

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama  
pacos*)**

**TESIS**

para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular

**AUTORA**

**Nadia Milagro Canorio Pariona**

**Lima-Perú**

**2008**

El presente trabajo ha sido desarrollado enteramente en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente quisiera agradecer a mis padres: Javier y Redina, hermanos y hermanas: Elvia , Ricardo, Marco, Roberto y Mary; quienes con su inmenso apoyo, comprensión, ejemplo y profundo amor forjaron mi carrera y me incentivaron a seguir desarrollándome profesionalmente en este mundo de la ciencia.

Así mismo quisiera agradecer a mi querida Bianca quien es el motor que impulsa mi carrera y mi vida, a su padre Fernando quien siempre nos ha dado su amor, apoyo y lo mejor para nosotras.

A mis queridos amigos: Claudia V., Evelyn, Luis, Alejandro, Maycoll, Lidia , Julio, Claudia F., Pedro , Ricardo y profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas quienes siempre fueron parte muy importante para el desarrollo del trabajo.

El presente trabajo ha sido desarrollado enteramente en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por ello quisiera agradecer a la responsable de dicho laboratorio, MsSc. Martha Valdivia Cuya, quien me brindó la oportunidad de poder ingresar y pertenecer al maravilloso mundo de la investigación, así mismo por inculcarme el deseo de estudiar a una especie de mucha importancia para nuestro país y permitirme formar parte de su maravilloso e importante grupo de investigación.

Quisiera agradecer a las fuentes de apoyo que financiaron el desarrollo del trabajo, organizaciones como la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS, siglas en inglés) y el Centro Internacional para el Estudio de la Biotecnología e Ingeniería Genética (ICGEB), quienes brindan el apoyo a las investigaciones que realiza el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal.

Un especial agradecimiento al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), quienes me brindaron el financiamiento para poder estudiar la carrera de Postgrado y terminar satisfactoriamente el presente trabajo de investigación, así mismo es el ente encargado de apoyar y financiar investigaciones de mucha importancia para nuestro país.

Agradecer a los fondos PROCOM financiados por el Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), especialmente por el financiamiento del proyecto titulado “Búsqueda de marcadores diagnóstico de fertilidad en alpacas macho”, lo cual permitió mi participación como Co-investigador y facilitó la culminación del presente trabajo.

## CONTENIDO

Agradecimientos	III
Resumen	VI
Summary	VIII
Contenido	IX
Abreviaturas	XIV
I.-Introducción	1
II.-Revisión Literaria	4
1.-Los camélidos sudamericanos: La Alpaca ( <i>Lama pacos</i> )	4
1.1.-Problemática en el campo de la reproducción	6
2.-El espermatozoide:	7
2.1.-Evaluación del estado de los espermatozoides :	12
3.-Fosforilacion en residuos de tirosina de ciertas proteínas y el proceso de capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides	14
3.1.-La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina	14
3.2.-Capacitación:	15
3.3.-La fosforilación de proteínas y la capacitación	17
3.4.-La reacción acrosomal	19
3.5.-La fosforilación de proteínas y la reacción acrosomal	20
4.-Criopreservacion de espermatozoides	22
4.1.-Efecto del proceso de criopreservación sobre la movilidad	25

4.2.-Efecto de la criopreservación sobre la membrana plasmática	27
4.3.-Efecto de la criopreservación sobre el acrosoma	27
5.-Criocapacitacion o capacitación inducida por el proceso de criopreservación	28
III.-Materiales	32
3.1.-Material biológico	32
3.2.-Material químico: reactivos	32
3.3.-Material de vidrio, plástico	35
3.4.-Equipos	35
IV.-Metodología	36
4.1.-Diseño experimental	36
4.2.-Colección de la muestra	36
4.3.-Medicion de la concentración	37
4.4.-Ensayo de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática	37
4.5.-Proceso de criopreservación de espermatozoides.	39
4.6.-Proceso de capacitación	40
4.7.-Estudio de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina	41
4.8.-Estudio del estado del sistema Proacrosina/acrosina	43
4.9.-Estudio de la capacidad de unión a zona pelúcida	45
4.10.-Análisis estadístico	46
V.-Resultados	47
5.1.-Resultados de concentración, viabilidad, movilidad y estado de la membrana plasmática iniciales.	47

5.2.-Resultados de viabilidad, movilidad y estado de la membrana plasmática después del proceso de criopreservación	48
5.3.-Resultados de viabilidad, movilidad y estado de la membrana plasmática después del proceso de capacitación	49
5.4.-Estado de las fosforilaciones en residuos de tirosina	50
5.5.-Estado funcional del sistema Proacrosina/acrosina	53
5.6.-Capacidad de unión a zona pelúcida	55
V.-Conclusiones	58
VI.-Referencias bibliográficas	59
VIII.-Anexo	74
Fotos	74
Foto 1: Colección de la muestra	74
Foto 2: Parámetros de análisis: Viabilidad e integridad de membrana	75
Foto 3: Proceso de Criopreservación	76
Foto 4: Patrón electroforético de proteínas de membrana	77
Foto 5: Identificación de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina por Western Blot	78
Foto 6: Patrón de Inmunofluorescencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.	79
Foto 7: Identificación del estado del Sistema Proacrosina-Acrosina	80
Foto 8: Prueba de unión a Zona Pelúcida	81
Figuras	82
Figura 1: Diferencias encontradas entre los porcentajes de movilidad , viabilidad e integridad de membrana plasmática entre los espermatozoides frescos , capacitados y criopreservados	82

Figura 2:	Resultados de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática obtenidos después del proceso de descongelamiento cuando se uso el agente crioprotector Dimetilsulfoxido a las concentraciones de 0.5M , 0.25M y 0.125M.	83
Figura 3:	Resultados de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática obtenidos después del proceso de descongelamiento cuando se uso el agente crioprotector Dimetilacetamida a las concentraciones de 0.75M , 0.37M y 0.18M.	84
Figura 4:	Diferencias encontradas en el número de espermatozoides que presentaban fluorescencia positiva para el anticuerpo 4G10 en la región de la cabeza.	85
Figura 5:	Diferencias encontradas entre el número de espermatozoides unidos a la zona pellucida entre espermatozoides capacitados In Vitro y espermatozoides criopreservados, las evaluaciones fueron realizadas en intervalos de tiempo de treinta minutos, hasta completar un periodo total de ciento veinte minutos.	86
Tablas		87
Tabla 1	Resultados obtenidos de las muestras frescas iniciales	87
Tabla 2	Resultados obtenidos después del proceso de descongelamiento	88
Tabla 3	Resultados obtenidos después del proceso de capacitación	89
Tabla 4	Resultados obtenidos de la Inmunolocalización de proteínas	90

	fosforiladas	
Tabla	Resultados obtenidos de la capacidad de unión a zona pellucida	90
Análisis	estadístico	91

## ABREVIATURAS

- ACP. Agente crioprotector
- HAM F10. Medio HAM F10
- DPBS. Medio Buffer Fosfato Salino Dulbecco`s
- PBS. Buffer fosfato salino
- DMSO. Dimetilsulfóxido
- DMA. Dimetilacetamida
- NaCl. Cloruro de sodio
- HCl. Ácido clorhídrico
- BSA. Albúmina sérica bovina
- Min. Minuto (s)
- KDa. Kilodaltons
- RPM. Revoluciones por minuto
- mOsm. Miliosmoles

## RESUMEN

El proceso de criopreservación de espermatozoides es ampliamente usado en los programas de reproducción asistida y de mejora genética de diversas especies. La alpaca es una especie doméstica de importancia económica en nuestro país. Existen diversas técnicas para el manejo de esta especie con la finalidad de realizar un programa de mejora genética. En el caso de la criopreservación de espermatozoides, se ha trabajado tanto con espermatozoides de semen y de epidídimo, siendo más factible para el presente trabajo el uso de espermatozoides del epidídimo.

Una característica que presentan los espermatozoides criopreservados en la mayoría de especies es una alteración a nivel de la membrana plasmática la cual conlleva a una reacción del acrosoma prematura, así como el descenso de la movilidad, provocando que el tiempo de vitalidad de estos espermatozoides sea muy reducido, todas estas alteraciones son producto de un tipo especial de capacitación llamada "Criocapacitación" que hasta la fecha, la posible causa, no ha sido definida. El objetivo de este estudio fue demostrar la presencia de un estado de Criocapacitación en espermatozoides criopreservados de alpaca, estudiando principalmente la movilidad, viabilidad, estabilidad de la membrana plasmática, el patrón de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, el estado del sistema Proacrosina-Acrosina y la capacidad de unión a zona pelúcida que tienen estos espermatozoides a diferencia de lo que presentan espermatozoides capacitados *in vitro*.

Los resultados indican que la criopreservación afecta directamente la movilidad, viabilidad e integridad de membrana acrosomal, mostrando que tanto

espermatozoides capacitados y criopreservados ofrecen un mismo patrón de proteínas fosforiladas, y que los espermatozoides criopreservados presentan una mayor cantidad de enzima activa (Acrosina) en la región del acrosoma.

## SUMMARY

The process of sperm cryopreservation is widely used in the programs of assisted reproduction and genetic improvement of many species. The alpaca is a domestic species of economic importance in our country. There are many techniques for managing this species in order to carry out a genetic improvement program. For the cryopreservation of sperm, samples of sperm from semen and epididymis have been used, being more feasible for the present study the use of sperm from the epididymis.

One feature present in the cryopreserved sperm in most species is a disturbance at the plasma membrane which leads to a premature acrosome reaction, as well as declining mobility, making the lifetime of the sperm very small. All these changes are the result of a special type of process called "Cryocapacitation" that so far, the possible cause, has not been defined. The aim of this study was to demonstrate the presence of a state of cryocapacitation on Alapaca's cryopreserved spermatozoa, studying mainly mobility, viability and stability of the plasma membrane, the pattern of proteins phosphorylated in tyrosine residues, the state of Proacrosin-Acrosin system and the ability of binding to pellucida zone that have these cryopreserved sperm and compare these results with those from capacitated *in vitro* sperm.

The results indicate that cryopreservation directly affects mobility, viability and integrity of acrosomal membrane, showing that both capacitated *in vitro* and cryopreserved sperm offered the same pattern of proteins phosphorylated in tyrosine residues and that cryopreserved sperm has an increment of active enzyme (Acrosin) in the acrosome region.

## I.-INTRODUCCIÓN

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar un ovocito maduro, necesita alcanzar el estado de capacitación que le permita dicho fin, el proceso de capacitación está muy relacionado con procesos de fosforilación en residuos de tirosina de ciertas proteínas conllevando a la generación de señales intracelulares resultando en la adquisición de una hiperactividad notable en el movimiento, el influjo de calcio y la reacción del acrosoma con la subsecuente activación del sistema proacrosina/acrosina, el cual le permitirá atravesar la zona pelúcida y penetrar al ovocito.

El proceso de capacitación ocurre normalmente dentro del tracto femenino donde se encuentran ciertos agentes llamados capacitantes que cumplen la función de activar la maquinaria molecular que conlleva al estado de capacitación. En condiciones *in vitro*, el proceso de capacitación es logrado a través del uso apropiado de medios de cultivo suplementados con sustancias capacitantes como albumina sérica bovina (BSA) y heparina que son los activadores de la maquinaria molecular que conllevan al estado de capacitación; también se requiere de un tiempo determinado y temperatura ideal, las cuales son especie específica.

Los espermatozoides de diversas especies que sufren un proceso de criopreservación presentan un tiempo de vida ligeramente corto dentro del tracto femenino cuando son usados en los procesos de inseminación artificial resultando en tasas de preñez reducida si se compara con las tasas alcanzadas con espermatozoides frescos, en condiciones de laboratorio el tiempo de viabilidad se ve afectado cuando son usados en los programas de fecundación *in vitro*.

En espermatozoides criopreservados de especies como: caballo, toro, mono, cerdo y bovino se ha comprobado que ocurre un evento similar al fenómeno de capacitación, la cual ha sido denominada criocapacitación o "Capacitación Influenciada por el proceso de criopreservación" la cual influiría directamente con la longevidad y estado funcional de dichos espermatozoides.

