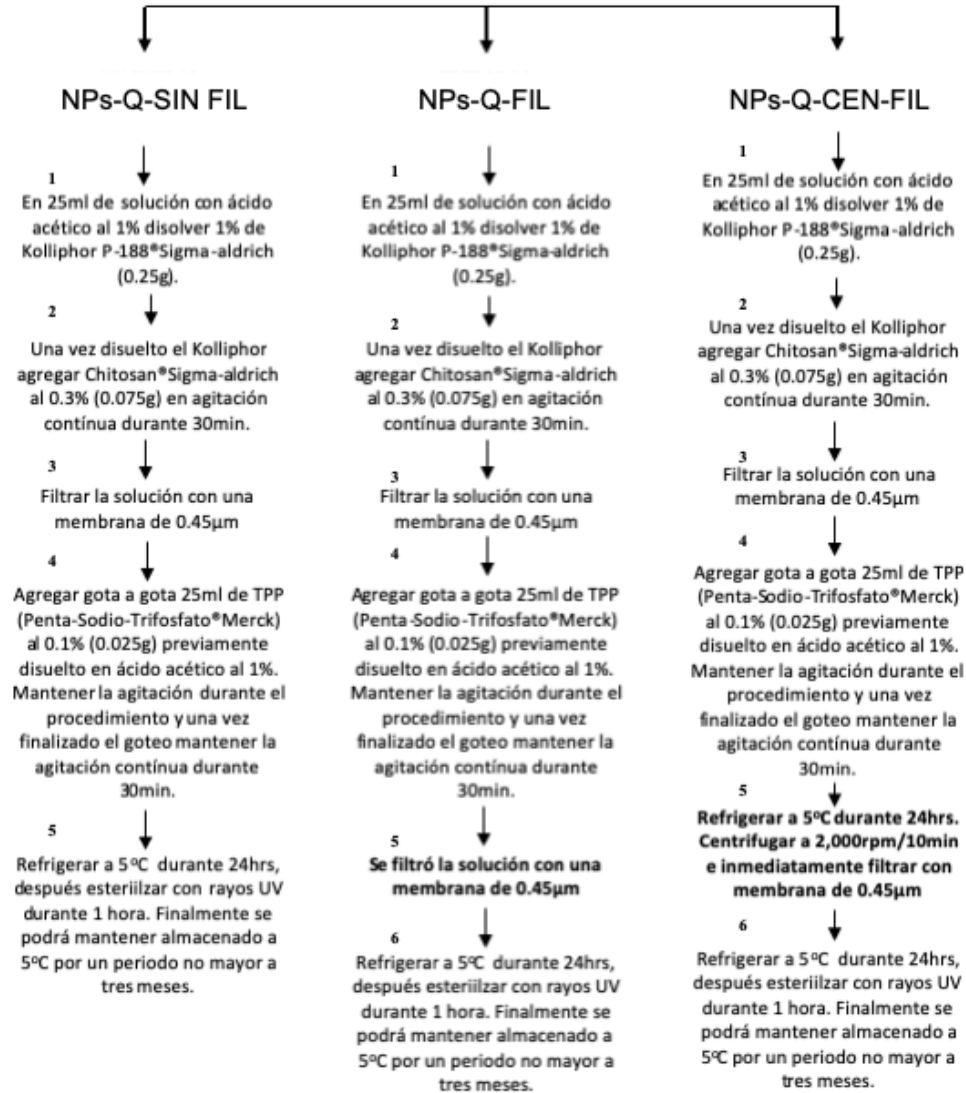
$$(\# \text{ Espermatozoides}) * (21) * (10,000) * (5) = [] \text{ de espermatozoides por mL}$$

6.2. Primera etapa: Elaboración y medición de nanopartículas poliméricas

Se utilizó el método modificado de gelificación iónica con tripolifosfato (TPP) por goteo (Valadez, 2017), se utilizó quitosán (Chitosan®Sigma-Aldrich) de bajo peso molecular (50-190KDa) con un porcentaje de desacetilación ≥75% a una temperatura promedio de 23°C.

6.2.1.- Elaboración de NPs-Q: Se prepararon con tres variaciones en su preparación, con ello se obtuvieron tres grupos: NPs-Q sin filtrar (NPs-Q-SIN FIL), filtradas (NPs-Q- FIL) y centrifugadas y filtradas (NPs-Q-CEN- FIL) Ver diagrama 1.

Diagrama 1: Procedimiento para la elaboración de NPs-Q



(Tomado y modificado de Ramírez *et al.*, 2020)

6.2.2.- Elaboración de NPs-QT: Se utilizó el procedimiento descrito para las NPs-Q del punto 6.2.1. La trehalosa (0.3% 0.075g) se agregó después de haberse filtrado la solución con quitosán con la membrana de 0.45µm (paso número 3 del diagrama 1), finalmente al realizar el segundo filtrado (paso número 5) se utilizó una membrana de 0.45µm de Nylon ACRODISC PALL con la ayuda de una jeringa de 3ml.

6.2.3.- Medición de NPs-Q y NPs-QT: Para obtener el tamaño de partícula se utilizó el análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) con un equipo Coulter Scientific instruments N4Plus.

6.3.- Segunda etapa: Pruebas de toxicidad previas a la congelación y durante la refrigeración

6.3.1.- Pruebas de toxicidad para las NPs-Q: En las pruebas de toxicidad se utilizaron alícuotas de semen a una concentración de 35×10^6 células/ml, las cuales se centrifugaron a 1500rpm (800g) durante 10 min para eliminar el medio de transporte y líquido seminal. Una vez reconstituida la pastilla en uno de los dos medios de incubación seleccionados DPBS (DPBS™ Gibco) o BTS (BTS® KUBUS, S.A) se realizaron evaluaciones repetidas sin NPs (T0: “Tiempo 0”) y una vez agregadas se tomaron muestreos durante cada hora hasta cumplir un total de 3hr (1, 2, 3 horas “T1,T2 y T3”). Además se evaluaron diferentes concentraciones (0, 40, 50, 100, y $150 \mu\text{l} / \text{ml}$) incubando a las células a una temperatura de 37°C . Para cada una de las evaluaciones de las diferentes unidades experimentales se consideró, motilidad, viabilidad e integridad acrosomal (M/V/IA). En el diagrama 2 se muestra el diseño factorial de las variables estudiadas, para ello se utilizaron tres repeticiones con muestras de cinco animales diferentes y un total de cuatro lotes diferentes de NPs-Q.

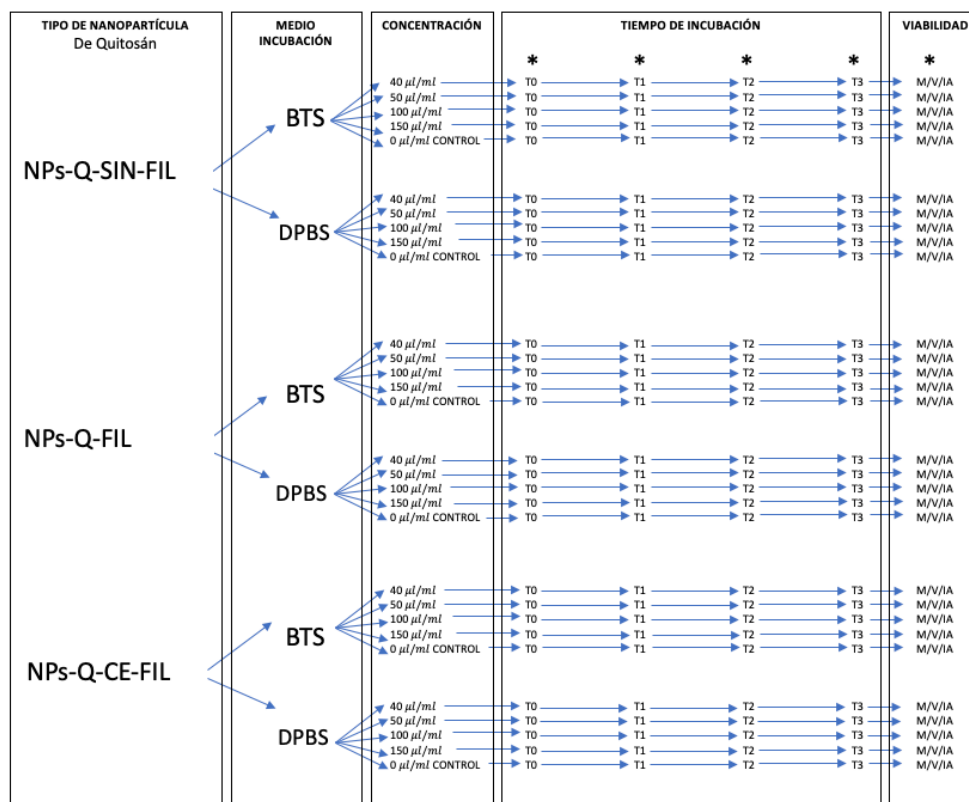


Diagrama 2: Diseño factorial (3x2x5x4 completamente al azar, el número “3” se refiere a los tres tipos de NPs-Q sin filtrar [NPs-Q-SIN FIL], filtradas [NPs-Q- FIL] y centrifugadas y filtradas [NPs-Q-CEN-FIL], el número “2” se refiere a los dos medios de incubación [DPBS Y BTS), el número “5” corresponde a las concentraciones [0, 40, 50, 100, y $150 \mu\text{l} / \text{ml}$], y el número “4” corresponde a los cuatro muestreos consecutivos cada hora durante la incubación *in vitro* [T0, T1, T2 y T3]. En la última columna se abreviaron las variables de estudio [M = Motilidad, V= Viabilidad y la IA= integridad acrosomal] que se evaluaron en cada uno de los tiempos y se representó con un asterisco.

6.3.2.- Pruebas de toxicidad para las NPs-QT: Estas pruebas se realizaron una vez que se seleccionaron las condiciones con base a los resultados del punto 6.3.1. Es decir, una vez que se determinó estadísticamente cuales fueron las condiciones para el empleo de las NPs-Q que no ocasionaron toxicidad sobre las células espermáticas.

6.3.3.- Pruebas de toxicidad para las NPs-Q y NPs-QT durante el enfriamiento: Tomando en consideración observaciones preliminares (Ramírez *et al.*, 2020) donde se observó una disminución de la motilidad por la adición de NPs-Q, en éste punto únicamente se evaluó la viabilidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides expuestos a los dos tipos de nanopartículas (NPs-Q y NPs- QT) a 16°C y 5°C durante una hora.

6.4.- Tercera etapa: Congelación

En esta sección se utilizaron diferentes protocolos de congelación incluidos los de rutina y con modificaciones al agregar NPs. Se incluyeron dos protocolos de rutina, el primero descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez, 2009 y el segundo utilizado por Nieves (2012). En el siguiente listado se presenta el procedimiento utilizado para cada uno de ellos, los resultados de experimentos preliminares nos permitieron agregar cinco grupos adicionales (grupos D, E, F, G y H) en los que se modificaron los tiempos de exposición con las NPs y la temperatura utilizada, ya que se observó que la temperatura y el tiempo de incubación fueron factores importantes para mantener la viabilidad y la integridad acrosomal (Ramírez *et al.*, 2020).

6.4.1.- Protocolo de congelación lenta de rutina

6.4.1.1.- “Grupo A”: Protocolo de congelación de rutina 1 (control A + B): Se utilizó el protocolo de congelación a dos tiempos (refrigeración y glicerolización) descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez, 2009. Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación 800 g (1500rpm) durante 10 min, se reconstituyó la pastilla con la mitad del volumen final en el diluyente “A” libre de glicerol (etapa de refrigeración) ajustando la concentración espermática a 600×10^6 espermatozoides/ml cada uno de los tubos se envolvieron en gases húmedas dentro de un recipiente con agua previamente atemperado a 16°C. Una vez estabilizadas a 16°C durante un periodo de dos horas se colocaron en refrigeración a 5°C durante dos horas, posteriormente se agregó la segunda mitad del diluyente (fracción B, etapa de glicerolización), adicionándolo de forma gradual en cuatro tiempo (5,10,15 y 20%) del volumen total en intervalos de 10min entre cada adición. Inmediatamente después se almacenaron en pajillas de 0.5ml selladas con alcohol polivinílico, logrando una concentración final de 300×10^6

células/pajilla. Después las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos con su almacenamiento posterior en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

La formulación del diluyente A y B se realizó el mismo día de la congelación, para los cuales se utilizó a la yema de huevo como parte del diluyente. Se extrae la yema de huevo libre de clara y chalazas con una jeringa estéril la cual se adiciona junto con el resto de los ingredientes previamente vertidos (Cuadro 3). Las dos fracciones se centrifugan a 800g (1500rpm) durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante, y una vez recuperado, se ajusta el pH en un rango de entre 6.8 a 7.2, empleando un potenciómetro (HANNA Instruments HI 2211 pH/ORP Meter).

Cuadro 3: Diluyente de congelación de rutina 1(Nieves, 2012)		
Ingredientes	Diluyente A	Diluyente B
Dextrosa (g)	0.399	0.399
Yema de huevo (20%) ml	1	1
Gentamicina (ml)	0.05	0.05
Glicerol (3%) ml	---	0.3
Agua desionizada cbp (ml)	5	5

6.4.1.2.- “Grupo B”: Protocolo de congelación de rutina 2 (control A + B + trehalosa): Se utilizó el protocolo de congelación a dos tiempos (refrigeración y glicerolización) descrito por Gutiérrez, 2009. Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación 800 g (1500rpm) durante 10 minutos, se reconstituyó la pastilla con la mitad del volumen final en el diluyente A libre de glicerol y adicionado con trehalosa (etapa de refrigeración) ajustando la concentración espermática a 600×10^6 espermatozoides/ml cada uno de los tubos se envolvieron en gasas húmedas dentro de un recipiente con agua previamente atemperado a 16°C. Una vez estabilizadas a 16°C durante un periodo de dos horas se colocaron en refrigeración a 5°C durante dos horas, posteriormente se agregó la segunda mitad del diluyente (fracción B adicionada con trehalosa, etapa de glicerolización), adicionándolo de forma gradual en cuatro tiempo (5,10,15 y 20%) del volumen total en intervalos de 10min entre cada adición. Inmediatamente después se almacenaron en pajillas de 0.5ml selladas con alcohol polivinílico, logrando una concentración final de 300×10^6 células/pajilla. Después las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos con su almacenamiento posterior en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

La formulación del diluyente A y B se realizó el mismo día de la congelación, para los cuales se utilizó a la yema de huevo como parte del diluyente. Se extrae la yema de huevo libre de clara y chalazas con una jeringa estéril la cual se adiciona junto con el resto de los ingredientes

previamente vertidos (Cuadro 4). Las dos fracciones se centrifugan a 800g (1500rpm) durante 10min para recuperar el sobrenadante, y una vez recuperado se ajusta el pH en un rango de entre 6.8 a 7.2, empleando un potenciómetro (HANNA Instruments HI 2211 pH/ORP Meter).

