



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMEN PORCINO TRATADO CON ESTREPTOLISINA O (SLO)

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. MICHELLE VALDÉS CANO

DIRECTORES:

DR. BELISARIO DOMÍNGUEZ MANCERA

DRA. PATRICIA CERVANTES ACOSTA

ASESOR:

DR MANUEL BARRIENTOS MORALES

VERACRUZ, VER.

SEPTIEMBRE 2015

**“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMEN PORCINO TRATADO CON
ESTREPTOLISINA O (SLO)”**

Por:

MICHELLE VALDÉS CANO

Tesis propuesta al Colegio de Profesores de Posgrado

De la

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

De la

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA ANIMAL

SEPTIEMBRE 2015

CONTENIDO

DEDICATORIA	IV
RECONOCIMIENTOS	V
ÍNDICE	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE CUADROS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV

DEDICATORIA

A mi padre Gerardo Valdés aunque no te encuentres físicamente siempre te llevo conmigo, eres la razón de cada uno de mis logros.

A mi madre Patricia Cano por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional durante esta y todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos Patsy y Oscar que son mis compañeros y confidentes en las buenas y en las malas, además de ser un ejemplo de vida y superación personal.

A mi abuela María del Carmen

Al Dr. Manuel Barrientos por brindarme su confianza y convertirse en el mejor tutor, colega, consejero y amigo durante la elaboración de este proyecto.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue realizado dentro del proyecto de investigación denominado "Valoración de la integridad y capacidad fecundante de espermatozoides criopreservados de cerdo en presencia intracelular de trehalosa" con clave 169861, aprobado por el Fondo de Investigación Científica Básica 2011 SEP-CONACYT.

Director del proyecto:
Dr. Manuel Barrientos Morales

RECONOCIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

No. De Becario: 490250

Por el apoyo financiero concedido durante el periodo agosto 2012 – julio 2014, en el cual realicé la formación profesional en estudios de posgrado.

RECONOCIMIENTOS

Universidad Veracruzana

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Director: MCA. Francisco Velázquez Sarmiento

Secretario: MVZ. Fabián Vanoye Lara

Maestría en Ciencia Animal

Dra. Violeta Trinidad Pardío Sedas

Lic. Juan José Leano Morales

Cuerpo Académico de la Maestría en Ciencia Animal

Dra. Violeta Trinidad Pardío Sedas

Dra. Patricia Cervantes Acosta

Dra. Lorena López de Buen

Dra. Dora Romero Salas

Dra. Concepción Ahuja Aguirre

Dr. Antonio Beltrán Hernández

Dr. Belisario Domínguez Mancera

Dr. Felipe Montiel Palacios

Dr. David I. Martínez Herrera

Dr. Apolo A. Carrasco García

Dr. Argel Flores Primo

Directores y asesor de tesis

Dra. Patricia Cervantes Acosta

Dr. Belisario Domínguez Mancera

Dr. Manuel Barrientos Morales

Colaboradores

Dr. Antonio Hernández Beltrán

Jurado de tesis

Dr. Antonio Hernández Beltrán

Dr. Apolo A. Carrasco García

Agradecimientos especiales

MVZ. Aida Ángeles Guzmán

QC. Arely Olmos García

LN. Karla Rendón Castro

MVZ. María Luisa Mendoza Sariago

MVZ. Margarita Crivelli Díaz

MVZ. María Eugenia Ruiz Aguilar

MVZ. Amado Manuel Canales Vergara

MVZ. Francisco Riveros Lara

MVZ. Jesús Colorado Galán

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
1 ANTECEDENTES	3
1.1 Espermatogénesis	3
1.1.1 Espermiogénesis	4
1.2 Morfología espermática	5
1.2.1 Membrana celular	7
1.2.2 Membrana espermática	8
1.2.3 Cromatina nuclear	9
1.3 Fisiología Espermática	9
1.3.1 Motilidad, Hiperactivación, Capacitación espermática y Reacción Acrosomal	10
1.3.1.1 Hiperactivación	11
1.3.1.2 Capacitación espermática	11
1.3.1.3 Reacción acrosomal	11
1.4 Características del semen	12
1.5 Evaluación de la viabilidad espermática	12
1.5.1 Evaluación de la motilidad	13
1.5.2 Evaluación de la morfología y fisiología	14
1.5.3 Eosina-Nigrosina	14
1.5.4 Técnica de Clortetraciclina	15
1.5.5 Naranja de Acridina	16
1.6 Preservación de semen porcino	18
1.6.1 Criopreservación de semen porcino	18
1.6.2 Extensores o diluyentes	19
1.6.3 Crioprotectores	21
1.7 Estreptolisina O	21
1.7.1 Características bioquímicas	21
1.7.2 La SLO como agente permeabilizador de membranas	22
1.7.3 Mecanismo de acción	23
1.7.4 Estructura de los poros	26
1.7.5 Sellado de poros	26

2	JUSTIFICACIÓN	27		
3	HIPÓTESIS	28		
4	OBJETIVOS	29		
	4.1	Objetivo general	29	
	4.2	Objetivos específicos	29	
5	MATERIAL Y MÉTODOS	30		
	5.1	Localización	30	
	5.2	Material biológico	30	
	5.3	Obtención del semen	30	
	5.4	Evaluación espermática	31	
		5.4.1	Motilidad en masa	31
		5.4.2	Motilidad individual	31
	5.5	Evaluación del estado funcional	32	
	5.6	Evaluación de la viabilidad espermática	33	
	5.7	Evaluación de la integridad de la cromatina nuclear	33	
	5.8	Permeabilización de la membrana plasmática	34	
	5.9	Recuperación de la integridad de la membrana plasmática	34	
	5.10	Análisis estadístico	34	
6	RESULTADOS	35		
	6.1	Valoración de la viabilidad espermática antes y después del sellado de poros	35	
	6.2	Evaluación de la integridad de la membrana antes y después del sellado de poros	36	
	6.3	Valoración de la integridad de la cromatina nuclear antes y después del sellado de poros	38	
7	DISCUSIÓN	40		
8	CONCLUSIONES	42		
9	PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES	43		
10	LITERATURA CITADA	44		

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema testicular y corte histológico de testis de ratón	4
FIGURA 2. Esquema de la espermatogénesis	5
FIGURA 3. Esquema de espermatozoides de porcino	6
FIGURA 4. Esquema de la composición de la membrana plasmática	8
FIGURA 5. Imagen microscópica de espermatozoides teñidos con EN	15
FIGURA 6. Patrón de fluorescencia por la técnica de Clortetraciclina	16
FIGURA 7. Patrón de fluorescencia por la técnica de Naranja de Acridina	17
FIGURA 8. Fotografía microscópica de eritrocitos de ratón tratados con SLO	23
FIGURA 9. Esquema de anillo incompleto formado en la membrana de un eritrocito tratado con SLO	25
FIGURA 10. Esquema de las estructuras formadas por la SLO	25
FIGURA 11. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre la viabilidad espermática	35
FIGURA 12. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre el estado funcional de los espermatozoides	37
FIGURA 13. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre la integridad de la cromatina nuclear	39

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Clasificación de la motilidad en masa	31
CUADRO 2. Patrones de fluorescencia por la técnica de Clortetraciclina	32
CUADRO 3. Medias y desviaciones estándar del porcentaje de espermatozoides vivos antes y después de la incubación con SFB al 5%	36
CUADRO 4. Medias y DE del porcentaje de espermatozoides sin capacitar y sin reacción acrosomal antes y después de la incubación con SFB al 5%	38
CUADRO 5. Medias y DE del porcentaje de espermatozoides con cromatina nuclear íntegra antes y después de la incubación con SFB al 5%	39

RESUMEN

Valdés Cano, Michelle. Maestría en Ciencia Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Septiembre 2014. **EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMEN PORCINO TRATADO CON ESTREPTOLISINA O (SLO)**. Director: Dr. Belisario Domínguez Mancera, Co-Directora: Patricia Cervantes Acosta, Asesor externo: Manuel Barrientos Morales.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto sobre la viabilidad, el estado funcional e integridad del ADN de espermatozoides de porcino tratados con SLO para la apertura de poros transmembranales. El trabajo se realizó en la Unidad de Diagnóstico "Augusto R. Mancisidor Ahuja" ubicado en la Posta Zootécnica "Torreón del Molino". Se obtuvieron 9 eyaculados de 3 verracos con 2 repeticiones mediante la técnica de mano enguantada con ayuda de un maniquí. El criterio de inclusión de los eyaculados fue motilidad en masa ≥ 3 y motilidad individual $\geq 70\%$. Se utilizó la tinción con Eosina-Nigrosina para evaluar viabilidad espermática y fluorescencia con Naranja de Acridina y Clortetraciclina para evaluar la integridad de la cromatina nuclear y cambios asociados a la capacitación y reacción acrosomal respectivamente. Se realizó la incubación con SLO (SIGMA-ALDRICH) a diferentes concentraciones (0.3, 0.6 y 1.2 UI/ml) durante 5 minutos a 37°C, además de un tratamiento testigo (fresco) y un grupo control los cuales fueron sometidos a las mismas pruebas; para el sellado de poros se utilizó suero fetal bovino (FBS) al 5%. Se realizó una segunda evaluación posterior al sellado de poros. Los datos obtenidos se analizaron por medio de la prueba H de Kruskal Wallis del programa STATISTICA V7.01. Se encontró que la viabilidad espermática fue $>80\%$ en todos los tratamientos y los porcentajes de células sin capacitar y sin reacción acrosomal $>75\%$ en todos los tratamientos; además, no hubo diferencia estadística significativa ($p>0.05$) antes y después del sellado de poros con el uso de SFB. Al realizar el análisis de la integridad de la cromatina nuclear se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) antes y después del sellado de poros para todos los tratamientos; sin embargo, los valores de integridad de cromatina nuclear siempre fueron superiores al 95%. Se puede concluir que en este estudio el uso de la SLO como herramienta para la permeabilización de membranas no afecta la viabilidad espermática, la funcionalidad de la membrana plasmática ni la integridad de la cromatina nuclear de los espermatozoides de porcino.

Palabras clave: Espermatozoides, porcino, estreptolisina O, permeabilización, suero fetal bovino.

ABSTRACT

Valdés Cano, Michelle. Masters in animal science. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. September 2014. **EVALUATION OF THE VIABILITY OF BOAR SPERMATOZOA TREATED WITH STREPTOLYSIN O (SLO)**
Director: Dr. Belisario Domínguez Mancera, Co-Director: Patricia Cervantes Acosta, External advisory: Manuel Barrientos Morales.

The objective of the present study was to determinate the effect on the viability, functional state and DNA integrity of boar spermatozoa treated with streptolysin O (SLO) for the membrane pore opening. The work was done in the Diagnostic Unit "Augusto R. Mancisidor Ahuja". Nine ejaculates from three boars (two repetitions each) were obtained trough the gloved hand technique. The inclusion criterion was: mass motility ≥ 3 and individual motility $\geq 70\%$. Eosin-Nigrosin staining was used to assess sperm viability, the fluorescence tests with Acridine Orange and chlortetraciline were performed to evaluate the chromatin nuclear integrity and to determinate the changes associated to capacitation status and acrosome reaction each. Incubation with Streptolisyn-O (Sigma-Aldrich) was performed at diferent concentrations (0.3, 0.6 and 1.2 IU/ml) for five minutes at 37° C, a witness treatment (fresh) and a control group were subject of the same proves; fetal bovine serum (FBS) at 5% was used to seal the pores and a second evaluation was performed afterwards. The data obtained were analyzed trough Kruscal Wallis H test of the V7.01 STATISTICA program. Sperm vibility was $>80\%$ in all treatments and the percentages of non-capacitated cells $>75\%$ in all treatments; besides there was no significant statistical diference ($p > 0.05$) before and after the pore sealing. When analyzing the integrity of the nuclear chromatin significant diferences ($p < 0.05$) were found in all treatments before and after the pore sealing; however, the values of nuclear chromatine integrity were always above 95%. It can be concluded that in this study the use of SLO as a tool for membrane permeabilization does not affect sperm viability, functionality of plasma membrane or the integrity of nuclear chromatin of boar spermatozoa.

Key words: Spermatozoa, boar, streptolysin O, permeabilization, fetal bovine serum.

INTRODUCCIÓN

En México se requiere el impulso de la biotecnología para la manipulación y mejora de los procesos reproductivos de los animales domésticos en las que se incluyen técnicas como: inducción de la ovulación múltiple, recolección, congelación y transferencias de embriones, fertilización *in vitro*, conservación y sexado de semen. La conservación de semen tiene varios propósitos, entre los que se pueden mencionar la conservación de especies y su contribución a la expansión de técnicas reproductivas como la inseminación artificial (IA) y fertilización *in vitro* (FIV). La IA es esencial en el cruzamiento y selección de individuos, contribuye en el incremento de la producción de las especies domésticas (Barbas y Mascarenhas, 2008). En el caso de la porcicultura se realizan en el mundo alrededor de 25 millones de inseminaciones cada año, de las cuales más del 99% se realizan con semen diluido y conservado entre 15° a 20°C en lapsos de 5 a 7 días, en concentración de $2.5 - 3 \times 10^9$ espermatozoides por dosis de inseminación (Wagner y Thiber, 2002). La fertilidad y prolificidad alcanzada es alta, similar, e incluso mejor que la obtenida con monta natural, con fertilidad al parto del 80-90%, en la mayoría de las granjas. El 1% de las inseminaciones restantes se realizan con semen criopreservado, en dosis de $5.0 - 6.0 \times 10^9$ de espermatozoides. A pesar del elevado número de espermatozoides por dosis, la fertilidad y prolificidad lograda por este método es menor a la obtenida con semen refrigerado, lo que en el mejor de los casos resulta en una tasa media de partos de aproximadamente el 70% (Roca *et al.*, 2006). Esta disminución en la tasa de fertilidad y el elevado número de espermatozoides utilizados por dosis, representan las principales razones del uso limitado de semen criopreservado en los actuales programas de IA en la especie porcina (Eriksson *et al.*, 2002).