La alpaca (*Lama pacos*) es una especie muy apreciada tanto en el plano económico como en el genético, pero todavía no se cuenta con estudios suficientes sobre el proceso de capacitación normal y más aun, se conoce poco sobre la maquinaria molecular que conlleva a dicho estado funcional. Podemos mencionar que el proceso de criopreservación que es una herramienta de preservación de materiales genéticos ricos y preciados como el de la alpaca, es tema central de varios proyectos de investigación, cuyos resultados no son tan gratos principalmente para el poblador altoandino quien es criador de esta especie, afectando negativamente los éxitos de las inseminaciones artificiales así como de las fecundaciones *in vitro*. Probablemente debido a que ocurre un proceso de criocapacitación (Capacitación prematura activada por el proceso de criopreservación) el cual produce alteraciones a nivel de membrana plasmática del espermatozoide y fosforilaciones de proteínas a nivel de residuos de tirosina conllevando a la activación del sistema proacrosina/acrosina. Dichas alteraciones resultan en la reducción de la viabilidad de los espermatozoides criopreservados debido a su avanzado nivel de capacitación y que por ello estén propensos a interactuar y reaccionar espontáneamente frente a cualquier estímulo, no necesariamente el ovocito maduro.

El objetivo principal de este trabajo fue evidenciar el proceso de criocapacitación y su efecto directo sobre el sistema proacrosina/acrosina en los espermatozoides criopreservados de alpaca, lo cual influye directamente en las tasas de fecundación *in vitro* de las inseminaciones artificiales con espermatozoides criopreservados. Esto fue logrado a través del desarrollo de los objetivos específicos como: Análisis de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, evaluación del estado del sistema proacrosina/acrosina y estudio de la capacidad de unión de los espermatozoides a zona pelúcida de ovocitos homólogos.

## II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.-LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS: LA ALPACA (*Lama pacos*)

Los camélidos sudamericanos así como los camélidos del viejo mundo se clasifican taxonómicamente en el orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, y familia Camelidae. A nivel de grupo se dividen en Lamini y Camelini, y a nivel de género en Lama y Vicugna para animales del nuevo mundo y Camelus para los del viejo mundo.

Actualmente existen cuatro especies:

-Llama (*Lama glama*) denominado por Linnaeus, 1758

-Alpaca (*Lama pacos* o *Vicugna pacos*) denominado así por Linnaeus, 1758.

-Guanaco (*Lama guanicoe*) denominado por Müller (1776).

-Vicuña (*Lama vicugna*) denominado por Molina (1782) o *Vicugna vicugna* denominado por Miller (1924)

Los camélidos sudamericanos juegan un papel muy importante en tierras altas del Perú. Los principales productos que se derivan de los camélidos sudamericanos y del cual radica su importancia son:

1. La fibra, cuyas características singulares, principalmente en los casos de la Vicuña y la Alpaca, hacen que tengan en general una altísima cotización en el mercado nacional e internacional.
2. La carne, cuyo valor nutritivo es similar y en ciertos casos superior a otras carnes.
3. Las pieles y cueros, con múltiples usos industriales y artesanales.
4. El estiércol que se usa como fertilizante o como combustible.

5. Además la llama por su tamaño y fortaleza, se utiliza también como animal de carga y cumple un papel importante en el transporte en las áreas rurales carentes de vías de comunicación.

Todos los camélidos sudamericanos, presentan glándulas metatarsianas, labio leporino, organización social polígama, utilización de estercoleros, ausencia de significativo dimorfismo sexual y ovulación inducida con una sola cría por parto y por año.

En el Perú existen 2 especies silvestres de camélidos sudamericanos, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*), y 2 formas domesticadas, la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*). Los camélidos domésticos alpaca y llama derivarían de los silvestres vicuña y guanaco, las evidencias más directas que se tienen sobre el origen de los domésticos son restos de huesos, fibras y tejidos, procedentes de diferentes sitios arqueológicos donde ocurrió este proceso (1).

Asimismo tienen una vida productiva de aproximadamente 14 años, quedando aptos para la reproducción a los 2 años.

La alpaca es una especie que representa un factor importante de la economía de nuestro país, siendo el país con la mayor población de alpacas, que llega casi a los 3 millones de cabezas y por lo menos 1.5 millones de campesinos de más de 1,000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno, los que se dedican a la crianza de vicuñas, llamas y alpacas.

El Perú al poseer la mayor población mundial de alpacas, presenta dos variedades domesticadas: Suri y Huacaya.

-La raza Huacaya tiene fibra corta y rizada, y son la mayoría.

-La raza Suri vive casi exclusivamente en Puno y su población está declinando, por lo que corremos el riesgo de perder su fina y sedosa fibra de hasta 40 cm de largo.

Actualmente, debido a la falta de manejo, predominan las alpacas blancas y muchas alpacas manchadas. La pérdida de la finura de la fibra de alpaca debe resolverse con un manejo adecuado, en vista que el precio está en estrecha relación con su calidad.

Existen una serie de factores que influyen en la disminución de la calidad de la fibra de la alpaca, que se evidencian por el engrosamiento de la fibra y la pérdida de las tonalidades de color naturales debido al mal manejo y cruce descontrolado entre los diferentes individuos, reducción del número de individuos de la raza Suri, así mismo reducción en el número total de individuos debido a la exportación a otros países de individuos de alta calidad, falta de conocimiento sobre la genética y falta de manejo de los gametos en condiciones *in vitro*.

La crianza de alpacas es una actividad muy importante, sin embargo un mal manejo repercute en la economía, ecología y sociedad de los pueblos andinos, ya que pueden perder uno de sus ingresos económicos más importantes.

## **1.2.-Problemática en el campo de la Reproducción**

La fisiología reproductiva de las alpacas difiere de la de otros animales domésticos y queda pobremente entendida, por ello se busca establecer tecnologías para el manejo y preservación de sus gametos.

Poseen una estacionalidad reproductiva, incluyendo el apareamiento y el parto los cuales se producen durante los meses de Diciembre a Marzo, coincidiendo con los periodos de lluvias abundantes y presencia de forraje (2).

Las técnicas de reproducción asistida como la criopreservación de gametos y embriones son una herramienta clave para el manejo sostenible y estudio a nivel molecular del comportamiento de éstas células, con la finalidad de la producción, manejo y mejoramiento de esta especie.

En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides. Una alternativa que se ha presentado es el uso de espermatozoides del epidídimo ya que estos espermatozoides se encuentran en un nivel de maduración notable y su manejo en el laboratorio es muy satisfactorio. El uso de estos espermatozoides es principalmente para establecer un protocolo de preservación que sea manejable y el cual permita la obtención de espermatozoides post descongelamiento que presenten una alta tasa de fecundación.

## **2.-EL ESPERMATOZOIDE**

Durante la maduración final del espermatozoide en el epidídimo los espermatozoides experimentan cambios en su maduración, que se presentan durante 10 a 15 días a través de su paso por el epidídimo donde se llevan a cabo los cambios metabólicos y estructurales, siendo principalmente la cola del epidídimo su lugar de depósito natural. En este sitio se concentran, debido a la

enorme resorción del líquido testicular, y se ha calculado la relación espermatozoide / plasma que es de 1:1 en la cabeza del epidídimo y en la región de la cola es de 70: 1.

Los cambios de madurez en el espermatozoide dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte. Uno de los cambios más notorios del espermatozoide durante la maduración epididimaria es el desarrollo de la movilidad espermática, la inhabilitación del espermatozoide para moverse es debida al menos en parte a la inmadurez de la membrana plasmática del espermatozoide. Durante la maduración epididimaria, los lípidos de membrana sufren cambios físicos y químicos lo que influye en el patrón de distribución de proteínas intramembrana (glicoproteínas), siendo un factor importante la presencia de altas cantidades de colesterol en el epidídimo las cuales estabilizan la membrana del espermatozoide.

El factor descapacitante aislado del fluido epididimario tiene la propiedad de estabilizar y proteger los espermatozoides hasta que sufra la capacitación y la reacción acrosomal en el tracto femenino. Una de las acciones conocidas es la inhibición de las enzimas acrosomales como en el sistema Proacrosina/Acrosina entre otras.

La maduración espermática es uno de los tres acontecimientos que debe experimentar el espermatozoide antes de que se realice la fecundación, siendo la capacitación y la reacción del acrosoma los otros dos hechos necesarios para la fusión entre espermatozoide y óvulo.

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por

la membrana plasmática. El acrosoma, es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal.

El acrosoma espermático.- Es un saco membranoso de doble pared, íntimamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de su formación, se origina del complejo de Golgi, contiene varias enzimas hidrolíticas, como el sistema proacrosina/acrosina, hialuronidasa esterasa e hidrolasas ácidas, que intervienen en el proceso de fecundación (3). El segmento ecuatorial del acrosoma junto con la porción anterior de la región post acrosómica son importantes ya que son las que inicialmente se unen con la membrana del ovocito durante la fecundación.

Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan para descargar el contenido acrosomal (3).

La forma del acrosoma y el tamaño varía entre especies (4). El acrosoma es la única organela del espermatozoide que es requerida para el proceso de fertilización (5). Múltiples enzimas están presentes en su interior, incluyendo muchas hidrolasas ácidas comúnmente encontradas en lisosomas y otras enzimas específicas de las células espermatogénicas. Durante la reacción acrosomal su contenido se libera por exocitosis mediada por calcio en respuesta a señales específicas (3,6). Luego de la liberación y activación de enzimas acrosomales, los espermatozoides penetran la zona pelúcida

alrededor del ovocito, un proceso que puede ser bloqueado con el uso de inhibidores de proteasas (7, 8).

El mejor constituyente caracterizado del acrosoma es el sistema proacrosina/acrosina, un miembro de la superfamilia de las serinaproteasas que es expresada en células espermatozoides. La proacrosina es el precursor de la enzima proteolítica, la acrosina, que está involucrada en la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. Esta proteasa tipo tripsina difiere de enzimas similares de otros tejidos tanto en peso molecular como en especificidad a ciertos sustratos e inhibidores (9,10). La secuencia de nucleótidos ha sido determinada para la proacrosina de espermatozoides de toro (11), humano (12), verraco (13), ratón (14, 15 ) y rata (16). La secuencia de aminoácidos deducidos indica que la proacrosina contiene dos dominios con marcada homología con otras serina proteasas y un dominio terminal COOH que es propio de la familia (13,17).

El dominio I, el dominio cimógeno, contiene una secuencia señal y una porción de la cadena ligera de la enzima activa. Durante la activación del precursor, la cadena liviana es cortada de la cadena grande, entre una arginina en la posición 23 y una valina en la posición 24, pero se mantiene unida a la cadena pesada por dos puentes disulfuro.

El dominio II, el dominio catalítico, contiene residuos de sitios activos conservados (histidina, aspartato y serina en la posición 70, 124 y 222) y dos sitios de glicosilación de unión a asparagina. Una región de unión a carbohidrato que juega un rol en la unión de espermatozoides a la zona pelúcida ha sido identificada en el dominio catalítico de la proacrosina de toro (17).

El dominio III, en el COOH terminal de la proacrosina es un segmento rico en prolina que es menos conservado entre las especies y no está presente en otras serina proteasas.

Estudios de inmunolocalización sugieren que la proacrosina está presente principalmente en la región anterior del acrosoma en espermatozoides humanos, verraco, toro, conejo (18, 19, 20), pero ha sido también identificada en la membrana interior de la membrana acrosomal (20).

La conversión de proacrosina desde zimógeno inactivo a enzima activa ocurriría durante la reacción del acrosoma (21, 22).

La acrosina es una de las hidrolasa liberada como consecuencia de la reacción acrosomal, es una serina proteasa de aproximadamente 32 KDa, tiene muchas propiedades en común con la tripsina pancreática. Esta inicialmente presente en el acrosoma como un zimógeno inactivo enzimáticamente, es decir la proacrosina. La acrosina es responsable de la proteólisis de la matriz glicoproteica de la zona pelúcida del ovocito, lo cual facilita la penetración del espermatozoide durante el proceso de fertilización. Recientes descubrimientos indican que el sistema proacrosina/acrosina de verraco también posee la capacidad de unión a ciertos grupos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas de la zona pelúcida, así como a glicoproteínas con residuos de L-fucosa y D-manosa, sugiriendo un importante rol del sistema proacrosina/acrosina en la fase de reconocimiento del espermatozoide y ovocito durante las fases iniciales de la fertilización (13).

Además, inhibidores de acrosina están presentes en el interior del acrosoma y en el plasma seminal (23).

### **2.1.-Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides:**

El éxito de las inseminaciones artificiales y los procesos de fertilización *in vitro* tienen enormes repercusiones tanto económicas como biológicas y depende tanto de la calidad como de la cantidad de espermatozoides depositados en el tracto reproductivo de la hembra.