Cuadro 4: Diluyente de congelación de rutina 2 (Gutiérrez, 2009)		
Ingredientes	Diluyente A	Diluyente B
Trehalosa (250mM)	0.945g	0.945g
Yema de huevo (20%) ml	2	2
Gentamicina (ml)	100 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Glicerol (1%) ml	---	0.2
Agua desionizada cbp (ml)	10	10

6.4.1.3.- “Grupo C”: Protocolo de congelación con diluyente A de rutina libre de glicerol adicionado con NPs-Q o de QT (16°C): Se utilizó el protocolo de congelación descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez, 2009. Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 minutos, se reconstituyó la pastilla en el diluyente “A” (Cuadro 3) a una concentración espermática de 300×10^6 espermatozoides/ml, inmediatamente se agregaron las NPs-Q o de QT ($40 \mu\text{l/ml}$) a una temperatura de **16°C** dejando que la muestra se estabilizara. Los tubos se envolvieron con gasas húmedas dentro de un recipiente con agua previamente atemperado. Una vez estabilizadas a 16°C por dos horas se colocaron en refrigeración a 5°C durante dos horas. Inmediatamente después se almacenaron en pajillas de 0.5ml selladas con alcohol polivinílico. Después las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos para su posterior almacenamiento en tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

6.4.1.4.- “Grupo D”: Protocolo de congelación con diluyente A de rutina libre de glicerol adicionado con NPs-Q o de QT (5°C/10min): Se utilizó el protocolo de congelación descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez, 2009. Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 minutos, se reconstituyó la pastilla en el diluyente “A” (Cuadro 3) a una concentración espermática de 300×10^6 espermatozoides/ml. Los tubos se envolvieron con gasas húmedas dentro de un recipiente con agua previamente atemperado. Una vez estabilizadas las muestras a 16°C durante dos horas se colocaron en refrigeración a **5°C** durante dos horas, sin embargo **10 minutos antes de empajillar** y sellar con alcohol polivinílico se **agregaron NPs-Q** o de **QT** ($40 \mu\text{l/ml}$). Una vez empajilladas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos para su posterior almacenamiento en tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

6.4.1.5.- “Grupo E”: Congelación lenta en medio BTS libre de glicerol adicionado con NPs-Q o de QT (5°C): Se utilizó el protocolo de congelación descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez, 2009. Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 minutos, se reconstituyó la pastilla en un medio con **BTS** (BTS® KUBUS, S.A.) a una concentración espermática de 300×10^6 espermatozoides/ml. Los tubos se envolvieron con gasas húmedas dentro de un recipiente con agua previamente atemperado. Una vez estabilizadas a 16°C durante dos horas, se colocaron en refrigeración a 5°C e inmediatamente se **agregaron las NPs-Q** o de **QT** ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$) manteniéndolas durante dos horas, para después ser almacenadas en pajillas de 0.5ml las cuales fueron selladas con alcohol polivinílico. Después las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20 minutos para su posterior almacenamiento en tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

6.4.2.- Protocolo de congelación rápida con pre-incubación con las NPs-Q o NPs-QT

6.4.2.1.- “Grupo F”: Protocolo de congelación con NPs-Q o de QT incubadas a 37°C: Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 min, se reconstituyó la pastilla en un medio BTS (BTS® KUBUS, S.A.) a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml para su incubación con NPs ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$) a 37°C durante 10min. Una vez transcurrida la incubación se realizó una segunda centrifugación y se reconstituyó en BTS a una concentración de 300×10^6 células/ml para empajillar. Inmediatamente las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20min y se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

6.4.2.2.- “Grupo G”: Protocolo de congelación con NPs-Q o de QT incubadas a 16°C: Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 min, se reconstituyó la pastilla en un medio BTS (BTS® KUBUS, S.A.) a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml para su incubación con NPs ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$) a 16°C durante 10min. Una vez transcurrida la incubación se realizó una segunda centrifugación y se reconstituyó en BTS a una concentración de 300×10^6 células/ml para empajillar. Inmediatamente las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20min y se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

6.4.2.3.- “Grupo H”: Protocolo de congelación con NPs-Q o de QT incubadas a 5°C: Se retiró el diluyente y el plasma seminal por centrifugación a 800g (1500rpm) durante 10 min, se reconstituyó la pastilla

en un medio BTS (BTS® KUBUS, S.A.) a una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml para su incubación con NPs ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$) a 5°C durante 10min. Una vez transcurrida la incubación se realizó una segunda centrifugación y se reconstituyó en BTS a una concentración de 300×10^6 células/ml para empajillar. Inmediatamente las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150°C) durante 20min y se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) durante 15 días.

En resumen, el siguiente cuadro nos muestra un resumen de las principales características de los diferentes grupos experimentales utilizados para la congelación de semen utilizando NPs (Cuadro 5).

Cuadro 5: Resumen de los diferentes componentes en los diluyentes de congelación para cada uno de los grupos experimentales.									
GRUPOS		Diluyente A (dextrosa)	Diluyente B (dextrosa+glicerol)	Diluyente A (Trehalosa)	Diluyente B (Trehalosa+glicerol)	NPs-Q	NPs-QT	BTS	Tiempo de exposición con NPs
Congelación lenta de rutina	A	x	x						---
	B			x	x				---
	C	x				x	x		4hrs
	D	x				x	x		10min a 5°C
	E					x	x	x	2hrs a 5°C
Congelación rápida Preincubación	F					x	x	x	10min a 37°C
	G					x	x	x	10min a 16°C
	H					x	x	x	10min a 5°C

6.5.- Descongelación de las muestras

Se realizó la descongelación colocando cada una de las pajillas en baño maría a 37°C durante 30 segundos, inmediatamente después el contenido de las pajillas fue colocado en tubos falcón previamente atemperados a 37°C con diluyente BTS, a un volumen de 1:6 durante 10 minutos a 37°C (Gutiérrez, 2009; Nieves, 2012, Juárez *et al.*, 2018). Una vez transcurrido el tiempo se tomaron tres muestras para evaluar motilidad, viabilidad e integridad acrosomal.

6.6.- Evaluación de la viabilidad espermática

Únicamente se consideraron aquellas muestras cuya motilidad era igual o por encima del 75%, además se utilizaron por un periodo no mayor a los tres días de refrigeración.

6.6.1.- Motilidad progresiva: Para evaluar la motilidad se realizó una valoración subjetiva del porcentaje de motilidad progresiva, para ello se tomó una muestra alícuota de $10\mu\text{l}$ de cada medio de incubación (35×10^6 espermatozoides/ml) para la observación directa al microscopio óptico (400x), para ello se colocó en un portaobjetos atemperado a 37°C , se contabilizó el número de espermatozoides que tuvieran motilidad progresiva hasta llegar a un total de 100 células para obtener el porcentaje (Gutiérrez, 2009; Nieves, 2012).

6.6.2.- Viabilidad celular: Se utilizó la tinción vital de eosina-nigrosina para valorar el número de espermatozoides vivos y muertos (Nieves, 2012). Para ello se tomó una muestra alícuota de $40\mu\text{l}$ de cada uno de los muestreos durante la incubación (35×10^6 espermatozoides/ml) más $5\mu\text{l}$ de tinción vital, se incubó durante 37°C durante 5 min. Cada frotis se realizó con $10\mu\text{l}$ de muestra y se contabilizó un total de 100 células para obtener el porcentaje de espermatozoides vivos. La interpretación fue “**vivos**” (no se tiñe el citoplasma) o “**muertos**” (citoplasma débilmente o fuertemente teñido) (Nieves, 2012).

6.6.3.- Integridad acrosomal: Se utilizó la tinción azul brillante de Coomassie (BBC) con la técnica por Larson y Miller (1999). En un tubo eppendorf se incubaron $40\mu\text{l}$ de la muestra a temperatura ambiente con $40\mu\text{l}$ de amortiguador de paraformaldehído al 4% (en agua desionizada, pH 7.4), durante 10min a temperatura ambiente, se retiró el paraformaldehído por centrifugación a $1600g$ (3000rpm) durante 4min reconstituyendo la muestra en DPBS, se realizaron dos lavados adicionales y fueron resuspendidos en cloruro de amonio al 50mM en el volumen inicial. Se realizaron los frotis y se tiñeron en solución de azul de Coomassie durante 4min, se lavaron con agua bidestilada para remover el exceso de colorante, una vez secos los frotis se observaron directamente al microscopio óptico (400x) y se contabilizó un total de 100 células por laminilla. La interpretación de la integridad acrosomal fue **íntegra** (acrosoma teñido), y **ausente** (ausencia del acrosoma).

7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa R-Studio versión 3.6.3. Para el análisis de los datos que presentaron una distribución normal (prueba de hipótesis de Shapiro-Wilk) se utilizó un análisis de varianza para medidas repetidas, adicional a ello se aplicó el test de esfericidad de Mauchly's y la corrección de esfericidad para verificar si las varianzas de las muestras fueron homogéneas; al encontrar diferencias significativas en el

ANOVA se aplicó las prueba de comparaciones múltiples de Fisher (LSD *Least Significant Difference*) para evaluar las diferencias significativas entre todos los grupos.

Finalmente para los resultados de la congelación que no presentaron una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y el análisis de comparaciones múltiples.

8.- RESULTADOS

8.1.- Medición de NPs-Q y NPs-QT

En el cuadro 6 se muestran los diferentes tamaños en nanómetros (nm) de las NPs-Q y de las NPs-QT para cada una de las condiciones específicas en su elaboración (sin filtrar, filtradas y centrifugadas y filtradas) obtenidas con el análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS). En la tabla se puede observar el índice de polidispersión (I.P.), promedios, desviación estándar y el porcentaje correspondiente a los diferentes tamaños que se encontraron en la suspensión. En gris se resaltan los porcentajes mayores al 40% junto con el tamaño de partícula correspondiente y en rojo se muestra el porcentaje y tamaño que no corresponde al tamaño nanométrico. En el caso de las NPs-QT sin filtrar aparentemente el 26.3% no correspondían a un tamaño nanométrico. Finalmente el volumen obtenido de solución de las NPs-QT filtradas fue muy reducido al existir mayor resistencia en el proceso de filtrado, lo que representó una limitante en la técnica.

Cuadro 6: Tamaño (nm) de las Nanopartículas poliméricas según la técnica de elaboración.												
		I.P.	Promedio	DS	Porcentajes							
NPs-Q	SIN FILTRAR	0.682	35.3nm	85.6nm	72.1% 14.3nm	20.9% 24.4nm	3% 205.4nm	3.9% 349nm				
	FILTRADO	0.76	270.6nm	115.5nm	11% 120.4nm	40.6% 205nm	46.3% 349.2nm	2.1% 594.6nm				
	CENT/FILT	0.617	10.7nm	28.2nm	94.3% 8.4nm	5% 14.3nm	0.4% 205nm	0.3% 349.2nm				
NPs-QT	SIN FILTRAR	0.634	954.7nm	2073.0nm	44.8% 8.4nm	17.6% 14.3nm	6.6% 24.4nm	2.4% 41.5nm	0.9% 70.7nm	0.3% 349.2nm	0.7% 594.6nm	26.3% 1000nm
	FILTRADO	0.623	114.8nm	145.7nm	71.3% 41.5nm	10.4% 205nm	18.3% 349.2nm					
	CENT/FILT	0.588	68nm	143.7nm	80% 24.4nm	6.2% 41.5nm	1.4% 120.4nm	4% 205nm	5.8% 349.2nm	2.7% 594.6nm		

8.2.- Segunda etapa: Pruebas de toxicidad previas a la congelación de las NPs-Q

En el cuadro 7 se puede observar el resumen de los factores que fueron significativos para cada una de las variables estudiadas. Se puede observar que la **motilidad** se ve afectada por la interacción de al menos dos factores, el tipo de nanopartícula junto con el medio de incubación, adicionalmente por el tipo de nanopartícula junto con el tiempo de incubación y la interacción de los factores concentración, medio y tiempo de incubación.

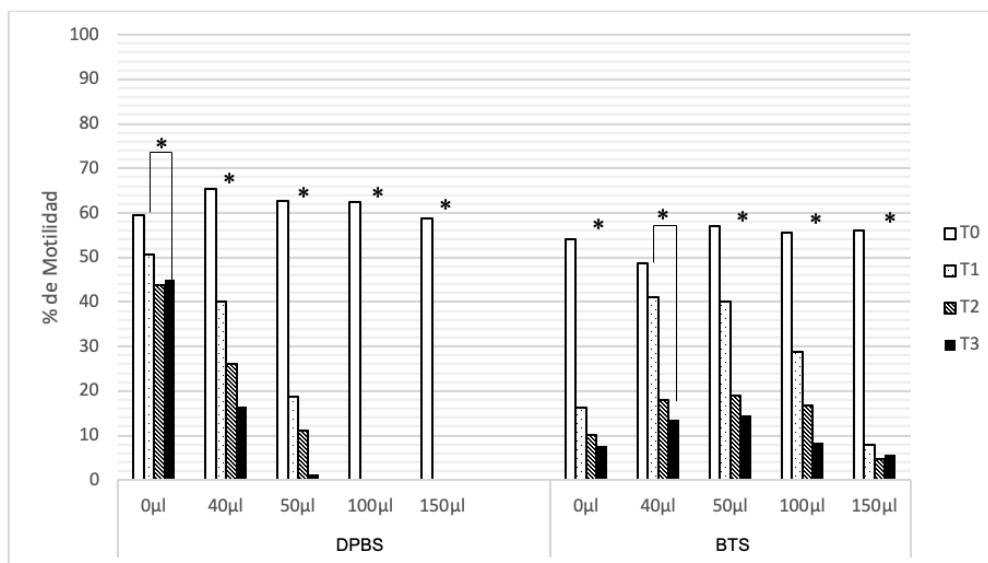
La **viabilidad** espermática se ve afectada por la interacción de las variables, concentración, medio de incubación y el tiempo de incubación y entre el tipo de nanopartícula, concentración y tiempo de incubación.

Con respecto a la **integridad acrosomal** existe una variación en cuanto al medio de incubación junto con el tiempo de incubación, pero el factor “Nanopartícula” por sí solo afecta la integridad acrosomal.

Cuadro 7. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) durante la incubación <i>in vitro</i> a 37°C			
Factores y combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)		
	Motilidad	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Nanopartícula			<u>P= 0.003</u>
Tiempo de incubación	P= 0.000	P= 0.000	P=0.000
Concentración	P= 0.000	P= 0.000	
Medio de incubación		P= 0.000	P= 0.000
Nanopartícula/Medio Inc	<u>P= 0.001</u>		
Nanopartícula/tiempo Inc	<u>P= 0.000</u>	P= 0.000	
Nanopartícula/Concent			
Concen/Tiempo Inc	P= 0.000	P= 0.000	
Medio inc/Tiempo Inc	P= 0.021	P= 0.000	<u>P= 0.015</u>
Concent/Medio Inc	P= 0.000	P= 0.004	
Conc/Medio/Tiempo	<u>P= 0.000</u>	<u>P= 0.015</u>	
Nano/Conc/Medio		<u>P= 0.043</u>	
Nano/Conc/Tiempo			
Nano/Medio/Tiempo			
Nano/Conc/Medio/Tiempo			

Se enlistan los cuatro factores involucrados (nanopartículas de quitosán: sin filtrar, filtradas y centrifugadas y filtradas; tiempo de incubación: tiempo 0, tiempo 1h, 2h y 3h; concentración: 0, 40, 50, 100, y 150 $\mu\text{l/ml}$; y medio de incubación: DPBS y BTS); así como las diferentes combinaciones entre sus interacciones. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (motilidad, viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas ($p < 0.05$) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos. Las probabilidades subrayadas, son de interés para el análisis de los resultados dado que la interacción involucra a la mayoría de los factores en estudio.

En la **gráfica 1** se muestra el porcentaje de motilidad en relación a la concentración de NPs, medio de incubación y tiempo de incubación. Los resultados muestran una disminución significativa de la motilidad ($p < 0.05$) entre el tiempo 0 (T0) con respecto al resto de los tiempos evaluados. La disminución se da a partir de una hora de incubación en un medio con DPBS a la concentración de $40 \mu\text{l/ml}$ de NPs, llegando a una motilidad de 0 a la concentración de $100 \mu\text{l/ml}$. En contraste en el medio BTS, la disminución es a partir de las dos horas de incubación a una concentración de $40 \mu\text{l/ml}$ de NPs sin llegar a una motilidad nula en ninguna de las concentraciones y tiempos evaluados.



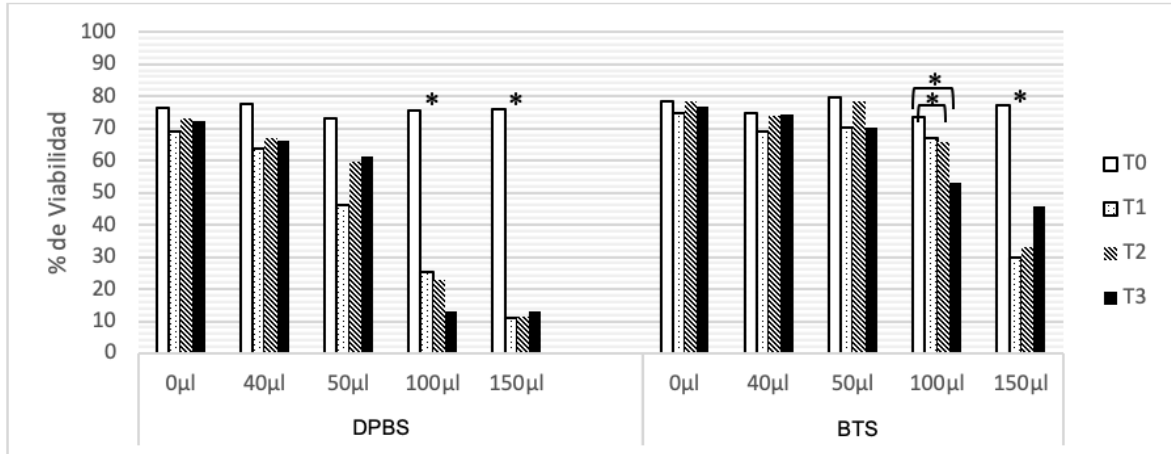
Gráfica 1: Porcentaje de motilidad espermática para cada una de las concentraciones de NPs (0, 40, 50, 100 y $150 \mu\text{l/ml}$) en los dos medios ensayados (DPBS y BTS) a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin NPs), T1 (una hora de incubación), T2 (dos horas de incubación) y T3 (tres horas de incubación). Los asteriscos solos (-) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) intragrupo entre el T0 y el T1 y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias intragrupo asociado con el tiempo de incubación.