A pesar de las desventajas que conlleva el uso de semen criopreservado, en la actualidad es el único procedimiento para almacenar semen de animales con elevado valor genético durante largos periodos de tiempo. Además, el uso de esta técnica ofrece numerosas ventajas con respecto al empleo de semen fresco o refrigerado en los programas de IA, tales como, transportar dosis espermáticas por grandes distancias y crear bancos genéticos que permitan gestionar y abastecer las necesidades de la producción porcina (Gerrits *et al.*, 2005).

En los últimos años los protocolos de criopreservación e inseminación han sido mejorados sustancialmente, lo que ha repercutido de manera positiva en la calidad espermática tras la descongelación; sin embargo, estos prometedores resultados se ven empañados por una elevada población de sementales cuyos espermatozoides muestran una mala respuesta al proceso de congelación, ocasionada por fenómenos como el choque por frío o la criocapacitación (Roca *et al.*, 2006; Medrano *et al.*, 2002). La mayoría de los diluyentes comerciales y crioprotectores que se encuentran disponibles en la actualidad protegen a los espermatozoides de manera externa, sin lograr penetrar la célula y los que logran permeabilizar la membrana plasmática pueden llegar a resultar tóxicos, lo que repercute en daño o muerte celular (Gutiérrez- Pérez *et al.*, 2009).

Una alternativa a esta problemática podría ser el uso de la Estreptolisina O (SLO) como agente permeabilizador de membranas. La SLO es una proteína citolítica capaz de formar poros en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares como células del sistema inmune, eritrocitos, espermatozoides y ovocitos de ratón; además, se ha experimentado de forma exitosa el uso de esta toxina para obtener células permeables sin alteración en la función membranal y viabilidad (Johnson *et al.*, 1999; Walev *et al.*, 2001; Sim *et al.*, 2013).

1 ANTECEDENTES

1.1 ESPERMATOGÉNESIS

La Espermatogénesis es el proceso mediante el cual las células germinales inmaduras pasan por una división, diferenciación y meiosis, lo que da lugar a espermátides haploides. Este proceso se lleva a cabo en los tubos seminíferos de la *testis* en asociación directa con las células somáticas del epitelio seminífero, llamadas células de Sertoli. Cuando una célula germinal se desarrolla por completo se liberan las espermátides al lumen y estas atraviesan la red testicular (*rete-testis* ó *Red de Haller*) hasta llegar al epidídimo mediante los tubos eferentes. Durante el paso al epidídimo a las células espermáticas les ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos que le otorgan su capacidad fecundante (Hess y De Franca, 2008).

Este proceso se lleva a cabo en diversas zonas del aparato reproductor como el parénquima testicular, formado por tubos seminíferos y tejido intersticial (Figura 1), los cuales se encuentran encapsulados en una estructura denominada túnica. El tejido intersticial contiene los vasos sanguíneos y linfáticos, esenciales para el transporte de hormonas y nutrientes. Las células predominantes en el intersticio son las de Leydig, involucradas en la secreción de andrógenos. Dentro del epitelio seminífero se encuentran las células germinales o espermatogonias agrupadas en capas concéntricas, alrededor de ellas se encuentran las células de Sertoli, encargadas de nutrir y mantener a las células germinales durante el proceso de la espermatogénesis. Las células germinales o denominadas también espermatogonias son el estado más inmaduro y se dividen en tres tipos: espermatogonia tipo A que no presentan heterocromatina en el núcleo, espermatogonia intermedia con cantidad intermedia de heterocromatina, y espermatogonia tipo B que sí presentan heterocromatina en el núcleo, cada una es considerada un estado de diferenciación de la anterior (Rooij y Russell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001). Estas células atraviesan una serie de mitosis para producir un gran número de células germinales. Es por esto, que la proliferación de las espermatogonias es esencial para producir millones de espermatozoides por día (Russell *et al.*, 1990).

Después de la mitosis de espermatogonias tipo B, se forman espermaticitos primarios, las cuales replican su ADN dando inicio a la meiosis. Durante la profase (primera división meiotica) las células cambian morfológicamente, mientras que en la fase cigótica ocurre el entrecruzamiento de los cromosomas y se producen células con cromosomas emparejados. En la fase del paquiteno se separan los pares de

cromosomas, lo que da lugar a los espermaticitos secundarios las cuales pasan por una segunda división meiótica para dar lugar a una célula haploide y redonda conocida como espermátide (Hess, 1990).

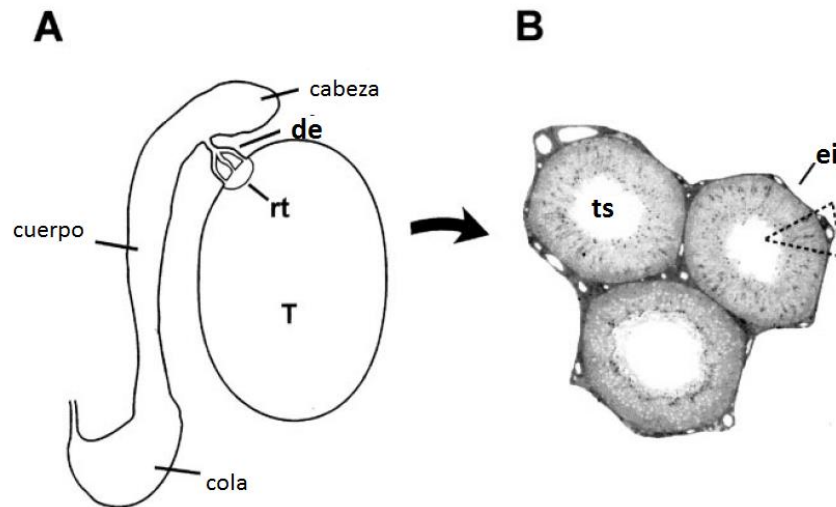


Figura 1. Esquema testicular y corte histológico de testis de ratón: (A) se observa (T) testis, (rt) red de testis, (de) ductos eferentes, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. (B) Se observan los (ts) tubos seminíferos y el (ei) espacio intersticial (O'Donnell *et al.*, 2001).

1.1.1 ESPERMIOGÉNESIS

Se le conoce como espermiogénesis al proceso de diferenciación de las espermátides redondas a una célula elongada, haploide, condensada y madura (Figura 2). Este proceso se lleva a cabo en 4 pasos o fases: Golgi, capa, acrosomal y maduración; durante la fase de Golgi ocurre el desarrollo de dicho organelo, responsable de producir las vesículas y gránulos con las enzimas y componentes del sistema acrosomal. En la fase de capa los gránulos acrosomales entran en contacto con la cobertura nuclear e inicia la formación de la vesícula acrosomal. Durante la fase acrosomal ocurre la condensación de la cromatina nuclear y hay migración de la vesícula acrosomal hacia la superficie ventral de la espermátide elongada. En la última fase, también denominada fase de maduración se observan pocos cambios en

la forma del núcleo y migración acrosomal y el exceso de citoplasma es removido (Hess y De Franca, 2008).

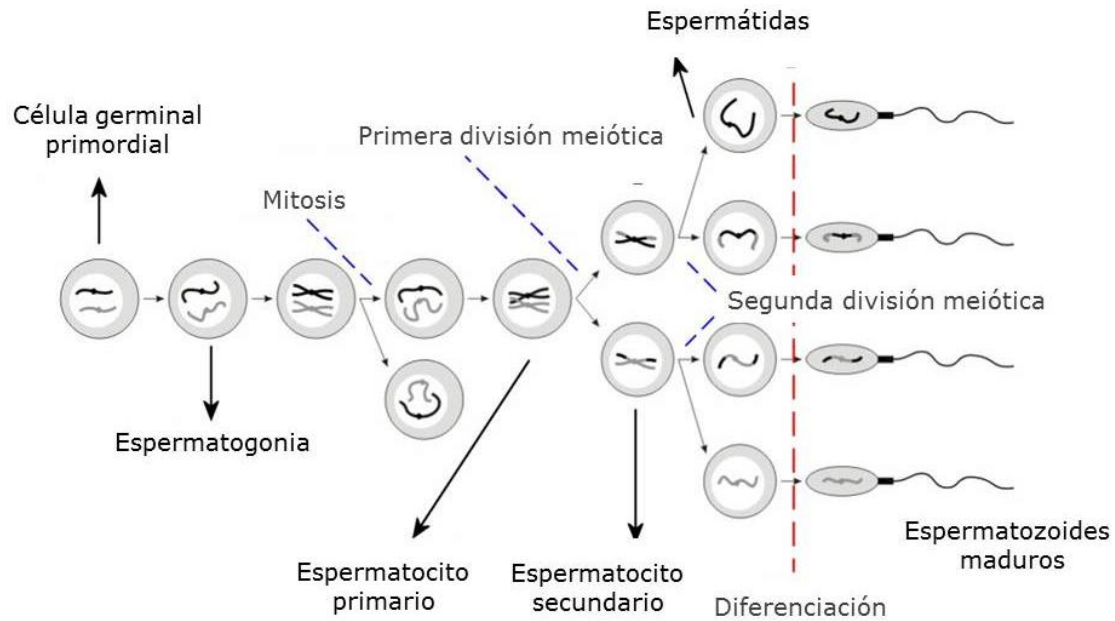


Figura 2. Esquema de la espermatogénesis.

1.2 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

El espermatozoide del cerdo se asemeja mucho al de otros ungulados domésticos. La cabeza es de aproximadamente $8.5\mu\text{m}$ de largo; es el doble de largo que de ancho. La pieza intermedia es de aproximadamente $10\mu\text{m}$ de largo y la cola es de $30\mu\text{m}$. La cabeza está cubierta por una estructura derivada del aparato de Golgi que se encuentra en forma de capa denominada acrosoma constituida por una membrana acrosomal interna y una externa, la primera más corta que la segunda, ambas son una extensión de la membrana plasmática del espermatozoide; además, en el interior de ambas membranas se encuentra el contenido acrosomal, compuesto por enzimas que son liberadas durante la reacción acrosomal (Figura 3). Al segmento donde coinciden estas dos partes se le denomina zona ecuatorial (Hancock, 1956). Los espermatozoides pueden perder el acrosoma cuando mueren, a este fenómeno se le

conoce como reacción acrosomal degenerativa y el análisis de esta reacción sirve para determinar el nivel de daño espermático (Cross y Meizel, 1989).

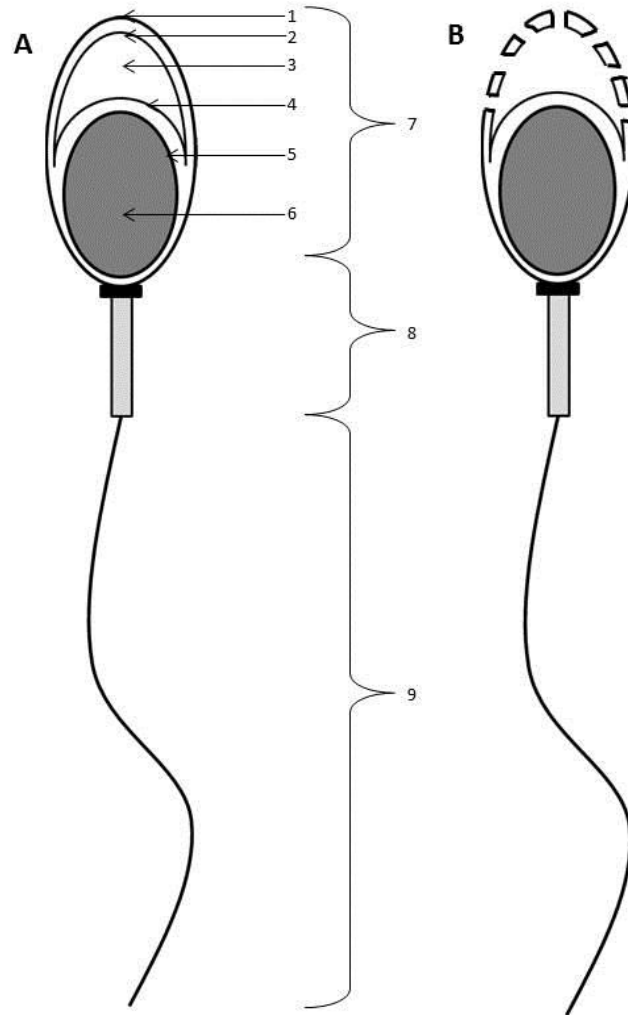


Figura 3. Esquema de espermatozoides de porcino. A) Representación esquemática de un espermatozoide "sin reacción acrosomal" donde se observa la (1) membrana plasmática, (2) membrana acrosomal externa, (3) contenido acrosomal, (4) membrana acrosomal interna, (5) envoltura nuclear, (6) núcleo, (7) cabeza, (8) pieza intermedia y (9) cola del espermatozoide sin reacción acrosomal. **B)** Representación de un espermatozoide de porcino con reacción acrosomal.

1.2.1 MEMBRANA CELULAR

Según Hernández y Ortega (2004) la membrana celular fue descrita por primera vez por Schwann en 1839 en su obra "Teoría Celular", donde la describe como una estructura capaz no solo de separar los contenidos celulares del medio externo, sino que además era capaz de alterar químicamente las sustancias con las que entraba en contacto. En 1888 George Quincke propuso que la membrana plasmática era de naturaleza lipídica y protéica. En estudios posteriores se destacaron los siguientes puntos acerca de la estructura y funciones de la membrana plasmática (Hernández y Ortega, 2004):

- 1) Constituida por proteínas y lípidos.
- 2) Los lípidos son anfifílicos y se organizan de tal manera que forman una bicapa, las regiones polares se orientan hacia el exterior de la membrana y las no polares al interior de ésta.
- 3) La estructura es mantenida por las interacciones hidrófobas, estas interacciones son relevantes tanto en la organización de los lípidos como en la interacción entre lípidos y proteínas (Figura 4).
- 4) Existen interacciones entre proteína y proteína.