La estimación de la calidad o de la evaluación de espermatozoides requiere la contrastación y correlación con datos de viabilidad, parámetros de motilidad espermática, morfología celular y grado de integridad celular (especialmente del acrosoma).

El desarrollo de pruebas de laboratorio que puedan anticipar de forma precisa el poder fecundante de los espermatozoides en las especies domésticas y salvajes ha sido un gran reto para los investigadores dedicados a las tecnologías reproductivas.

La evaluación de los parámetros fisiológicos y morfológicos que presentan los espermatozoides es fundamental, ya que proporciona criterios sobre el destino de las muestras, su forma de conservación y su forma de aplicación.

Hoy en día no existe un método universal que pueda predecir la fertilidad de las muestras de espermatozoides. El objetivo de las pruebas de valoración *in vitro* es determinar cuántos espermatozoides son funcionalmente competentes para alcanzar el proceso de fertilización con éxito.

La evaluación rutinaria incluye: determinación de la movilidad, viabilidad e integridad acrosómica y de membrana plasmática.

Determinación de la viabilidad: Se han usado una variedad de métodos para poder distinguir espermatozoides vivos de muertos, tales como la tinción con

eosina Y y nigrosina (24), o las sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (25, 26). Siendo la usada rutinariamente la técnica de coloración con Eosina Y.

Valoración de la Movilidad: La movilidad espermática se considera el primer parámetro de calidad ya que el transporte espermático en el tracto femenino y la capacidad de penetración del ovocito, dependen en gran medida de este parámetro.

Sin embargo, la movilidad no es sinónimo de capacidad fecundante ya que refleja únicamente una de las funciones del espermatozoide, que es la actividad flagelar, mientras que otras estructuras espermáticas (acrosoma, membrana espermática) también intervienen en el proceso de la fertilización. Por tanto, a pesar de ser indispensable para la fertilización, no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, debido fundamentalmente a la valoración subjetiva de dicho parámetro, por lo que su correlación con la fertilidad oscila entre valores que van de 0 a 0,6 (27)

Determinación de la integridad de membrana: El test de endósmosis inicialmente fue descrito como un test de funcionalidad, sin embargo, hoy se considera un test de integridad de membrana.

Presenta una elevada correlación con los test de penetración, aunque ha de considerarse únicamente como un aspecto adicional de la viabilidad espermática, ya que valora la capacidad osmorreguladora del espermatozoide, un aspecto de la integridad funcional de la membrana.

Se basa en la capacidad de los espermatozoides de resistir un estrés hiposmótico moderado. Los espermatozoides cuya membrana no está intacta en toda su longitud, son incapaces de reaccionar al medio e hincharse. Además los espermatozoides inmóviles que mantienen su membrana intacta o aquellos envejecidos con poca capacidad de osmorregulación, muestran un hinchamiento incontrolado que provoca de forma rápida la rotura de la membrana sobre distendida. Por tanto, el porcentaje de espermatozoides que muestran hinchamiento en estas condiciones de test, se considera la fracción con buena capacidad de osmorregulación (28).

Finalmente, existen métodos para distinguir en una misma preparación la viabilidad de las células y su integridad morfológica (29).

Los resultados de estos análisis pueden ser la base para tomar decisiones importantes relacionadas con la aplicación de las técnicas de reproducción asistida.

### **3.-FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA Y EL PROCESO DE CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES**

#### **3.1.-La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina**

La fosforilación de ciertas proteínas es un proceso post traduccional de la síntesis de proteínas lo cual le permite a las células poder controlar ciertas vías metabólicas o actividades intracelulares. En células eucariotas las fosforilaciones pueden ocurrir en residuos de serina, treonina y en reducido

número en residuos de tirosina, el estado de fosforilación de ciertas fosfoproteínas está regulado por quinasas y fosfatasas.

La fosforilación de proteínas juega un rol importante en la regulación de numerosas actividades celulares. Las proteína quinasas, cuyos blancos específicos de fosforilación modulan su función, y las proteína-fosfatasas, las cuales desfosforilan las moléculas, controlan la fosforilación de las proteínas.

Son agrupadas en tres grandes grupos

- Las serina-treonina quinasas es el grupo mayor de proteína quinasas que catalizan la adición del grupo fosfato en los aminoácidos serina y treonina de un sustrato proteico. Incluyen entre otras a la proteína quinasa A dependiente de AMPc, quinasas reguladoras del calcio y calmodulina, y proteína quinasas activadas por fosfolípidos.
- Las tirosina quinasa, son un segundo grupo de quinasas que fosforilan en residuos de tirosina, esta clase de quinasas son importantes, y es un grupo mucho más pequeño que las serina-treonina quinasas, sin embargo, las tirosina proteína quinasas son importantes mediadores de diversas reacciones biológicas (30), por ejemplo la función de varios factores de crecimiento (31).
- Una tercera clase de proteína quinasas ha sido recientemente caracterizada y es capaz de fosforilar ambos grupos, tirosina y serina-treonina, son las proteína quinasas de especificidad dual (32)

### **3.2.-La Capacitación**

Chang y Austin en 1951 (33,34) observaron por primera vez que el espermatozoide debe permanecer dentro del aparato reproductor femenino

antes de estar en condiciones de unirse y penetrar el óvulo. A este proceso se le denominó capacitación del espermatozoide y parece que el principal sitio de la capacitación es el oviducto, específicamente la región ístmica.

La capacitación de espermatozoides ha sido descrita como un complejo de eventos que ocurren a nivel de membrana e intracelularmente y que ocurren *in situ* dentro del tracto femenino, siendo un requisito para que se lleve a cabo la reacción acrosómica y de esta forma se produzca la fertilización (35).

La capacitación involucra eventos de la membrana plasmática que permiten un incremento del influjo de calcio celular, fusión y vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa y pérdida de las proteínas de la matriz acrosomal, el cual se llama reacción acrosomal, el proceso de capacitación está muy relacionado con cambios en el metabolismo de AMPc y fosforilación de residuos de tirosina en diversas proteínas de membrana (36).

La capacitación ocurre tanto *in vivo* en el tracto femenino, como *in vitro* empleando medios de cultivo especiales.

Se ha realizado la capacitación *in vitro* de espermatozoides de diversas especies de animales, especialmente en los mamíferos; pero cada uno de ellos necesita condiciones adecuadas como una determinada temperatura de incubación, un medio de cultivo adecuado, un tiempo de capacitación que le permita alcanzar dicho fin y la presencia de sustancias capacitantes que cumplen la función de activar la maquinaria molecular intracelular que conlleva al estado de capacitación.

En la especie Alpaca, se ha visto que el proceso de capacitación es logrado a través de la incubación de los espermatozoides en medios especiales como el medio Ham F10, el cual es rico en nutrientes, usando una concentración de

4mg/ml de albúmina sérica bovina como agente capacitante, el cual tiene como función la remoción de colesterol provocando cambios en la fluidez de la membrana lo cual está muy relacionado con la capacitación, siendo de tres horas el tiempo requerido para el proceso de capacitación que se realiza en incubación bajo condiciones de laboratorio (37, 38).

### **3.3.-Fosforilacion en Residuos de tirosina de espermatozoides capacitados**

Los espermatozoides como células altamente especializadas poseen un mecanismo totalmente único y diferente, ya que son células transcripcionalmente inactivas e incapaces de sintetizar nuevas proteínas, por ello es muy posible argumentar la relación del estado maduro de los espermatozoides con el estado de los procesos de fosforilación como medio de alterar su función, las cuales están estrechamente relacionadas.

Durante la fertilización, existen procesos intracelulares que regulan los diferentes mecanismos que conllevan al éxito de la misma, los cuales están relacionados con la activación de la fosforilación de ciertas proteínas en residuos de tirosina, regulando ciertas funciones del espermatozoide, como la movilidad (39, 40) y el reconocimiento de la zona pelúcida (41, 42).

La capacitación en los mamíferos es probablemente mediada por la fosforilación de proteínas. Entre las especies estudiadas como ratón (35, 36), humano (43, 44), bovino (45, 46), porcino (47, 48), hámster (49) y gato (50); la capacitación y los cambios en la movilidad parecen estar asociados con la fosforilación de proteínas espermáticas en una manera proteína quinasa A

dependiente y varias vías específicas de transducción de señal probablemente estén involucradas durante la capacitación espermática (51, 52, 36) , aunque las enzimas (quinasas y fosfatasa) y las proteínas sustrato implicadas aun no han sido totalmente caracterizadas .

Los estudios de las proteínas fosforiladas en espermatozoides han sido estudiadas en poblaciones de espermatozoides capacitados y después de la reacción acrosómica, mediante las técnicas de western blot, esto ha sido facilitado últimamente por el uso de anticuerpos monoclonales específicos que reconocen este tipo de proteínas, siendo aun un gran reto el poder dilucidar el patrón de proteínas fosforiladas en espermatozoides capaces de fecundar un ovocito.

La identificación del sitio en el cual una proteína en particular es fosforilada es importante para la identificación de la proteína quinasa fisiológicamente relevante involucrada en una vía en particular. Además, se han realizado estudios de mutagénesis sitio dirigidas para entender la función de una fosfoproteína (53).

La determinación de sitios individuales de fosforilación *in vivo* frecuentemente requiere la purificación o por lo menos la identificación de dichas proteínas. Es importante determinar cuáles sitios son fosforilados en respuesta a un estímulo en particular .La evaluación de la fosforilación diferencial, contribuye con el conocimiento de la secuencia fosforilada, permitiendo de esta manera poder entender los mecanismos y vías de señalización intracelular.

La inmunolocalización indirecta de las proteínas fosforiladas apoya el hecho de que se produce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación en espermatozoides de cerdo (53). Las proteínas fosforiladas en

residuos de tirosina fueron relocalizadas durante la capacitación en la zona media del acrosoma, la cual se relaciona con la fosforilación de proteínas en la capacitación y la reacción acrosómica. Experimentos previos de inmunofluorescencia indirecta revelaron la presencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en la pieza media y pieza principal de espermatozoides capacitados de ratón y de humano, con marcaje insignificante en la cabeza. En el caso de espermatozoides capacitados de cerdo (53), sin embargo, se observó solo una débil señal en la pieza media. Las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de espermatozoides de ratón y de humano están asociadas a la vaina fibrosa, sugiriendo que ellos pueden estar implicados con la movilidad hiperactiva, la cual está asociada con la capacitación. En contraste, la ausencia de marcaje en el flagelo del espermatozoide de cerdo tiende a sustentar la importancia de estas proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en la capacitación y/o reacción acrosómica. En el caso de espermatozoides permeabilizados, los espermatozoides muestran una redistribución de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en el acrosoma durante la capacitación, esta observación sugiere que estas proteínas llegan a estar asociadas con las membranas externas de la región acrosomal durante la capacitación.

#### **3.4.-La Reacción Acrosomal**

La reacción acrosomal es definida como una serie de eventos que involucran la exocitosis de los gránulos secretorios; dicha reacción ocurre de forma espontánea ya sea *in vitro* o *in vivo*. En general la proporción de espermatozoides capaces de inducir la reacción acrosomal disminuye, son

muchas las sustancias candidatas a inducir la reacción acrosomal que se presentan en el sitio de la fertilización. El fluido folicular, el cumulus y la zona pelúcida pueden inducir la reacción acrosomal. Son varias las moléculas bioactivas asociadas con el ovocito que se encuentran en la trompas de Falopio, incluyendo la progesterona, sulfato glicosaminoglicano (GAGS), albumina sérica, serotonina, prostaglandinas, ácidos insaturados y una variedad de enzimas.

La reacción acrosomal es un pre requisito para la penetración de la zona pelúcida por espermatozoides de mamíferos y es un fenómeno que ocurre posterior al proceso de capacitación. Durante la reacción acrosomal la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona y vesícula con la membrana acrosomal externa, como consecuencia de esto, un número de enzimas acrosomales son expuestas, entre ellas el sistema enzimático proacrosina/acrosina es activado, dando lugar a la activación de la enzima: La acrosina.

### **3.5.-Fosforilación de proteínas durante la reacción acrosomal**

Los espermatozoides son estructuras altamente polarizados, con la cabeza del espermatozoide evolucionado para realizar diversas funciones relacionadas como la interacción del ovocito y la producción de energía para la movilidad espermática.

La localización de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en el flagelo está relacionada con la hiperactividad durante la capacitación (55, 56, 57, 58, 59, 60, 61)

Sin embargo la fosforilación de proteínas en el tallo del espermatozoide no puede explicar la otra característica clave de la capacitación, la habilidad del espermatozoide de unirse o interactuar con la zona pelúcida y de realizar la reacción acrosomal.