Con respecto a la interacción entre el tipo de nanopartícula y el tiempo de incubación se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir de la hora de incubación con una diferencia mínima de medias de 6.94 (FLSD). La mayor diferencia en la disminución de la motilidad fue para las NPs-Q-FIL con una disminución del 49.37% y la de menor disminución fue de 26.43% para las NPs-Q-SIN-FIL (**Cuadro 8**).

Cuadro 8: Medias y DS del porcentaje de motilidad asociado al tiempo y tipo de nanopartícula			
	NPs-Q-SIN-FIL	NPs-Q-FIL	NPs-Q-CEN-FIL
T0	55.45 ± 18.24	69.70 ± 16.94	50.54 ± 22.08
T1	29.03 ± 28.3	20.33 ± 23.01	22.80 ± 25.01
T2	21.95 ± 23.96	11.93 ± 18.88	9.48 ± 17.60
T3	15.80 ± 22.75	9.8 ± 17.51	7.23 ± 16.04

En la **gráfica 2** se muestra el porcentaje de **viabilidad** asociado a la **concentración, medio y tiempo de incubación**. Sin considerar el tipo de NP se

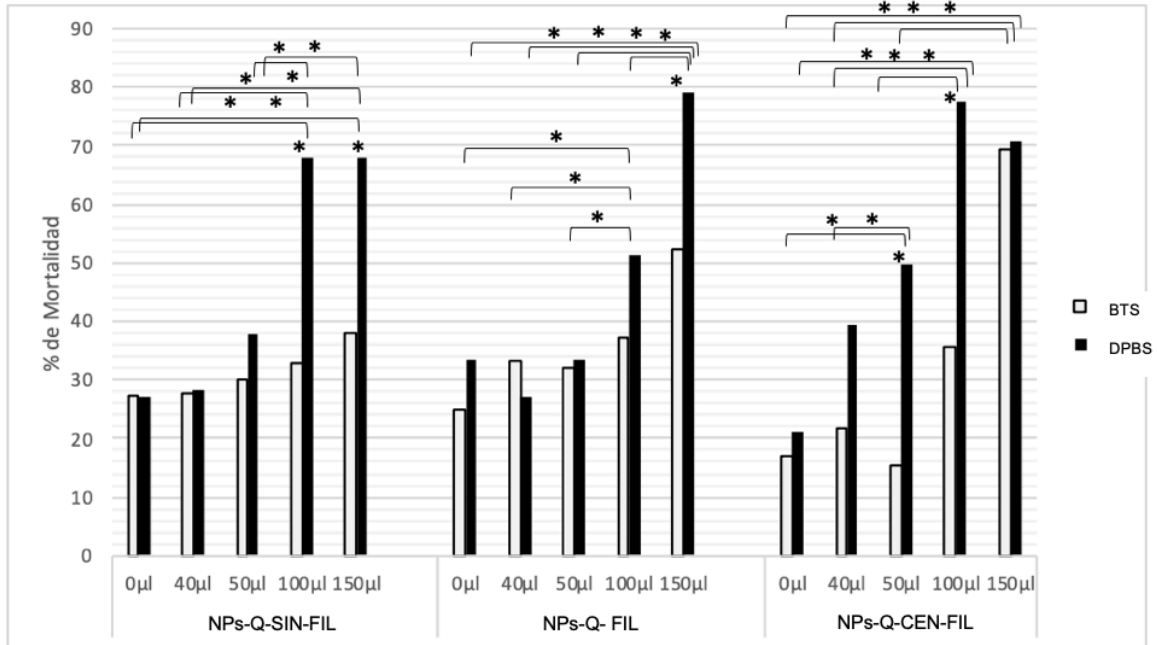
pueden observar diferencias significativas a partir de la concentración de $100 \mu\text{l/ml}$ sin considerar el medio de incubación, sin embargo la viabilidad observada fue mayor en el caso de la incubación con BTS.



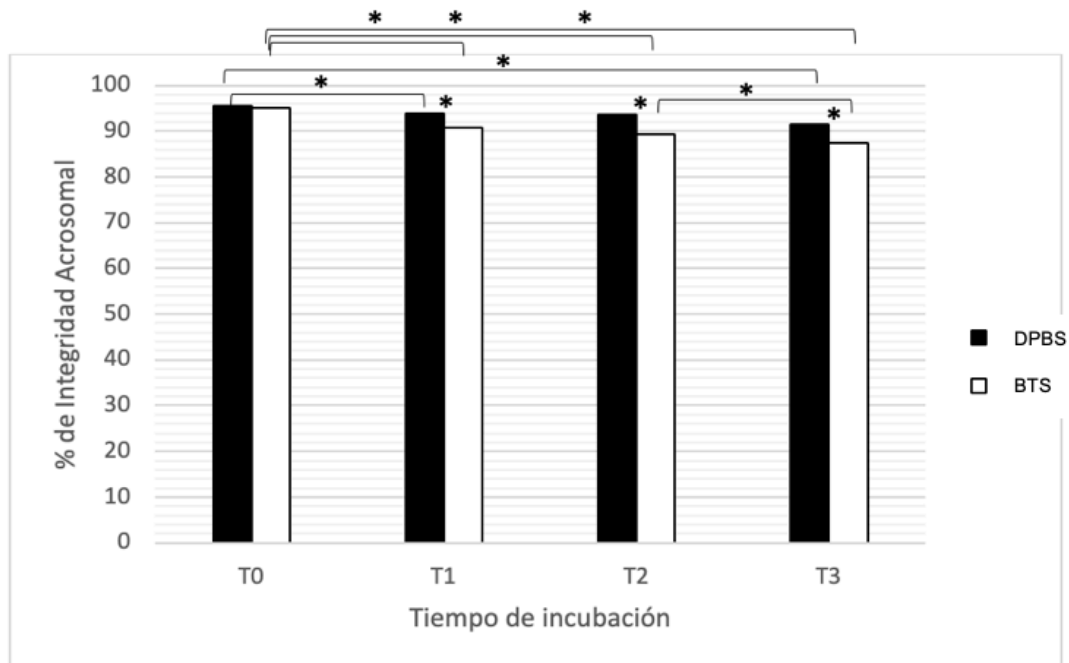
Gráfica 2: Porcentaje de viabilidad espermática para cada una de las concentraciones (0, 40, 50, 100 y $150 \mu\text{l/ml}$) en los dos medios ensayados (DPBS y BTS) a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T1 (una hora de incubación con NPs), T2 (dos horas de incubación) y T3 (tres horas de incubación). Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) intragrupo entre el T0 y el T1 y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias intragrupo asociado con el tiempo de incubación.

En la **gráfica 3** se puede observar un aumento de la mortalidad a las dosis mayores de nanopartículas (100 y $150 \mu\text{l/ml}$) asociado al tipo de nanopartícula; existiendo una mortalidad del 50% de las células a una dosis de $50 \mu\text{l/ml}$ para las NPs-Q-Ce-FIL. En el caso de las NPs-Q-SIN-FIL a dosis bajas ($40 \mu\text{l/ml}$) se tiene una mortalidad por debajo del 30%. Observándose diferencias significativas en el incremento de la mortalidad si se utiliza un medio como el PBS al incrementarse un 51% a una hora de incubación con dosis de $100 \mu\text{l/ml}$ y de un 64% con dosis de $150 \mu\text{l/ml}$ a una hora de incubación, ello contrasta con la mortalidad en un medio como el BTS, ya que se observó un 20% de mortalidad a una dosis de $100 \mu\text{l/ml}$ hasta las tres horas de incubación. Además si se analiza el tipo de NPs se encontró que las NPs-Q centrifugadas y filtradas fueron las de mayor potencial tóxico al presentar un incremento de la mortalidad del 27% a dosis menores ($50 \mu\text{l/ml}$).

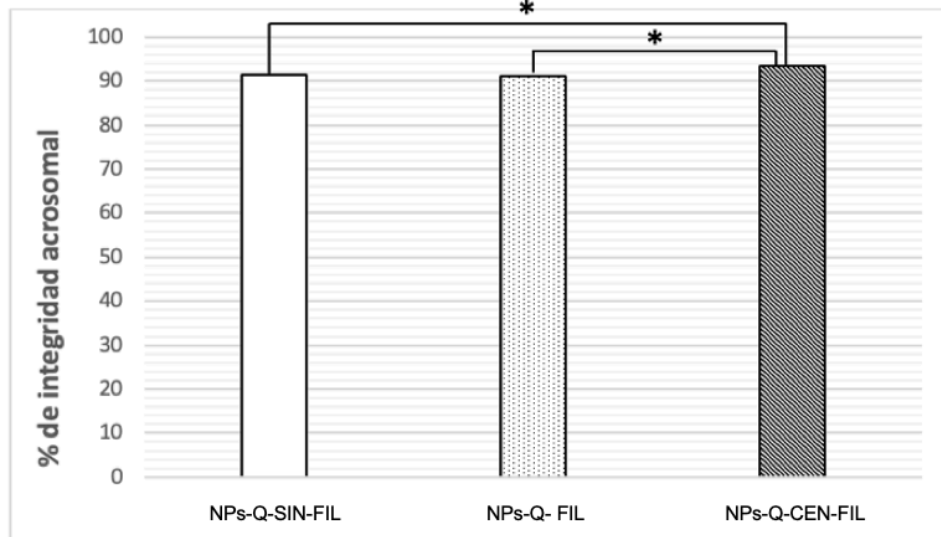
Para la **integridad acrosomal** en la **gráfica 4** se puede observar que durante la incubación existen diferencias significativas a partir de la hora de incubación sin embargo se mantuvo por encima del 80% independientemente del medio de incubación. Sin embargo, ello fue mayor al emplear a las NPs-Q-Ce-FIL (ver **gráfica 5**).



Gráfica 3: Porcentaje de mortalidad espermática para cada tipo de nanopartícula de quitosán (NPs-Q) según la técnica de su elaboración: NPs-Q sin filtrar (NPs-Q-SIN FIL), filtradas (NPs-Q-FIL) y centrifugadas y filtradas (NPs-Q-CEN-FIL), la concentración de NPs (0, 40, 50, 100 y 150 $\mu\text{l}/\text{ml}$) en los dos medios ensayados (DPBS y BTS). Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada medio de incubación para las concentraciones y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias entre grupos para cada tipo de NPs.



Gráfica 4: Porcentaje de integridad acrosomal a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T1 (una hora de incubación con NPs), T2 (dos horas de incubación) y T3 (tres horas de incubación) en los dos medios ensayados (DPBS y BTS). Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada medio de incubación y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias a lo largo del tiempo.



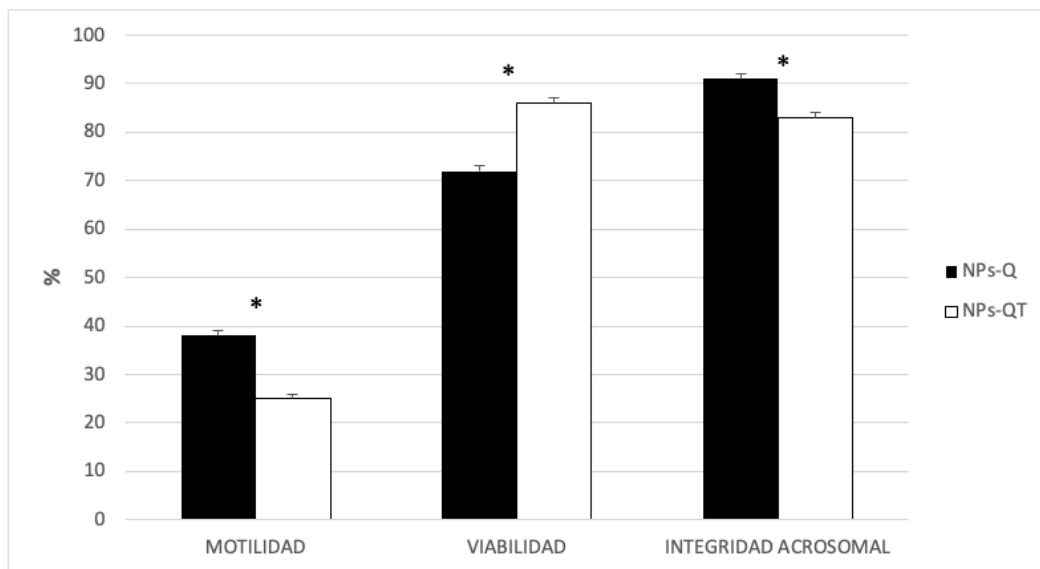
Gráfica 5: Porcentaje de integridad acrosomal para cada tipo de nanopartícula de quitosán (NPs-Q) según la técnica de su elaboración: NPs-Q sin filtrar (NPs-Q-SIN FIL), filtradas (NPs-Q- FIL) y centrifugadas y filtradas (NPs-Q-CEN-FIL). Los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias entre grupos para cada tipo de NPs.

Para las pruebas de toxicidad con las NPs-QT se consideraron las concentraciones de 40 y 50 $\mu\text{l/ml}$ en el medio de incubación con BTS. Se realizó un análisis de varianza para medidas repetidas y se obtuvieron los siguientes resultados estadísticos al realizar las comparaciones múltiples comparando tanto las NPs-Q junto con las NPs-QT (**Cuadro 9**). Se puede observar que la motilidad es afectada por el tipo de nanopartícula, concentración y tiempo de incubación y en el caso de la viabilidad y la integridad acrosomal únicamente es afectada por el tipo de nanopartícula utilizada.

Cuadro 9. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y de Quitosán cargadas con Trehalosa (NPs-QT) durante la incubación <i>in vitro</i> a 37°C en un medio con BTS (Beltsville thawing).			
Factores y sus combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)		
	Motilidad	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Nanopartícula	P= 0.009	<u>P= 0.000</u>	<u>P= 0.000</u>
Tiempo de incubación	P= 0.000		
Concentración			
Nanopartícula/tiempo Inc	<u>P= 0.000</u>		
Nanopartícula/Concent			
Concen/Tiempo Inc	<u>P= 0.020</u>		
Nano/Conc/Tiempo			

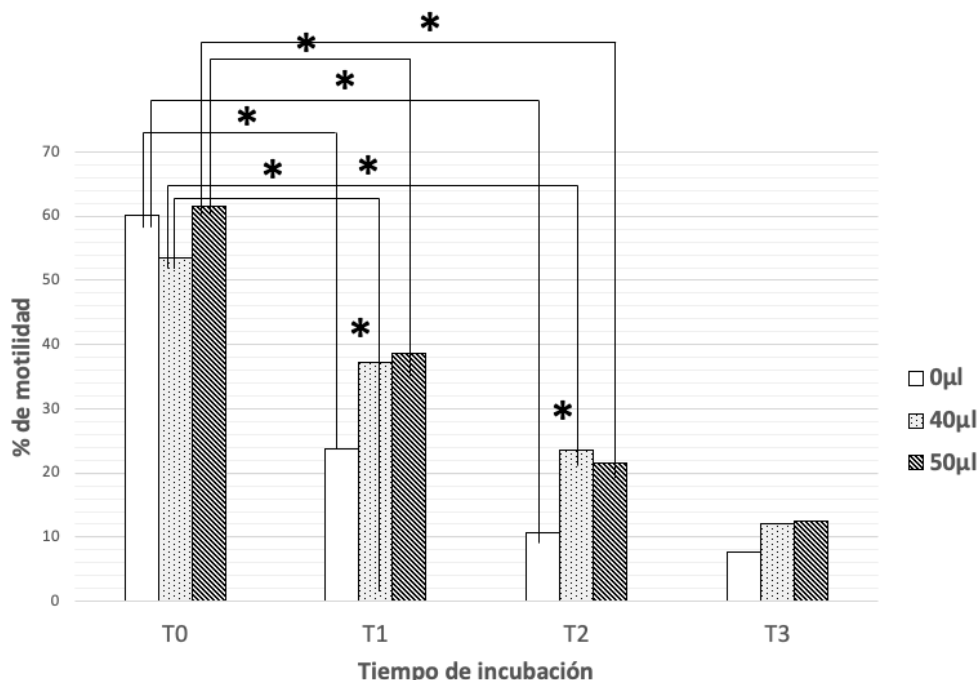
Se enlistan los tres factores involucrados (nanopartículas: NPs-Q y NPs-QT; tiempo de incubación: tiempo 0, tiempo 1h, 2h y 3h; y concentración: 0, 40, 50 $\mu\text{l/ml}$); así como las diferentes combinaciones entre sus interacciones. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (motilidad, viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas ($p<0.05$) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos. Las probabilidades subrayadas, son de interés para el análisis de los resultados dado que la interacción involucra a la mayoría de los factores en estudio.

En la **gráfica 6** se pueden observar como las NPs-Q permiten mantener un 13% más la motilidad que las NPs-QT durante la incubación, así como mantener un 8% más en la integridad acrosomal. En contraste las NPs-QT mantienen mejor la viabilidad en un 14%.