Las proteínas involucradas en el transporte de sustancias atraviesan la membrana. El modelo de Mosaico Fluido propone a la membrana celular como una solución bidimensional de lípidos en la que se encuentran sumergidas proteínas globulares, postulando que (Hernández y Ortega, 2004):

- 1) Cada molécula lipídica puede desplazarse en el plano de la monocapa en la que se encuentra, que le proporciona un estado de fluidez a la membrana.
- 2) Las proteínas que se encuentran inmersas en la membrana pueden moverse lateralmente.
- 3) La membrana celular es asimétrica lo que significa que cada una de sus caras es diferente.

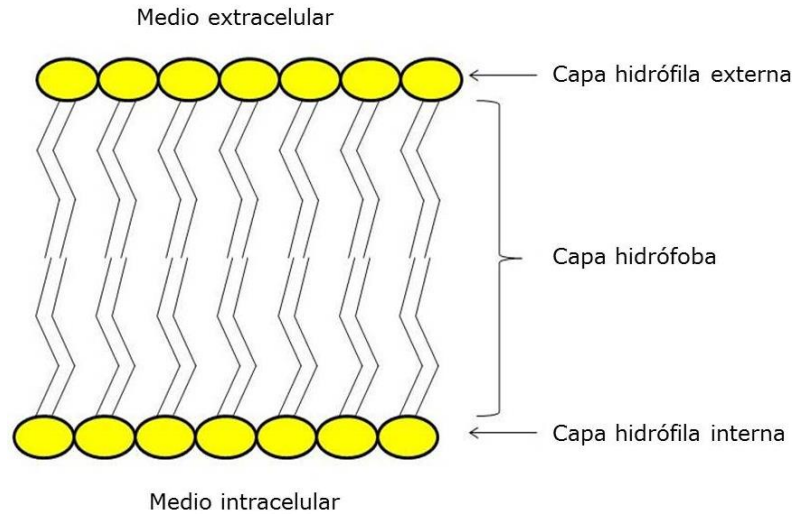


Figura 4. Esquema de la composición de la membrana plasmática. Adaptada de Hernández y Ortega (2004).

Una característica de la membrana plasmática es el transporte de sustancias. En general las moléculas sin carga eléctrica (no iónicas) como el H_2O , N_2 , O_2 , CO_2 , etanol, glicerol y los esteroides se difunden a través de la membrana. Las moléculas con carga eléctrica (iónicas) como H^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , glucosa y todos los aminoácidos no difunden a través de la membrana ya que al presentar carga eléctrica se unen a moléculas de H_2O las cuales deben liberar para poder atravesar la porción hidrófoba de la membrana plasmática (Roseto *et al.*, 2003).

1.2.2 MEMBRANA ESPERMÁTICA

Las células espermáticas y su membrana plasmática ofrecen un modelo de estudio interesante, ya que ellas exhiben una composición lipídica diferente al de las células somáticas, con una polaridad lateral inusual que es objeto de cambios dinámicos posterior al eyaculado, lo cual constituye un papel importante en la fertilización (Yanagimachi, 1994). La función biológica y organización molecular de los glicolípidos de la membrana celular son asuntos de importancia en la biología celular (Trotter y Voelker, 1994).

Los espermatozoides de los mamíferos son células altamente diferenciadas, lo que se refleja en su membrana plasmática. Basados en evidencia morfológica, la distribución de las diferentes clases de proteínas integrales de la membrana varía significativamente entre la cola, la pieza intermedia, la región ecuatorial y el acrosoma. En la membrana plasmática se encuentra el 35% del total de lípidos del espermatozoide (Parks y Hammerstedt, 1985).

Existe evidencia que indica que la composición de la membrana plasmática, en particular la constitución lipídica, está relacionada con la susceptibilidad de las células a la criocapacitación o al choque por frío. Especies que producen espermatozoides con un alto contenido de colesterol y grasas poliinsaturadas en la membrana tienden a ser más susceptibles al choque por frío (Quinn *et al.*, 1980), el colesterol está involucrado en la fluidez y estabilidad de membrana, en los espermatozoides de porcino a diferencia de los de bovino el porcentaje de colesterol en las membranas es menor (0.45 y 0.26% respectivamente) y se distribuye de manera asimétrica ya que se encuentra en mayor proporción en la monocapa externa (Johnson *et al.*, 2000; Flesch y Gadella, 2000).

1.2.3 CROMATINA NUCLEAR

La cromatina espermática es una estructura compacta, condensada y organizada, la cual es considerada un componente clave en la fertilización y término de la gestación (Erenpreiss *et al.*, 2006). Se ha reportado en humanos y otras especies domésticas, entre ellas los cerdos, que los machos infértiles tienen mayores niveles de defectos en la cromatina e integridad del ADN en contraste a los individuos fértiles; además, la calidad del semen se encuentra relacionada con estas deficiencias (Irvine *et al.*, 2000)

1.3 FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA

Los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante el recorrido epididimal, los cuales son atribuidos a la subsecuente interacción con secreciones específicas del epitelio epididimal (Burgos *et al.*, 1992). El tiempo requerido para que los espermatozoides de cerdo atraviesen el epidídimo es de tres días en la cabeza, dos en el cuerpo y de cuatro a nueve en la cola. En el transcurso de estas casi dos semanas a través del epidídimo, el espermatozoide pasa

por un proceso de maduración que toma lugar principalmente en las primeras dos regiones del epidídimo, para ser almacenado en la cola hasta la eyaculación (Hess y Franca, 2008). La duración del pasaje espermático a través del epidídimo varía entre especies y se puede reducir de un 10-20% cuando aumenta la frecuencia con que este eyacula (Setchell, 1991). Como resultado de esto, se pueden encontrar células con diferentes estados de madurez en un eyaculado, lo que contribuye a aumentar o disminuir el potencial de fertilidad (Briz *et al.*, 1995).

Durante su paso a través del epidídimo, los espermatozoides se enfrentan a variaciones en el ambiente iónico, en la cabeza del epidídimo la concentración de iones sodio es superior a 100nM y disminuye hasta <50 mM en la cola; por otra parte, la concentración de iones potasio aumenta de ~20mM a ~40mM en ambas regiones. Dichas variaciones ejercen un efecto de maduración sobre la célula espermática, lo que se ve reflejado en procesos morfo-fisiológicos como: modificaciones en los patrones de movimiento, de la forma del acrosoma y de la membrana plasmática, cambios en los patrones metabólicos, en la estructura de los organelos de la cola y en la cromatina nuclear, pérdida de la gota citoplasmática y disminución progresiva del agua con aumento de la gravedad específica (Briz *et al.*, 1995).

1.3.1 MOTILIDAD, HIPERACTIVACIÓN, CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSOMAL

Los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fertilizar el ovocito, para lograr su capacidad fertilizante tienen que someterse a diversos procesos como la activación de la motilidad, hiperactivación, capacitación espermática y reacción acrosomal, los cuales ocurren de manera normal en el tracto reproductor de la hembra. Los espermatozoides de los mamíferos presentan dos formas de motilidad la activación y la hiperactivación, en la primera el movimiento flagelar es de menor amplitud que en la segunda lo que le da el impulso necesario a la célula de atravesar el tracto reproductivo de la hembra; dicha activación se encuentra regulada por los iones Ca^{2+} y HCO_3^- presentes en el plasma seminal, los cuales al entrar en contacto con la célula espermática activan el proceso de fosforilación de proteínas flagelares (Esposito *et al.*, 2004; Darszon *et al.*, 2006).

1.3.1.1 HIPERACTIVACIÓN

La hiperactivación espermática se lleva a cabo en las regiones superiores del tracto reproductivo de la hembra y muchas veces coincide con un fenómeno conocido como capacitación espermática; sin embargo, ambos procesos son independientes el uno del otro. La hiperactivación consiste en movimientos flagelares de mayor amplitud que ocasionan que el espermatozoide nade en forma de "8", lo que resulta fundamental para que la célula atraviese un segmento del oviducto que presenta mayor viscosidad así como a la penetración a través de las células del cúmulo (Darszon *et al.*, 2006).

1.3.1.2 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación espermática se ha asociado a la reducción del contenido de colesterol que resulta en una disminución en la rigidez de la membrana plasmática y modificaciones en el contenido de lípidos y proteínas de ésta. Existen variables físico-químicas como la concentración de iones, pH y temperatura que ejercen una influencia sobre el metabolismo de la célula espermática lo que eventualmente le permitirá fertilizar al ovulo (Darszon *et al.*, 1999). El bicarbonato activa la adenil ciclasa lo que induce un incremento en los niveles de adenosil monofosfato cíclico (AMPC) en el espermatozoide, que activa la proteína quinasa A (PKA) para la fosforilación de ciertas proteínas como la tirosina, la cual induce cambios conformacionales en las proteínas y fosfolípidos de la membrana plasmática que prepara al espermatozoide para la subsecuente unión con el ovocito (Flesch *et al.*, 1999).

1.3.1.3 REACCIÓN ACROSOMAL

El acrosoma de los espermatozoides de mamíferos se deriva del aparato de Golgi, la cual protege la cabeza del espermatozoide a manera de capa. La reacción acrosomal es una forma modificada de exocitosis celular que involucra la fusión de la membrana acrosomal con la membrana plasmática del espermatozoide (Figura 3), seguida de una vesiculación de membranas para la liberación del contenido acrosomal (Yudin *et al.*, 1988). Esta reacción es esencial para la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (Sabeur *et al.*, 1996).

1.4 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN

El semen de porcino difiere al de otras especies domésticas, la característica más destacada es el gran volumen de eyaculado que llega a ser de entre 200 y 250 ml de semen. El eyaculado se compone de espermatozoides y plasma seminal, el cual se encuentra constituido por una mezcla del contenido de los ductos de la cola del epidídimo y de secreciones producidas por las glándulas sexuales accesorias, las cuales se vacían al lumen uretral de forma fraccionada y concentrada, por lo que el eyaculado se divide en tres fracciones o porciones. En la primera fracción denominada pre-espermática predomina la secreción de las glándulas uretrales, bulbouretrales y próstata. En la segunda porción o "fracción rica" es donde se encuentra la gran mayoría de los espermatozoides y dónde el fluido del epidídimo en el que originalmente son bañados se diluye con fluido derivado de las vesículas seminales y de la próstata. La última fracción también denominada post-espermática en la cual se encuentra una menor proporción de espermatozoides bañados casi en su totalidad por secreciones provenientes de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales (Peña *et al.*, 2006; Rodríguez-Martínez, 2003).

El plasma seminal contiene bajas concentraciones de fructuosa y sorbitol y a la vez un elevado contenido de ácido cítrico, ergotionina e inositol, las cuales son producidas en las vesículas seminales (Albers *et al.*, 1961). El gel seminal o tapioca contiene una alta concentración de ácido sálico, lo que refleja la funcionalidad de las glándulas bulbouretrales, estas contribuyen a la secreción acuosa que es pobre en materia orgánica pero rica en cloruro de sodio (Dziuk y Mann, 1963).

Existen diversos factores que afectan la calidad espermática del semen de porcino, como lo son el fotoperiodo, humedad relativa, temperatura, nutrición, manejo, raza, edad, infecciones virales, parasitarias o bacterianas y en específico la frecuencia con la que se colecta semen, en esta última se ve un decremento en la concentración espermática, así como un efecto en la motilidad y morfología (Bonet *et al.*, 1991).

1.5 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Los métodos para la evaluación de la calidad del semen antes de su distribución para la inseminación artificial o posterior a un tratamiento experimental en el laboratorio están en continuo desarrollo para estimar de manera más aproximada la fertilidad. Los métodos clásicos de evaluación espermática se basan en la medición de

parámetros como concentración espermática, motilidad individual y progresiva, porcentaje de células viables y estado acrosomal (Gadea, 2005).

Estimar la fertilidad mediante el uso de una sola técnica puede resultar poco efectivo; sin embargo, al combinar varias técnicas que evalúen el estado de las diferentes estructuras que conforman al espermatozoide, se logra una mejor estimación (Graham *et al.*, 1980); debido a esto se han desarrollado numerosas técnicas para diferenciar células vivas de muertas en base a la integridad de la membrana o para evaluar viabilidad e integridad acrosomal al mismo tiempo. Todas estas técnicas requieren tiempo para su preparación y evaluación; en consecuencia durante estos procedimientos el número de espermatozoides examinados es bajo (<200) (Graham *et al.*, 1990).

Uno de los principales objetivos de la espermatología es el desarrollo de nuevas técnicas o ensayos que detecten alteraciones espermáticas que sean características de una baja fertilidad (Foote, 1989). Los métodos clásicos de evaluación se enfocan en la estructura de la célula y tienen un bajo nivel de predicción de fertilidad, ya que solo las muestras que tienen una muy baja calidad son detectadas. Para resolver este problema se han creado nuevos procedimientos en combinación con los clásicos para la evaluación de la funcionalidad y la interacción ovocito-espermatozoide (Gadea, 2005).

1.5.1 EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD

La evaluación de la motilidad espermática es un buen indicador de la funcionalidad y es además, uno de los métodos más usado debido a su simpleza, rapidez y bajo costo. A pesar de sus limitaciones, la evaluación de la motilidad resulta un parámetro eficiente debido a que está significativamente relacionado con el número de lechones nacidos por camada, por lo que es incluido en varios modelos como parámetro de calidad espermática. Aunque los resultados encontrados en la literatura con respecto a la relación que guardan la motilidad espermática y la fertilidad son variados y contradictorios debido a diferencias experimentales así como el factor humano, la evaluación de la motilidad sigue siendo al día de hoy una medida útil y ampliamente recomendada para el análisis de la calidad espermática en los sistemas de producción. Una alternativa para resolver la problemática del error ocasionado por el

factor humano es el uso del ASAC o Análisis Sistemático Asistido por Computadora (Gadea, 2005).