Para poder entender la relación con la reacción acrosomal, es necesario conocer el mecanismo que regula el evento de exocitosis en el espermatozoide. Los homólogos de la proteína SNARE en el espermatozoide así como las proteínas asociadas a SNARE han sido detectados en espermatozoides de erizo de mar y en espermatozoides de mamífero (62). Estas observaciones apoyan la idea de que el acrosoma del espermatozoide puede ser regulado de manera similar al proceso de exocitosis en las células somáticas.

Se han identificado proteínas que son blanco de las fosforilaciones durante la capacitación (63), la mayoría de ellas son proteínas que median la fusión de las membranas de Golgi (64).

Más aun, un proceso de fusión de membranas así como el ensamblaje de un retículo endoplasmático transitorio *in vitro* requiere de la fosforilación de cierta proteína denominada VCP/p97. Esta proteína se localiza en el cuello del espermatozoide cuando éste no se encuentra capacitado, pero cuando ya está capacitado, por estudios de inmunofluorescencia se demostró que la fluorescencia en el cuello disminuye y esta proteína es ubicada en la cabeza del espermatozoide (63), por lo tanto se sugiere que la proteína VCP/p97 y la fosforilación en residuos de tirosina de esta proteína pueden tener un rol de nexo entre la capacitación y la reacción acrosomal.

La posibilidad de una relación entre la membrana plasmática, fosforilación a nivel de la misma y unión a zona pelúcida han sido demostrados en varias especies de mamíferos (48, 53), confirmando que el patrón de fosforilación que ocurre en la cabeza del espermatozoide es un requisito que facilita el reconocimiento a la zona pelúcida y confirmaría también el nivel de capacidad de fertilización de los espermatozoides.

Un estudio reportó la reducción de la unión a zona pelúcida cuando los espermatozoides vivos eran pre-incubados con un anticuerpo monoclonal anti fosfotirosina, sugiriendo que las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina pueden estar involucradas directamente en la adhesión de gametos (65).

#### **4.-CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

El proceso de criopreservación es una metodología aplicada en la reproducción asistida.

La criopreservación (congelar a altas temperaturas frías) de tejidos y células es una técnica que se ha utilizado desde 1700. Este proceso pone a las células en animación suspendida donde pueden retener su viabilidad y procesos metabólicos indefinidamente. En la práctica, las células congeladas son almacenadas a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido.

En 1776, Spallanzani (66) hizo el primer reporte del mantenimiento de la motilidad de espermatozoides humanos después de ser expuestos a bajas temperaturas.

A mitades de 1900, la ciencia de la criobiología mejoró rápidamente con el descubrimiento de los efectos de sustancias crioprotectoras las que se agregan a las soluciones heladas celulares, siendo Polge en 1949 (67) quien descubre la efectividad del glicerol como un agente crioprotector para espermatozoides de pavo y luego en espermatozoides de humano. Sherman en 1953 (68) reporta el congelamiento exitoso de espermatozoides humanos en hielo seco, los cuales fueron descongelados y usados para fertilizaciones *in vitro* dando origen así al primer éxito de fertilización *in vitro* con uso de espermatozoides congelados.

Con el pasar de los años, desde 1970 se dio inicio al crecimiento y desarrollo de las técnicas de criopreservación no solo de espermatozoides sino también de ovocitos y embriones. La criopreservación se usa ahora rutinariamente para guardar gametos, embriones y varios tipos de células y tejidos de animales y humanos.

Hoy en día se usan muchos protocolos en los cuales se trabajan con concentraciones variadas de agentes crioprotectores (ACPs), los cuales son clasificados en dos grandes grupos:

Agentes crioprotectores permeables: Como su mismo nombre lo indica, esta clase de agentes crioprotectores ingresan dentro de la célula ya que poseen un peso molecular relativamente bajo, y desde ahí ejercen un efecto directo sobre las células, la cual es la deshidratación, dentro de este grupo podemos mencionar a los siguientes agentes crioprotectores: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), el propilén glicol, dimetilacetamida (DMA) entre otros.

Agentes crioprotectores no permeables: Los cuales no ingresan dentro de la célula ya que son de peso molecular relativamente alto, y su efecto lo ejercen en el medio exterior ,ya que estos agentes crioprotectores mayormente son azúcares y favorecen la deshidratación celular. Dentro de este grupo se encuentran: glucosa, sacarosa, trealosa, fructosa.

Se han establecido las condiciones normales, las cuales han sido encontradas eficaces, para la criopreservación de espermatozoides de diversas especies. El uso de un apropiado protocolo de criopreservación en espermatozoides de mamífero logra mantener con éxito aproximadamente el 50% de supervivencia y un cierto grado de éxito en las fecundaciones *in vitro* la cual es menor si se compara con el éxito de los espermatozoides frescos o no congelados (69, 70). Para facilitar mejoras en la criopreservación de espermatozoides, se necesita comprender las propiedades criobiológicas fundamentales de estas células, incluso sus límites de tolerancia osmótica y la respuesta a la adición, remoción y penetración de agentes crioprotectores (ACPs), también cabe destacar la importancia del rango de congelamiento que se está usando.

Mientras que los ACPs son esenciales para la supervivencia celular durante la criopreservación, su adición y remoción subsiguiente crean un ambiente anisomótico para las células, produciendo cambios de volumen y daño osmótico potencial (71, 72).

Además de causar el daño osmótico, los ACPs pueden causar pérdida de la viabilidad celular debido a la toxicidad química.

La pérdida de motilidad del espermatozoide puede ser el resultado de la exposición prolongada a ACPs, y los espermatozoides de diversas especies varían en respuesta al tipo y exposición de los ACPs (73).

Se ha visto que, aunque es posible criopreservar espermatozoides y obtener crías a partir de una inseminación artificial, la supervivencia de los espermatozoides después de la criopreservación es muy limitada y requiere perfeccionamientos adicionales en la mayor parte de las especies (74).

En la especie Alpaca se ha venido trabajando con espermatozoides de epidídimo, evaluando el efecto de agentes crioprotectores permeables como el glicerol, Dimetilsulfoxido y Dimetilacetamida a diferentes concentraciones usando sistemas de congelamiento lento termocontrolado, observándose que el porcentaje de sobrevivencia era mayor cuando se usaba el agente crioprotector Dimetilacetamida (75, 76, 77, 78, 79)

#### **4.1.-Efecto de la criopreservación sobre la movilidad**

El espermatozoide como célula altamente especializada, presenta una serie de compartimentalizaciones muy relacionadas con la membrana plasmática y la membrana mitocondrial. Estas membranas deben retener un estado intacto y funcional que permita la competencia celular.

La proporción de espermatozoides descongelados funcionales es considerablemente reducida (80), la movilidad es uno de los parámetros seriamente afectados (81), es también un predictor fuerte de la habilidad de una muestra dada para llevar a cabo la fertilización *in vitro*. Todavía el mecanismo por el cual la movilidad es reducida no está totalmente elucidado.

La movilidad espermática es parcialmente dependiente de la función mitocondrial (82), las mitocondrias que se encuentran en la pieza media tienen como función proveer de energía a los filamentos del flagelo, permitiendo la propulsión efectiva del espermatozoide en su búsqueda del ovocito y para poder penetrar la zona pelúcida.

Las membranas plasmáticas y mitocondrial son susceptibles a daño por el proceso de criopreservación, y este daño puede diferir dependiendo de la medida en la cual el espermatozoide tenga accesibilidad a los agentes crioprotectores

El patrón de movimiento del espermatozoide refleja el ambiente bioquímico y condiciones físicas impuestas al espermatozoide: Aunque los estados tempranos de la criopreservación (dilución, enfriamiento y periodo de estabilización) no afectan totalmente la movilidad, esos estadios cambian los parámetros finos o sofisticados de la movilidad espermática.

La velocidad de la movilidad espermática en especies como búfalo también se encontró disminuida hasta luego del proceso de estabilización a 4°C y mucho menos después del proceso de criopreservación (83), esto posiblemente debido al incremento de la permeabilidad celular y al incremento de la viscosidad del medio extracelular a 4°C (84), se sustenta que la disminución de la velocidad de la movilidad está relacionada con el descenso de la temperatura del medio de criopreservación (80).

El descenso de la velocidad post descongelamiento puede ser debido a daños a nivel de la mitocondria (85) y al axonema (86) del espermatozoide.

Los pasos dentro del proceso de criopreservación son muy estresantes y causan cambios en el patrón de velocidad de los espermatozoides.

#### **4.2.-Efecto de la criopreservación sobre la membrana plasmática**

La integridad funcional de la membrana plasmática es de importancia primordial para la habilidad o capacidad del espermatozoide de resistir el congelamiento así como de realizar la fertilización, lo cual en diversas especies como búfalo (83) se ha encontrado disminuida luego del proceso de criopreservación, esto debido a que durante el proceso en sí de criopreservación, la membrana plasmática del espermatozoide es desestabilizada debido a las bajas temperaturas así como a la alta concentración de sales (87). La pérdida del plasmalema sobre la región entera del acrosoma, una proyección marcada en la parte anterior de la membrana acrosomal externa, vesiculación extensiva, disrupción del plasmalema y de la membrana acrosomal externa son los defectos de membrana que mayormente se encuentran en los espermatozoides descongelados de bovino.

Los componentes lipídicos de la membrana plasmática de espermatozoides de gallo (87) y de toro (88) son significativamente reducidos debido al proceso de criopreservación, encontrándose valores de integridad de membrana muchos menores en comparación a espermatozoides frescos.

#### **4.3.-Efecto de la Criopreservación sobre el acrosoma**

La presencia del acrosoma es importante en el proceso de la fertilización y ha sido altamente relacionado con la fertilidad de espermatozoides criopreservados de bovino (89), en espermatozoides de búfalo se encontró un porcentaje menor de espermatozoides con acrosoma intacto luego del proceso de criopreservación (83).

Así como la membrana plasmática y la movilidad son influenciadas por el proceso de criopreservación, el acrosoma es adversamente afectado por el proceso de descongelamiento (86), esto se ha visto tanto en espermatozoides criopreservados de búfalo (83), toro y conejo (87). Al producirse daño y desestabilización a nivel del acrosoma ocurre consecuentemente la liberación del contenido enzimático acrosomal, enzimas como la hialuronidasa y la acrosina (90, 91).

## **5.-CRIOCAPACITACION O CAPACITACION INDUCIDA POR EL PROCESO DE CRIOPRESERVACION**

Los espermatozoides criopreservados son una fuente importante de material genético y su importancia radica en el uso de éstos en los procesos de fertilización *in vitro* e inseminación artificial.

Es generalmente aceptado que la viabilidad espermática es reducida a un 50% durante la criopreservación de los mismos (81), ya que durante este proceso, el espermatozoide es sujeto a cambios o estrés químico, osmótico, termal y mecánico debido a la adición y remoción de agentes crioprotectores, el descenso de temperatura, la reorganización a nivel de membrana y la producción de especies de oxígeno reactivas. Lo cual conlleva a que los espermatozoides post descongelamiento presenten daño a la membrana plasmática y mitocondrial, al acrosoma y a la cola del espermatozoide, por ello, los espermatozoides totalmente funcionales que retienen membranas intactas, actividad mitocondrial y flagelo con actividad normal son particularmente bajos en número luego del proceso de criopreservación (80).

En espermatozoides de bovino este daño es evidenciado por la pérdida de la movilidad y de daños a nivel del acrosoma (92), liberación extracelular de la transaminasa oxaloacética glutámica (93) y la acrosina (91), conllevando a la pérdida de la fertilidad (88).

Espermatozoides criopreservados de bovino y de equino han demostrado exhibir signos de capacitación prematura asociada con el proceso de criopreservación (94, 95, 96), demostrándose esto a través del incremento de la fosforilación de ciertas proteínas en residuos de tirosina de estos espermatozoides criopreservados cuyo patrón de expresión de estas fosforilaciones es casi similar comparado con los patrones obtenidos en una capacitación *in vitro* con espermatozoides frescos.

Un efecto notorio que ocurre durante la criopreservación es que se produce un elevado nivel de calcio intracelular, evento que asemeja a lo que ocurre durante un proceso de capacitación normal, donde se produce una hiperactividad y reacción del acrosoma inducida por la zona pelúcida y que es un evento normal durante el proceso de fertilización (97, 98).

