

LA UTILIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA LA LIBERACIÓN INTRACELULAR DE TREHALOSA Y SU EFECTO SOBRE LA INTEGRIDAD Y FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO

Mendoza C^{1*}, Bernad MJ², Barrientos M³, Trujillo M¹, Gutiérrez O^{*}

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; ²Facultad de Química, UNAM; ³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia –UV
denisse_mendez@hotmail.com

Palabras clave: Trehalosa, liposomas, espermatozoide porcino, criopreservación, viabilidad.

Introducción

La composición estructural de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, lo hace especialmente susceptible al daño celular por congelación². Con el propósito de minimizar estas alteraciones, se han utilizado diversos crioprotectores que estabilizan a la célula tras la congelación, un ejemplo de estos es la trehalosa². No obstante ha sido reportado que para obtener la máxima protección, se requiere su presencia en ambos lados de la célula¹. Uno de los métodos para favorecer su ingreso a la célula son vesículas lipídicas denominadas liposomas. El objetivo de este proyecto fue valorar el efecto crioprotector de liposomas cargados con trehalosa, en comparación al conferido por diluyentes convencionales (yema de huevo, glicerol) para mejorar los resultados sobre motilidad y viabilidad espermática al descongelado.

Material y Métodos

Se realizó la preparación de los liposomas a base de lecitina de soya (3mM) en presencia de 300mM de trehalosa y vacíos, mediante el método de calentamiento³. Posteriormente se llevó a cabo la caracterización física de éstos usando el Zetasizer Nano ZS analyzer ZEN 3600, evaluándose tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (ζ). Así también se hizo la determinación colorimétrica de fosfolípidos con ferrocianato de amonio³ y la visualización de las partículas por tinción negativa de microscopía electrónica de transmisión. Los eyaculados se obtuvieron de 2 verracos pertenecientes al C.E.I.E.P.P (FMVZ-UNAM). Para la congelación se definieron cuatro grupos experimentales: 1. Trehalosa² (300 mM), 2. Androstar® CryoPlus, 3. Liposomas cargados y 4. Liposomas vacíos. Esta división se realizó con el fin de valorar el efecto de los liposomas cargados (grupo 3), descartar el efecto de la trehalosa y de los liposomas por si solos (grupos 1 y 4) y utilizando el diluyente comercial como control (grupo 2). Muestras de cada tratamiento fueron descongeladas por triplicado a los 15 días postcongelación², para valorar motilidad (microscopía óptica) y viabilidad (Eosina-Nigrosina)².

Resultados y Discusión

En el cuadro 1 se muestra que los liposomas cargados con trehalosa son de mayor tamaño que los vacíos (357 y 256 nm), mientras que estos últimos presentan un menor rango de variación en el tamaño de las partículas. Respecto a la estabilidad electrostática (potencial ζ), tanto en los cargados como los vacíos el potencial ζ fue negativo, mostrando una tendencia a la aglomeración. La

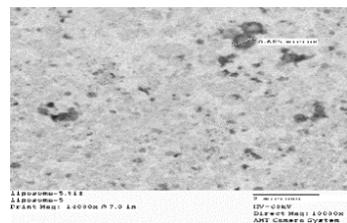
concentración de fosfolípidos de los liposomas cargados fue de 1.43 mg/ml y en los vacíos de 0.92 mg/ml, obteniéndose un mayor rendimiento (61%) en el caso de los cargados. Lo anterior coincide con los resultados reportados por Linares et al., 2016³ en la caracterización de liposomas elaborados por el mismo método.

Cuadro 1. Caracterización física de liposomas

Preparado	Tamaño (nm)	PDI	ζ (mV)
Cargados	357 ± 23.22	0.434 ± 0.009	-18.13 ± 0.466
Vacíos	256 ± 6.3025	0.326 ± 0.028	-17.9 ± 0.2517

Los valores representan los promedios ± error estándar; n=3

Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión, se muestran partículas esféricas unilamelares de tamaño variable.



Los resultados al descongelado (Cuadro 2) mostraron un porcentaje de motilidad menor en los dos diluyentes experimentales respecto a los controles ($P < 0.05$), mientras que en el porcentaje de viabilidad espermática no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre los diluyentes control y experimentales, al igual que los resultados obtenidos por Pillet et al., en 2012 al emplear liposomas comerciales con una concentración del 4% en semen de caballo⁴.

Cuadro 2. Efecto sobre motilidad y viabilidad

Diluyente	Motilidad (%)	Viabilidad (%)
Trehalosa (300 mM)	21.8750 ± 1.3457	26.9333 ± 1.7048
Androstar Cryoplus	23.3333 ± 1.666 ^a	23.166 ± 1.8518
Liposomas cargados	14.8077 ± 1.7092 ^b	19.6846 ± 2.9589
Liposomas vacíos	16.1538 ± 3.3447 ^b	21.5615 ± 3.6591

*Los valores representan la media ± error estándar

^a Literales diferentes por columna indican diferencia ($P < 0.05$).

* Variable motilidad = Kruskal Wallis; * Variable viabilidad = Tukey.

Conclusión

El grupo 3 mantuvo la viabilidad sin diferencias significativas a la del grupo control, pero no la motilidad. En vista del resultado del grupo 1, se sugiere ensayar otras concentraciones de trehalosa para mejorar la motilidad al descongelado.

Referencias

- Costa Morato, D et al. Biochim Biophys Acta.2008.1408-1411.
- Gutiérrez, O et al. Cryobiology.2009.287-292.
- Linares, MA et al. J. Ocul Pharmacol Ther.2016.11-22.
- Pillet, E et al. Theriogenology.2012.268-279.