1.5.2 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

La integridad de la membrana plasmática es requisito necesario para el correcto funcionamiento del espermatozoide. Se han desarrollado diversos métodos para la evaluación de la membrana, unas mediante el uso de colorantes como Eosina-Nigrosina y otros con el uso de componentes fluorescentes como Naranja de acridina, Clortetraciclina, PSYBR-14, Horchst 33258, etc. (Gadea, 2005). Dichas técnicas de evaluación pueden detectar anomalías morfológicas y fisiológicas que están relacionadas a problemas de infertilidad, obtener información del estado de espermatogénesis, facilitar la selección de verracos en programas de inseminación artificial y permitir a los productores evaluar la intensidad de estrés producida por las altas frecuencias de colección de semen (Bonet y Briz, 1991; Briz *et al.*, 1995).

Otro factor relacionado con baja fertilidad o problemas de fertilización son los altos niveles de alteración acrosomal. Los ensayos enfocados en determinar el estado acrosomal deben ser adecuados con el objetivo de determinar el potencial de fertilidad (Hammit *et al.*, 1989). Un análisis espermático completo debe lograr detectar muestras de baja calidad para de este modo ser descartadas debido a su asociación con una baja fertilidad (Gadea, 2005).

1.5.3 EOSINA-NIGROSINA

La tinción con Eosina-Nigrosina (EN) permite diferenciar entre espermatozoides vivos y muertos, la técnica consiste en dos colorantes, el primero es Eosina que tiñe a los espermatozoides y la nigrosina que tiene la función de fondo negro. Como se observa en la Figura 5, esta mezcla permite diferenciar entre los espermatozoides muertos que se tiñen debido a alteraciones en la membrana plasmática lo que permite el paso del colorante, a diferencia de los vivos que al mantener la integridad de la membrana no logran teñirse debido a que no permiten el paso del colorante al interior de la célula (Brito *et al.*, 2003).

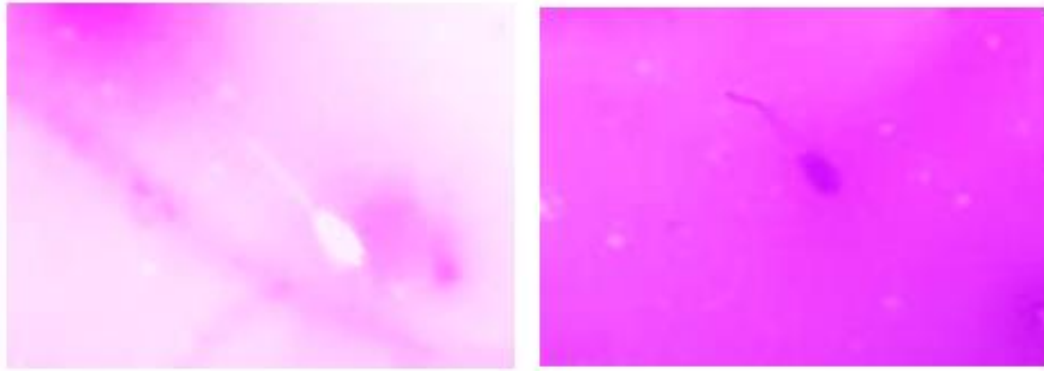


Figura 5. Imagen microscópica de espermatozoides teñidos con EN. En la imagen de la izquierda se muestra un espermatozoides de porcino que no presenta eosinofilia y en la imagen de la derecha uno con eosinofilia, lo cual es un indicador de alteración en la membrana plasmática (Valdés, 2013).

La nigrosina provee un fondo más uniforme que el de otros colorantes como el azul ópalo o azul anilina (Swanson y Bearden, 1951). La técnica fue usada por primera vez en humanos y posteriormente en otros mamíferos como toros, porcinos, ovejas y conejos. Otro beneficio del uso de esta técnica es que muestra ciertas características morfológicas como la presencia de gota citoplasmática y anomalías en el acrosoma (Björndahl *et al.*, 2003).

1.5.4 TÉCNICA DE CLORTETRACICLINA

La técnica de fluorescencia con Clortetraciclina (CTC) fue utilizada por primera vez por Ward y Storey (1984) para la evaluación del estado funcional de espermatozoides de ratón. Los patrones de fluorescencia obtenidos con CTC permiten evaluar los cambios asociados al Ca^{+2} y el estado funcional del espermatozoides. Esta técnica no solo diferencia entre células con o sin reacción acrosomal; además, divide en dos grupos a las células que presentan acrosoma intacto: capacitadas y sin capacitar (Das Gupta *et al.*, 1993).

Los espermatozoides intactos (sin capacitar y sin reacción acrosomal) presentan fluorescencia en toda la cabeza y la pieza intermedia, los capacitados sin reacción acrosomal presentan fluorescencia en acrosoma y pieza intermedia lo que deja una banda en la región ecuatorial que no emite fluorescencia, mientras que los

capacitados con reacción acrosomal no presentan fluorescencia en la cabeza, solo en la pieza intermedia, tal como se muestra en la Figura 6 (Saling y Storey, 1979).

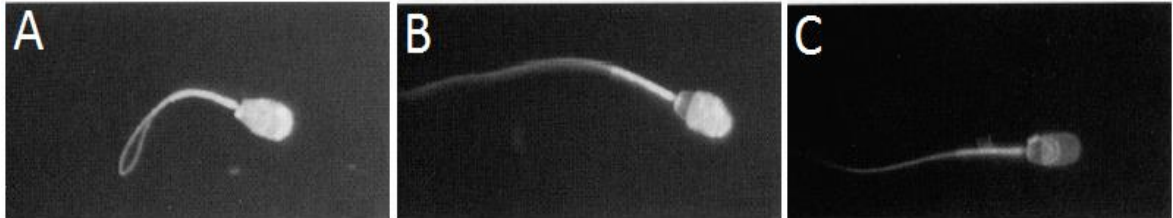


Figura 6. Patrón de fluorescencia obtenido por la técnica de clortetraciclina. (A) Espermatozoide sin capacitar y con acrosoma íntegro, (B) capacitado con acrosoma íntegro y (C) capacitado con reacción acrosomal (Wang *et al.* 1995)

1.5.5 NARANJA DE ACRIDINA

Los análisis de la calidad de semen están enfocados a evaluar motilidad, morfología y concentración; sin embargo, estudios indican que disminuciones en la tasa de fertilidad están relacionadas con anomalías a nivel de la cromatina espermática. Debido a esto se han desarrollado diversas técnicas para medir la integridad de la cromatina nuclear, una de ellas es la Naranja de Acridina (NA) que es un colorante fluorescente citoquímico específico para núcleo celular, en particular de ADN (Kazerooni *et al.*, 2009). Esta técnica se desarrolló en un principio para la evaluación de células somáticas y Evenson *et al.* (1980) usaron la técnica por primera vez en espermatozoides de humano y reportaron diferencias entre las muestras de individuos fértiles e infértiles, notaron un incremento en la proporción de células con fluorescencia roja en pacientes con problemas de fertilidad o con parejas con abortos recurrentes. Estudios posteriores la propusieron como una técnica simple para la evaluación de la cromatina frente a agentes desnaturizadores (Tejada *et al.*, 1984).

El compuesto se une al material genético y puede diferenciar entre ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) y refleja el estado de la cromatina nuclear. La NA fluoresce verde cuando se une como monómero a una doble cadena normal de ADN y fluoresce rojo al unirse como agregado a la cadena sencilla

desnaturalizada de ADN (Figura 7). La cromatina espermática es una estructura compacta, condensada y altamente organizada considerada como factor fundamental para la fertilización. Está demostrado que los individuos infértiles presentan mayores niveles de defectos en la cromatina y ADN (Ichimura *et al.*, 1971).

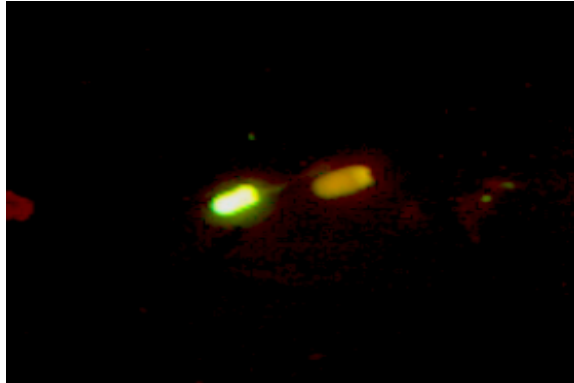


Figura 7. Patrón de fluorescencia con la técnica de Naranja de Acridina. Espermatozoides verdes (cromatina íntegra) y naranjas (cromatina alterada) (Valdés 2013).

Se introdujo como indicador del estado del ADN de células espermáticas (Evenson, 1990), el colorante emite una fluorescencia verde cuando sus monómeros se unen en paralelo a las bases nitrogenadas de la doble cadena de la hélice de ADN. La fluorescencia roja o naranja es un indicador de unión de los polímeros de la NA a una cadena sencilla de ADN (Ward y Coffey, 1991). Esto refleja el proceso de la unión de la protamina con la ranura externa del ADN, lo que reemplaza a las histonas de las células somáticas en los estadios de espermátides durante la espermatogénesis (Green *et al.*, 1994).

La NA se ha utilizado para determinar el estado de madurez nuclear y condensación del ADN espermático, si los espermatozoides no están maduros y contienen cadenas sencillas se logra apreciar un incremento en la proporción de células que presentan fluorescencia roja (Kosower *et al.*, 1992). Niveles altos de fluorescencia roja/naranja en el eyaculado sugieren altos niveles de células inmaduras y por lo tanto menor proporción de células maduras presentes en el eyaculado (Golan *et al.*, 1996).

La principal problemática de esta técnica es la variabilidad en resultados ocasionada por el factor humano debido a que existen niveles de coloración intermedios los cuales están asociados con diferentes grados de desnaturalización; en adición a esto, los resultados no son reproducibles, ya que cambian con el tiempo, lo que dificulta diferenciar entre individuos fértiles e infértiles (Chohan *et al.*, 2006).

1.6 PRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO

En la práctica comercial, dentro de la porcicultura la mayoría las inseminaciones artificiales se realizan con semen fresco o almacenado y diluido a una temperatura de entre 15-20°C. Los diluyentes permiten la preservación de semen por periodos de hasta 5 o 7 días (Laforest y Allard, 1996); sin embargo, no son capaces de prevenir por completo los cambios en los espermatozoides ocasionados por las condiciones del almacenamiento (Cerolini *et al.*, 2000). Estos cambios estructurales y bioquímicos se ven reflejados en una reducción significativa de la capacidad fertilizante. Para compensar este problema se han realizado trabajos con dosis espermáticas más concentradas, aunque los resultados de estos estudios son inconsistentes y contradictorios (Lyczynski y Kolat, 1996).

Investigaciones anteriores reportan cambios en la estructura molecular de la membrana plasmática, lo que es responsable de la disminución en las tasas de fertilidad del semen almacenado. La composición lipídica de la membrana se ve afectada durante los procesos de enfriamiento, lo que compromete la fluidez de membrana (Buhr *et al.*, 1989). Los espermatozoides se caracterizan por contener altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que la peroxidación lipídica puede ser el mecanismo responsable de los cambios bioquímicos y biofísicos que ocurren durante el almacenaje (Cerolini *et al.*, 2000).

1.6.1 CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE PORCINO

La criopreservación de semen de porcino representa un medio efectivo para el almacenamiento de material genético por largos periodos de tiempo. Este método elimina la dificultad que representa el transporte de animales o semen fresco a través de grandes distancias o por largos periodos de tiempo. La criopreservación exitosa de semen de porcino podría mejorar de manera significativa la producción porcina así

como el valor económico que esta representa. Sin embargo, los métodos actuales de preservación son inadecuados. A la fecha, los procedimientos de criopreservación resultan complicados o imprácticos con dosis bajas de inseminación debido a la pobre supervivencia celular, lo que resulta en tasas bajas de fertilidad y prolificidad (Gilmore *et al.*, 1998).

Esta técnica no se realiza de manera comercial, las principales razones son las bajas tasas de supervivencia espermática y como consecuencia, la necesidad de dosis altamente concentradas. Las diferencias en la composición de ácidos grasos y lípidos de la membrana espermática son factor importante de resistencia a los procesos de congelación de gametos (Parks y Lynch, 1992).

La necesidad de almacenar semen de ciertas líneas genética y la necesidad del intercambio internacional de semen congelado ha llevado a muchos intentos de desarrollar métodos para el uso comercial de semen congelado de porcino (Pursel y Johnson 1975, Fiser y Fairfull 1990). A pesar de los numerosos esfuerzos, las tasas de concepción con semen congelado se encuentran por debajo de las de semen fresco o diluido. A temperaturas menores a 10 °C los espermatozoides sufren un proceso denominado choque por frío (Gilmore *et al.*, 1996), que es un fenómeno irreversible en el que la organización molecular de los lípidos de la membrana se ve alterada (Bamba y cran, 1992).

1.6.2 EXTENSORES O DILUYENTES

En la actualidad en 99 % de las inseminaciones artificiales realizadas en la porcicultura son con semen fresco o diluido con extensores que permiten el almacenamiento de semen hasta por 7 días. La principal ventaja del uso de extensores es que la fertilidad se mantiene inclusive con dosis bajas de espermatozoides por dosis de inseminación. Esto representa un mejor rendimiento de semen, pues a menor número de espermatozoides por dosis, mayor es el número de dosis por eyaculado. Debido a esto, el principal reto de la producción porcina es mantener la capacidad fecundante del semen de porcino durante varios días (De Ambrogi *et al.*, 2006), ya que al ser eyaculados, los espermatozoides entran en contacto con fluidos provenientes de las glándulas accesorias y mantienen la motilidad durante unas pocas horas en el plasma seminal; por lo que, para extender su periodo de vida *in vitro* es necesario reducir su actividad metabólica, esto se logra

al disminuir la temperatura del semen o al agregar algún inhibidor químico (Johnson *et al.*, 2000).