Por estas características presentadas, se ha planteado que se produce un proceso de capacitación inducida por el mismo proceso de criopreservación, llamada Criocapacitación, la cual estaría muy relacionado también con las alteraciones que ocurren a nivel de membrana plasmática ya que es el primer sitio dañado por la criopreservación (81), principalmente la membrana plasmática sobre la pieza principal, pieza media, y cabeza, con la membrana de la cabeza siendo inevitablemente dañada (87, 99).

La reorganización estructural de las membranas de la cabeza del espermatozoide después de la criopreservación aparentemente alteraría la

habilidad del espermatozoide para interactuar normalmente con las células del tracto genital femenino. La disminución de ciertos fosfolípidos ocurriría tanto en espermatozoides criopreservados así como en espermatozoides reaccionados capacitados *in vitro* (100), esta similitud en la alteración de ciertos fosfolípidos en espermatozoides criopreservados y capacitados indicaría que debe ocurrir un cambio similar en la membrana; indicando en parte que la reacción acrosomal ha comenzado muy temprano en espermatozoides criopreservados, lo cual explica que ellos requieren un periodo de tiempo más corto para las fertilizaciones *in vitro* que los espermatozoides capacitados; por lo tanto, la capacidad fecundante y viabilidad de los espermatozoides criopreservados es reducida (88).

De acuerdo a las evidencias presentadas se puede hablar de un proceso de criocapacitación la cual en teoría no es totalmente entendida. Resultados obtenidos en equino (96), bovino (99, 101), mono (70), ofrecen evidencias de que en los espermatozoides criopreservados de estas especies está ocurriendo un proceso de criocapacitación y tiene un efecto negativo en el éxito de los procesos de fecundación *in vitro*.

El porcentaje obtenido de espermatozoides descongelados en diversas especies y que presenten buenas condiciones (viabilidad, motilidad, integridad acrosómica, etc.) es el resultado de cambios que sufre el espermatozoide durante el proceso de criopreservación. Estudios sugieren que el proceso mismo de criopreservación aceleraría los procesos de capacitación y de reacción acrosómica.

La alpaca (*Lama pacos*) es una especie importante y el uso de técnicas como la criopreservación de gametos representa un método de manejo sostenible y

facilita el estudio a nivel genético y molecular de esta especie, así como su conservación.

Estudios sobre el estado de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, el estado del sistema proacrosina/acrosina, movilidad, viabilidad e interacción con zonas pelúcidas ofrecerían un panorama claro del nivel de capacitación que presenten estos espermatozoides, lo cual sería muy comparable con el estado que presentan espermatozoides frescos que han sido capacitados *in vitro*.

Así mismo la preocupación principal radica en el efecto de un proceso de criocapitación sobre el éxito de la fertilización, siendo los espermatozoides post descongelamiento más sensibles de reaccionar frente a cualquier estímulo no necesariamente el ovocito, y por lo tanto se tendría que recurrir a una metodología diferente para tratar estos espermatozoides posterior al proceso de criopreservación, ya que no necesitarían ser capacitados *in vitro* para realizar una Fecundación *in vitro*. Por lo que esta tesis tiene como objetivo evidenciar el proceso de criocapitación en espermatozoides criopreservados de alpaca.

### **III.-MATERIALES.-**

#### **3.1.-Material Biológico**

Se utilizaron muestras de testículo de más de veinte machos de alpaca las cuales fueron obtenidas desde el Camal Municipal de Huancavelica, en la provincia de Huancavelica (3000 – 3700 msnm , temperatura promedio anual entre los 8°C y 10°C) y correspondían a muestras de alpacas machos de entre 4 a 6 años de edad. Las muestras fueron almacenadas en suero fisiológico a 4°C y transportadas al laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal en la ciudad de Lima (101msnm, temperatura promedio anual entre los 11°C y 28°C).

Las colectas de muestras fueron realizadas una vez cada dos semanas, en el periodo comprendido entre Marzo-Julio de 2007 y de 2008.

#### **3.2.-Material Químico**

1.-Medios de cultivo, de lavado, de capacitación, de criopreservación:

- Medio Buffer Fosfato salino Dulbecco´s (DPBS, SIGMA Cód. D5773): El cual se encontraba suplementado con cloruro de calcio, 0.075g de penicilina, 0.075g de estreptomina.
- Medio HAM F10 (SIGMA Cód. N6635): El cual se encontraba suplementado con 0.075g de penicilina, 0.075g de estreptomina, 0.245g de lactato de calcio, y 2.1 g de bicarbonato. para usar el medio Ham F10 en los procesos de capacitación se le adicionó BSA a la concentración de 4mg/ml.
- Medio Tes.Tris Yolk, contenía una solución de citrato de sodio 5% (SIGMA Cód. D1546), Tes 2% ((SIGMA Cód. T1375), Trizma Base 8%

(SIGMA Cód. T6066), Yema de huevo 20%, suplementados con una solución 1:1000 de estreptomicina y heparina.

## 2.-Soluciones:

- Solución de eosina Y 0.5%: Contení 50mg de eosina en 10ml de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.
- Solución hiposmótica: Contení 0.1470g de citrato de sodio y 0.2702g de fructosa , disueltos en 20ml de agua
- Buffer fosfato salino (PBS): NaCl 124 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol/L, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mmol/L.

## 3.-Reactivos:

- Para la extracción de proteínas fosforiladas:  
Ortovanadato de sodio (0.2M), Buffer muestra 5X (Tris HCl 1M pH: 6.8, Glicerol 50%, Sodio Dodecil Sulfato 10%, β-Mercaptoetanol 14.4mM, Azul de bromofenol 1% y Agua destilada 7.4ml).
- Para la extracción de proteínas acrosomales :  
NaCl al 0.15%, Tritón al 0.1%, HCl 1M, HCl 1M suplementado con glicerol (1:900)
- Para Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)
  - a. Gel concentrador al 5%: Solución de Acril-bis acrilamida (250 mul), buffer Tris 0.5M pH:6.8 (190 mul), agua destilada (1.05 ml), sodio dodecil sulfato al 10% (15 mul), persulfato de amonio al 10% (15 mul), TEMED (5 mul).
  - b. Gel resolutivo al 10% : Solución de acrilamida-bisacrilamida (990 mul), Buffer Tris 1.5M pH 8.8 (750 mul), agua destilada (1.2 ml),

sodio dodecil sulfato al 10% (30 ml), persulfato de amonio al 10% (30 ml), TEMED (10 ml).

c. Para la coloración en plata: Acido acético al 7%, metanol al 50%, nitrato de plata al 20%, hidróxido de sodio al 30%, hidróxido de amonio 14.8 M, acido cítrico al 1%, formaldehido al 37%.

- Para la técnica de Western Blot:
  - a. Buffer de bloqueo para western blot: Se usó una solución de 50ml de PBS la cual contenía 2g de albúmina sérica bovina (BSA), 50 ml de gelatina IGSS y 0.007g de azida de sodio.
  - b. Buffer de lavado para western blot: Se usó una solución de 50ml de PBS la cual contenía 0.4g de albúmina sérica bovina (BSA), 50ul de gelatina IGSS y 0.007g de azida de sodio.
  - c. Solución de revelado con plata para western blot: Se usó el kit de amplificación con plata Inten SEM (Amershan), el cual consistía en una Solución A o iniciador de reacción y una Solución B o amplificador de reacción.

#### 4.-Anticuerpos

- Anticuerpo primario antiacrosina C5F10, BIOSONDA, Chile
- Anticuerpo primario anti fosfoproteínas fosforiladas en residuos de tirosina , PY20, MILLIPORE
- Anticuerpo primario anti fosfoproteínas fosforiladas en residuos de tirosina, 4G10, conjugado a FIT-C , MILLIPORE.
- Anticuerpo secundario Anti Región Fab de Ig G de ratón marcado con oro coloidal, Auro Probe LM GAR, Amershan.

### **3.3.-Material de Vidrio y Plástico**

Tubos eppendorff de 1.5ml, tubos de plástico de 10ml, puntas de micropipeta de 100ul, puntas de micropipeta de 1000ul, puntas de micropipeta de 10ul, placas petri de plástico, placas de cultivo, laminas portaobjeto de vidrio, laminas cubreobjeto de vidrio, cámara de Neubauer, envases de enfriamiento, recipientes de plástico, pajuelas de congelamiento.

### **3.4.-Equipos**

Micropipeta de 100ul, micropipeta de 1000ul, microscopio de luz con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X, microscopio invertido con objetivos de 4X, 10X y 40X, incubadora de CO<sub>2</sub>, incubadora simple, baño María, refrigeradora, congelador vertical, equipo de electroforesis Mini protean BIORAD, equipo de transferencia Mini Trans Blot BIORAD, equipo de congelamiento termocontrolado CRYOBATH, computador pentium III, software de control del equipo de congelamiento termocontrolado Cryogenesis Ver 4.0, cámara digital OLYMPUS SP310, centrifuga normal, ultracentrífuga, tanque de nitrógeno.

## **IV.-METODOLOGÍA:**

### **4.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL**

Este estudio tuvo un método exploratorio y comparativo, ya que son pocos los estudios a nivel molecular sobre el estado funcional (viabilidad, motilidad, integridad acrosómica, capacidad fecundante) del espermatozoide criopreservado de alpaca, por ello se procedió a comparar con resultados encontrados en otras especies.

Además fue un método transversal donde se realizó varias pruebas en tiempos determinados.

### **4.2.-COLECCIÓN DE LA MUESTRA:**

En el laboratorio, dentro de las 14 horas post mortem del animal se procedió a aislar los epidídimos, de los cuales sólo se utilizó la región de la cola, la cual fue removida y cortada en pequeñas piezas, los espermatozoides fueron obtenidos en suero fisiológico a 37°C. Luego la suspensión conteniendo a los espermatozoides fue pasada a tubos de plástico de 10 ml, colocados luego en una incubadora a 37°C por quince minutos para permitir que los espermatozoides se recuperen. Pasado este tiempo se procedió a evaluar la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática, posteriormente se lavó la muestra con DPBS por medio de centrifugaciones para poder remover restos de tejidos, quedando solo los espermatozoides. El primer lavado fue a 700 RPM por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 1200 RPM por 15 minutos. Se separó el sobrenadante del precipitado, en la fracción del precipitado se obtuvo la mayor cantidad de espermatozoides. Se analizó la

fracción del sobrenadante y si contenía aún espermatozoides se le volvía centrifugar a 1200 RPM por quince minutos.

Luego, a la muestra de espermatozoides ya concentrada, se le agregó lentamente medio DPBS a 37°C por las paredes del tubo.

#### **4.3.-MEDICION DE LA CONCENTRACIÓN**

La concentración fue evaluada de acuerdo al Criterio del Organismo Mundial de la Salud (102). Se usó el método de recuento con cámara o hemocitómetro de Neubauer. Para lo cual se usó 10  $\mu$ l de solución inicial de espermatozoides diluidos en 990  $\mu$ l de agua, de esta solución se usó 10  $\mu$ l para ser realizado el conteo. Se contaron todos los espermatozoides que se encontraban en los 25 cuadrados

El número final de espermatozoides obtenido fue multiplicado por  $10^6$  espermatozoides por volumen de solución.

#### **4.4.-EVALUACION DE LA MOVILIDAD, VIABILIDAD E INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA INICIALES**

La movilidad fue evaluada de acuerdo al Criterio del Organismo Mundial de la Salud (102) mediante el conteo porcentual de los patrones de movilidad que presentaban los espermatozoides, los patrones considerados fueron:

Patrón "A": progresivamente rápidos

Patrón "B": Progresivamente lentos

Patrón "C": Se mueven en su sitio, no avanzan.

Patrón "D": No se mueven

Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X).

La viabilidad fue evaluada mediante el uso del colorante vital eosina Y, para lo cual se incubó una gota de muestra con una gota del colorante a 37°C por quince minutos y se procedió al conteo de los patrones presentados:

Espermatozoides incoloros: espermatozoides vivos

Espermatozoides de color rosa: espermatozoides muertos.

Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopios óptica de campo claro (400X).

La integridad de membrana fue evaluada a través del test de endosmosis, el cual consistió en incubar 100  $\mu$ l de la muestra en 900  $\mu$ l de una solución de fructosa-citrato a 600 miliosmoles (mOsm) por treinta minutos a 37°C. Luego se procedió a contar los patrones de formas que presentaban los espermatozoides:

-Espermatozoides con el flagelo enrollado: espermatozoides con la membrana intacta.

-Espermatozoides con el flagelo recto, sin enrollamientos de ninguna clase: espermatozoides con la membrana alterada.

Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X).

