

# VALORACIÓN DEL ESTADO FUNCIONAL AL POS DESCONGELAMIENTO EN ESPERMATOZOIDES DE PORCINO TRATADOS CON TREHALOSA INTRACELULAR.

## CONACYT CB 169861

Ortega-Castro M.<sup>1\*</sup>, Barrientos-Morales, M.<sup>1\*</sup>, Domínguez-Mancera B.<sup>1</sup>, Hernández A.<sup>1</sup> Cervantes P.<sup>1</sup> Absalón-Medina V.<sup>2</sup>  
 1.Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UV. 2. University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine, New Bolton Center  
**Palabras Clave:** Trehalosa, espermatozoides, Estreptolisina O, motilidad, viabilidad  
 \*mbarrientos@uv.mx

### Introducción

La trehalosa es un azúcar presente en el cornezuelo del centeno, se ha demostrado que es capaz de proteger, estabilizar la estructura y la función de las enzimas, así como la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo; por lo tanto, la trehalosa ha sido utilizada como un crioprotector para espermatozoides por lo que sería importante valorar la factibilidad, de introducir ésta y determinar el efecto que causa en funcionalidad de la célula espermática. Un método que podría ser útil para lograr lo anterior es la incubación en Estreptolisina O (SLO), que ha demostrado ser un excelente permeabilizador de membrana plasmática y como consecuencia permitiría el paso del disacárido hacia el interior del gameto. El objetivo del presente estudio es determinar la concentración de Trehalosa necesaria para introducir y mantener el estado funcional pos congelamiento.

### Materiales y Métodos

El estudio se realizó en los laboratorios de Biología de la Reproducción de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Veracruzana. Se trabajaron 15 eyaculados de 4 verracos, obtenidos mediante la técnica de la mano enguantada. Los criterios de inclusión de los eyaculados fueron: motilidad en masa  $\geq 4$  y motilidad individual  $\geq 70\%$ . Se diluyeron y refrigeraron a 16°C durante 24 horas. Posterior a esto se incubó con SLO (0.6 UI), al mismo tiempo, se expusieron en trehalosa en 3 diferentes concentraciones (100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  y un grupo control) durante 5 minutos a 37°C, posteriormente se sellaron los poros usando suero fetal bovino. Después de esto se congelaron mediante la técnica de Westendorf. La valoración de la motilidad se hizo mediante microscopio óptico y la valoración del estado acrosomal se realizó con la tinción de Clortetraclina (CTC) mediante microscopía de fluorescencia.

### Resultados y Discusión

En el cuadro 1 se observa el efecto de la concentración de Trehalosa sobre el estado acrosomal, se muestra el porcentaje de espermatozoides sin capacitar siendo el tratamiento de 200  $\mu\text{M}$  el que presenta el promedio más alto con  $16.86 \pm 5.27$  ( $p < 0.05$ ), por el contrario, es el tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  con mayor porcentaje de espermatozoides capacitados/ con reacción acrosomal con  $74.21 \pm 9.16$  ( $p < 0.05$ ), a diferencia a lo reportado por Hu *et al.*, 2008 en donde reporta una integridad acrosomal de 66.48% en gametos de cerdo para la cual se utilizó otra técnica de fluorescencia.

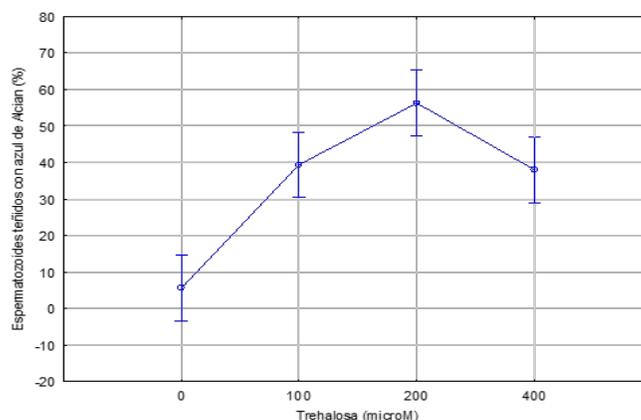
**Cuadro 1.** Efecto de la concentración de Trehalosa sobre el estado de capacitación y reacción acrosomal.

Tratamiento	Sin capacitar	Capacitado/sin reacción acrosomal	Capacitado/con reacción acrosomal
Control	$17.12 \pm 6.28^b$	$8.50 \pm 5.76^a$	$74.21 \pm 9.16$
100 $\mu\text{M}$	$8.68 \pm 3.96^a$	$7.92 \pm 5.32^a$	$86.68 \pm 20.45$
200 $\mu\text{M}$	$16.86 \pm 5.27^b$	$11.10 \pm 7.43^{ab}$	$72.09 \pm 9.85$
400 $\mu\text{M}$	$8.48 \pm 4.29^a$	$9.42 \pm 7.36^{ab}$	$81.56 \pm 9.00$

<sup>a,b</sup>, literales diferentes entre fila de la misma columna son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

En la figura 1 se observa el porcentaje de espermatozoides teñidos con azul de alcian. Con esta técnica, McKinney, 1953 logra determinar la presencia de carbohidratos intracelulares en bacterias. El tratamiento que presentó el mayor número de células con trehalosa intracelular (teñidos de azul) fue el de 200  $\mu\text{M}$ , ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Porcentaje de espermatozoides con trehalosa intracitoplasmática



### Conclusión

La incubación en SLO y trehalosa fue capaz de introducir de trehalosa al compartimiento intracitoplasmática de la célula espermática, sin embargo, la penetración del disacárido no mejora el estado funcional posdescongelamiento en semen de porcino.

### Referencias

- Gutiérrez. O., Juárez M.L., Uribe C.S, Trujillo O.M. 2009 Cryobiology. 58: 287-292
- Hu J.H., Li Q.W., Li G., Jiang Z.L., Bu S.H., Yang H., Wang L.Q. 2009. Animal Reproduction Science, 112:107-118
- McKinney R. E. 1953. Southwest Foundation for Research and education, San Antonio, Texas.
- Yamamoto I., Hisashi K., Yoriko T., Akira T. 2001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (12), 2682- 2689.