Gráfica 6: Porcentaje de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal según el tipo de nanopartícula utilizada para la incubación in vitro de los espermatozoides de cerdo en un medio con BTS. Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tipo de NP utilizada. NPs-Q: nanopartículas de quitosán y NPs-QT: nanopartículas de quitosán acarreadoras de trehalosa.

En el caso de la motilidad es más sensible al tiempo de incubación y a la concentración como lo observamos en la gráfica 7, en donde existe el mismo patrón de disminución de la motilidad en ambas NPs con respecto al tiempo; en el caso de las NPs-QT no hubo diferencia entre las dos concentraciones utilizadas (40 y 50 $\mu\text{l/ml}$). Sin embargo, hay que destacar que los medios que contienen NPs la motilidad observada fue mayor, con una diferencia promedio del 14% con respecto al grupo control en la primera hora de incubación y en la segunda hora se mantiene la diferencia promedio de casi el 12%.



Gráfica 7: Porcentaje de motilidad espermática a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs-QT), T1 (una hora de incubación con NPs-QT), T2 (dos horas de incubación) y T3 (tres horas de incubación) según la concentración utilizada (0, 40, 50 $\mu\text{l/ml}$) en un medio de incubación con BTS. Los asteriscos solos (-) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la concentración 0 $\mu\text{l/ml}$ al compararlo con las concentraciones de 40 y 50 $\mu\text{l/ml}$, y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias intra grupos a lo largo del tiempo.

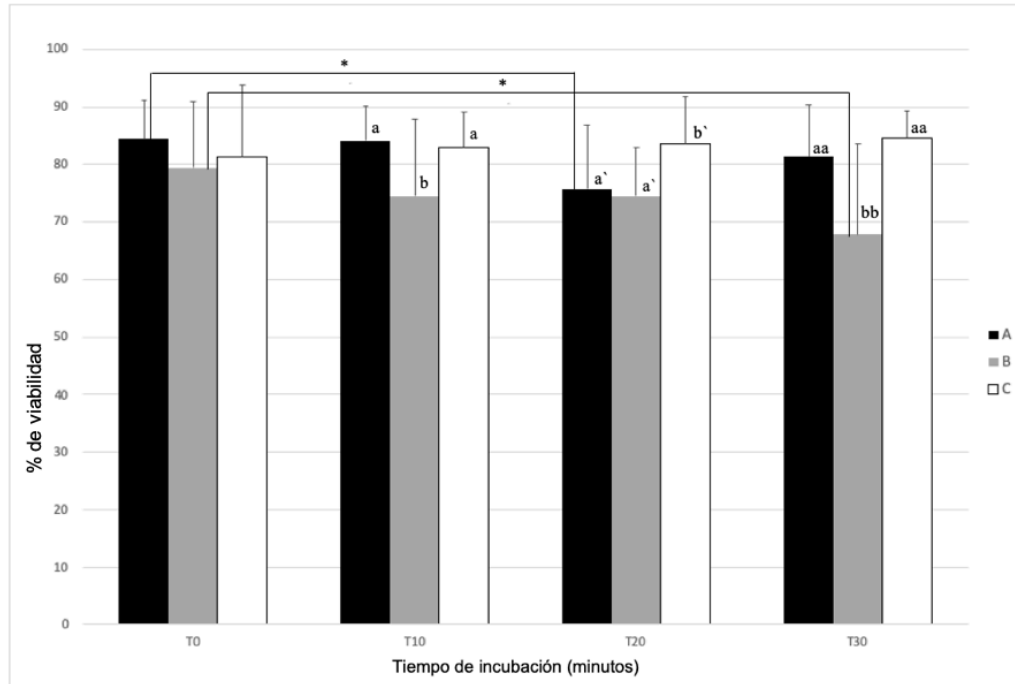
No se encontró una diferencia significativa entre las dosis más bajas de NPs tanto para las NPs-Q y NPs-QT, por lo que se decidió utilizar la dosis más baja de 40 $\mu\text{l/ml}$ para las pruebas durante el periodo de refrigeración (ver resultados de la segunda etapa). Además se realizó un análisis adicional, ensayándose como controles el medio de preparación (ácido acético al 1%) de las NPs a la temperatura de 37°C con la cantidad de trehalosa o de quitosán utilizada para elaborar nanopartículas pero sin los agentes reticulantes y estabilizadores. A estos grupos se les llamó controles positivos: **control positivo con quitosán** (CON-POS-Q: Solución de ácido acético al 1% más quitosán al 0.3%), **control positivo con trehalosa** (CON-POS-T: Solución de ácido acético al 1% más trehalosa 0.3%). Evaluándose en total cinco grupos [NPs-Q, NPs-QT, CON-POS-Q, CON-POS-T y CON-NEG (BTS)]. Para ello se utilizaron muestras de tres animales diferentes, por lo que también se evaluó si existían diferencias individuales; únicamente considerando la viabilidad y la integridad acrosomal. Los muestreos se realizaron cada 10 minutos hasta un total de 30 minutos de incubación a 37°C. Las diferencias en el análisis de varianza se pueden observar en el **cuadro 10**.

Cuadro 10. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y de Quitosán cargadas con Trehalosa (NPs-QT) y controles durante la incubación *in vitro* a 37°C en un medio con BTS (Beltsville thawing).

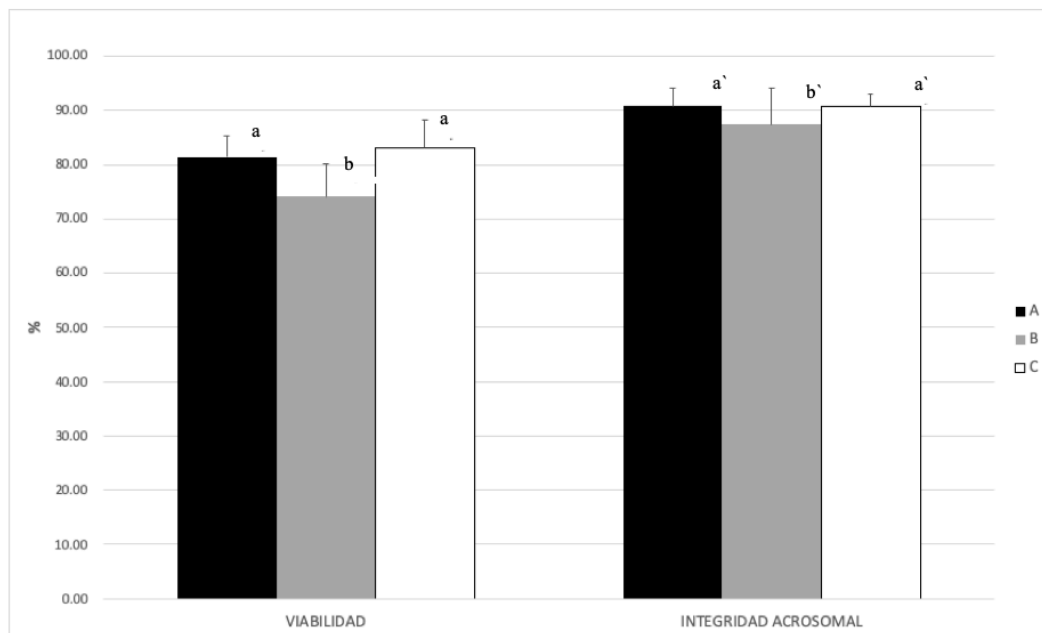
Factores y sus combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)	
	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Cerdo	P= 0.000	<u>P= 0.023</u>
Nanopartícula		<u>P= 0.001</u>
Tiempo de incubación		<u>P= 0.000</u>
Cerdo/Nanopartícula		
Cerdo/Tiempo de incb.	<u>P= 0.016</u>	
Nanopartícula/Tiempo de incub.		
Cerdo/Nanopartícula/Tiempo de incub.		

Se enlistan los tres factores involucrados (cerdo: A, B y C; nanopartícula: NPs-Q, NPs-QT, Control positivo con trehalosa, control positivo con quitosán y control negativo; a una concentración de 40µl /ml; tiempo de incubación: tiempo 0, tiempo 10min, 20min y 30min); así como las diferentes combinaciones entre sus interacciones. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas (p<0.05) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos. Las probabilidades subrayadas, son de interés para el análisis de los resultados dado que la interacción involucra a la mayoría de los factores en estudio.

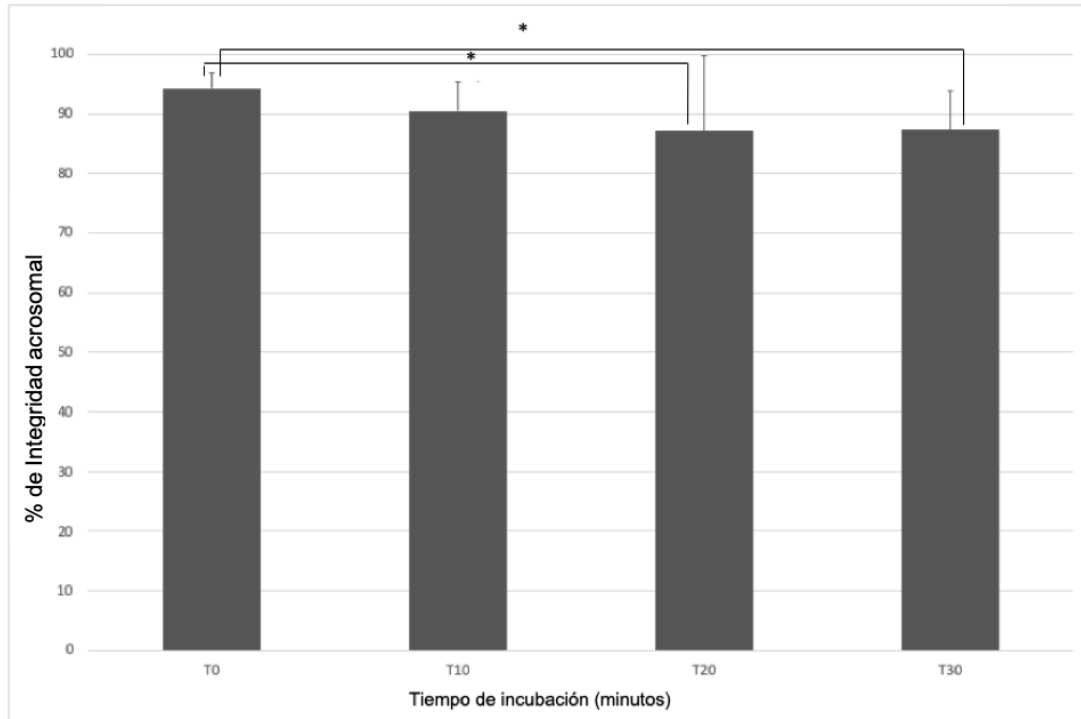
En el **cuadro 10** se observa que la viabilidad está determinada por la interacción entre el tipo de animal y el tiempo de incubación, ello se puede visualizar en la **gráfica 8**, donde es evidente que a partir de los 20 minutos de incubación existió una disminución de la viabilidad en el animal identificado con la letra “A”. El mismo patrón se puede observar en las **gráficas 9, 10**.



Gráfica 8: Porcentaje de viabilidad espermática a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T10 (10min. de incubación con NPs), T20 (20min. de incubación) y T30 (30min. de incubación); y al cerdo: A, B y C. Se utilizó una concentración de $40\mu\text{l}/\text{ml}$ en un medio BTS. Los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tiempo, y las letras diferentes para cada uno de los tiempos indican las diferencias significativas entre cerdos asociado únicamente a cada uno de los tiempos.

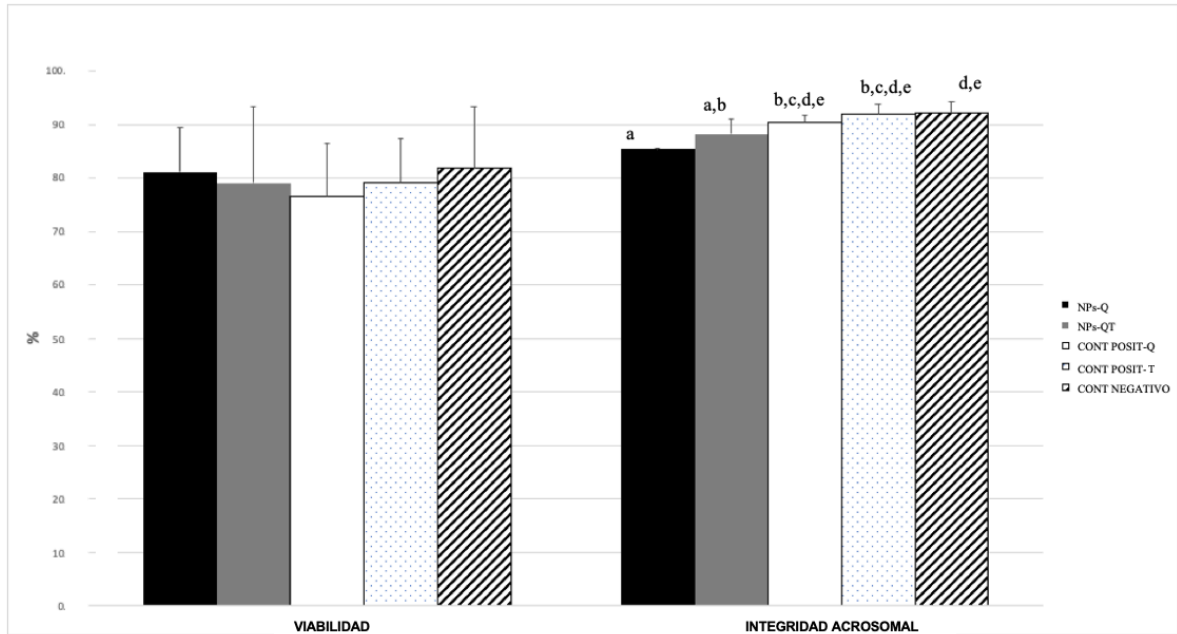


Gráfica 9: Porcentaje de viabilidad espermática e integridad acrosomal para cada uno de los cerdos (A, B y C), durante media hora de incubación en un medio BTS. Las letras diferentes indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto en viabilidad como en integridad acrosomal de forma independiente.



Gráfica 10: Porcentaje de la integridad acrosomal de espermatozoides de cerdo a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T10 (10min. de incubación con NPs), T20 (20min. de incubación) y T30 (30min. de incubación) en un medio BTS. Los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tiempo

En la **gráfica 11** se muestra como las nanopartículas de quitosán disminuyen la integridad acrosomal siendo significativo al compararlo con los controles positivos y negativos.



Gráfica 11: Porcentaje de viabilidad e integridad acrosomal de acuerdo con el tipo de nanopartículas NPs: NPs de quitosán (NPs-Q); NPs de quitosán cargada con trehalosa (NPs-QT); Control positivo con trehalosa (CONT POSIT-T); Control positivo con quitosán (CONT POSIT-Q) y control negativo (CONT NEGATIVO) a una concentración de $40\mu\text{l} / \text{ml}$ en medio BTS. Las letras iguales significa que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

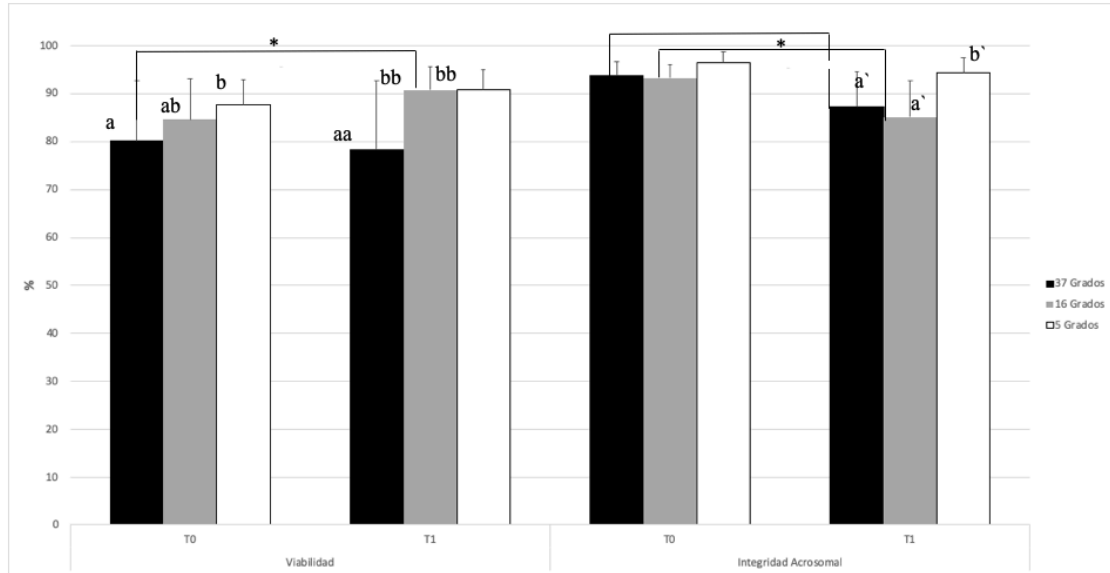
8.3.- Segunda etapa: Pruebas de toxicidad durante la refrigeración

Para las pruebas de toxicidad se consideró una concentración de $40 \mu\text{l/ml}$ durante una hora de incubación, para ello en el **cuadro 11** se muestra el resumen del análisis de varianza. Se encontró que existe un efecto de la variable refrigeración y el tiempo de incubación de una hora.