#### **4.5.-PROCESO DE CRIOPRESERVACION DE ESPERMATOZOIDES.**

El método usado fue el de congelamiento lento programable (79), en el cual se usó como medio de criopreservación el medio Yolk Citrato, el cual estuvo suplementado con los agentes crioprotectores: Dimetilacetamida a concentraciones de 0.75M, 0.375M y 0.18M; Dimetilsulfoxido a las concentraciones de 0.5M, 0.25M y 0.125M.

Las muestras de espermatozoides fueron estabilizadas a volumen uno a uno con el medio Yolk Citrato previo al congelamiento, mantenidas a 4°C por una hora, luego las muestras fueron colocadas en pajuelas de criopreservación de 250  $\mu$ l. Las pajuelas fueron selladas y colocadas en el sistema de congelamiento termocontrolado haciendo uso del sistema CRYOBATH dirigido por el software Cryogenesis Versión 4.0 (Cryologics), siendo el protocolo de congelamiento el siguiente:

La temperatura inicial fue de 4°C, las muestras fueron mantenidas en esa temperatura por cinco minutos. El segundo periodo fue el descenso de la temperatura de 4°C a 2°C a una velocidad de 3°C/min, manteniendo a 2°C por un minuto, posteriormente se procedió a hacer la siembra (SEEDING), la cual consiste en el sembrado de cristales de hielo. Para ello se procedió a tocar la base de las pajuelas con la punta de una pinza la cual estaba a -196°C aproximadamente hasta que se viera un ligero cambio de color en las paredes de las pajuelas, lo cual indica la formación de microcristales. El tercer periodo fue desde 2°C hasta -30°C con una velocidad de congelamiento de 5°C por minuto y finalmente de -30°C a -80°C con una velocidad de congelamiento de 8°C/min. Después de este punto se colocaron las pajuelas en nitrógeno líquido

a  $-196^{\circ}\text{C}$  y fueron mantenidas a esta temperatura hasta su descongelamiento y respectiva evaluación.

Las muestras fueron descongeladas a  $50^{\circ}\text{C}$  por 7 segundos, luego las pajillas fueron cortadas por ambos extremos y el contenido colocado en tubos eppendorf nuevos, lavándose las muestras con medio HAM F10 libre de BSA. Luego se procedió a evaluar el estado de los espermatozoides.

Se realizaron evaluaciones de viabilidad, movilidad y estado de la membrana plasmática siguiendo la misma metodología que se usó previo al proceso de criopreservación.

#### **4.6.-PROCESO DE CAPACITACION**

Los espermatozoides frescos lavados fueron sometidos a el proceso de capacitación mediante el método descrito por Manosalva (37) y modificado por Uriondo (38). Los espermatozoides fueron sometidos a una solución de medio HAM F10 que contenía una concentración de  $4\text{mg/ml}$  de BSA, los espermatozoides fueron lavados a 2000 RPM por 10 minutos a fin de obtener la mayor cantidad de éstos, luego se eliminó el sobrenadante y se usó el precipitado al cual se le agregó lentamente nuevo medio HAM F10 con BSA ( $4\text{mg/ml}$ ), luego se dejaron incubando las muestras a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  por un periodo de tres horas para que se pudiera realizar el proceso de "swim up", en el cual los espermatozoides altamente móviles y capacitados migran hacia la superficie del medio dejando en el precipitado a los espermatozoides muertos y/o defectuosos.

Transcurrido este tiempo se realizaron evaluaciones de viabilidad, movilidad y estado de la membrana plasmática siguiendo la misma metodología que se mencionó anteriormente.

#### **4.7.-ESTUDIO DE LAS PROTEINAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE TIROSINA**

**Extracción de las proteínas:** Se siguió la metodología descrita por Galantino (45), para ello se usaron suspensiones de espermatozoides frescos, capacitados y descongelados a una concentración de  $5 \times 10^6$  espermatozoides, los cuales fueron centrifugados a 16000 RPM a temperatura ambiente en buffer fosfato salino (PBS, pH =7.4) que contenía ortovanadato de sodio a una concentración de 0.2 mM.

Las proteínas espermáticas fueron extraídas en un buffer de solubilización en condiciones no reductoras y fueron calentadas a 100°C por 5 minutos, luego la suspensión obtenida fue centrifugada por 3 minutos a 16000g, al sobrenadante se le agregó  $\beta$ -mercaptoetanol, luego fueron calentadas nuevamente a 100°C por 5 minutos y centrifugados a 16000g por un minuto.

Las proteínas solubilizadas fueron guardadas a -20°C hasta su separación en minigeles SDS-PAGE al 10% (103).

**Identificación de la proteínas Fosforiladas:** Para este estudio se realizó un western blot usando el anticuerpo primario antifosfotirosina específico PY20 (Millipore) para identificar a este tipo de proteínas.

Se usaron extractos de proteínas, las cuales fueron corridas en un gel de electroforesis SDS PAGE al 10% usándose 8ug de proteína por carril y una

transferencia a nitrocelulosa a 350A por una hora. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada por 3 horas a temperatura ambiente (o por toda la noche a 4°C). Al terminar este paso se procedió a realizar tres lavados con el buffer de lavado por 5 minutos cada vez.

Se Incubó con el anticuerpo primario PY20 (53  $\mu$ l/5ml de buffer) por una hora. Se lavó tres veces con el buffer de lavado por cinco minutos cada lavado.

Se Incubó con el segundo anticuerpo anti Fab de IgG de ratón (AURO PROBE Ore GAR, 17  $\mu$ l/5ml) por tres horas y se lavó por tres veces con buffer de lavado por cinco minutos cada vez, luego se procedió al mismo procedimiento de lavado pero haciendo uso de PBS y finalmente con agua destilada.

Una vez terminado el proceso de lavado se realizó el revelado para ello se amplificó con plata (15 gotas de solución A y 15 gotas de solución B) por 20 minutos, en todo momento se cuidó de que la membrana se encuentre en agitación, una vez que se podían observar las bandas correspondientes se procedió al lavado con agua destilada y a la observación respectiva.

**Inmunolocalización de las proteínas fosforiladas:** Para este estudio se usó muestras de espermatozoides fijadas en láminas y se usó el anticuerpo monoclonal 4G10 el cual es específico para proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Las muestras de espermatozoides fueron fijadas en láminas portaobjetos mediante el uso de una solución de paraformaldehído al 4% por un periodo de un minuto, luego se lavó las láminas dos veces con PBS, cada lavado duró entre 10 a 15 minutos. Se permeabilizó las muestras con una solución de Triton-100 al 0.25% por un periodo de tres minutos, luego se lavó las láminas

con PBS. Se dejó incubando las láminas con PBS que contenía BSA al 1% con la finalidad de cubrir los sitios inespecíficos, esto por un periodo de una hora, luego se procedió a lavar las láminas con PBS y se incubaron las láminas con una solución de PBS con BSA al 1% que contenía además el anticuerpo 4G10 (1:1000) y se dejó incubando por 90 minutos. Este anticuerpo estaba conjugado a la fluoresceína de tiocinato FITC, la cual emite una fluorescencia de color verde en el rango de excitación de banda azul.

Luego se lavó las láminas con PBS, tres veces, cada lavado fue de 10 minutos y se procedió a observar las muestras mediante el uso de un microscopio de fluorescencia, se usó un filtro azul y las observaciones fueron realizadas a 400X.

#### **4.8.-ESTUDIO DEL ESTADO DEL SISTEMA PROACROSINA/ACROSINA**

**Extracción de proteínas acrosomales:** Se procedió a realizar la obtención del extracto espermático siguiendo la metodología planteada por Leyton (104), para lo cual se procedió a usar muestras de espermatozoides frescos, descongelados y capacitados, las cuales fueron lavadas por medio de centrifugaciones sucesivas a 2000 RPM por 10 minutos, a fin de obtener una alta concentración de espermatozoides, que fueron lavadas con una solución de NaCl 0.15M y luego solubilizadas. Para ello, el precipitado obtenido se resuspendió en una solución de Tritón X-100 por una hora, se centrifugó a 600 g por 20 minutos luego se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en una solución de HCl y glicerol, se ajustó el pH a 2.8 y se dejó incubando a 4°C por toda una noche, luego se centrifugó a 16 000 RPM por 15

minutos y se recuperó el sobrenadante que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

**Identificación de las enzimas acrosomales:** Se usó el extracto de enzimas acrosomales, los cuales fueron corridos en un gel de electroforesis SDS PAGE al 10% (103) y luego se realizó un western blot a 350A por una hora. Posteriormente se incubó la membrana de nitrocelulosa con la solución de bloqueo por 3 horas a temperatura ambiente (o por toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Al terminar este paso se procedió a realizar tres lavados con el buffer de lavado por 5 minutos cada vez.

Se incubó por una hora con el anticuerpo primario anti proacrosina/acrosina C5F10 (Biosonda) a una concentración de 53 $\mu\text{l}$ /5ml de buffer. Se lavó tres veces con el buffer de lavado por cinco minutos cada lavado. Se incubó con el segundo anticuerpo anti Fab de IgG de ratón (AURO PROBE Ore GAR, 17 $\mu\text{l}$ /5ml) por tres horas y se lavó por tres veces con buffer de lavado por cinco minutos cada vez, luego se procedió al mismo procedimiento de lavado pero haciendo uso de PBS y finalmente con agua destilada.

Una vez terminado el proceso de lavado se realizó el revelado para ello se amplificó con plata (15 gotas de solución A y 15 gotas de solución B) por 20 minutos, en todo momento se cuidó de que la membrana se encuentre en agitación, una vez que se podían observar las bandas correspondientes se procedió al lavado con agua destilada y a la observación respectiva.

#### 4.9.-ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN A ZONA PELÚCIDA

**Unión a Zona Pelúcida:** Se procedió a probar en distintos tiempos la capacidad fecundante de muestras de espermatozoides capacitados y descongelados mediante la unión a zona pelúcida de ovocitos homólogos. Para ello se usó ovocitos de alpaca, los cuales fueron colocados en placas de cultivo, fueron luego lavados y suspendidos en medio HAM F10 y cortados mediante el uso de una microcuchilla con la finalidad de obtener en dos mitades la zona pelúcida del ovocito.

Una vez hechos los cortes, las dos mitades fueron mantenidas y estabilizadas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>.

Luego los espermatozoides descongelados fueron lavados con medio HAM F10 y se enfrentó la muestra de espermatozoides con una de las mitades de la zona pelúcida, en el caso de los espermatozoides frescos se procedió a capacitarlos *in vitro* mediante el uso del medio HAM F10 suplementado con BSA al 4% y se les enfrentó con la otra mitad restante de la zona pelúcida.

La evaluación fue realizada bajo microscopia invertida de campo claro y contraste de fases, y consistió en contar el número de espermatozoides que se pegaron a la zona pelúcida tanto para el grupo de espermatozoides frescos como para los espermatozoides descongelados; siempre tomando en consideración intervalos de tiempo (media hora, una hora, hora y media, y finalmente dos horas).

#### **4.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores encontrados en las pruebas de movilidad, viabilidad, integridad de membrana plasmática, número de espermatozoides unidos a zona pelúcida, presencia de fluorescencia positiva para el anticuerpo 4G10 de ambos grupos de estudio (espermatozoides criopreservados y espermatozoides capacitados), fueron analizados para poder encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, para ello los valores fueron transformados por el arco seno y luego se realizó un ANOVA y se rechazaron comparaciones mediante el análisis estadístico no paramétrico (Prueba de Tukey). Se usó el programa estadístico del SPSS Ver15.00, considerando el nivel de significancia de  $\leq$  a 0.05.

## **V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **5.1.-RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN, VIABILIDAD, MOVILIDAD Y ESTADO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA INICIALES:**

En el presente trabajo se usaron espermatozoides epididimarios, especialmente de la cola del epidídimo, los cuales ofrecen ventaja sobre los espermatozoides de semen , ya que el semen de la alpaca es bajo en volumen, muy viscoso y presenta una concentración baja de espermatozoides; haciendo desalentador el trabajo con este tipo de muestra. Por el contrario, los espermatozoides de la cola del epidídimo ofrecen ventajas como mayor concentración de espermatozoides los cuales se encuentran en un nivel de maduración final, así como el manejo de estas muestras es mucho más rentable y fácil, permitiendo un mejor estudio de estos espermatozoides.