Una problemática común del uso de dosis diluidas es que después de 12-24 h de almacenamiento pierden de manera gradual su capacidad fertilizante y de prolificidad (Waberski *et al.*, 1994). En un estudio realizado por Ratto y Jokimen (1991) se demostró que la tasa de concepción y tamaño de la piara disminuían de 85.6 % a 80.4 % y 11.9 a 10.8 lechones respectivamente, conforme aumentaba el periodo de almacenamiento del semen diluido con un extensor comercial en dosis de 2.5×10^9 espermatozoides.

La mayoría de los extensores que se encuentran de manera comercial ayudan a preservar el semen por la presencia de compuestos con ciertas características bioquímicas: la glucosa y otras azúcares proporcionan energía a la célula, la albúmina sérica les brinda protección contra el choque por frío, las sales tamponadas como el bicarbonato de sodio, el ácido hidroxietil piperacínil etanosulfónico (HEPES) y el amino hidroximetil propanodiol (TRIS) tienen la función de estabilizadores de pH, las sales básicas como cloruro de sodio y cloruro de potasio mantienen el balance osmótico y los antibióticos inhiben el crecimiento bacteriano (Kuster y Althouse. 1999).

El semen de porcino es en extremo sensible a las bajas temperaturas, debido a la composición de su membrana plasmática. Esta sensibilidad obliga a moderar las temperaturas de almacenamiento las cuales van de 16 – 20 °C, lo restringe la capacidad del semen de ser almacenado, ya que el metabolismo no disminuye y las condiciones microbianas no son controladas de manera. Asimismo, se presentan cambios morfológicos y fisiológicos en el semen almacenado en medios líquidos, parecidos al proceso de maduración espermática, cuya intensidad está determinada por las condiciones y tiempo de almacenamiento (De Ambrogi *et al.*, 2006). La maduración espermática *in vitro* ocurre durante el almacenamiento, mientras que la maduración *in vivo* ocurre en el tracto reproductor de la hembra después de ser inseminada y todos estos cambios se ven reflejados en varias estructuras celulares como la membrana plasmática, las mitocondrias y el ADN (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

1.6.3 CRIOPROTECTORES

La supervivencia de las células al proceso de criopreservación depende de la interacción entre los crioprotectores y el método de congelado y descongelado (Manzur, 1985). Los crioprotectores no permeables como la glucosa, galactosa, sacarosa, trehalosa, entre otros azúcares favorecen la deshidratación espermática previa al congelado y disminuyen la formación de cristales de hielo. El efecto crioprotector de estos azúcares difiere uno de otro de acuerdo al peso molecular de cada azúcar (Molina *et al.*, 1994). Estos compuestos no penetran a la célula, pero incrementan la efectividad osmótica del medio celular, lo que sirve para proteger la integridad del acrosoma (Woelders *et al.*, 1997).

El glicerol es el crioprotector permeable de uso más común para el semen de porcino, su mecanismo de acción no se logra entender por completo, pero parece regular la deshidratación al reemplazar de manera osmótica el agua intracelular. Esto reduce el volumen celular y minimiza la formación de cristales de hielo; sin embargo, el glicerol es un mal estabilizador de membrana y en altas concentraciones causa fusión de las membranas (Graham Y Hammerstedt, 1992). Su uso está limitado a dosis menores al 4 % debido a su potencial tóxico (Gutiérrez- Pérez *et al.*, 2009).

1.7 ESTREPTOLISINA O (SLO)

1.7.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

La estreptolisina O (SLO) es una toxina producida por *Streptococcus pyogenes*, es una proteína que tiene un peso molecular de 60 kDa que pertenece al grupo A β -hemolítico de las toxinas citolíticas conocidas como oxígeno-lábiles activadas por tiol. Este grupo de toxinas es producido por bacterias gram positivas y poseen características similares como su relación antigénica, requieren de la presencia de un agente reductor como el ditiotreitól para una máxima expresión de su actividad biológica, la cual es inhibida por la presencia de concentraciones bajas de colesterol y otros esteroides (Duncan y Schlegel, 1975; Bhakdi *et al.*, 1985; Portnoy *et al.*, 1992). Este polipéptido se compone de 541 residuos de aminoácidos y posee una región C-terminal, la cual juega un papel importante en la unión a la membrana plasmática (Fawcett *et al.*, 1998).

1.7.2 LA SLO COMO AGENTE PERMEABILIZADOR DE MEMBRANAS

Además de su interés patogénico, la SLO ha sido reportada como una herramienta ideal en la permeabilización de las células. La parte codificadora del gen con actividad de citolisina de la SLO ha sido clonada y de manera particular los requerimientos estructurales para la actividad de la misma han sido estudiados, encontrándose que el reemplazamiento de un simple residuo de cisteína por alanina, no afecta la actividad hemolítica, pero la sustitución por serina resulta en una baja de la función lítica. Además se sabe, que la maduración del extremo N-terminal (de 70 residuos de aminoácidos) es indispensable para la actividad de la SLO (Yamamoto *et al.*, 2001).

Se ha experimentado con la SLO como agente permeabilizador de membranas de diferentes tipos celulares. Fawcett *et al.* (1998) experimentaron con SLO en concentraciones de 0.2 UI/ml para la permeabilización reversible de miocitos de ratón para la introducción de macromoléculas adheridas a marcadores fluorescentes y dichas moléculas se mantenían dentro de la célula viva después del sellado de los poros (Fawcett *et al.*, 1998). Otro trabajo realizado en espermatozoides de ratón probó que estas células se mantenían viables en medios que contenían SLO en concentraciones hasta de 0.6 UI/ml, sin embargo, el periodo de tiempo que permanecían viables es corto en comparación a aquellas células tratadas con concentraciones más bajas de SLO (Johnson *et al.*, 1999).

En otros estudios se menciona el uso de SLO como medio de permeabilización de membranas para la introducción de proteínas a diferentes tipos celulares del sistema inmune; además, al devolver la integridad de membrana de dichas células, estas mostraron tasas de viabilidad similares a las de las células control que no fueron tratadas con SLO (Walev *et al.*, 2001). En un trabajo más reciente, Bo-Woong *et al.* (2013) utilizaron a la SLO en dosis de 5 UI/ml como medio para la introducción de ADN exógeno a espermatozoides de ratón y demostraron que existe un incremento en la tasa de producción de embriones y camadas transgénicas posterior a la inyección intracitoplasmática de dichos espermatozoides.

1.7.3 MECANISMO DE ACCIÓN

La SLO se une como monómero al colesterol presente en las membranas plasmáticas de las células animales (Ohno Iwashita *et al.*, 1991), al difundirse en la membrana reacciona con otros monómeros formando dímeros que actúan como puntos de cristalización para dar lugar a estructuras en forma de anillos transmembranales que

contienen un estimado de 50-80 subunidades (Bhakdi *et al.*, 1985; Sekiya *et al.*, 1993). Estos poros pueden medir más de 30 nm (Figura 8) de diámetro (Palmer *et al.*, 1998; Fawcett *et al.*, 1998) y exceden en tamaño a los formados por otras toxinas como la α -toxina (Füssle *et al.*, 1981) o al complejo de ataque de membrana del complemento (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1984). Estos poros permiten el flujo de iones y moléculas de mayor tamaño a través de la membrana plasmática (Palmer *et al.*, 1995), lo que ha convertido a la SLO en una herramienta popular para la permeabilización de membranas celulares (Bhakdi *et al.*, 1993).

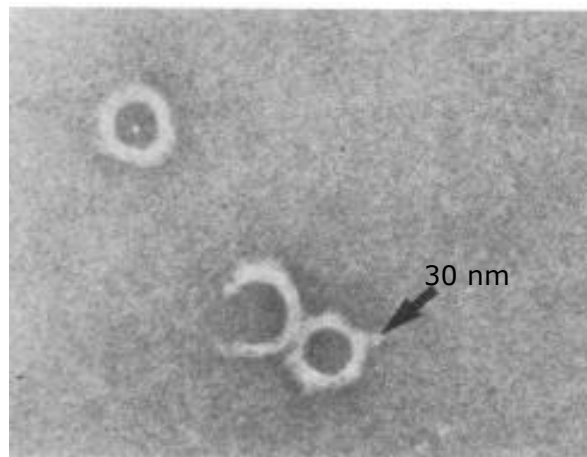


Figura 8. Fotografía microscópica de eritrocitos tratados con SLO. La flecha indica el diámetro de las estructuras en forma de arcos y anillos de la membrana plasmática de eritrocitos de ratón tratados con SLO (Bhakdi *et al.*, 1985).

En teoría estos poros permitirían que la SLO entre a la célula, aunque esto rara vez ocurre debido a que las moléculas de SLO quedan atrapadas en la membrana plasmática donde las concentraciones de colesterol son mayores en comparación al de las membranas de los organelos citoplasmáticos, por lo que es poco probable que ocurra un daño significativo en estas estructuras (Fawcett *et al.*, 1998; Bhakdi *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1995).

La acción de la SLO es en extremo rápida, la permeabilización ocurre en cuestión de minutos, pero además se ha demostrado que, dependiendo de la selección correcta

de la dosis, la permeabilización de las células con SLO es reversible por la adición del colesterol no esterificado, por la adición de suero fetal o por la adición de calcio al medio de incubación (Wannameker, 1983; Walev *et al.*, 2001).

La temperatura a la que las células son incubadas juega un papel importante en el blindaje de la toxina al colesterol de las membranas, la incubación a temperaturas de 0°C no permite la formación de poros y está demostrado que la permeabilización solo ocurre en temperaturas que van de los 30-37°C (Ahnert-Hilger *et al.*, 1988; Fawcett *et al.*, 1998).

1.7.4 ESTRUCTURA DE LOS POROS

Al inicio la SLO forma arcos de pocas subunidades que se insertan en la membrana. Los lípidos de la membrana que se encuentran en la región cóncava del arco se retraen creando un poro en forma de media luna (Figura 9). El arco continúa extendiéndose mediante la adición de monómeros de SLO en los terminales libres dando como resultado el poro completo en forma de anillo (Bhakdi *et al.*, 1985; Palmer *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1998).

Además de estructuras en forma de anillos, es común encontrar en las imágenes de microscopía electrónica de células tratadas con SLO la presencia de otro tipo de organización en el ensamblaje de los monómeros (Figura 10) como arcos o semicírculos, dímeros, trímeros, y forma de "S" (Bhakdi *et al.*, 1985; Palmer *et al.*, 1998; Duncan y Schlegel 1975; Sekiya *et al.*, 1993).

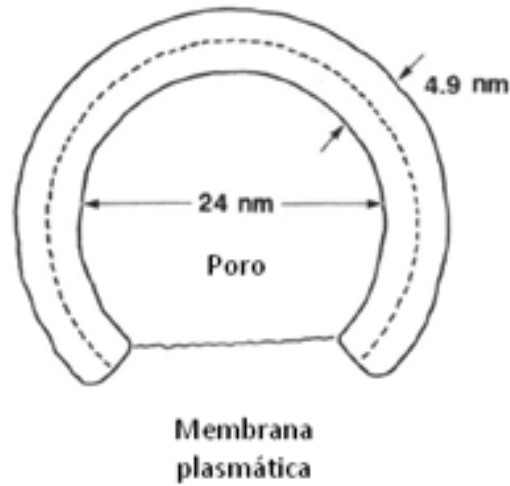


Figura 9. Esquema de anillo incompleto formado sobre la membrana de un eritrocito tratado con SLO (adaptada de Sekiya *et al.*, 1993).

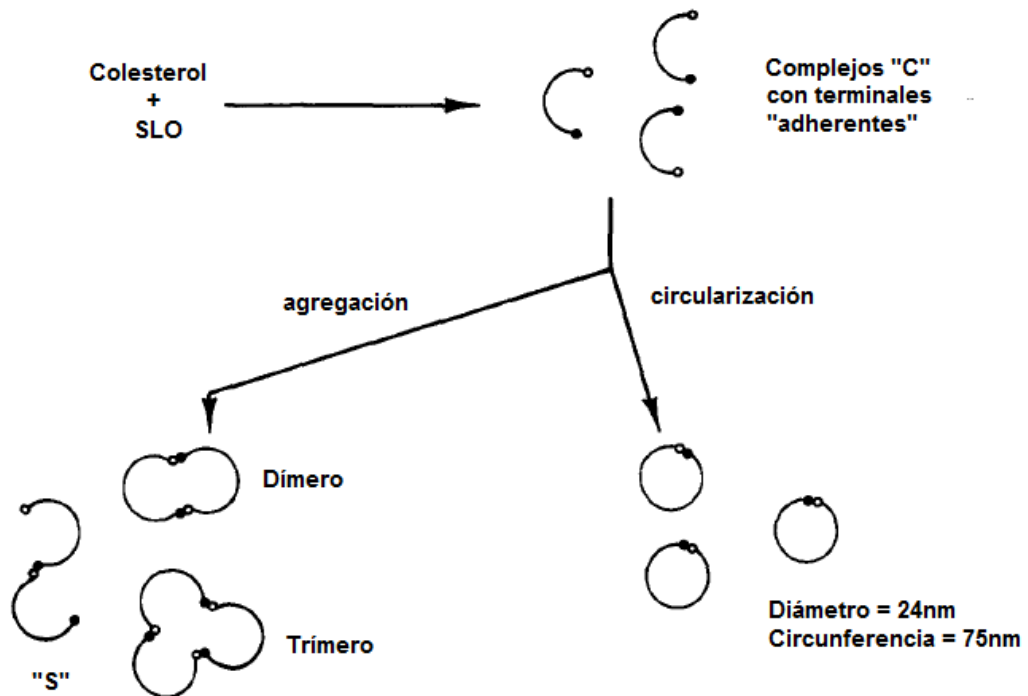


Figura 10. Esquema de las estructuras formadas por la SLO. Formación y agregación de las diferentes estructuras (dímero, trímero y "S") en la membrana de células incubadas con SLO (adaptado de Duncan y Shlegel, 1975).