Cuadro 11. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y de Quitosán cargadas con Trehalosa (NPs-QT) durante la incubación <i>in vitro</i> a 37°C, 16°C y 5°C en un medio con BTS (Beltsville thawing) durante una hora.		
Factores y sus combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)	
	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Nanopartícula		
Refrigeración	P= 0.001	P= 0.000
Tiempo de incubación		P= 0.000
Nanopartícula/Refrigeración		
Refrigeración/Tiempo de incb.	P= 0.000	<u>P= 0.021</u>
Nanopartícula/Tiempo de incub.		<u>P= 0.034</u>
Nanopartícula/Refrigeración/Tiempo de incub.	<u>P= 0.000</u>	

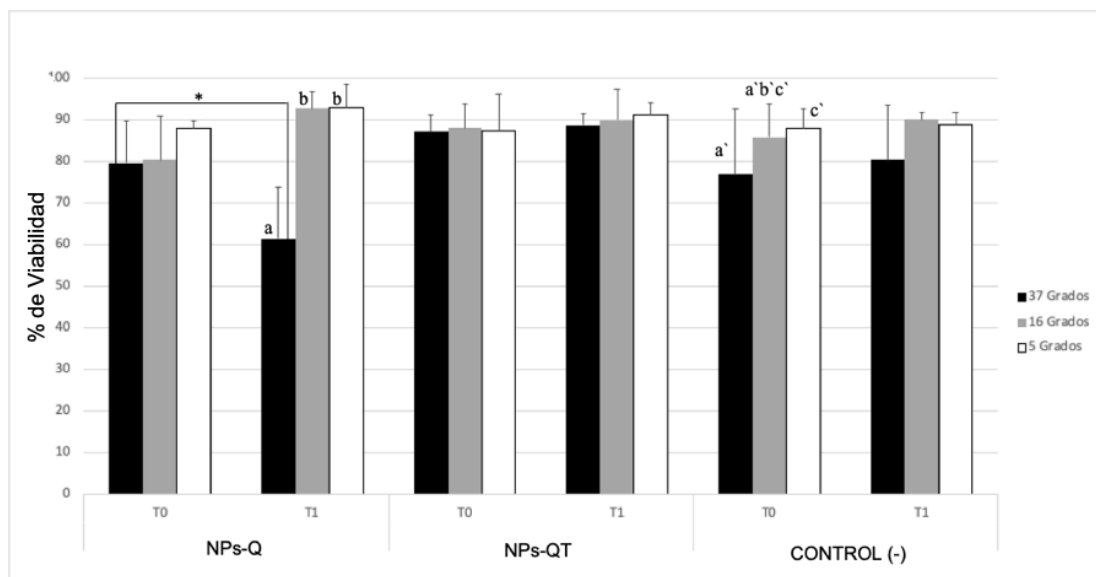
Se enlistan los tres factores involucrados (nanopartícula: NPs-Q y NPs-QT a una concentración de $40 \mu\text{l/ml}$; refrigeración: 37°C, 16°C y 5°C; y tiempo de incubación: tiempo 0 y tiempo 1h); así como las diferentes combinaciones entre sus interacciones. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas ($p < 0.05$) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos. Las probabilidades subrayadas, son de interés para el análisis de los resultados dado que la interacción involucra a la mayoría de los factores en estudio.

En la **gráfica 12** se observa que existe un detrimento de la integridad acrosomal a la hora de incubación de las muestras asociado a la temperatura de incubación (37°C y 16°C). En la viabilidad se observa el decremento únicamente a la temperatura de 37°C.

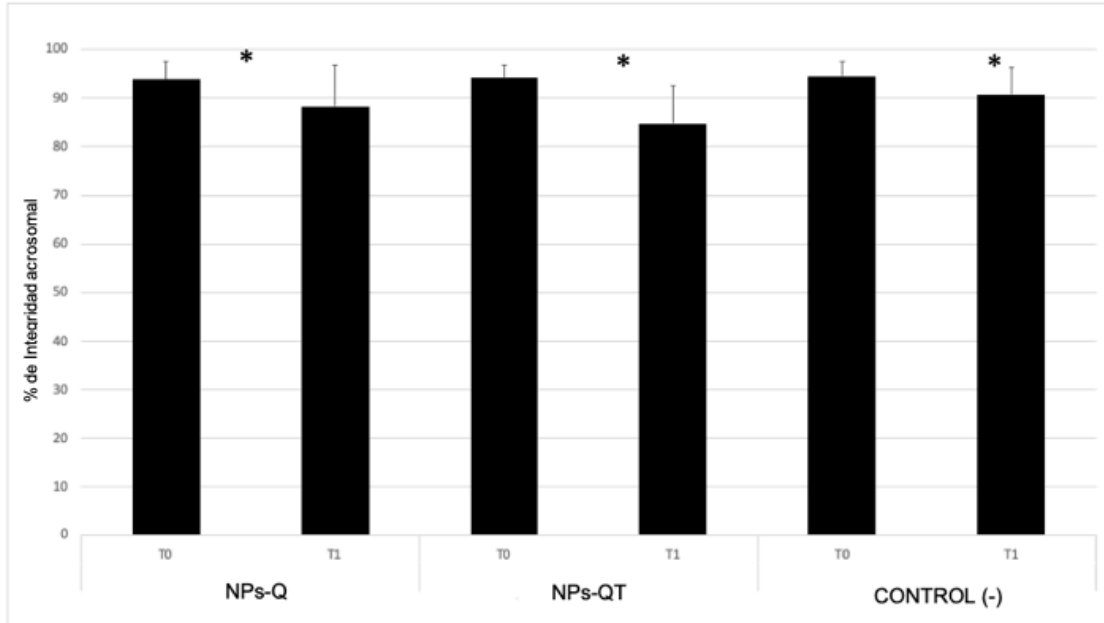


Gráfica 12: Porcentaje de viabilidad e integridad acrosomal a los diferentes tiempos T0 (sin nanopartículas NPs) y T1 (una hora de incubación con NPs) y temperatura de incubación (37°C, 16°C y 5°C) en un medio BTS. Los asteriscos asociados a líneas muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) intra grupos, y las letras diferentes muestran las diferencias entre los grupos para cada uno de los tiempos.

De acuerdo al tipo de nanopartícula, se encontró que en especial a las de quitosán, generaron menor viabilidad a la temperatura de 37°C. En el caso de la integridad acrosomal también se observa un decremento sin importar el tipo de NPs (ver gráfica 13 y 14).



Gráfica 13: Porcentaje de viabilidad en relación a cada tipo de nanopartícula NP: NPs de quitosán (NPs-Q) y NPs de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) y sin NPs (CONTROL (-)); tiempo de incubación T0 (sin nanopartículas NPs) y T1 (una hora de incubación con NPs) y temperatura de incubación (37°C, 16°C y 5°C) en un medio BTS. Los asteriscos asociados a líneas muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) intra grupos, y las letras diferentes muestran las diferencias entre los grupos para cada uno de los tiempos.



Gráfica 14: Porcentaje de integridad acrosomal en relación al tipo de nanopartícula NP: NPs de quitosán (NPs-Q), NPs de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) y sin NPs (CONTROL (-)); tiempo de incubación T0 (sin nanopartículas NPs) y T1 (una hora de incubación con NPs) en un medio BTS. Los asteriscos muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) intra grupos según el tiempo.

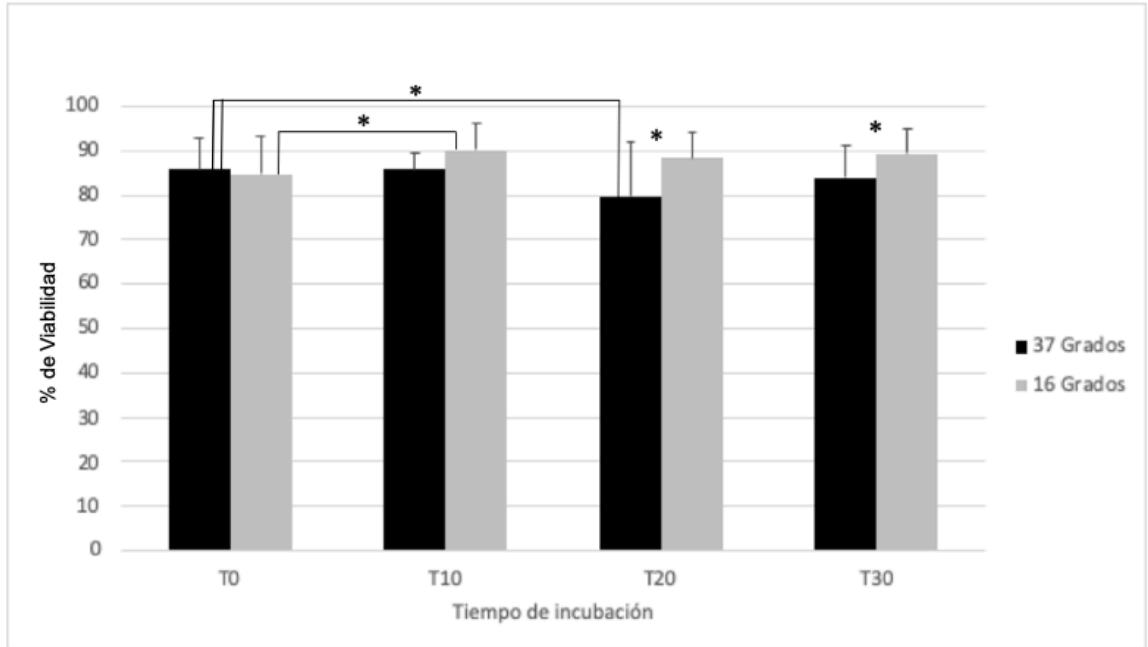
Los resultados obtenidos de la disminución del tiempo de incubación a 30 minutos únicamente en los grupos en donde hubo diferencias significativas asociadas a la temperatura de 37°C y 16°C, se muestran en el **cuadro 12**.

Cuadro 12. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y de Quitosán cargadas con Trehalosa (NPs-QT) durante la incubación <i>in vitro</i> a 37°C y 16°C en un medio con BTS (Beltsville thawing) durante media hora.		
Factores y sus combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)	
	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Cerdo		
Nanopartícula		<u>P= 0.000</u>
Refrigeración	P= 0.001	
Tiempo de incubación		<u>P= 0.000</u>
Cerdo/Nanopartícula		
Cerdo/Refrigeración	<u>P= 0.009</u>	
Nanopartícula/Refrigeración		
Cerdo/Tiempo Inc		
Nanopartícula/Tiempo Inc		
Refrigeración/Tiempo Inc	<u>P= 0.030</u>	
Cerdo/Nano/Refrigeración		
Cerdo/Nano/Tiempo Inc		
Cerdo/Refrigeración/Tiempo Inc		
Nano/Refrigeración/Tiempo		
Cerdo/Nano/Refrigeración/Tiempo Inc		

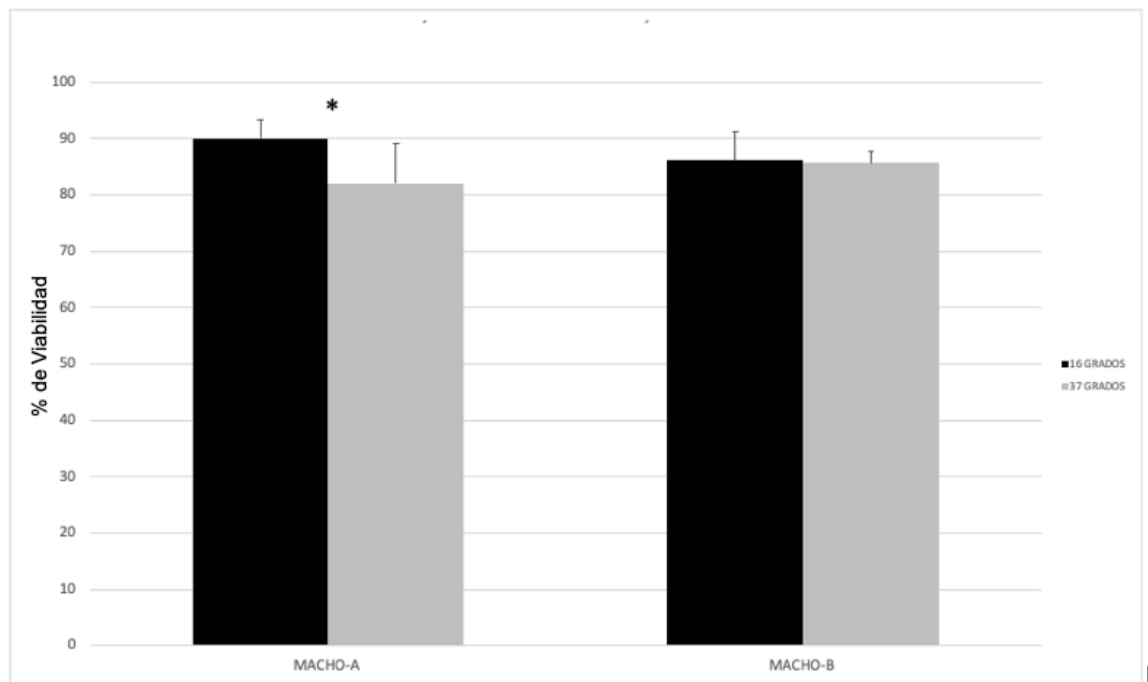
Se enlistan los cuatro factores involucrados (cerdo: A y B; nanopartícula: NPs-Q y NPs-QT a una concentración de 40µl /ml; refrigeración: 37°C y 16°C; y tiempo de incubación: tiempo 0, tiempo 10min, 20min, y 30min); así como las diferentes combinaciones entre sus interacciones. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas (p<0.05) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos. Las probabilidades subrayadas, son de interés para el análisis de los resultados dado que la interacción involucra a la mayoría de los factores en estudio.

Se observó que existe mayor viabilidad a la temperatura de 16°C (88.14% en promedio) en comparación a la de 37°C (83.86%) siendo significativa la diferencia, además para la incubación a 37°C se observa el decremento a partir de los 20 minutos. Por lo que es el tiempo máximo de incubación que fue utilizado para la pre-incubación en el proceso de congelación. También se puede observar que existen diferencias entre machos (**Gráficas 15 y 16**).

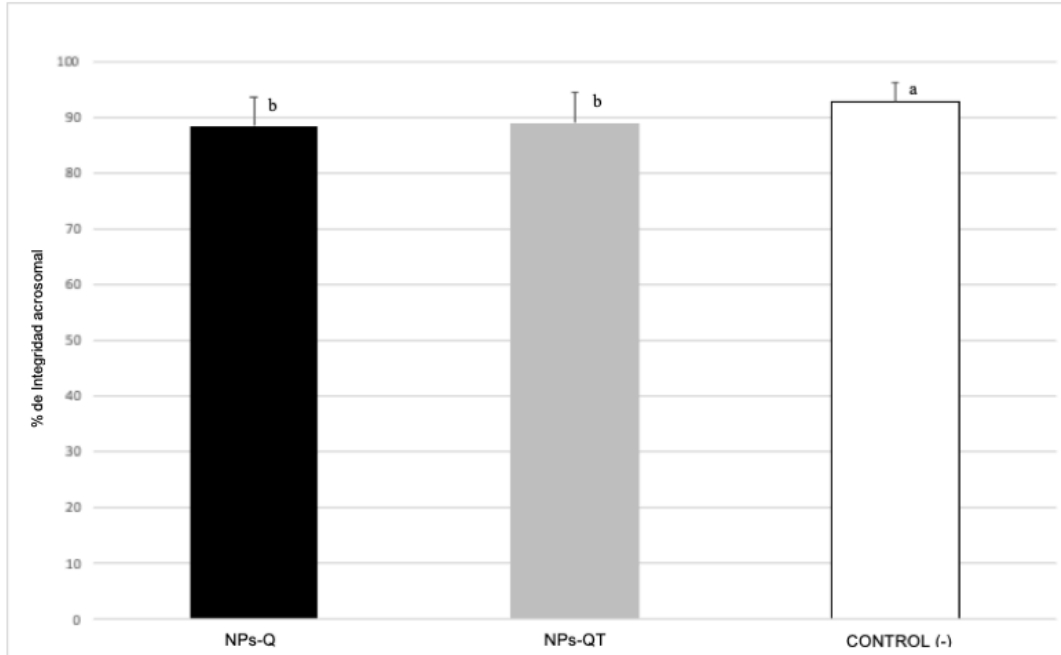
La integridad acrosomal no se ve afectada por el tipo de nanopartícula pero si por el periodo de incubación, la cual disminuyó a partir de los 10 minutos de incubación, sin embargo se mantiene alrededor del 90% y ello no se ve afectado por la temperatura (**Gráficas 17 y 18**).