Las muestras iniciales presentaban en promedio una concentración de  $45 \times 10^6$  espermatozoides por ml de solución, luego de haber realizado la obtención y lavado de las muestras de espermatozoides epididimarios, se analizó la movilidad la cual presentaba un valor promedio de 42.26%, la viabilidad que presentó un valor promedio de 72.47% y la integridad de membrana plasmática la cual presentó un valor promedio de 63.15% (Ver anexo; fotos 1 y 2, figura 1, tabla 1).

## **5.2.-RESULTADOS DE VIABILIDAD, MOVILIDAD Y ESTADO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DESPUÉS DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN:**

El proceso de criopreservación es aplicado a diversas especies, así como a diversos tipos celulares, en el campo de la reproducción se ha venido trabajando con la criopreservación de células gaméticas como los ovocitos y espermatozoides.

En el caso de la criopreservación de espermatozoides se ha observado un éxito de sobrevivencia de menos del 50% comparada con el estado inicial de estos espermatozoides, sugiriendo así que se producen daños que afectan principalmente la membrana del espermatozoide conllevando a la alteración y desestabilización de la membrana provocando descenso en la movilidad, así como se ve afectada la región del acrosoma.

En el presente trabajo se usó la técnica de congelamiento lento haciendo uso de agentes crioprotectores como DMA y DMSO, los cuales se emplearon a diferentes concentraciones.

La evaluación de los parámetros de viabilidad y movilidad e integridad de membrana plasmática en los espermatozoides descongelados en presencia de los CPAs (DMA y DMSO), mostraron diferencias significativas, encontrándose mejores resultados cuando se usaban los agentes DMA a la concentración de 0.375M y DMSO a la concentración de 0.25M.

Para ambos casos se analizaron la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática; para el caso de DMA 0.375M, la movilidad presentaba un valor promedio de 34.42%, la viabilidad presentó un valor promedio de

55.32 % y la integridad de membrana plasmática presentó un valor promedio de 60.28%; en el caso de DMSO 0.25M la movilidad presentaba un valor promedio de 33.45%, la viabilidad un valor promedio de 49.90% y la integridad de membrana plasmática un valor promedio de 52.19% (Ver anexo: foto 3, figura 2 y 3, tabla 2).

Con los resultados obtenidos se procedió a elegir el agente crioprotector Dimetilacetamida (DMA 0.37M) como ACP para el presente estudio ya que los valores de movilidad, viabilidad e integridad de membrana encontrados fueron mucho más altos que los obtenidos con DMSO 0.25M, siendo estos resultados satisfactorios si los comparamos con estudios hechos por otros investigadores (105) en los cuales se obtiene solo un 20% de éxito de movilidad.

Por ello las muestras congeladas con DMA 0.375M fueron descongeladas y usadas en los estudios respectivos sobre las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, sobre el estado del sistema proacrosina/acrosina, y la capacidad de unión a zona pelúcida, los resultados fueron comparados con los resultados de los espermatozoides capacitados.

### **5.3.-RESULTADOS DE VIABILIDAD, MOVILIDAD Y ESTADO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DESPUÉS DEL PROCESO DE CAPACITACIÓN:**

Se analizó la movilidad postcapacitación la cual presentaba un valor promedio de 53.7%, la viabilidad presentó un valor promedio de 67.8 % y la integridad de membrana plasmática la cual presentó un valor promedio de 65.7% (Ver anexo: figura 1, tabla 3).

Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los resultados obtenidos de movilidad, viabilidad e integridad de membrana de los espermatozoides capacitados y los espermatozoides criopreservados.

#### **5.4.-ESTADO DE LAS FOSFORILACIONES EN RESIDUOS DE TIROSINA**

##### **Identificación de proteínas fosforiladas en extractos de proteínas:**

Así mismo se realizó el estudio de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, esto debido a que este tipo de proceso está muy relacionado con el proceso de capacitación que es una fase previa que tiene que alcanzar el espermatozoide para poder fertilizar un ovocito maduro (35), adquiriendo ciertas características como: la hipermovilidad e incremento de calcio intracelular, conllevando a la reacción acrosómica que es la exocitosis de las diversas enzimas como el sistema proacrosina/acrosina contenidas dentro del acrosoma y que permiten el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida, siendo las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina las que conllevarían a la activación de señales internas que permiten que el espermatozoide alcance tal nivel de capacitación.

Los espermatozoides criopreservados de diversas especies sufren un proceso similar al de capacitación el cual conlleva a que estos espermatozoides presenten un nivel de sobrevida menor, así mismo una capacidad de poder unirse a la zona pelúcida sin pasar o alcanzar un estado de capacitación adicional, sin necesitar ningún tratamiento adicional para alcanzar un nivel de capacitación.

La concentración de proteína que se usó en el presente trabajo fue de 8  $\mu\text{g}$  de proteína por carril, observándose que el patrón electroforético de ambos grupos de estudio, tanto espermatozoides capacitados y criopreservados presentaban

el mismo patrón electroforético, observándose una ligera diferencia en la intensidad de las primeras bandas, las cuales podrían ser importantes para diferenciar ambos eventos (capacitación y criocapacitación). Por lo cual se realizó un western blot para la identificación de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, para ello se usó el anticuerpo monoclonal antifosfoproteínas en residuos de tirosina PY20.

En diversas especies el patrón de proteínas fosforiladas entre espermatozoides capacitados y criopreservados es muy similar, encontrándose proteínas de peso molecular entre los 30 KDa a los 60 y 90 KDa (96), en el presente estudio el anticuerpo monoclonal PY20 reconoció tres proteínas en las muestras de espermatozoides capacitados y criopreservados, cuyos pesos moleculares se encontraban en el rango de 60 KDa, 42 KDa y 33 KDa (Ver anexo: foto 4 y 5), lo cual coincide con lo encontrado en otras especies.

Por el contrario cuando un espermatozoide se encuentra en condiciones normales, sin estar frente a un estímulo como el tracto femenino o en sustancias capacitantes como BSA o heparina, no presenta muchas proteínas fosforiladas o es muy baja la presencia de éstas, demostrándose que no estaría activada la maquinaria intracelular que conllevaría a la capacitación (36, 45), lo cual fue verificado en muestras de espermatozoides frescos que no fueron ni capacitados *in vitro* ni criopreservados observándose sólo una banda de peso molecular de 60 KDa (Ver anexo: foto 4 y 5).

### **Inmunodetección de las proteínas fosforiladas:**

Las proteínas fosforiladas también se encuentran relacionadas con la capacidad de unión a zona pelúcida (48, 53), ya que están muy relacionadas

con el proceso de exocitosis del acrosoma. El espermatozoide es un célula compartimentalizada y especializada, cuya maquinaria interna está diseñada para realizar funciones diversas como la movilidad y reacción del acrosoma, pero como la capacitación es un proceso secuencial previo a la reacción acrosomal, cuando los espermatozoides no han sufrido ningún proceso de capacitación entonces la presencia de estas proteínas fosforiladas es casi ausente, principalmente en la región del flagelo (106), esto es comprobado mediante los estudios de inmunodetección de las proteínas fosforiladas.

Por el contrario si un espermatozoide es sometido a un proceso de capacitación *in vitro* y no ha alcanzado un nivel alto de capacitación o solo ha alcanzado fases iniciales de capacitación, entonces se ha observado que solo debe producirse la fosforilación de proteínas que se encuentren en el flagelo o en la pieza media del mismo (45), así mismo cuando el espermatozoide ha alcanzado un nivel alto de capacitación y esta propenso a sufrir un proceso de reacción del acrosoma entonces se puede observar que el patrón de proteínas fosforiladas se encuentra más que nada en la región de la cabeza del espermatozoide y ausente del flagelo, esto evidenciado gracias a la técnica de la inmunodetección y al uso de anticuerpos especiales como el 4G10 que es un anticuerpo muy importante de amplio espectro para la detección de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina, es usado como patrón de oro para la detección de estas proteínas, el cual fue usado en el presente trabajo y estuvo conjugado a FIT-C, lo cual facilitó la observación e identificación de la presencia de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina dentro del espermatozoide, ya que se emitía una fluorescencia de color verde cuando se

observaban las muestras por microscopia de fluorescencia usando un filtro azul de excitación.

Nuestros resultados demuestran que tanto los espermatozoides capacitados *in vitro* usando medio Ham F10 suplementado con BSA (4mg/ml) por un periodo de tres horas bajo condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y a temperatura de 38°C, mostraban que las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina se encontraban y daban positivo para la región de la cabeza y que en el caso de los espermatozoides criopreservados sin tratamiento de capacitación *in vitro* mostraban un patrón similar de presencia de estas proteínas en la región de la cabeza (Ver anexo: figura 4, tabla 4 y foto 6), encontrándose un mayor porcentaje de espermatozoides con este patrón de fluorescencia en espermatozoides capacitados *in vitro* (82.47%) a comparación de lo encontrado en los espermatozoides criopreservados (58.74%), siendo estas diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Estos resultados nos indican que los espermatozoides capacitados *in vitro* así como los espermatozoides criopreservados están en un nivel de capacitación cercano a lo que sería la reacción del acrosoma y que estos dos grupos de espermatozoides serían capaces de unirse a la zona pelúcida.

#### **5.5.-ESTADO FUNCIONAL DEL SISTEMA PROACROSINA/ACROSINA**

La reacción acrosomal es un proceso posterior al proceso de capacitación, siendo el acrosoma adversamente afectado por el proceso de criopreservación (86), esto se ha visto tanto en espermatozoides criopreservados de búfalo (83), toro y conejo (86). Al producirse daño y desestabilización a nivel del acrosoma

ocurre consecuentemente la liberación del contenido enzimático acrosomal así como la activación del sistema proacrosina/acrosina (90, 91).

Un descenso en la proporción proacrosina/acrosina capaz de ser activado como un resultado del proceso de criopreservación fue observado en espermatozoides criopreservados de bovino(91), el proceso de criopreservación puede inactivar la acrosina o causar la pérdida de esta enzima desde el acrosoma de espermatozoides que han sobrevivido a este proceso (91), la prematura criocapacitación estaría influenciando sobre el estado de estos espermatozoides (101).

En el presente trabajo se estudió el estado del sistema proacrosina/acrosina ,usándose muestras de extracto de enzimas acrosomales cuya concentración fue de 1.3 mg/ml, para la identificación del sistema proacrosina/acrosina se usó el anticuerpo monoclonal C5F10 que es específico para acrosina; observándose que en espermatozoides frescos que no han sufrido ningún tipo de tratamiento se encontró mayor cantidad de la proenzima, es decir de proacrosina (peso molecular aproximado de 53KDa), por el contrario, en el caso de los espermatozoides capacitados *in vitro* se encontró la presencia de dos bandas, una de las cuales correspondía a la enzima inactiva, la proacrosina (peso molecular aproximado de 53KDa), y otra banda de aproximadamente 47KDa que correspondería a la acrosina ( $\alpha$ -acrosina).

Los espermatozoides criopreservados mostraron un patrón casi similar al encontrado en espermatozoides capacitados, a diferencia de que hubo en algunos casos la presencia de hasta tres bandas, una banda correspondiente a la proacrosina, una segunda banda que correspondería a la acrosina ( $\alpha$ -acrosina) y una tercera banda que presentaba un peso molecular de

aproximadamente 40KDa, la cual correspondería a la  $\beta$ -acrosina (Ver anexo, foto 7), lo cual concuerda con lo encontrado en muestras de espermatozoides de bovino (101, 107), sugiriendo que en este grupo de espermatozoides se ha producido una activación prematura del sistema proacrosina/acrosina con la consecuente liberación de la acrosina.

### **5.6.-CAPACIDAD DE UNIÓN A ZONA PELÚCIDA**

Se evaluó el número de espermatozoides que se pegaban a la zona pelúcida tanto para espermatozoides capacitados y espermatozoides criopreservados.

Se usaron intervalos de tiempo de 30 minutos cada uno, donde se procedió a contar el número de espermatozoides pegados en la zona pelúcida, las observaciones fueron realizadas usando un microscopio invertido.

Se observó que el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida en el caso de espermatozoides capacitados *in vitro* era mayor que el observado en espermatozoides criopreservados (Ver anexo: figura 5, tabla 5, foto 8), encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos durante los intervalos de tiempo de evaluación ( $p \leq 0.05$ ), lo que resultó bastante notable es que los espermatozoides criopreservados no tuvieron ningún tratamiento especial luego del proceso de criopreservación y que demostraron gran capacidad de unión a la zona pelúcida, es decir no necesitaron ser capacitados para poder unirse a la zona pelúcida.

