

REDISTRIBUCIÓN DE LA ACTINA DE LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

*Martel, B. S., Trujillo, O. M. E., García, T. C. G., Hernández, H. J. M.† y Juárez, M. M. L.

Departamentos de Morfología y Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. †CINVESTAV-IPN. Correspondencia con el autor: smartel@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN.- La teca perinuclear (TP) es el principal elemento del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide. Está (TP) es una capa densa que rodea el núcleo del espermatozoide de los mamíferos, excepto en una limitada área, donde la pieza del cuello del espermatozoide se implanta en la base del núcleo. Morfológicamente ha sido dividida en dos regiones, la hoja subacrosomal que llena el espacio entre el acrosoma y el núcleo, y la capa postacrosomal o también llamada cáliz, que es la extensión caudal de la anterior, localizada entre la membrana nuclear y la membrana plasmática (MP). Diversos autores mencionan que la congelación-descongelación (CD) posiblemente ocasione alteraciones en el interior de la célula espermática, refiriéndose a ellos como una posible lesión en el citoplasma. Como se sabe, muchas de las proteínas del citoesqueleto exhiben una despolimerización y repolimerización dependiendo de la temperatura, lo cual podría tener una implicación muy significativa en la criopreservación del espermatozoide.

MATERIALES Y MÉTODOS.- Se obtuvieron 18 eyaculados de verracos de diferentes razas comerciales por el método de la mano enguantada y se congelaron de acuerdo con el protocolo descrito por Thilmant (1997). Muestras de semen frescas y congeladas-descongeladas se sometieron a los siguientes procesos: extracción de las proteínas de la TP (35×10^6 células/ml) con el detergente Brij 36-T (conc. final 0.65%) + Ditiotretol (conc. final 3.5 mM) por 40 segundos. Las proteínas obtenidas (150×10^6 células/ml) fueron corridas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%; una parte del gel se reveló con azul de Coomassie y la otra se transfirió a papel de nitrocelulosa (PNT). Las proteínas transferidas en el PNT fueron tratadas para la inmunodetección de actina-G, utilizándose para el revelado la quimioluminiscencia (luminol). Para la identificación de la actina en la célula se utilizaron frotis de espermatozoides enteros permeabilizados con Tritón X-100 al 1% y se incubaron con un anticuerpo anti-actina-G conjugado con FICT y se observaron en un microscopio confocal.

RESULTADOS.- El patrón de proteínas obtenido en los espermatozoides frescos reveló un par de proteínas mayoritarias ubicadas una por debajo y otra por arriba de los 45kDa del mismo peso. Este mismo patrón se repitió en las muestras descongeladas, pero las bandas obtenidas fueron más intensas. La inmunotinción reveló una banda de aproximadamente 43 kDa en ambos tipos de espermatozoide (frescos y descongelados) (Fig. 1); observándose una mayor intensidad en estos últimos. También fue reconocida una banda con un peso molecular por arriba de los 31kDa, lo cual puede ser producto de la degradación de actina. Al microscopio confocal, en las muestras frescas a excepción del segmento ecuatorial, toda la de la TP mostró

fluorescencia en las muestras frescas (Fig. 2a). Por su parte, las muestras descongeladas mostraron una redistribución de actina, observándose un cinturón fluorescente en la región ecuatorial (Fig. 2b). Así también, se tiñó ligeramente la región postacrosomal.

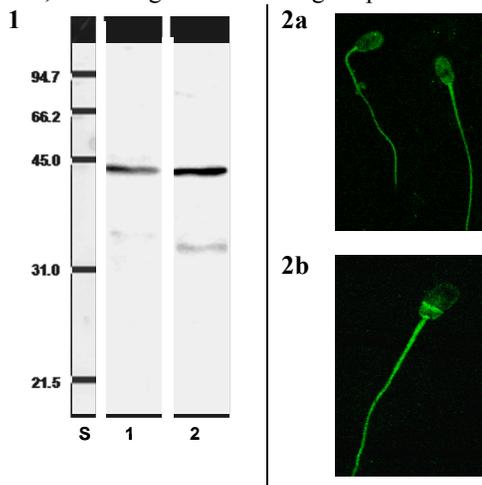


Fig. 1. Inmunodetección de actina; (S) marcadores de peso molecular, (1) espermatozoides frescos y (2) descongelados. **Fig.2.** Microscopía confocal; inmunofluorescencia de la localización de actina; a) y b) espermatozoides frescos y descongelados respectivamente. Imágenes a 600X

DISCUSIÓN.- Los resultados demuestran que la actina es un componente de la TP, lo cual coincide con lo reportado por Camatini, *et al.* (1986). Asimismo, se demostró que la CD del espermatozoide provoca cambios estructurales en el citoesqueleto de actina y posiblemente daños en la proteína, ya que una banda con un peso menor al reportado por la actina (43kDa) fue reconocida en los espermatozoides descongelados. Noiles, *et al.* (1997) comprobaron que la CD provoca alteraciones a las estructuras espermáticas mencionando que la más afectada es la MP, la cual se ancla a la TP, por medio s proteínas trans-membranales. Delgado, *et al.* (2005) encontraron una redistribución de actina a la región ecuatorial en el espermatozoide de cobayo con reacción acrosomal. La distribución de actina en el espermatozoide descongelado encontrada en el presente estudio es similar a la de los espermatozoides capacitados, lo cual ha sido descrito por Petrunkina, *et al.* (2005), como una “criocapacitación”. Nuestros resultados muestran que posiblemente las alteraciones que sufre la TP durante la CD están participando en este fenómeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camatini, *et al.* (1986). Euro. J. Cell. Biol. **42**: 311-318.
2. Delgado, *et al.* (2005). Mol. Reprod. Dev. **70**: 198-210.
3. Noiles, *et al.* (1997). Cryobiology. **35**: 79-92.
4. Petrunkina, *et al.* (2005). Theriogenology. **63**: 1390-1406.
5. Thilmant, P. (1997). Ann. Med. Vet. **141**: 457-462.