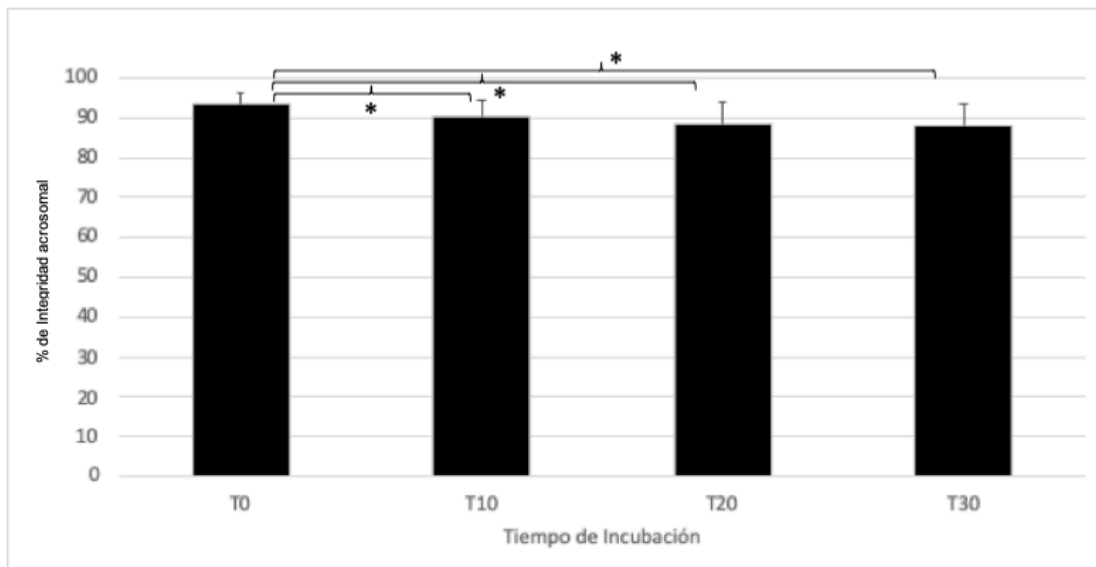
Gráfica 15: Porcentaje de viabilidad espermática durante el tiempo de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T10 (10min. de incubación con NPs), T20 (20min. de incubación) y T30 (30min. de incubación); y temperatura de incubación (37°C y 16°C) en un medio BTS. Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos según su temperatura de incubación y los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias intra grupos a lo largo del tiempo.



Gráfica 16: Porcentaje de viabilidad espermática para cada uno de los animales (A y B) según la temperatura de incubación (37°C y 16°C) en un medio con BTS. Los asteriscos solos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos según su temperatura de incubación.



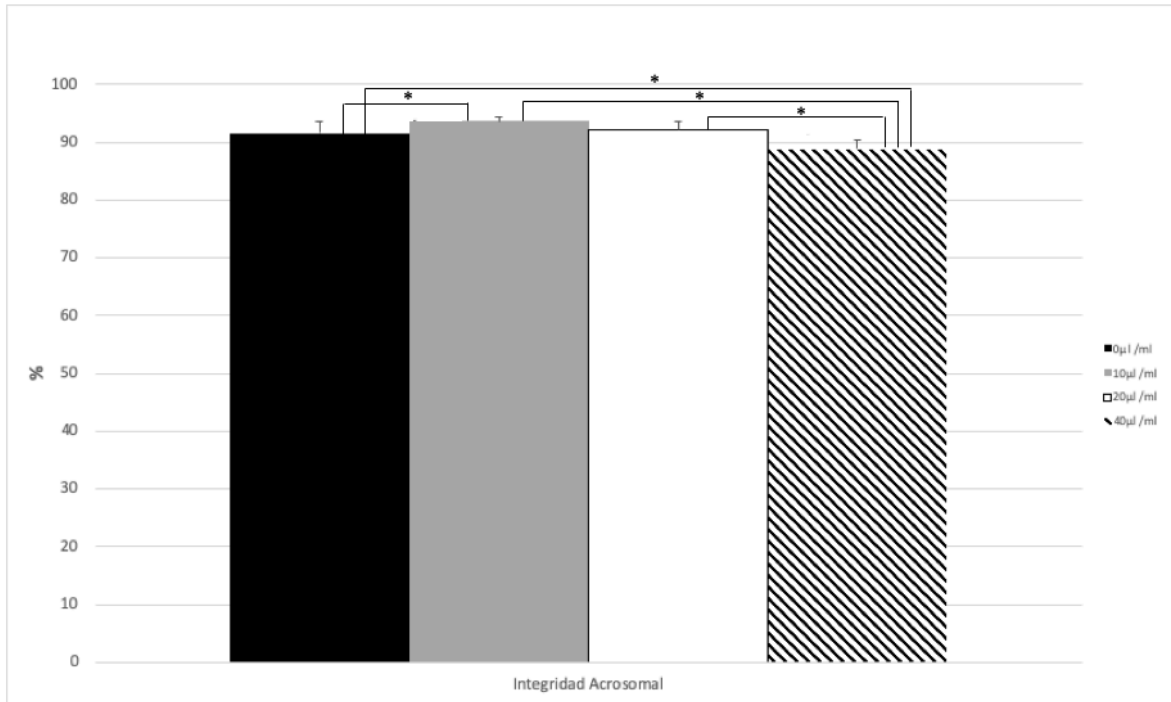
Gráfica 17: Porcentaje de integridad acrosomal en relación al tipo de nanopartícula NP: NPs de quitosán (NPs-Q), NPs de quitosán cargadas con trehalosa (NPs-QT) y sin NPs (CONTROL (-)) en un medio BTS. Las letras diferentes muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.



Gráfica 18: Porcentaje de integridad acrosomal a los diferentes tiempos de incubación T0 (sin nanopartículas NPs), T10 (10min. de incubación con NPs), T20 (20min. de incubación) y T30 (30min. de incubación) en un medio BTS. Los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias intra grupos a lo largo del tiempo.

Dado que la concentración de las NPs es un factor importante que puede afectar la viabilidad y la integridad acrosomal espermática, se realizó un estudio preliminar en donde se incluyeron dos concentraciones menores a $40 \mu\text{l/ml}$ (20 y $10 \mu\text{l/ml}$) (tanto para NPs-Q y de QT). En el análisis de varianza se encontraron diferencias únicamente en la integridad acrosomal asociado a la concentración y tiempo de

incubación. En la **gráfica 19** se observa como las concentraciones de 20 y 10 $\mu\text{l/ml}$ no afectan la integridad acrosomal en contraste con una concentración de 40 $\mu\text{l/ml}$. Sin embargo también mostraron diferencias significativas a partir de los 10 minutos de incubación con un decremento del 2.79%.



Gráfica 19: Porcentaje de integridad acrosomal a una concentración de NPs (0, 10, 20 y 40 $\mu\text{l/ml}$) en un medio BTS durante una hora de incubación. Los asteriscos asociados con líneas indican las diferencias entre grupos según su concentración.

Finalmente para determinar si existía una diferencia entre los diferentes lotes utilizados en los experimentos se compararon tres diferentes lotes tanto para la viabilidad como para la integridad acrosomal ($40 \mu\text{l}/\text{ml}$). En el **cuadro 13** se muestran los resultados de la prueba anova.

Cuadro 13. Resumen del análisis de varianza para medidas repetidas de las Nanopartículas de quitosán (NPs-Q) y de Quitosán cargadas con Trehalosa (NPs-QT) según su lote y tiempo de incubación en un medio con BTS (Beltsville thawing) durante una hora a 37°C.		
Factores y sus combinaciones	Variables respuesta y la probabilidad asociada (P<0.05)	
	Viabilidad	Integridad Acrosomal
Lotes NPs-Q		
Tiempo de incubación NPs-Q	P= 0.030	
Lotes NPs-Q / Tiempo de incubación		
Lotes NPs-QT		
Tiempo de incubación NPs-QT	P= 0.000	
Lotes NPs-QT / Tiempo de incubación		

Se enlistan los dos factores involucrados para cada tipo de NP a una concentración de $40 \mu\text{l}/\text{ml}$ (lotes de nanopartícula de quitosán NPs-Q: 1,2 y 3; y por otro lado para las de quitosán con trehalosa NPs-QT: 4, 5 y 6; y tiempo de incubación: tiempo 0 y tiempo 1h); así como su combinación. En las columnas de la derecha se observa la probabilidad asociada para las variables respuesta (viabilidad e integridad acrosomal) en donde únicamente se colocaron las probabilidad que fueron significativas ($p < 0.05$) y los espacios en blanco los valores no fueron significativos.

En la prueba anova se puede observar que existen diferencias únicamente en el tiempo de incubación como se describió en la etapa de toxicidad, pero lo importante es poder identificar que no existen diferencias para los diferentes lotes, por lo que la técnica de elaboración de las NPs es considerada estable y reproducible.

8.4.- Etapa 3: Congelación con NPs

Una vez identificadas las características para mantener la mejor viabilidad de los espermatozoides al incubarlas con las NPs, ello a través de los resultados obtenidos de las diferentes pruebas de toxicidad efectuadas, se realizó la congelación de las células y los resultados obtenidos se presentan en la **gráfica 20**. Para la congelación se utilizaron NPs sin filtrar a una concentración de $40 \mu\text{l}/\text{ml}$.

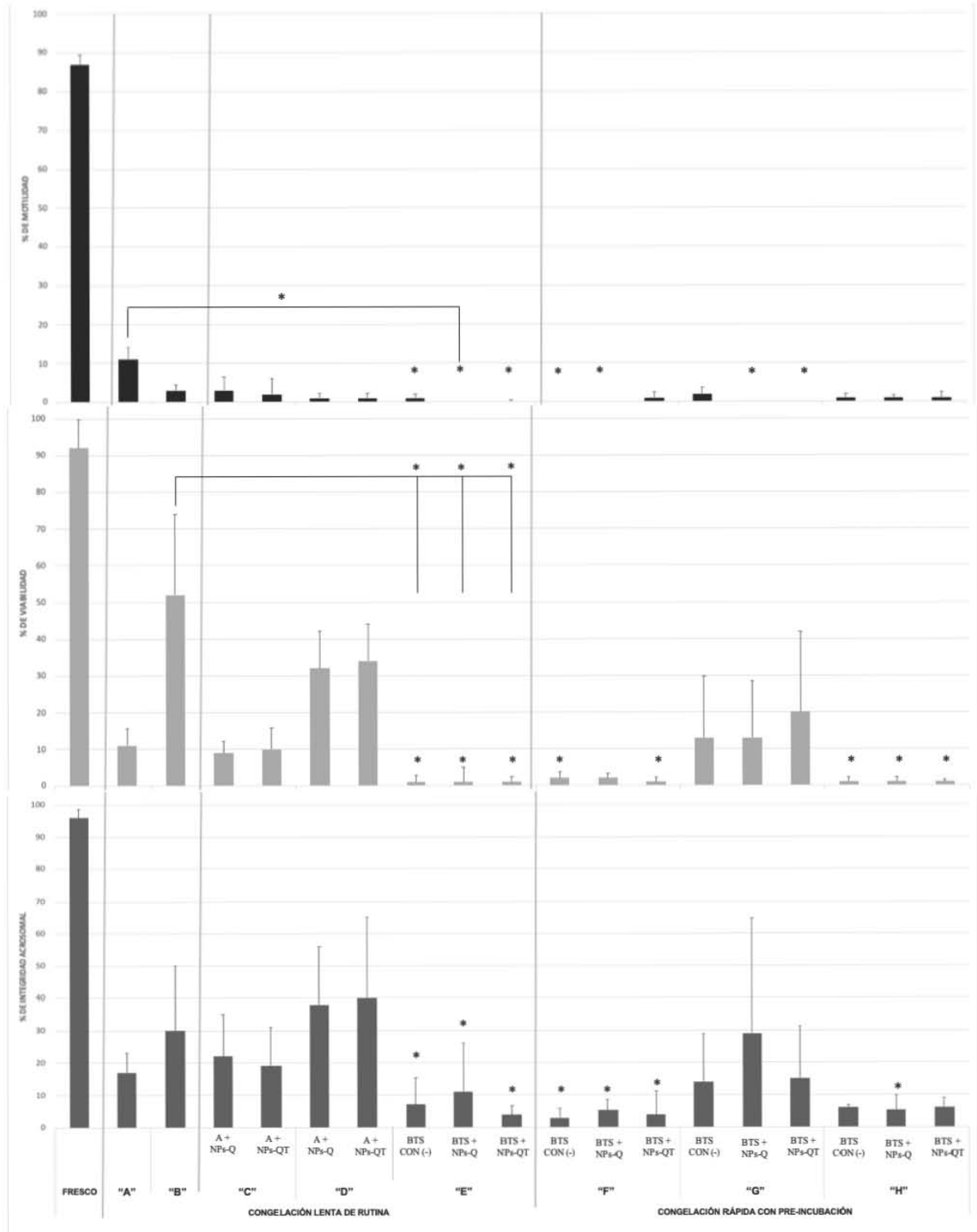


Figura 20: Porcentajes de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal pre y post descongelación para cada uno de los diluyentes de congelación con NPs-Q y NPs-QT. Los asteriscos solos (*) muestran las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los espermatozoides frescos comparándolas con todas las condiciones experimentales después de la descongelación y las líneas con asterisco muestra las diferencias significativas entre cada grupo de descongelación. Los grupos de congelación se identifican de la siguiente forma de izquierda a derecha: Grupos "A" (A+B1), "B" (A+B2), "C" 16°C (A+NPs-Q y QT), "D" 5°C (A+NPs-Q y QT), "E" 5°C (A+NPs-Q y QT), "F" 37°C (A+NPs-Q y QT), "G" 16°C (A+NPs-Q y QT) y "H" 5°C (A+NPs-Q y QT).

La motilidad disminuyó en su totalidad en los siete grupos de evaluación, únicamente el grupo correspondiente a la congelación de rutina (**A+B1**) presentó 11% de espermatozoides con movimiento, representando una disminución del 76% de la motilidad post-descongelación.

El grupo con mayor porcentaje de viabilidad espermática de los grupos descongelados fue el correspondiente al grupo "**B**" (**A+B2**) con un 52%, seguidos del grupo cuya adición de NPPs fue durante la refrigeración a 5°C del grupo "**D**" con un 32% y 34% (**A+NPs-Q** y **A+NPs-QT**). Sin embargo, de forma importante en el grupo "**G**" (**BTS+NPs-QT**) existió un 20% de espermatozoides vivos. En cuanto a la integridad acrosomal (IA) el mejor grupo fue el "**D**" cuyas NPPs se agregaron 10 minutos antes de empajillar en el diluyente a base de yema de huevo con un 38 y 40% para los grupos con **NPs-Q** y **NPs-QT** respectivamente, seguido del protocolo de rutina utilizando trehalosa (30%) y los espermatozoides pre-incubados a 16°C y congelados con **BTS+NPs-Q** con un 29%

9.- DISCUSIÓN

El efecto tóxico de las nanopartículas sobre diferentes tipos celulares, en especial en los gametos ha sido un pilar esencial para poder utilizar esta nueva tecnología en el campo de la reproducción. Ello podría permitir la optimización de las técnicas de congelación, selección y hasta sexado de gametos (Greco *et al.*, 2015; Hill y Li 2017; Falchi *et al.*, 2018; Feugang *et al.*, 2019).

En este estudio, como parte del objetivo se propuso evaluar los efectos de las NPs en la viabilidad espermática, previo al protocolo de congelación. Se observó que existe cierta toxicidad de las NPs-Q sobre los espermatozoides, cuyo efecto depende de la interacción de diferentes factores, como el tipo de técnica utilizada para la elaboración de las NPs, tiempo de incubación, medio de incubación (DPBS o BTS) y la concentración utilizada.

En estudios *in vitro*, el decremento de la motilidad espermática está relacionado con los diferentes medios de incubación y concentraciones utilizadas de quitosán, como lo mencionaron Schimpf *et al.* (2019), quienes encontraron que la mezcla de oligos de quitosán a una dosis de 0.5% (P/V) de forma inmediata disminuye la velocidad del movimiento de las células al emplear como medio de incubación el PBS, lo cual fue atribuido a la osmolaridad baja del medio y la falta de sustratos energéticos. Ellos mismos, al utilizar un medio con características similares al líquido seminal como el TRIS (que incluye citratos, glucosa y piruvato) no encontraron que existiesen diferencias en la motilidad (Schimpf *et al.*, 2019). A este respecto, la regulación y propagación de la señal en la flexión flagelar reside en el control de la actividad de ATPasa de los brazos de dineína en el axonema, lo cual es modulado o alterado por el pH, disponibilidad de ATP, concentración de calcio y fosforilación de proteínas (Freitas *et al.*, 2017). Por ello, el suministro constante de ATP es crucial por la fosforilación oxidativa en mitocondrias y de glucólisis en el flagelo y cabeza del espermatozoide (Freitas *et al.*, 2017); en especial glucosa como fuentes de energía provenientes del medio externo es indispensable para los espermatozoides de cerdo (Rodríguez y Bonet 2016).