1.7.5 SELLADO DE POROS

La permeabilización ocasionada por la SLO a las membranas plasmáticas se puede hacer reversible mediante el empleo de suero fetal bovino debido a su alto contenido de calcio (Fawcett *et al.*, 1998), el mecanismo mediante el cual se reparan estas lesiones aún no está claro (Walev *et al.*, 2001). Estudios han reportado que el calcio regula la fusión de las vesículas necesarias para el sellado de los poros mediante la activación de las vías de la kinasa (Bi *et al.*, 1995).

A pesar que existen numerosos estudios donde se describen las características bioquímicas de la SLO y su aplicación como agente permeabilizador de membranas plasmáticas de diversos tipos celulares llegan a ser escasos aquellos en los que se utilice a la célula espermática como modelo experimental.

2 JUSTIFICACIÓN

La sustentabilidad de la producción animal depende del desarrollo e implementación de técnicas que incrementen el potencial productivo de los recursos pecuarios. En particular, dentro de la producción porcina es necesario realizar estudios en metodologías de conservación de gametos y experimentar con biotecnologías innovadoras que sienten las bases de nuevos métodos para la criopreservación de semen, las cuales permitan a los productores y compañías genéticas optimizar los recursos biológicos, para preservar semen por largos periodos de tiempo y con valores de viabilidad aceptables. Es por estas razones y debido a las numerosas ventajas que ofrece el uso de semen congelado con respecto al semen fresco o diluido que se justifica el desarrollo del presente estudio que tiene como objetivo establecer las bases para la creación de nuevas técnicas de criopreservación de semen porcino.

3 HIPÓTESIS

La permeabilización de la membrana del espermatozoide de porcino mediante el uso de estreptolisina O, no altera la funcionalidad de los espermatozoides.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que ejerce la apertura de poros en la membrana plasmática sobre la viabilidad de los espermatozoides de porcino

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Valorar la viabilidad de los espermatozoides permeabilizados con SLO antes y después del sellado de poros con SFB.
- 2) Evaluar la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides permeabilizados con SLO antes y después del sellado de poros con SFB.
- 3) Valorar la integridad de la cromatina nuclear de espermatozoides permeabilizados con SLO antes y después del sellado de poros con SFB.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Área de Reproducción, así como en los laboratorios de Biología de la Reproducción, Parasitología y Biología Celular de la Unidad de Diagnóstico "Augusto R. Mancisidor Ahuja" ubicados en la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, en el km 14.5 de la carretera Veracruz-Jalapa del municipio de Veracruz. Las coordenadas geográficas son: 19° 11' latitud norte y 96° 08' longitud oeste, con altitud de 10 msnm.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron eyaculados de sementales de líneas genéticas comerciales en edad productiva (2-5 años), con fertilidad probada. A cada macho se le asignó una clave (A, B, y C). Los sementales pertenecen a la granja porcícola "San Antonio" de la localidad de la víbora, perteneciente al municipio de Tlalixcoyan del Estado de Veracruz Ignacio de la Llave (18° 48'11.27"N 96°3'39.67" O, a 10 msnm).

Las muestras se procesaron en los laboratorios de Biología de la Reproducción, Radioinmunoanálisis y Parasitología, de la Unidad de Diagnóstico "Augusto R. Mancisidor Ahuja", localizado en la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" de la Universidad Veracruzana, (19° 11' latitud norte, 96° 08' longitud oeste, altitud de 16 msnm).

5.3 OBTENCIÓN DEL SEMEN

Previo a la recolección de los eyaculados se realizó limpieza de la zona del prepucio con agua y toallas absorbentes para evitar contaminación del material biológico. Se obtuvieron 9 eyaculados recolectados por medio de la técnica de la mano enguantada con ayuda de un maniquí. Se colectaron todas las fracciones del eyaculado, se utilizó tela de gasa para filtrar el eyaculado y descartar el gel o tapioca proveniente de las glándulas bulbouretrales así como partículas contaminantes. (Rillo *et al.*, 1996).

5.4 EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

5.4.1 MOTILIDAD EN MASA

Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos a 37°C, se observó a 10X durante un minuto en un microscopio de contraste de fases OLYMPUS CX41. La estimación de la motilidad en masa se realizó en base al vigor de las ondas espermáticas de acuerdo a lo descrito por Salamon *et al.* (1990), con valores entre 0-5 (Cuadro 1). Las muestras que obtuvieron valores por debajo a 3 fueron descartadas.

Cuadro 1: Clasificación de la motilidad en masa.

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas y remolinos de movimientos muy rápidos
4	Buena	Movimientos vigorosos, pero las ondas y los remolinos no son rápidos
3	Regular	Ondas de movimiento lento
2	Pobre	No se aprecian las ondas, pero si movimiento de la muestra
1	Muy pobre	Muy poco movimiento
0	Muertos	Ningún movimiento

Salamon *et al.*, 1990

5.4.2 MOTILIDAD INDIVIDUAL

Se midió el porcentaje de los espermatozoides móviles entre 0 y 100% (Maxwel y Evans, 1990). Para realizar la técnica se colocó una gota de semen diluida en una gota de solución salina fisiológica sobre un portaobjetos a 37°C, se le puso un cubreobjetos y se observó en el microscopio de contraste de fases OLYMPUS CX41 a 100x, se observaron varios campos y se valoró el porcentaje de espermatozoides que presentaban movimiento rectilíneo progresivo; sólo se aceptaron muestras que obtuvieron valores $\geq 70\%$ de motilidad progresiva.

5.5 EVALUACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL

Se determinó el estado de capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide mediante la técnica de Clortetraciclina (CTC). Se colocó 1 ml de semen en tubos tipo eppendorf y se lavó por centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos para retirar el plasma seminal, la muestra se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora de fosfato (PBS). Se tomaron 100 µl del semen centrifugado y se adicionaron 100 µl de la solución de CTC la cual se componía por 750 µM de CTC en una solución amortiguadora (130 µM NaCl, 5 µM cisteína, 20 µM Tris-HCl pH7.8), la muestra se agitó vigorosamente y se adicionaron 8 µl de p-formaldehído al 12% en una solución amortiguadora de 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), se volvió a agitar vigorosamente y sobre un porta objetos limpio se colocaron 10 µl de la muestra y 10 µl de diaminotretileno (DABCO) al 0.22 M en una solución de glicerol: PBS (9:1), se colocó un cubre objetos y se observó en el microscopio de fluorescencia (Leica 020-518.500 DM/LS) con filtro azul de excitación 405-455 nm (Gillan *et al.*, 1997); se revisaron varios campos hasta evaluar 200 células, las cuales presentaron los siguientes patrones de fluorescencia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Patrones de fluorescencia por la técnica de Clortetraciclina

Patrón	Descripción
Patrón A	Espermatozoide sin capacitar y sin reacción acrosomal: Fluorescencia en cabeza y pieza intermedia.
Patrón B	Espermatozoide capacitado y sin reacción acrosomal: Fluorescencia en región acrosomal y pieza intermedia del espermatozoide.
Patrón C	Espermatozoide capacitado y con reacción acrosomal: Fluorescencia en pieza intermedia y una banda con escasa fluorescencia en la región ecuatorial del espermatozoide.

DasGupta *et al.*, 1993

5.6 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó mediante la tinción con Eosina-Nigrosina (EN) en una dilución 1:8 de la muestra de semen y colorante de EN. La muestra se incubó durante 5 minutos a 37°C y se realizó un frotis con una gota de la dilución sobre un porta objetos limpio y desengrasado (Björndahl *et al.*, 2003).

Las laminillas se observaron en un microscopio de contraste de fases OLYMPUS CX41 a 40x, se revisaron varios campos hasta contar 200 células, las cuales presentaron el siguiente patrón de coloración.

- Células que no presentan eosinofilia o blancas – espermatozoide vivo
- Células Eosinófila o moradas – espermatozoide muerto

5.7 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA CROMATINA NUCLEAR

La integridad de la cromatina nuclear se evaluó mediante la técnica de fluorescencia con Naranja de Acridina (NA), la cual consistió en colocar 1 ml de la muestra de semen en un tubo tipo Eppendorf para lavar mediante centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos y retirar el plasma seminal, la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS; sobre un porta objetos limpio se colocó una gota de la suspensión y se realizó un frotis, el cual se dejó fijar en solución de Carnoy (metanol y ácido acético glacial 3:1) durante 24 horas. A las laminillas fijadas se les agregó ácido cítrico al 0.1 M (pH2.5) durante 5 minutos, se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar, se les colocó una solución de Naranja de Acridina (300 mg de colorante de Naranja de Acridina, 2 ml de etanol y 100 ml de agua purificada) durante 5 minutos y se lavaron con agua desionizada; se puso el cubreobjetos sobre la laminilla que aún se encontraba húmeda y se leyó inmediatamente en el microscopio de fluorescencia (Leica 020-518.500 DM/LS) con filtro azul de excitación 405-455 nm, a 40x, se revisaron varios campos hasta contar 200 células las cuales presentaron los siguiente patrones de fluorescencia:

- Espermatozoides verdes: doble cadena de ADN intacto.
- Espermatozoides naranjas o rojos: doble cadena de ADN desnaturalizado.

5.8 PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para la permeabilización de la membrana se prepararon tres tratamientos con Estreptolisina O (SLO) liofilizada de la marca Sigma Aldrich®, la cual fue reactivada mediante el uso de ditioneitol (DTT) al 4 mM en PBS. Las concentraciones para cada tratamiento con SLO fueron de 0.3, 0.6 y 1.2 UI/ml.

Se adicionaron 100 µl de semen a cada uno de los tratamientos y se incubaron durante cinco minutos a 37°, posterior a la incubación las muestras se lavaron dos veces por centrifugación a 1200 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de PBS (Fawcett *et al.*, 1998).

5.9 RECUPERACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para la recuperación de la integridad de la membrana plasmática o "sellado de poros" se adicionaron 50 µl de Suero Fetal Bovino (SFB) a cada uno de los tratamientos y se incubaron a 37°C durante 15 minutos (Fawcett *et al.*, 1998). Al término de la incubación con SFB realizaron nuevamente las pruebas de viabilidad espermática (EN), estado funcional (CTC) e integridad de la cromatina nuclear (NA).

5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados por comparación de proporciones en cada tratamiento con el uso del módulo de no paramétrica del programa STATISTICA V10.0, donde se evaluó: el porcentaje de estado acrosomal por la técnica de CTC, el porcentaje de integridad de membrana plasmática por la técnica de Eosina-Nigrosina y el porcentaje de la integridad de la cromatina nuclear por la técnica de Naranja de Acridina.

Se realizó además la prueba H de Kruskal Wallis para determinar si los datos de comportaban de manera normal y si se cumplían los supuestos de homogeneidad y homoscedasticidad.

6 RESULTADOS

6.1 VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA ANTES Y DESPUÉS DEL SELLADO DE POROS

En la Figura 11 se ilustran los porcentajes de espermatozoides vivos en cada uno de los tratamientos y se puede apreciar que no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) en los grupos testigos (fresco y control), contra los tratamientos con SLO en diferentes concentraciones. El porcentaje de espermatozoides vivos aumentó en todos los tratamientos después de la incubación con SFB al 5%; sin embargo este aumento no fue significativo ($P>0.05$).

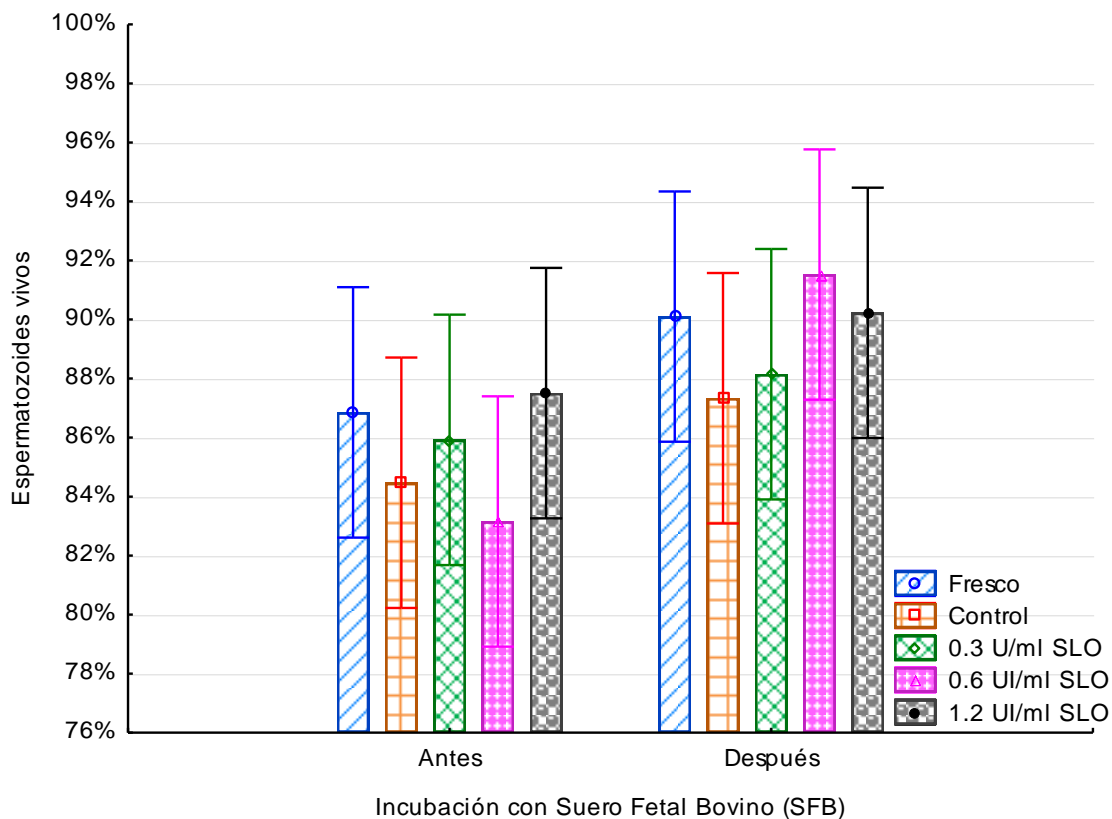


Figura 11. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre la viabilidad espermática.

