



COMPARACION ENTRE PORCENTAJES DE PENETRACION OBTENIDOS CON ESPERMATOZOIDES DE CERDO CRIOPRESERVADOS EN UN DILUYENTE CONVENCIONAL Y OTRO SUPLEMENTADO CON TREHALOSA, UTILIZANDO LA PRUEBA DE PENETRACION HETEROLOGA IN VITRO (hIVP). Gutiérrez-Pérez O<sup>ab\*</sup>, Juárez Mosqueda ML<sup>c</sup>, Uribe Carvajal S<sup>d</sup>, Trujillo Ortega ME<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Subdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría. <sup>b</sup> Departamento de Producción Animal Cerdos FMVZ-UNAM. <sup>c</sup> Departamento de Morfología, FMVZ-UNAM. <sup>d</sup> Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Introducción:** La trehalosa es un disacárido utilizado por una gran variedad de organismos (insectos, plantas, levaduras etc.), para resistir el estrés provocado por condiciones extremas de temperatura y desecación. La características crioprotectoras de este disacárido ha permitido su utilización de manera exitosa en la formulación de medios de congelación para diferentes tipos celulares. Su adición a medios de criopreservación para semen de cerdo es capaz de disminuir el daño ocasionado por la congelación sobre la integridad espermática. El presente estudio busco valorar la capacidad fertilizante de semen porcino criopreservado en un medio con una baja concentración de glicerol (1%) y adicionado con trehalosa. **Material y Métodos:** Semen de 1 machos previamente probado como buen congelador, fueron diluidas en cada uno de dos medios experimentales para su congelación. Los medios a comparar se designaron como T1 (yema de huevo 20%, glicerol 1%, trehalosa 250  $\mu$ M) y G3 (yema de huevo 20%, glicerol 3%, dextrosa 230.8  $\mu$ M).

Se utilizo solo un eyaculado por macho para todas las pruebas y valoraciones, con el fin de disminuir la variabilidad reportada en la eficiencia de la fertilización *in vitro* (IVF), que se atribuye a las características espermáticas individuales que se presentan entre machos y aun entre eyaculados del mismo macho. Para la selección de los eyaculados a ser utilizados se aplicaron la prueba de resistencia hiposmotica (HOST) y el test rápido de de termo resistencia (sTMT). Muestras de los eyaculados seleccionados se descongelaron y se filtraron por columnas de sephadex G-10 activado en citrato de Na al 2.9%, para enriquecer la población de espermatozoides motiles. Los espermatozoides filtrados se tiñeron con Hoechst 33342(1 $\mu$ g/ml) 10 min a 38°C, para posteriormente ponerlos a interactuar con ovocitos de cerda madurados *in vitro*. Los ovocitos fueron obtenidos por punción de ovarios recolectados en rastro y madurados *in vitro* por 48hrs. Para la prueba de penetración homologa *in vitro* (hIVP), se colocaron 40,000 espermatozoides filtrados y teñidos por cada 20 ovocitos. A las 16-18 hrs se realizo el conteo de espermatozoides que penetraron la zona pelucida por medio de microscopia de fluorescencia. **Resultados:** Los espermatozoides T1 presentaron mejor tipo de movimiento (P<0.005) y mejor integridad acrosomal (P= 0.005) que espermatozoides G3 (Tabla 1). No se encontraron diferencias estadísticas entre espermatozoides G3 y T1, HOST+ con acrosoma integro (Tabla 1). El número de espermatozoides por ovocito fue ligeramente mayor en T1, pero sin diferencia significativa en porcentajes de penetración (P>0.05). Los espermatozoides T1 alcanzaron rangos

intermedios de penetración (56.8%), pero sin diferencia con los G3 (Tabla 2). Por lo tanto los espermatozoides T1 presentaron mejor respuesta a una prueba de

	trat	10 min	45 min	diferencia	Valor P (linea) <sup>a</sup>
% motilidad	G3	26.1±1.68	23±1.37	3.17±1.17	0.042
	T1	8.8± 0.6	13.6±0.84	4.8±0.9	0.003 <sup>*</sup>
valor P (columna) <sup>b</sup>		0.004 <sup>*</sup>	0.005 <sup>*</sup>		
Tipo de movimiento	G3	4.3±0.21	2.1±0.30	2.16±0.30	0.002 <sup>*</sup>
	T1	4.5±0.22	2.67±0.21	1.83±0.30	0.001 <sup>*</sup>
valor P (columna) <sup>b</sup>		0.640	0.246		
Acrosomas integros	G3	110.7±10.6	49.2±4.8	61.5±9.9	0.002 <sup>*</sup>
	T1	149.7±18.1	77.6±8.9	72±11.2	0.001 <sup>*</sup>
valor P (columna) <sup>b</sup>		0.128	0.005 <sup>*</sup>		

<sup>a</sup> valor p (linea) diferencia obtenidas antes y después del tratamiento (T pareada)  
<sup>b</sup> valor p (columna) diferencia obtenida con la comparación entre diluyentes (Mann-Whitney)  
<sup>\*</sup> diferencias significativas (P<0.005)

Diluyente	Host+ *	Vivos *	Host+ AI *	espz x ovo *	% penetración <sup>**</sup>
G4	36.66±3.89 <sup>a</sup>	55.33±2.1 <sup>a</sup>	23.16±4.2 <sup>a</sup>	14.1±0.10	62.6±6.6 <sup>a</sup>
T1	21.66±3.33 <sup>b</sup>	47.33±4.8 <sup>a</sup>	20.0±3.7 <sup>a</sup>	14.4±0.14	56.8± 5.33 <sup>a</sup>
Valor P	0.015	0.119	0.588	0.488	0.229

\* diferencias entre medias por prueba exacta de Fisher, se presentan medias± error standar  
<sup>\*\*</sup> diferencias entre medianas por prueba Mann-Whitney; se presentan medianas± error standar  
<sup>a</sup> Superíndices diferentes por columna indican diferencia significativa

termoresistencia y mejores índices de integridad acrosomal, por lo que se esperaban mejores índices de penetración con espermatozoides T1 que con G3. Sin embargo solo fueron capaces de alcanzar rangos de penetración intermedios (entre 40 a 60% de penetración), pero sin diferencia significativa a los G3. Se ha reportado una fuerte correlación, entre esta prueba y los resultados de fertilidad *in vivo*. Por lo tanto, las fertilidades esperadas deberían entrar dentro de este rango (40 a 60%), pero debe tomarse en cuenta que en el estudio se utilizaron muestras enriquecidas por filtración lo cual probablemente haya suprimido la diferencia existente entre T1 y G3, por lo cual aunque los datos *in vitro* no demostraron mejor capacidad fertilizante entre medios, *in vivo* la aplicación de la dosis debería mantener la tendencia de enriquecimiento espermático, por lo que el volumen de inseminación con T1 deberá ser mayor que con G3.

#### Referencias

- 1.- Gutiérrez-Pérez O. *et al.*. 2009 Cryobiology (in press).
- 2.- Hu et al. 2008 Anim Rep Science 112 (1-2); 107-18.
- 3.- Pérez Llano et al., 2001 Theriogenology 56; 387-98
- 4.- Gadea et al 1998 Theriogenology 56;95-108.