Se ha descrito que si bien no existe una disminución significativa de la cantidad de ATP al adicionar oligos de quitosán a las concentraciones de 0.5% y 1%; exposiciones al 5% del semen fresco produce una inhibición del 100% de la síntesis de ATP. Esto posiblemente debido a la penetración de los oligos de quitosán en la mitocondria e interrupción de su función, disminuyendo la producción de ATP al interferir con las proteínas de la cadena de transporte de electrones (Schimpf *et al.*, 2019). Entonces, la privación tanto de glucosa e interrupción de la actividad mitocondrial se convierten en una disminución de la motilidad espermática (Freitas *et al.*, 2017), ello posiblemente facilitado por las nanopartículas de quitosán.

Adicionalmente, se reporta una disminución de la motilidad en espermatozoides de caninos, incubados en PBS, debido a que la Osm de 282 ± 11.3 está por debajo de la Osm del plasma seminal (Schäfer y Aurich, 2007). Esto podría explicar porqué en el presente trabajo tanto la motilidad como la viabilidad espermática presentaron mejores porcentajes en el medio BTS, ya que tienen una Osm de 330 (Gadea, 2003), además de estar adicionado con glucosa como fuente energética. Por ello se propone utilizar medios de incubación con las características similares al líquido seminal, con una osmolaridad de 300mOsm y pH 7.5 que incluyan citratos, glucosa y piruvato (Gadea, 2003).

También se ha reportado que concentraciones del 40-80% (v/v) de nanopartículas con núcleo lipídico recubiertas con quitosán disminuyen la motilidad rectilínea en los espermatozoides de bovino después de una hora de incubación y que ello está relacionado directamente a la concentración utilizada (Castro *et al.*, 2017). Lo que apoya que concentraciones adecuadas para la utilización de nanopartículas y un medio diferente al PBS puede dar resultados más eficientes en la motilidad espermática.

Además en el presente trabajo los resultados mostraron que la concentración de las NPs está asociada al incremento de la mortalidad, lo que apoya lo descrito por Schimpf *et al.* (2019). En nuestro caso con las NPs-Q la mortalidad incrementa con dosis de $100 \mu\text{l/ml}$. Posiblemente, la relación entre la toxicidad y tipo de NPs de quitosán también podría deberse al tamaño de partícula que se utiliza, así como se ha reportado para otro tipo de NPs como las elaboradas con plata, las cuales reducen el recuento espermático al tener un tamaño de 20nm en comparación con un tamaño de 200nm (Gromadzka *et al.*, 2012). Lo anterior coincide, ya que las NPs-Q que se centrifugaron y filtraron fueron las de menor tamaño (10.7nm) y las más tóxicas a concentraciones bajas ($50 \mu\text{l/ml}$).

La toxicidad debido al tamaño de partícula, podría estar asociado a la internalización y el estrés oxidativo generado, como lo describe Das *et al.* (2016) quienes así lo señalan al emplear otro tipo de nanopartículas, en especial las NP inorgánicas. En los espermatozoides de bovino, esta posible internalización además favorecida por las características catiónicas del quitosán, se ha descrito para las NPs lipídicas sólidas con recubrimiento de quitosán (Castro *et al.*, 2017). El recubrimiento otorga una carga positiva a las NPs lo que lleva a tener una afinidad con la membrana plasmática cargada negativamente como resultado de la atracción electrostática. La internalización de partículas pequeñas puede estar mediada por mecanismos de transporte a través de la membrana, como la osmosis, canales iónicos, o endocitosis mediada por caveolina presentes en los microdominios (Gestel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2016). La importancia de los microdominios de membrana asociados a la internalización de micropartículas posiblemente sean los que favorecer éste mecanismo endocítico, y cuya dependencia se asocie a una “fase de activación” o fase fluida (generalmente a 37°C), y en el caso particular de las plaquetas se da a una temperatura de 22°C

(Wolkers *et al.*, 2003). Sin embargo aún falta realizar estudios complementarios al respecto para comprobar si en nuestro trabajo existe adhesión o una probable internalización de NPs.

Con respecto a la integridad acrosomal (IA) se observó que la disminución de células con acrosoma íntegro está relacionada únicamente al tipo de NPs, medio de incubación y tiempo de incubación. En el presente estudio hay que destacar que fue la valoración que menos se vio afectado por la acción de las NPs a lo largo del tiempo, ya que no fue menor del 80%, llegando inclusive a observarse un ligero aumento (3%) estadísticamente significativo, de espermatozoides con acrosoma íntegro para los que se expusieron a las NPs-Q-CEN-FIL, sin embargo en este estudio no se evaluó la probable internalización de las NPs como posible explicación para la estabilización del acrosoma.

De la primera etapa podemos concluir que las concentraciones de 40 y 50 μ l/ml de NPs-Q son las que permitieron mantener la viabilidad. Lo anterior concuerda con la afirmación de que el quitosán no daña la membrana plasmática de los espermatozoides de humano (Schimpf *et al.*, 2019) o la no toxicidad de las nanopartículas de quitosán en cultivos celulares (MARC-145) en donde no modifican la estructura celular (evaluada a través de la integridad de la actina F) y la viabilidad celular después de 24 a 72h de exposición a una concentración de 50 μ l/ml (Jardón *et al.*, 2018). A su vez, el medio de incubación con BTS permitió mantener de forma más eficiente la viabilidad espermática (alrededor del 70%) durante las 3 horas de incubación y la integridad acrosomal por encima del 85%, en contraste con el DPBS, ya que uno de los objetivos del diluyente es preservar las características funcionales de los espermatozoides como lo menciona Cuenca y Avellaneda (2017).

Una de las particularidades de los sistemas nanométricos de transporte, es la entrega dirigida de moléculas (Feugang *et al.*, 2019), por lo que en nuestro estudio una vez que se determinó el mejor protocolo en la elaboración de las NPs-Q utilizando la técnica por gelificación iónica, la cual es fácilmente reproducible y no requiere de equipo especializado, se evaluó el uso de las NPs de quitosán cargadas con trehalosa.

Uno de los propósitos para utilizar a las nanopartículas de quitosán como acarreadoras de la trehalosa se basa en la capacidad crioprotectora que se le ha otorgado a este azúcar a la concentración molar de 250mM (Gutiérrez, 2009) o 100mM extra o intracelular como parte del diluyente de congelación en células espermáticas (Nieves, 2012). Sin embargo los resultados durante la incubación *in vitro* mostraron que las NPs-QT mantiene una pobre viabilidad espermática (14%) durante la incubación *in vitro* a 37°C en un medio con BTS independientemente si se utiliza una concentración de 40 ó 50 μ l/ml, además los resultados son similares a los obtenidos con las NPs-Q, por lo que habría que caracterizar a éste tipo de

nanopartículas (NPs-QT) y dilucidar la cantidad de carga de trehalosa que están transportando.

En relación a los resultados observados en el caso de las NPs-QT generan incertidumbre ya que lo observado en viabilidad e integridad acrosomal, durante la incubación a 37°C, se asemejan a los grupos que denominamos controles positivos. Lo anterior podría estar relacionado a un bajo porcentaje en la generación de NPs como lo observamos en el análisis por DLS, al tener más del 26% con partículas por encima de los 1000nm, ello podría estar asociado a la técnica en sí de elaboración, ya que existen diferentes factores involucrados en la variabilidad del tamaño final, así como lo describe Rampino *et al.* (2013) y Antoniou *et al.* (2015). Por lo tanto es necesario realizar estudios complementarios para caracterizar a las NPs de quitosán acarreadoras de trehalosa, ya que no contamos con antecedentes al respecto.

Toxicidad durante la refrigeración

Para el proceso de congelación descrito por Córdoba y modificado por Gutiérrez (2009) es importante considerar que el tiempo de equilibrio de los espermatozoides en refrigeración requiere un total de cuatro horas, involucrando dos horas a 16°C y dos horas a 5°C, por lo que fue importante describir el efecto tóxico de las NPs según la temperatura de exposición, pues la interacción entre éstas y la membrana, así como los mecanismos endocíticos se modifican dependiendo la temperatura (Wolkers *et al.*, 2003).

En este trabajo se encontró que la temperatura es un factor adicional e importante para el espermatozoide expuesto a las NPs. De manera significativa, la viabilidad disminuyó (18%) al incubarse a 37°C durante una hora, únicamente en las NPs de quitosán, sin embargo se mantuvo constante a 16°C y 5°C. En cuanto a la integridad acrosomal las NPs expuestas a una temperatura de 5°C permitió mantener la estructura en casi el 100% de los espermatozoides. Ello podría asociarse a que la elaboración del diluyente (BTS) realizado por Pursel y Johnson desde la década de 1970, se adaptó específicamente para el mantenimiento de los espermatozoides en refrigeración por un tiempo corto (Dubé, 2004; Gadea, 2003). De manera sobresaliente las NPs-QT mantuvieron estable el porcentaje de viabilidad sin importar la temperatura de incubación, ello podría relacionarse a la estabilidad que otorga la trehalosa a la membrana plasmática y proteínas asociadas, como se ha comprobado en espermatozoides de cerdo (Chen *et al.*, 2001; Tang, Waring y Hong 2007; Gutiérrez, 2009; Nieves, 2012).

La disminución de la viabilidad se observó a partir de los 20 minutos de incubación para los espermatozoides incubados a 37°C, no existiendo diferencias entre el tipo de NPs, pero sí entre individuos. Las diferencias individuales coinciden con lo descrito por Gutiérrez (2009) al mencionar que hay una tolerancia individual

al proceso de congelación, motivo por el cual los animales se pueden clasificar como “buenos o malos congeladores” (Yeste, 2016), sin embargo, aún no se conocen por completo los mecanismos que favorecen una mejor tolerancia a los cambios de temperatura. Se menciona, que existen diferencias individuales asociadas a variaciones en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, lo que hace más resistentes a la membrana plasmática a las variaciones de la temperatura (Waterhouse *et al.*, 2006). También se ha descrito que existen variaciones individuales con respecto a la motilidad, concentración espermática y hasta una membrana intacta con respecto a la estación del año en la cual se recolecta la muestra de semen (Zasiadczyk *et al.*, 2015).

Es de gran relevancia señalar que las diferencias observadas en las pruebas de toxicidad no están relacionadas con el uso de diferentes lotes de NPs, ya que la respuesta en el porcentaje de viabilidad e integridad acrosomal no mostraron diferencias significativas entre lotes, por lo que la técnica utiliza en su elaboración es replicable, esto puede ser posible a pesar de la variación en la obtención de diferentes tamaños de NPs asociada a la técnica por gelificación, que va desde “decenas a cientos de nanómetros” (Nader *et al.*, 2017).

Congelación con NPs-Q y con NPs-QT

El uso de NPs-Q y de QT durante la congelación lenta no mejoró la motilidad, la viabilidad, ni la integridad acrosomal al utilizar un medio de congelación como el BTS, sin embargo se observó que la viabilidad y la integridad acrosomal se pueden mantener cercanas al 30% y 40% respectivamente, siempre y cuando la adición de las NPs se realicen a una temperatura de 5°C y por 10 minutos antes del empajillado de las células para su congelación junto con un diluyente a base de yema de huevo. El no poder prescindir del uso de la yema de huevo. como parte del diluyente de conservación, seguramente está asociado a la protección otorgada a sus componentes, como por ejemplo las lipoproteínas de baja densidad y la lecitina, otorgándole protección al prevenir los daños generados por el enfriamiento en los espermatozoides de cerdo (Álvarez, Vicente y Rodríguez 2017).

Los porcentajes de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal obtenidos después de la congelación lenta agregando a las NPs en el periodo de refrigeración (16°C) en un diluyente a base de yema de huevo fueron menores a los resultados descritos por Juárez *et al.*, (2018), a pesar de utilizar concentraciones que no causan toxicidad. Estas diferencias podrían radicar en el tamaño de partícula utilizada, sin embargo fue una característica no reportada por los investigadores.

La adición de las NPs como único agente crioprotector en una congelación rápida, mostró bajo mantenimiento de la viabilidad e integridad acrosomal y eliminación total de la motilidad. Por lo que el protocolo de congelación de forma lenta, sigue siendo el más eficiente, así como lo ha descrito Gutiérrez, (2009) y Nieves, (2017). El efecto

protector que se esperaba lograr, por una probable internalización de las NPs, no se logró, probablemente por el tiempo de incubación, ya que se ha reportado que para poder generar una endocitosis en fase líquida en células no espermáticas, el tiempo de incubación debe ser por arriba de las 4 horas (Stewart y He, 2019). Por otro lado Castro *et al.*, (2017) reportaron la incorporación del 80% de las nanopartículas lipídicas sólidas con recubierta de quitosán en los espermatozoides de bovino a concentraciones de $400 \mu\text{l}/\text{ml}$ durante una hora de incubación, sin embargo como lo observamos en el presente trabajo (toxicidad), ello sería inviable en los espermatozoides de cerdo.

Por otra parte, en este estudio, el que los resultados no mostraran diferencias significativas relacionadas al uso de NPs cargadas con trehalosa, podría estar asociado a su concentración en el medio, ya que para el presente trabajo se utilizó una proporción de 1:1 con respecto al quitosán, lo cual equivale a una concentración molar de 0.198mM, mientras que en los experimentos en donde se reporta una mejora en la viabilidad celular en el proceso de congelación la concentración extracelular de trehalosa empleada fue de 250mM (Gutiérrez, 2009) y de forma intracelular una concentración de 100mM (Nieves, 2012). En el caso de las nanopartículas cargadas con trehalosa utilizada por Juárez *et al.*, (2018) la concentración empleada fue de 150mM donde emplearon además una técnica diferente para la fabricación de las NPs. Un punto importante a tomar en consideración para poder incrementar la concentración molar de trehalosa usando como vehículo a las NPs-Q es la modificación de la técnica para su elaboración, lo que a su vez incrementa el tamaño de las mismas, pues recientemente se describió que para la crioprotección de células del sistema inmune al usar NPs-QT se requiere que tengan un tamaño cercano a los 200nm (Yao *et al.*, 2020).

10.- CONCLUSIONES

1. El trabajo realizado mostró que el uso de nanopartículas poliméricas de quitosán (NPs-Q) o como acarreador de la trehalosa (NPs-QT) en la incubación *in vitro*, previo a la congelación de los espermatozoides de cerdo, pueden dañar la viabilidad de las células.

2. El efecto citotóxico de las NPs pueden relacionarse al tamaño y concentración de las mismas, el medio de incubación, tiempo de exposición y la temperatura de incubación.

3. Tanto las NPs-Q como las NPs-QT afectan directamente la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides de cerdo.

4. Para mantener la viabilidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides de cerdo con el uso de NPs-Q y con QT la concentración de éstas no debe ser mayor a los $40 \mu\text{l}/\text{ml}$ en un medio de incubación con el BTS, y su tiempo de exposición no debe ser mayor a los 10 minutos independiente de la temperatura utilizada (37°C , 16°C y 5°C).

5. Lo anterior es motivo para rechazar la hipótesis planteada ya que no se logró mantener de forma eficiente la viabilidad espermática después del proceso de congelación-descongelación.

11.- PERSPECTIVAS

1.- Caracterizar a las nanopartículas de quitosán cargadas con trehalosa, con respecto a su tamaño, morfología y capacidad de carga, con la ayuda de técnicas como DLS, microscopía electrónica de barrido y cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

2.- Determinar la interacción que existe entre las NPs y los espermatozoides, ya que se sabe que el quitosán es altamente adherible, además de valorar si existe su internalización en el espermatozoide, daño en la membrana plasmática o interferencia en algún proceso funcional como la capacitación espermática, ello se podría lograr utilizando NPs marcadas con agentes fluorescentes como por ejemplo la Rodamina y medios de cultivo *in vitro* para la capacitación.

3.- Evaluar si las NPs de quitosán tienen un efecto directo sobre la actividad mitocondrial y que ello se refleje en la disminución de la motilidad espermática.

4.- Evaluar si la preincubación a una temperatura de 16°C con NPs junto con un diluyente a base de yema de huevo es viable para la congelación rápida de los espermatozoides.