Por otra parte, como se muestra en el Cuadro 3 el valor de viabilidad espermática más bajo encontrado fue de 83.15 ± 10.9 del tratamiento con SLO a 0.6 UI/ml antes de la incubación con SFB, mientras que el valor más alto (91.52 ± 4.83) se encontró en la misma concentración de SLO pero después de ser incubado con SFB para el sellado de poros transmembranales; sin embargo, las diferencias entre concentraciones e incubación con SFB no resultaron significativas ($P>0.05$).

Cuadro 3. Medias y desviaciones estándar del porcentaje de espermatozoides vivos antes y después de la incubación con SFB al 5%

Tratamiento/incubación SFB	Porcentaje de espermatozoides vivos	
	Antes	Después
Fresco	86.85 ± 16.87	90.09 ± 7.88
Control	84.46 ± 10.31	87.33 ± 6.43
0.3 UI/ml SLO	85.92 ± 8.61	88.14 ± 6.72
0.6 UI/ml SLO	83.15 ± 10.90	91.52 ± 4.83
1.2 UI/ml SLO	87.50 ± 6.83	90.22 ± 5.28

6.2 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ANTES Y DESPUÉS DEL SELLADO DE POROS

Al realizar el análisis de la integridad de la membrana plasmática se observó una disminución en el porcentaje de células sin capacitar que no presentaban reacción acrosomal en los tratamientos fresco, control y el de 1.2 UI/ml de SLO antes y después de la incubación con SFB; sin embargo, dichas diferencias no fueron significativas ($P>0.05$) para dichos tratamientos así como para los de 0.3 y 0.6 UI/ml de SLO, tal como se muestra en la Figura 12.

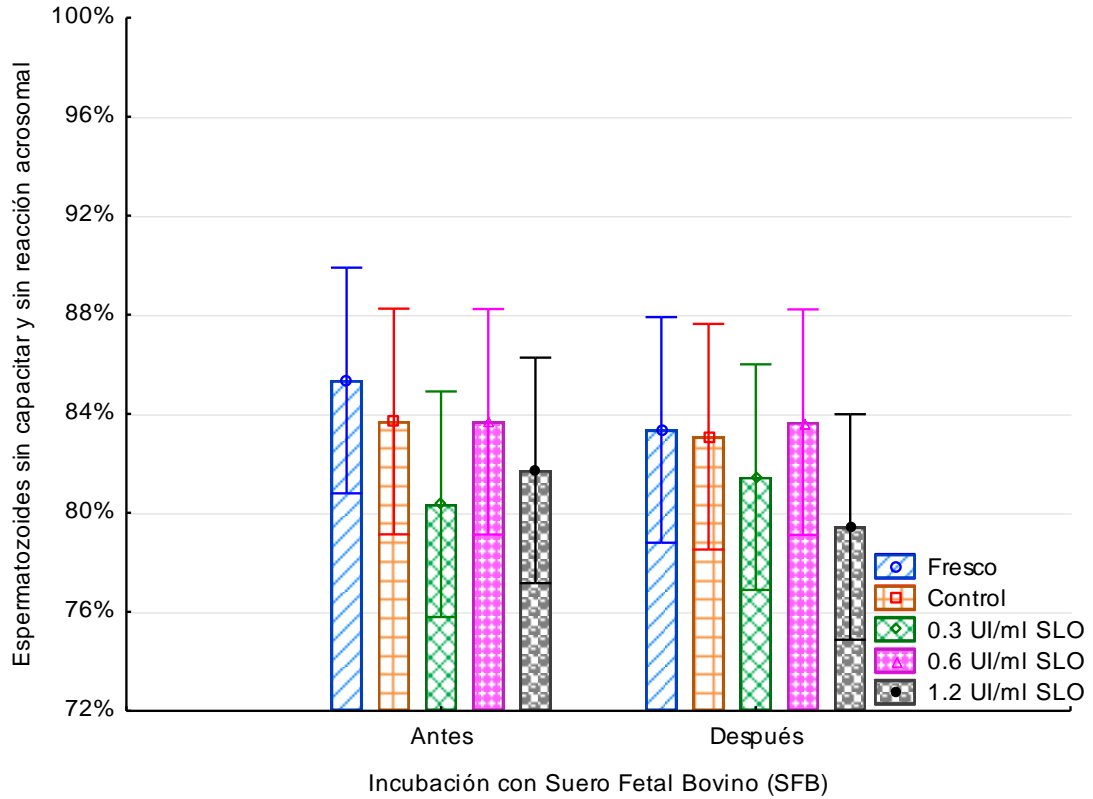


Figura 12. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre el estado funcional de los espermatozoides.

En el Cuadro 4 se muestran las medias y desviaciones estándar (DE) de cada uno de los tratamientos con SLO antes y después del sellado de poros con SFB al 5%, el valor más alto (85.34%) se encuentra en el tratamiento fresco antes de la incubación con SFB y el más bajo (79.42%) en el tratamiento con 1.2 UI/ml de SLO posterior al sellado de poros; sin embargo, estos resultados no son significativos ($P < 0.05$) para ninguno de los tratamientos antes o después del sellado de poros debido a que las desviaciones estándar son $> 4.7\%$.

Cuadro 4. Medias y DE del porcentaje de espermatozoides sin capacitar y sin reacción acrosomal antes y después de la incubación con SFB al 5%

Tratamiento/incubación SFB	Porcentaje de espermatozoides sin capacitar y acrosoma íntegro	
	Antes	Después
Fresco	85.34 ± 6.35	83.34 ± 5.15
Control	83.68 ± 4.76	83.07 ± 9.17
0.3 UI/ml SLO	80.34 ± 7.80	81.44 ± 7.66
0.6 UI/ml SLO	83.67 ± 5.60	83.66 ± 7.37
1.2 UI/ml SLO	81.71 ± 8.18	79.42 ± 5.03

6.3 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA CROMATINA NUCLEAR ANTES Y DESPUÉS DEL SELLADO DE POROS

En la Figura 13 se ve el efecto de la adición de SFB al 5% para el sellado de poros transmembranales sobre la integridad de la cromatina nuclear de semen de porcino tratado a diferentes concentraciones de SLO (0.3, 0.6 y 1.2 UI/ml). Nuevamente no se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos antes o después de la incubación con SFB. Los porcentajes de células con cromatina íntegra se mantuvieron $> 98\%$ en todos los tratamientos.

Por otra parte, en el Cuadro 5 se muestran las medias y desviaciones estándar del porcentaje de espermatozoides con cromatina nuclear íntegra antes y después del sellado de poros. Las desviaciones estándar fueron menores que en las otras técnicas, sin embargo, a pesar que se reportan desviaciones menores al 1%, los resultados siguen sin ser significativos ($P < 0.05$).

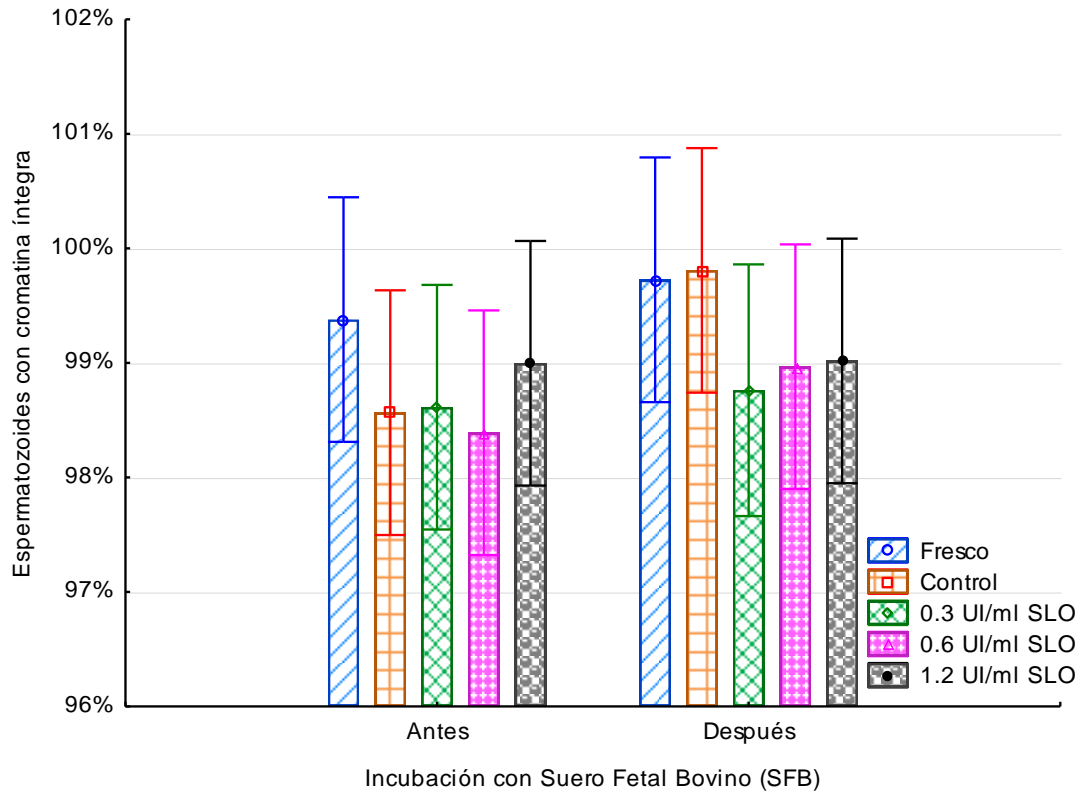


Figura 13. Efecto de las concentraciones de SLO antes y después del sellado de poros con SFB sobre la integridad de la cromatina nuclear.

Cuadro 5. Medias y DE del porcentaje de espermatozoides con cromatina nuclear íntegra antes y después de la incubación con SFB al 5%

Tratamiento/incubación SFB	Porcentaje de espermatozoides con cromatina íntegra	
	Antes	Después
Fresco	99.37 ± 1.51	99.72 ± 0.56
Control	98.56 ± 3.09	99.80 ± 0.48
0.3 UI/ml SLO	98.61 ± 3.35	98.76 ± 2.60
0.6 UI/ml SLO	98.39 ± 2.87	98.96 ± 2.53
1.2 UI/ml SLO	98.99 ± 2.04	99.01 ± 1.87

7 DISCUSIÓN

El decremento que se observa en el porcentaje de espermatozoides vivos al ser incubados con SLO para la permeabilización celular (Figura 11), seguido de un aumento en el porcentaje de espermatozoides vivos posterior a la incubación con SFB para el sellado de poros transmembranales, lo que nos indica que la SLO actúa sobre la membrana plasmática del espermatozoide, esto permite la entrada del colorante Eosina al interior de la célula, similar a lo descrito por Tartakoff (1991) que establece que ciertos colorantes impermeables como el Azur A, Azul tripán y Eosina logran atravesar la membrana plasmática de células tratadas con toxinas permeabilizadoras como la α -toxina, SLO y digitonina y que la exposición prolongada a dichos colorantes provoca la tinción de células intactas; sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos antes y después del sellado de poros, contrario a lo reportado por Johnson *et al.* (1999) que al utilizar la misma técnica con SLO a dosis de 0.6 UI/ml logró permeabilizar el 80% de espermatozoides de ratón; por otra parte, Michaut *et al.* (2000) y Yunes *et al.*, (2002) realizaron un estudio en espermatozoides de humano y lograron permeabilizar el 100% de las células, estas diferencias pueden encontrarse asociadas al contenido de colesterol en la membrana, el cual difiere significativamente entre especies siendo más bajo en cerdos que en ratón o en humanos y como se mencionó con anterioridad, la SLO es una toxina que actúa uniéndose al colesterol presente en las membranas plasmáticas.

Fawcett *et al.* (1998), establecen que la temperatura, dosis y periodo de exposición a la toxina son factores que están asociados al efecto de la SLO sobre las membranas plasmáticas al permeabilizar miocitos de ratón con dosis de 0.2 UI/ml a 37 °C durante 5 min se encontraron el mayor porcentaje de células viables tras el sellado de poros con SFB (50%) y que periodos de exposición superiores a los 5 minutos, así como el empleo de dosis más altas resulta en un decremento en el porcentaje de células que se mantenían viables tras el sellado de poros con SFB; en este estudio la temperatura de incubación fue de 37 °C y el periodo de incubación de 5 minutos y se encontró que tanto la viabilidad como el estado funcional e integridad de la cromatina nuclear se mantuvieron en porcentajes altos en todos los tratamientos antes y después del sellado de poros, similar a lo reportado por dichos autores; sin embargo, estos resultados no pueden ser comparables con estudios realizados en células

espermáticas como los de Yunes *et al.*, (2000) y Michaut *et al.* (2000), ya que en estos trabajos no está reportado el uso de algún componente para el sellado de poros con su posterior evaluación de viabilidad.

Para determinar el efecto de la SLO sobre la fisiología espermática se utilizó la técnica de CTC la cual indica el estado de capacitación y reacción acrosomal, al realizar el estudio no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos antes y después de la incubación con SFB para el sellado de poros; sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en el porcentaje de células sin capacitar y sin reacción acrosomal, esta reducción puede atribuirse a que al ser eyaculada la célula espermática y entrar en contacto con el plasma seminal comienza a desarrollar dichos procesos de manera natural (Gadella *et al.*, 2008). En este estudio al permeabilizar espermatozoides de porcino durante 5 minutos con SLO a 0.3, 0.6 y 1.2 UI/ml se encontró que los porcentajes de células sin capacitar y sin reacción acrosomal eran de 80.34 ± 7.8 , 83.67 ± 5.6 y 81.71 ± 8.18 respectivamente, similar a lo reportado por Johnson *et al.* (1999), que al permeabilizar espermatozoides de ratón con SLO a 0.6 UI/ml durante 5 minutos encontró que la mayoría de las células mantenían el acrosoma intacto (75%) y que al aumentar el tiempo de exposición a 15 minutos el porcentaje disminuía (44%). Estos resultados indican que la permeabilización con SLO lleva a cabo en la membrana plasmática y no en la membrana acrosomal.

