

## ALTERACIONES EN LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO CRIPRESERVADO MODIFICAN EL PROCESO DE DESCONDENSACION NUCLEAR

Gutiérrez Pérez O.\*, Juárez Mosqueda ML, Mota Rojas D□ , Trujillo Ortega ME

FMVZ-UNAM Departamento de Producción Animal Cerdos y Dpto. de Morfología; □Dpto. Etología UAM-X . Proyecto apoyado por la DGAP-UNAM(PAPIIT IN206702).

Introducción: Durante el proceso de fertilización la envoltura nuclear desaparece, dejando a la cromatina espermática rodeada exclusivamente por la teca perinuclear (TP); estructura citoesquelética que protege de la acción de los factores externos descondensantes al DNA espermático. Durante el tránsito por el epidídimo la TP se somete a un proceso de maduración que se ve reflejado en la presencia de una subestructura (sTP) en la porción apical de la hoja postacrosomal. Cuando el espermatozoide sufre la reacción acrosomal (RA) y previo a su incorporación al huevo, la TP sufre un cambio morfológico que la prepara para permitir la correcta descondensación nuclear mediante su desestructuración, durante este proceso la sTP desaparece. La actina F ha sido reportada en la estabilización de la sTP. En estudios anteriores se observó que si el acrosoma y la TP persisten dentro del huevo fertilizado, la descondensación se lleva a cabo de manera irregular. Existen reportes que indican que el proceso de criopreservación en espermatozoides de bovino provoca daño a la TP, mientras que este mismo proceso de congelación provoca en humanos y porcinos una hipercondensación de la cromatina que parece retrasar la formación del pronúcleo masculino ocasionando un pobre desarrollo embrionario y/o su muerte temprana. El objetivo del presente trabajo fue comprobar que existe relación entre el daño sufrido por la TP tras el proceso de congelación/descongelación y modificación en el proceso de descondensación de la cromatina nuclear espermática. Material y Métodos: Se obtuvo la fracción rica de eyaculados de cerdo por medio de la técnica de la mano enguantada. Los espermatozoides fueron sometidos a cuatro diferentes tratamientos: 1) Descondensación de espermatozoides frescos, 2) Descondensación de espermatozoides descongelados, 3) Descondensación de espermatozoides frescos preincubados con faloidina (59  $\mu$ M). 4) Descondensación de espermatozoides descongelados preincubados con faloidina (59  $\mu$ M). Antes de cada tratamiento los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en NaCl (154mM) e incubados en el detergente Brij 36-T 10% (1.2%) por 10 min. a una concentración de  $35 \times 10^6$  espz /ml, con la finalidad de retirar membranas y dejar la TP expuesta. Posteriormente se retiró el detergente y se adicionaron como agentes descondensantes Dithiothreitol (DTT) 3.75mM y Heparina 5USP. Para dar seguimiento al proceso de descondensación, de cada tratamiento se fijaron alícuotas a los 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 y 600 segs. De cada muestra fijada se elaboraron rejillas para su valoración en Microscopio Electrónico de Transferencia (MET). Resultados y Discusión: En

contraste con lo reportado para los espermatozoides de cobayo, los espermatozoides del cerdo presentan una TP más sensible a la acción del DTT/heparina la desestructuración de la TP se produce al adicionar DTT a una concentración menor a 15mM que fue la utilizada en el cobayo. El patrón de descondensación observado en espermatozoides porcinos con DTT 3.5mM+5USP de heparina inicia en la región subacrosomal de la TP a diferencia de la reportada *in vivo* que inicia en la región postacrosomal de la TP, este efecto puede correlacionarse con la ausencia de la membrana acrosomal interna que fue retirada por el tratamiento con Brij 36-T. Los espermatozoides frescos antes del tratamiento descondensante (muestra control), presentaron la sTP sin alteraciones. Por su parte los espermatozoides descongelados mostraron diferentes grados de pérdida de integridad de la sTP. Un retraso en el proceso de descondensación de los espermatozoides descongelados se hizo aparente al compararlos con el proceso presentado por los espermatozoides frescos: mientras que los espermatozoides descongelados presentaron solo una ligera pérdida de material nuclear a los 120 segs. de exposición al tratamiento, en los espermatozoides frescos la descondensación fue aparente a partir de los 60 segs. Nuestros datos sugieren que este retraso no es debido a una sobrecondensación de la cromatina como algunos autores han reportado, si no a la falta de algún elemento regulador del proceso, perdido durante la alteración sufrida por la TP. Esta teoría se ve reforzada tras la estabilización de actina F con faloidina ya que los patrones de descondensación presentados en espermatozoides frescos y descongelados muestran diferencias, los espermatozoides frescos preincubados con faloidina presentan constricción a manera de cinturón en la región ecuatorial, característica que los espermatozoides descongelados no poseen, ya que estos sufren una hinchazón mas generalizada y la única parte que parece estabilizarse por acción de la faloidina es una pequeña región cercana a la fosa de implantación.

Referencias bibliográficas:

1. Cordova A, Gutiérrez J F et al, 2002 *Theriogenology* 57:2119-2128
2. Gall E W and Oshumi Y, 1976 *Experimental Cell Research* ;102 : 349-358
3. Hamamah S, Doyere et al, *Reprod.Nutr.Dev.*1990;30:59-64
4. Juárez Mosqueda M L, Mujica A, Navarro F, Hernández G, 2003 *Microscopy Research and technique* 61:76-87
5. Sutovsky P, Oka R et al 1997: *Development Biology*; 188:75-84