12.- REFERENCIAS

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. & Walter P. 2016. *Biología molecular de la célula*. Sexta edición. OMEGA. Pp. 946-947.
2. Almeida F.F.L., Leal M.C. & França L.R. 2006. Testis Morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of reproduction*. 75: 792-799.
3. Álvarez R.M., Vicente C.A. & Rodríguez M.H. 2017. Exogenous individual lecithin-phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol) cannot prevent the oxidative stress imposed by cryopreservation of boar sperm. *Journal of veterinary medicine and surgery*. 1(1):1-11.
4. Ann V.I., Sandhya K., Ramya N., Deepak R.U., Sujith R.S., Guruprasad K., Satish K.A., Jyothsna M., Srinivas M. Divya S. & Renu P. 2017. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 494: 656-662.
5. Antoniou J. Liu F. Majeed H., Qi J., Yokoyama W. & Zhong F. 2015. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 465:137-146.
6. Arenas N.M.A. 2008. Efecto de distintas concentraciones de glicerol sobre la integridad de la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo. Tesis de licenciatura. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
7. Arenas R.E., Cambrón R.A., Ambríz G.D., Zúñiga R.P., Rodríguez T.A. & Rosado G.A. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Departamento de biología de la reproducción*. 78: 5-11.
8. Asare N., Instanes C., Sandberg W.J., Refsnes M., Schwarze P., Kruszewski M. & Brunborg G. 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*. 291(1-3):65-72.
9. Ávila P.L., Madero M.D.J.I., López C., León M.F., Acosta L., Gómez C., Delgado L.G., Gómez C., Lozano J.M. & Reguero M.T. 2006. Fundamentos de criopreservación. Artículo de revisión. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57(4):291-300.
10. Baust J.M., Campbell L.H. & Harbell J.W. 2017. Best practices for cryopreserving thawing, recovering, and assessing cells. *In vitro cellular & Development Biology*. 53: 855-871.
11. Barkalina N., Jones C., Kashir J., Coote S., Huang X., Morrison R., Townley H. & Coward K. 2014. Effects of mesoporous silica nanoparticles upon the function of mammalian sperm in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 10:859-870.
12. Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R., Aversa A., Calogero A.E. & Condorelli R.A. 2020. Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. *Journal of clinical medicine*. 9(363): 1-12.

13. Barrientos, M. M., Juárez M. M., Trujillo, O.M. & Montiel, P.F. 2009. Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zootecnia Trop.* 27(1): 17-24.
14. Bonet S.M., Briz M., Pinart E., Sancho S., García G.N. & Badia E. 2000. Morfología espermática del porcino. Instituto de estudios catalanes de la universidad de Barcelona. Pp. 49-59
15. Buffone M.G., Foster J.A. & Gerton G.L. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The international journal of Developmental Biology.* 52: 511-522.
16. Castro J.S.A., Härter R.M., Gomes L.C., Borges D.W., Silveira T., Dame P.J., Jornada D.S., Dahl C.C., Varela J.A.S., Prado W.A., Farias C.V., Kömmling S., Guterres S., Pohlmann A. & Collares T. 2017. Effects of chitosan-Coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells. *Toxicol in vitro.* 40:214-222.
17. Córdova I.A., Hernández P.E., Fernández R.F., Saltijeral O.J., Gutiérrez P.J., Martín R.S., García A.C., Lleo C.B. 2001. Congelación del semen de verraco. 1ª Ed. México: UAM-Xochimilco CBS.
18. Cuenca C.M. & Avellaneda C.J. 2017. Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista electrónica veterinaria.* 18(9):1-11.
19. Chen T., Acker J.P., Eroglu A., Cheley S., Bayley H., Fowler A. & Toner M. 2001. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane Integrity of Dried Mammalian Cells. *Cryobiology.* 43(2): 168-181.
20. Das J, Choi Y-J, Song H., & Kim J-H. 2016. Potencial toxicity of engineered nanoparticles in mammalian germ cells and developing embryos: treatment strategies and anticipated applications of nanoparticles in gene delivery. *Human Reproduction Update.* 22:5.
21. Du Plessis S., Kashou A., Benjamin D., Yadav S., & Agarwal A. 2011. Proteomics: A subcellular look at spermatozoa. *Reproductive biology and endocrinology. Reproductive Biology and Endocrinology.* 9:36.
22. Dubé C., Beaulieu M., Reyes M.C., Guillemette C. & Bailey J.L. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology.* 62:874-886.
23. Elliott G.D., Liu X-H., Cusick J.L. Menze M., Vincent J., Witt T., Hand S. & Mehmet T. 2006. Trehalose uptake through P2X7 purinergic channels provides dehydration protection. *Cryobiology.* 52: 114–127.
24. Expósito H.R. 2010. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.
25. Eroglu A., Toner M. & Toth T.L. 2002. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil. Steril.* 77: 152–158.
26. Falchi L., Khalil W.A., Hassan M. & Marei W.F.A. 2018. Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 6:2, 265-269.
27. Feugang J.M., Rhoads C.E., Mustapha P.A., Tardif S., Parrish J.J., Willard S.T. & Ryan P.L. 2019. Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility. *Theriogenology.* 137:75-81.

28. Foster J.A., & Gerton G.L. 2016. The Acrosomal Matrix. In: Buffone M. (eds). Sperm Acrosome Biogenesis and Function during fertilization. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Vol. 220. Springer, Cham.
29. França L.R., Avelar G.F. & Almeida F.F.L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63: 300-318.
30. Freitas M.J., Vijayaraghavan S. & Fardilha M. 2017. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility Review. *Biology of Reproduction*. 96(1):2-12.
31. Fraser L., Strzezek J., Filipowicz K., Mogielnicka B.M. & Zasiadczyk L. 2016. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. *Theriogenology*. 86(3):806-816.
32. Gadea J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2): 17-27.
33. Gadella B.M., Tsai P.S., Boerke A. & Brewis I.A. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*. 52(5-6): 473-480.
34. García V.F.A., Hernández C.I., Yáñez Q.W., Matás C., Soriano Ú.C. & Izquierdo R.M-J. 2015. Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology*. 84(4): 566-574.
35. García de Castro A. & Tunnacliffe A. 2000. Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells. *FEBS Lett*. 487: 199–202.
36. Gestel R.A., Brewis I.A., Ashton P.R., Helms J.B., Brouwers J.F. & Gadella B.M. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction*. 11(8): 583-590.
37. Gervasi M.G. & Visconti P.E. 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*. (5): 204-218.
38. Gilbert S.F. 2010. *Developmental Biology*. 9a edición. Sinauer Associates, Inc. USA. Pp. 204-231.
39. Gilmore J.A., Du J., Tao J., Peter A.T. & Critser J.K. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Reproduction and Fertility*. 107: 87-95.
40. Gómez G.C. 2014. Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. Artículo de revisión. *Sociedad de farmacología de Chile*. 7(2):7-16.
41. Gómez F.J., Gómez I.E., Tomás C., Mocé E. & De Mercado E. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 133(1-2): 109-116.
42. Gutiérrez P.O. 2009. 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). Ciudad de México (México): Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

43. Greco F., Courbière B., Rose J., Orsière T., Sari-Minodier I., Bottero J.Y., Auffan M. & Perrin J. 2015. Reproductibilité des nanoparticules. Toxicity of nanoparticles on reproduction. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 43:49-55.
44. Gromadzka O.J., Dziendzikowska K., Lankoff A., Dobrzynska M., Instanes C., Brunborg G., Gajowik A., Radzikowska J., Wojewódzka M. & Kruszewski. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology letters*. 214(3):251-258.
45. Hancock J.L. 1955. The morphology of boar spermatozoa. A.R.C. Animal breeding research organization. 8(2): 84-97.
46. Hezavehei M., Sharafi M., Mohseni K.H., Agarwal A. , Esmaeili V. & Shahverdi A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine online*. 37:3.
47. Hill E.K. & Li J. 2017. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 1-13.
48. Horikawa D.D., Iwata K.-I., Kawai K., Koseki S., Okuda T. & Yamamoto K. 2009. High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. *Zoological Science*. 26:238-242.
49. Jardón S. García C.G. Quintanar D., Nieto J.L. Juárez M.M.L. & Mendoza S.E. 2018. Effect of two glycyrrhizic acid nanoparticle carriers on MARC-145 cells actin filaments. *Applied Nanoscience*. 8: 1111-1121.
50. Juárez M.M.L., Díaz T.R., Córdova I.A., Lara J.E.R., Gutiérrez P.O. & Cornejo C.M.Á. 2018. Evaluación del uso de nanopartículas para mantener la viabilidad de los espermatozoides de verraco sometidos al proceso de criopreservación. *Compendio de Ciencias Aplicadas*. Pp.169-179.
51. Kaasen I., McDougall J. & Strøm A.R. 1994. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*. 145: 9–15.
52. Kean T. & Thanou M. 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62: 3-11.
53. Kunzmann A., Andersson A., Thurnherr T., Krug H., Scheynius A. & Fadeel B. 2011. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et biophysica*. 1810(3): 361-373.
54. Larson L.J. & Miller D.J. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm for several species, *Molecular Reproduction and Development*. 52(4): 445-449.
55. Lee H.-J., Yoon Y.-S. & Lee S.-J. 2018. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death & Disease*. 9(7): 7-12.
56. Lee J., Twomey M., Machado C., Gomez G., Doshi M., Gesquiere A.J. & Moon J.H. 2013. Caveolae-mediated endocytosis of conjugated polymer nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*. 13(7):913-920.

57. Liu Q., Xu C., Ji G., Liu H., Mo Y., Tollner D.J., Gu A. & Zhang Q. 2016. Sublethal effects of zinc oxide nanoparticles on male reproductive cells. *Toxicol in vitro*. 35: 131-138.
58. Martínez O.C., Juárez M.M.L., Hernández J. & Valencia J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*. 66: 1969-1975.
59. Motta J.P.R., Paraguassú-Braga F.H., Bouzas L.F. & Porto L.C. 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. 68: 343–348.
60. Nader S., Yuhang C. & Yakov L. 2017. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 157: 110-117.
61. Nagavarma B.V.N., Hemant K.S.Y., Ayaz A., Vasudha L.S. & Shivakumar H.G. 2012. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles A review. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*. 5(3): 16-23.
62. Nieves O.M.M. 2012. Viabilidad del espermatozoide criopreservado de cerdo en presencia intracelular de trehalosa (Tesis de Maestría en Ciencias). Ciudad de México (México): Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
63. Nieves O.M., Juárez M.M., Jácome S.E., Domínguez M.B., & Barrientos M.M. 2017. Spermatic quality after thawing of pig semen treated with Streptolisin and Trehalosa. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*. 7(1):1-7.
64. Núñez R.R.J. 2013. "Evaluación del efecto de tamaño de nanopartículas de polietilenoacrilato-quitosán sobre la viabilidad celular in vitro, por medio del ensayo de "MTT" y exclusión de azul tripán". Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios Superiores Cuautitlán (Tesis de licenciatura).
65. Oliver A.E., Jamil K., Crowe J.H. & Tablin F. 2004. Loading Human Mesenchymal Stem Cells with Trehalose by Fluid-Phase Endocytosis. *CELL Preserv*. 2(1): 35-49.
66. Olivera M., Ruiz T., Tarazona A. & Giraldo C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 19(4): 426-436.
67. Parks J.E. & Lynch D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29: 255-266.
68. Pesch S. & Bergman M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micrón*. 37:597-612.
69. Pezo F., Zambrano F., Uribe P., Risopatrón J., Moya C., Cesar de Andrade F., Burgos R.A., Yeste M., & Sánchez R. 2020. Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: Effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. *Cryobiology*. Artículo en prensa.

70. Ragoonanan V., Hubel A. & Aksan A. 2010. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. *Cryobiology*. 61: 335-344.
71. Rakhi K.J., Pradeep K.J., Koel C., Suresh V.S.R. & Sujoy K.G. 2014. An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology. *Nano Reviews*. 5:1, 22762.
72. Ramírez C.S., Días T.R., Jardón X.S., Juárez L.N.O., Gutiérrez P.O., Córdova I.A. & Juárez M.M.L. 2020. La solución Beltsville thawing (BTS) permite mantener la viabilidad en los espermatozoides de cerdo incubados con nanopartículas poliméricas de quitosán (resultados preliminares). *Compendio de ciencias aplicadas*.
73. Ramírez C.S., Días T.R., Juárez L.N.O. Gutiérrez O.O., Córdova I.A. & Juárez M.M.L. 2020. Efectos de las nanopartículas poliméricas (NPPs) de quitosán (NPPs-Q) y con trehalosa (NPPs-QT) sobre la viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco durante la incubación in vitro a 16°C y 37°C (Resultados preliminares). XL Congreso Mexicano de Histología y VII Congreso Iberoamericano de Histología en línea.
74. Rampino A., Borgogna M.M., Blasi P., Bellich B. & Cesáro A. 2013. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 455: 219-228.
75. Rangasamy M. 2011. Nano technology: A Review. *Journal of applied pharmaceutical science*. 1(2):8-16.
76. Rodríguez G.J. & Bonet S. 2016. Current knowledge on boar sperm metabolism: comparison with other mammalian species. *Theriogenology*. 85: 4-11.
77. Rodríguez H.N., Valderrama N.A., Alarcón C.H. & López M.A. 2010. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 76(4): 336-354.
78. Silva C., Cunha E., Malaquias J., Báó S. & Martins C. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*. 70: 90-94.
79. Sieme H., Oldenhof H. & Wolkers W.F. 2015. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*. 50(3): 20-26.
80. Schäfer S.S. & y Aurich C. 2007. Use of new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for prediction. *Animal Reproduction Science*. 102:1-13.
81. Schimpf U., Nachmann G., Trombotto S., Houska P., Yan H., Bjorndahl L. & Crouzier T. 2019. Assessment of oligo chitosan biocompatibility towards human spermatozoa. *ACS Applied materials & interfaces*. 11,50 46572-46584.
82. Shinde P., Khan N., Melinkeri S., Kale V. & Limaye L. 2019. Freezing of dendritic cells with trehalose as an additive in the conventional freezing

- medium results in improved recovery after cryopreservation. *Transfusion*. 59(2):686-696.
83. Stewart S. & He X. 2019. Intracellular delivery of trehalose for cell banking. *Langmuir*. 35:7414-7422.
 84. Tang M., Waring J.A. & Hong M. 2007. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. *Journal of Magnetic Resonance*. 184(2): 222-227.
 85. Urrejola M.C., Soto L.V., Zumarán C.C., Peñaloza J.P., Álvarez B., Fuentevilla I. & Haidar Z.S. 2018. Sistemas de nanopartículas poliméricas II: Estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de auto-ensamblaje capa por capa (Layer-by-layer Self-Assembly). *International Journal Morphol*. 36(4):1463-1471.
 86. Valadez, T. 2017. Estudio de la capacidad antigenotóxica de las nanopartículas de Quitosán-GSH en linfocitos humanos. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
 87. Vadnais L. M., Galantino H.J.H. & Althouse C.G. 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Archives of andrology: Journal of Reproductive Systems*. 53: 109-123.
 88. Waterhouse K.E., Hofmo P.O., Tverdal A., & Miller R.R. 2006. Within and between bred differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 131: 887-894.
 89. Williams S., Fernández V., Gavazza M., Marmunti M., Zeinsteger P. & Prena G. 2015. Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica. *ANALECTA Vet*. 3(1): 17-25.
 90. Wolkers W.F., Looper S.A., Fontanilla R.A., Tsvetkova N.M., Tablin F. & Crowe J.H. 2003. Temperature dependence of fluid phase endocytosis coincides with membrane properties of pig platelets. *Biochimica et Biophysica*. 612: 154-163.
 91. Wolkers W.F., Walker N.J., Tablin F. & Crowe J.H. 2001. Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying. *Cryobiology*. 42: 79–87.
 92. Yao X., Jovevski J.J. Todd M.F., Xu R., Li Y., Wang J. & Matosevic S. 2020. Nanoparticle-Mediated intracellular protection of natural killer cells avoids cryoinjury and retains potent antitumor functions. *Advanced Science*. 7(1902938):1-11.
 93. Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 85: 47-64.
 94. Yeste M., Rodríguez G.J. & Bonet S. 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. Review article. *Molecular Reproduction and Development*. 84: 1-12.
 95. Zasiadczyk L., Fraser L. Kordan W. & Wasilewska K. 2015. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology*. 83(8): 1287-1303
 96. Zhang W., Gilstrap K., Wu L., Bahadur R.K.C., Moss M.A., Wang Q., Lu X. & He X. 2010. Synthesis and Characterization of Thermally Responsive

- Pluronic F127–Chitosan Nanocapsules for Controlled Release and Intracellular Delivery of Small Molecules. *ACS Nano*. 4: 6747–6759.
97. Zheng Y.X., Ma L.Z., Liu S.J., Zhang C.T., Meng R., Chen Y.Z. & Jiang Z.L. 2018. Protective effects of trehalose on frozen-thawed ovarian granulosa cells of cattle. *Animal Reproduction Sci.* 200:14-21.
98. Zhou X., He H., Liu B. & Hua T. 2008. Loading Trehalose into Red Blood Cells by Improved Hypotonic Method. *Cell Preserv. Technol.* 6: 119–124.