Hasta el momento no existen reportes acerca del efecto que tiene el uso de la SLO como agente permeabilizante sobre la integridad de la cromatina nuclear de las células espermáticas; sin embargo, numerosos autores reportan que porcentajes >50% de espermatozoides con cromatina íntegra son valores considerados normales en individuos fértiles, en este trabajo los valores reportados de porcentaje de cromatina íntegra fueron >98% para todos los tratamientos antes y después de la incubación con SFB para el sellado de poros, lo que nos indica que la SLO no tiene ningún efecto negativo sobre la integridad estructural de la cromatina nuclear y que las células permeabilizadas y selladas son capaces de fertilizar.

8 CONCLUSIONES

1.- Los espermatozoides de porcino tratados con SLO se mantuvieron viables tras el sellado de poros con SFB.

2.- La SLO actúa sobre la membrana plasmática del espermatozoide sin producir alteraciones sobre la membrana acrosomal.

3.- No se observó ningún efecto negativo en el uso de la SLO sobre la integridad estructural de la cromatina nuclear y capacidad fecundante del espermatozoide de porcino.

4.- la SLO es una herramienta útil para la permeabilización de la membrana plasmática de espermatozoides de porcino.

9 PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES

1.- Introducir sustancias crioprotectoras antes del sellado de poros con SFB y evaluar el efecto que tiene sobre la viabilidad y estado funcional de los espermatozoides de porcino.

2.- Criopreservar semen de cerdo previamente permeabilizado con SLO para la introducción de sustancias crioprotectoras y evaluar su viabilidad al ser descongelado.

10 LITERATURA CITADA

- Ahnert-Hilger G, Weller U, Dauzenroth ME, Habermann E, & Gratzl M. (1989). The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis. *FEBS letters*. 242(2): 245-248.
- Albers JG, Mann T, Polge C. (1961). Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. *J Reprod Fertil*. 2: 42-53.
- Bamba K, Cran DG. (1992). Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal of reproduction and fertility*. 95(1): 69-77.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*. 10(1): 49-62.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, Palmer M. (1996). Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Archives of Microbiology*. 165(2): 73-79.
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J. (1984). On the cause and nature of C9-related heterogeneity of terminal complement complexes generated on target erythrocytes through the action of whole serum. *The Journal of Immunology*. 133(3): 1453-1463.
- Bhakdi s, Tranum-Jensen J, Sziegoleit A. (1985). Mechanism of membrane damage by streptolysin O. *Infection and Immunity*. 47: 52-60
- Bhakdi S, Weller U, Walev I, Martin E, Jonas D, Palmer M. (1993). A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Medical microbiology and immunology*. 182(4): 167-175.
- Bi GQ, Alderton JM, Steinhardt RA. (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *The Journal of cell biology*. 131(6): 1747-1758.
- Björndahl L, Söderlund L, Kvist U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm viability assessment. *Human reproduction*. 18, 4: 813-846.
- Bonet S, Briz M, Fradera A. (1991). The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies. *Scient Gerund*. 17: 77-84.

Bonet S, Briz MD. (1991). New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *sus domesticus*. *Theriogenology*. 35: 725-730

Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*. 60: 1539-1551.

Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R. (1995). Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and regions of the epididymis. *Journal of Andrology*. 16, 2: 175-188

Buhr MM, Canvin AT, Bailey JL. 1989. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gam Res*. 23: 441-449.

Burgos MH, Fornés MW, Gutiérrez LS, Vincenti A. (1992). El proceso de maduración del espermatozoide durante el tránsito epididimario. V Congr Iberoam Biol Cel (Málaga). *Reprod*: 70

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 58: 99-111

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 27:53-59.

Cross NL, Meizel S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of reproduction*. 41: 635-641

Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*. 131: 977 - 988

Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinoza F. (1999). Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews*. 79: 481 - 510

DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. (1993). Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *Journal of reproduction and fertility*. 99(1): 135-143.

De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, Andersson M, Rodríguez-Martínez H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 29: 543-552.

Duncan JL, Schlegel R. (1975). Effect of streptolysin o on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A Protein-Cholesterol Interaction. *The Journal of Cell Biology*. 67: 160-173.

Dziuk PJ, Mann T. (1963). Effect of atropine on the composition of semen and secretory function of male accessory organs in the boar. *J Reprod Fertil*. 5: 101-108.

Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*. 8: 11-29.

Eriksson BM, Petersson, H, Rodríguez-Martínez H. (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*; 58: 1065-1079.

Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M & Gossen JA. (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *PNAS* 101 2993-2998.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 210: 1131-1133.

Evenson DP. (1990). Flow Cytometric analysis of ale germ cell quality. *Methods Cell Biol*. 33: 40-410.

Fawcett JM, Harrison SM, Orchard CH. (1998). A method for reversible permeabilization of isolated rat ventricular myocytes. *Experimental Physiology*. 83: 293 - 303.

Fiser PS, Fairful RW. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. *Molecular Reproduction and Development*. 25: 123-129.

Flesch FM, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 262: 787-792.

Flesch FM, Gadella BM. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane un the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469 (3): 197-235.

Foote RH. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J Androl*. 10: 89-98

Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Tranum-Jensen J, Kranz T, Wellensiek HJ. (1981). On the mechanism of membrane damage by Staphylococcus aureus alpha-toxin. *The Journal of cell biology*. 91(1): 83-94.

Gadea J. (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 63: 431-444.

Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*. 52(5): 473.

García E. (1988). Modificación a sistemas de clasificación de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Gerrits, RT, Lunney, JK, Johnson, LA, Pursel, VG, Kraeling, RR, Rohrer, GA, Dobrinsky, JR. 2(005). perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*; 63:283-299.

Gillan L, Evans G, Maxwell W. (1997). "Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 9: 841-487.

Gilmore JA, DU A, Junying TJ, Peter AT, Critser JK. (1996). Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 107: 87-95.

Gilmore JA, Lui J, Peter AT, Crister JK. (1998). Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*. 58: 28-36.

- Golan R, Cooper TG, Oschry Y, Oberpenning R, Schulze H, Shochat L. (1996). Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determinate by flow cytometry. *Hum Reprod.* 11: 1457-1562.
- Graham EF, Schmehl MKL, Nelson DS. (1980). Problems with laboratory assays. In Proceedings of the eighth technical conference on artificial insemination and reproduction. (pp. 59-66). National Association of Animal Breeders, Inc.
- Graham JK, Kunze E, Hamerstedt H. (1990). Analysis of sperm cell viability, Acrosomal Integrity, and mitochondrial Function using flow cytometry. *Biology of Reproduction.* 43: 55-64.
- Graham JK, Hammerstedt RH. (1992). Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. *Cryobiology.* 29(1): 106-117.
- Green CM, Cockle SM, Watson PF, Fraser LR. (1994). Simulating effect of pyroglutamylglutamylproline-amide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev.* 38(2): 215-221.
- Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Uribe CS, Trujillo OME. (2009). Boar spermatozoa Cryopreservation in low glicerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology.* 58: 287-292.
- Hammitt DG, Martin PA, Callahan T. (1989). Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology.* 32: 385-399.
- Hancock JL. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society.* 76(3): 84-97.
- Hernández DAK 2011. Intercambio de plasma seminal porcino y valoración de la viabilidad espermática en semen refrigerado. Tesis de licenciatura FMVZUV.
- Hernández ME y Ortega A. 2004. Fisiología Celular y Molecular, Principios y Conceptos. (pp. 58-61). Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., México.
- Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In Molecular mechanisms in spermatogenesis (pp. 1-15). Springer New York.

- Hess RA. (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium; light microscopic observations of perfusion-fixed and plasticembedded testes. *Biol Reprod.* 43:525-542.
- Ichimura S, Zama M, Fujita H. (1971). Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochem Biophysiol Acta.* 240: 489-495.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. (2000). Integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 21:33-44.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science.* 62: 143-172.
- Johnson LR, Moss SB, Gerton GL. (1999). Maintenance of motility in mouse sperm permeabilized with streptolysin O. *Biology of Reproduction.* 60: 683 - 690.
- Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. (2009). Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet.* 26: 591-596.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. (1992). Thiol-sulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J androl.* 13: 342-348.
- Kuster CE, Althouse GC. (1999). The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-cell extenders. *Theriogenology.* 52: 365-376.
- Laforest JP, Allard A. (1996). Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen: III, international conference on boar semen preservation. *Reoprod Domest Anim.* 31 (1): 275-276.
- Lyczynski A, Kolat K. (1996). Boar semen preservation in MR-A diluent: III. International conference on boar semen preservation. *Reprod Domest Anim.* 31 (1), 271-272.
- Mazur, P. (1985). Basic concepts in freezing cells (No. CONF-8508192-1). Oak Ridge National Lab., TN (USA).

Maxwel WMC, Evans G. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. (34: 19-32). El Acriba S.A., Madrid. Can.

Medrano A, Watson PF, Holt WV. (2002). Importance of cooling rate and animal viability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*. 123: 315 – 322.

Michaut M, Tomes CN, De Blas G, Yunes R, Mayorga LS. (2000). Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(18): 9996-10001.

Molina FC, Evans G, Maxwell WMC. (1994). In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction Nutrition and Development*. 34: 491-500

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Reproductive biology*. 22 (3): 289- 318

Ohno-Iwashita Y, Iwamoto M, Mitsui KI, Ando S, Iwashita S. (1991). A cytolysin, θ -toxin, preferentially binds to membrane cholesterol surrounded by phospholipids with 18-carbon hydrocarbon chains in cholesterol-rich region. *Journal of biochemistry*. 110(3): 369-375.

Palmer M, Valeva A, Kehoe M, Bhakdi S. (1995). Kinetics of streptolysin O self-assembly. *European Journal of Biochemistry*. 231(2): 388-395.

Palmer M, Harris R, Freytag C, Kehoe M, Tranum-Jensen J, Bhakdi S. (1998). Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *The EMBO journal*. 17(6): 1598-1605.

Parks JE, Hammerstedt RH. (1985). Developmental changes occurring in the lipids of epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*. 32: 653-668.

Parks JE, Lynch DV. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29: 255-266.

- Peña FJ, Saravia F, Núñez-Martínez I, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. (2006). Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. *Animal Reproduction Science* 93: 101 – 113.
- Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. (1992). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infection and Immunity*. 60(4): 1263.
- Pursel VG, Johnson LA. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40: 99-102
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J Reprod Fert*. 60: 403-407
- Ratto J, Jokinen L. (1991). Reports about number of swine insemination and farrowing results in Finland 1989. Comparison between two diluents, EDTA and MR-A. *Reproduction in Domestic Animals*. 26 (1): 365-368.
- Rillo SM, Martínez EA, García AC, De Alba C (1996). Boar semen evaluation in practice. *Reprod Domest Anim*. 31: 519 – 526.
- Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martínez EA. (2006). Challenges in pig artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(s2): 43-53.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. 63: 514-535.
- Rodríguez-Martínez H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reprod Domest Anim*. 38: 312 – 318.
- Rooij DG, Russell LD. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology*. 21: 776 – 798.
- Roseto A, Repetto HA, Exeni R. (2003). Las membranas celulares. Los canales iónicos y nefrología molecular. *Arch Argent Pediatr*. 101: 320-343
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, FL

- Sabeur K, Edwards DP, Meizel S. (1996). Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 54: 993-1001.
- Salamon S, Evans G, Maxwell W (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1ra ed. España, Acribia.
- Saling PM, Storey BT. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlorotetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol*. 83: 544-555.
- Sekiya K, Satoh R, Danbara H, Futaesaku Y. (1993). A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *Journal of bacteriology*. 175(18): 5953-5961.
- Setchell BP. (1991). Male reproductive organs and semen. *Reproduction in domestic animals*. 8: 221-249.
- Sim BW, Cha JJ, Song BS, Kim JS, Yoon SB, Choi SA, Chang KT. (2013). Efficient production of transgenic mice by intracytoplasmic injection of streptolysin-O-treated spermatozoa. *Molecular reproduction and development*. 80(3): 233-241.
- Swanson EW, Bearden HJ. (1951). An Eosin-Nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anim SCI*. 10: 981-987.
- Tartakoff AM. (1991). Laboratory methods in vesicular and vectorial transport. Academic Press, San Diego, California.
- Tejada RI, Mitchell JC, Normal A. (1984). Test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 42: 87-91
- Trotter PJ, Voelker DR. (1994). Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biochim Biophys. Acta*. 1213: 43-50.
- Waberski D, Meding S, Dirksen G, Weitze KF, Leiding C, Hahn R. (1994). Fertility of long-term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal Reproduction Science*. 36: 145-151.

Ward WS, Coffey DS. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*. 44(4): 569-574.

Wagner, HG and Thibier, M. (2002). World statistics for artificial insemination in small ruminant and swine. Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden. Abstracts vol. 2, 15:3.

Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva A, Aktories K, Bhakdi S. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13:3185-3190.

Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. (1995). Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104: 305 – 313.

Wannamaker L W . (1983). Streptococcal toxins. *Rev Infect Dis*. 4: 723 – 732.

Ward CR, Storey BT. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology*. 104: 287-296.

Woelders H, Marthjs A, Engel B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of full sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. 35: 93-105.

Yamamoto Ikkyu, kimoto Hisashi, Taketo Yoriko, Taketo Akira. (2001). Mutational and comparative Analysis of Streptolysin O, an Oxygen-labile Streptococcal Hemolysin. *Biosci Biotechno. Biochem*, 65 (12), 2682- 2689.

Yanagimachi R. (1994). The physiology of reproduction. Knobil E and Neil JD) Raven press, New York. Pp. 189-317.

Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S. (1988). Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res*. 20: 11-24.

Yunes R, Michaut M, Tomes C, Mayorga LS. (2000). Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 62(4):1084-1089.

Yunes R, Tomes C, Michaut M, De Blas G, Rodriguez F, Regazzi R, Mayorga LS. (2002). Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS letters*. 525(1): 126-130.