En diversas especies, un tratamiento de criopreservación afecta tanto la membrana plasmática, el acrosoma y la movilidad del espermatozoide, esto en conjunto afecta su capacidad de poder unirse a la zona pelúcida del ovocito (87, 99), en especies de bovinos se encontró que el número de

espermatozoides unidos a zona pelúcida luego del proceso de criopreservación es considerablemente menor al encontrado en espermatozoides capacitados *in vitro* (97), pero estos espermatozoides criopreservados no necesitaban un proceso de capacitación adicional para poder lograr su unión a la zona pelúcida. Nuestros datos confirman también la capacidad de unión a zona pelúcida de los espermatozoides criopreservados ya que solo necesitaron un lavado para poder retirar el agente crioprotector y de esta forma poder unirse a la zona pelúcida.

Considerando en conjunto los resultados de todos los experimentos, podemos mencionar que los espermatozoides criopreservados de alpaca deben estar sufriendo un proceso de criocapacitación, inducida por el mismo proceso de criopreservación, la cual afecta tanto a la membrana plasmática, al flagelo y a la región del acrosoma; permitiendo la activación de la maquinaria intracelular que conlleve a un estado especial de capacitación que puede ser comparable o casi similar al encontrado en espermatozoides capacitados *in vitro*, quedando aun pendiente de estudiar el agente activador causante de este tipo de capacitación.

Por lo tanto, el manejo de los espermatozoides criopreservados de alpaca debe ser diferente a el manejo de los espermatozoides frescos, ya que si son usados en procesos de Fertilización *in vitro*, estos espermatozoides no deben de ser sometidos a un proceso de capacitación adicional para poder lograr la fertilización, bastaría solo con un lavado leve para poder retirar el agente crioprotector y la incubación en medios nutritivos por un periodo de 15 a 20 minutos para su estabilización y finalmente su incubación con los ovocitos.

En el caso de las inseminaciones artificiales se recomendaría realizar inseminación intrauterina en lugar de la inseminación cervical, ya que estos espermatozoides al presentar un nivel avanzado de capacitación necesitan estar en un región cercana al ovocito, así mismo el tracto femenino ofrece variedad de agentes o sustancias que pueden producir una reacción acrosomal espontánea provocando así el descenso de la viabilidad de estos espermatozoides.

## VII.-CONCLUSIONES

- Los espermatozoides criopreservados presentan diferencias tanto en la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática en comparación con la de los espermatozoides frescos y espermatozoides capacitados, siendo los valores mucho más reducidos en los espermatozoides criopreservados.
- Los espermatozoides criopreservados de alpaca tienen un patrón de proteínas fosforiladas en residuo de tirosina similar al de los espermatozoides capacitados.
- La capacidad de unión a zona pelúcida de los espermatozoides criopreservados fue menor que la de los espermatozoides capacitados, pero los espermatozoides criopreservados no necesitan ningún tratamiento de capacitación *in vitro* para lograr dicho fin.

## VII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. WHEELER, J.C. Origen, evolución y status actual. En: Avance y perspectivas de los camélidos sudamericanos. Ed. Saúl Fernández-Baca. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991.
2. SMITH, C.L., A.T. PETER, D.G. PUGH. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology* 1994, 41: 573-596.
3. YANAGIMACHI ,R. Fertility of mammalian spermatozoa : Its development and relativity , *Zigote* , 1994 (2) , 371-2.
4. FAWCETT DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod Suppl.* 1970;2:90–127.
5. FAWCETT DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* 1975 Jun;44(2):394–436.
6. LOESER C. Y TULSIANI D., The Role of Carbohydrates in the Induction of the Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa, *Biology of Reproduction*; 1999, 60, 94–101.
7. STAMBAUGH R, BUCKLEY J. Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1969 Aug;19(3):423–432.
8. BEYLER SA, ZANEVELD LID, Inhibition of in vitro fertilization of mouse gametes by proteinase inhibitors. *J Reprod Fertil*, 1982, 66:425 -3 1
9. POLSKOSKI K , PARRISH R , Boar Proacrosina . purification and preliminary activation studies of Proacrosina isolated from ejaculated boar sperm . *J. Biol. Chem.* ,1977 , 252 :1888-1894

10. NAYERNIA K , ADAHM I , SHAMSADIN R , MULLER C , SANCKEN U , ENGEL W , Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility , *Mol. Hum. Reprod* . , 2002, 8(5):434-440.
11. KREMLING H , LUERSSEN H , ADHAM I , KLEMM U, TSAOUSIDOU S, ENGEL W, Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals , *Differentiation* , 2006 , Julio 30, 40(3): 184-190.
12. KEINE S, ADHAM JM, ENGEL W, Nucleotide sequence and exon-intron organization of the human proacrosin gene, *European Journal of Biochemistry*, 1990, Mayo 3, 190(1):195-200.
13. BABA T, KASHIWABARA S ,WATANABE K., ITOH H., MICHIKAWA Y., KIMURA K., TAKADA M., FUKAMIZU A. , ARAI Y. ,Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure ,*J. Biol. Chem.*, 1989, Vol. 264, Issue 20, 11920-11927.
14. KASHIWABARA S, BABA T, TAKADA M, WATANABE K, YANO Y, ARAI Y. Primary structure of mouse proacrosin deduced from the cDNA sequence and its gene expression during spermatogenesis. *J Biochem (Tokyo)* 1990; 108:785–791
15. KLEMM U, MÜLLER-ESTERL W, ENGEL W. ,Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease, *Hum Genet.* 1991 Oct;87(6):635-41
16. Kremling H, Flake A, Adham I, Radtke J, Wolfgang E, Exón Intrón estructura and nucleotide sequence of the rat proacrosin gene, *DNA Seq.*, 1991, 2:57-60.

17. TOPFER PETERSON E , CECHOVA D , HENSCHEN A , STEINBERGER M , FRIESS A , SUCKER A , Cell biology of acrosomal proteins , *Andrologia Suppl.* , 1990 , 1:110-121.
18. GARNER D , EASTON M , Immunofluorescent localization of acrosina in mammalian spermatozoa , *J. Exp. Zool.* , 1977 , 200:157-162.
19. VALDIVIA M., YUNES R. , MELENDEZ J., IOANNES A.E., LEYTON L., BECKER M. AND BARROS C. ; Immunolocalization of Proacrosin/Acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space , *Molecular Reproduction and Development*, 1994, 37:216-222.
20. GREEN DP, HOCKADAY AR. The histochemical localization of acrosin in guinea-pig sperm after the acrosome reaction. *J Cell Sci.* 1978 Aug; 32:177–184.
21. POLAKOSKI KL, PARRISH RF, Boar proacrosin , purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm , *J. Biol. Chem* , 1977 , Marzo 20, 252(6):1888-94.
22. BROWN C. , HARRISON R. , The activation of Proacrosina in spermatozoa from ram , bull and boar , *Biochim. Biophys. Acta* , 1978 , 526:202-217.
23. MÖRITZ A. , LILJA H. , FINK E. , Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the human acrosina , *FEBS Lett.* , 1991, 278:127-130.
24. HANCOCK JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen *Nature*, 1951 , 167 323.

25. GARNER DL, PINKEL D, JOHNSON LA, PACE, MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses *Biology of Reproduction*, 1986, 34, 127-138.
26. HARRISON RAP, VICKERS SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa *Journal of Reproduction and Fertility* ,1990, 88, 343-352.
27. FISER, P.S., R.W. FAIRFULL. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Molecular Reproduction and Development*, 1990, 25: 123-129.
28. JEYENDRAN R S; VAN DER VEN H H; PEREZ-PELAEZ M; CRABO B G; ZANEVELD L J , Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics , *Journal of reproduction and fertility* 1984;70(1):219-28.
29. TALBOT P, CHACON R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm, *Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215, 201-208.
30. PAWSON T. , Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; 373:573-580
31. ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203-212
32. LETWIN K, MIZZEN L, MOTRO B, BEN-DAVID Y, BERNSTEIN A, PAWSON T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is

- related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J* 1992; 11:3521-3531
33. CHANG MC, Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, *Nature*, 1951, 168:697-698
34. AUSTIN CR, Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg, *Aust. J. Sci. Res* 4 (Series B), 1951, 581-596
35. VISCONTI PE, BAILEY JL, MOORE GD, PAN D, OLDS-CLARKE P, KOPF GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121:1129-1137)
36. VISCONTI PE, GALANTINO-HOMER H, MOORE GD, BAILEY JL, NING X, FORNES M, KOPF GS. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 1998; 19:242-248)
37. MANOSALVA I. ,Capacitación in vitro de espermatozoides de alpaca. Tesis Título– Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2003.
38. URIONDO H, ALVAREZ C, RODRÍGUEZ C, UIPAN P Y VALDIVIA M. “Evaluación de la motilidad y reacción acrosómica durante la capacitación in vitro de espermatozoides de alpaca en presencia de zona pelúcida intacta y solubilizada” ,En acta en La XIX Reunion Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, 3-5 de Septiembre de 2008, Chile
39. VIJAYARAGHAVAN S, TRAUTMAN KD, GOUELI SA, CARR DW. A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and calcium. *Biol Reprod* 1997; 56:1450-1457

40. TASH JS, MEANS AR. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983; 28:75-104
41. LEYTON L, SALING P. 95 kd Sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 1989; 57:1123-1130
42. NAZ RK, AHMAD K. Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity, and involvement of FA-1. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:397-408
43. LECLERC PIERRE, DE LAMIRANDE EVE, GAGNON CLAUDE. Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate-Dependent Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Relation to Human Sperm Capacitation and Motility, *Biology of Reproduction*, 1996, 55, 684-692.
44. LUCONI M, KRAUSZ C, FORTI G, BALDI E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1996; 55:207-216)
45. GALANTINO-HOMER HL, VISCONTI PE, KOPF GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biology of Reproduction*, 1997; 56:707-719
46. CHAMBERLAND A, FOURNIER V, TARDIF S, SIRARD MA, SULLIVAN R, BAILEY JL. The effect of heparin on motility parameters and protein

- phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, 2001, 55:823-835)
47. KALAB P, PEKNICOVA J, GEUSSOVA G, MOOS J. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular Reproduction Development*, 1998; 51:304-314
48. FLESCH FM, COLENBRANDER B, VAN GOLDE LM, GADELLA BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 262:787-792
49. KASTURI M , S. SHIVAJI, Novel Tyrosine-Phosphorylated Post-Pyruvate Metabolic Enzyme, Dihydrolipoamide Dehydrogenase, Involved in Capacitation of Hamster Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 2004; 70: 887 - 899.
50. B. S. Pukazhenthil, J. A. Long, D. E. Wildt, M. A. Ottinger, D. L. Armstrong and J. Howard, Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species, *Journal of Andrology*, 1998, Vol 19, Issue 6 675-685
51. VISCONTI PE, MOORE GD, BAILEY JL, LECLERC P, CONNORS SA, PAN D, OLDS-CLARKE P, KOPF GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 1995; 121:1139-1150
52. NAZ RAJESH K. , Involvement of protein Tyrosine Phosphorylation of human sperm in capacitation / acrosome reaction and zona pellucida binding , *Frontiers in Bioscience* , 1996, 206-213.

53. TARDIF S, SIRARD MA, SULLIVAN R, BAILEY JL. Identification of capacitation-associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated with ATP-<sup>32</sup>P. *Molecular Reproduction and Development*, 1999; 54:292-302
54. URNER FRANCOISE, SAKKAS DENNY, Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa, *Reproduction*, 2003, 125, 17–26
55. MAHONY MC, GWATHMEY T. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1999, 60: 1239-1243.
56. NASSAR, A., MAHONY, M., MORSHEDI, M. ET AL. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertility and Sterility*, 1999 ,71, 919–923.
57. SI Y; OKUNO M , Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation ,*Biology of reproduction*, 1999, 61(1):240-6.
58. MANDAL, A., NAABY-HENSEN, S., WOLKOWICZ, M. J., KLOTZ, K., SHETTY, J., RELIEF, J. D., COONROD, S. A., KINTER, M., SHERMAN, N., CESAR, F. ET AL. FSP95, a testis-specific 95 kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1999, 61,1184 -1197.
59. TURNER R, ERIKSSON RLM, GERTON GL AND MOSS SE ,Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Molecular Human Reproduction*, 1999 , 5,816–824

60. URNER FRANCOISE, SAKKAS DENNY, Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa, *Reproduction*, 2001, 125, 17–26
61. ECROYD H, JONES , AITKEN J, Tyrosine Phosphorylation of HSP-90 During Mammalian Sperm Capacitation ,*Biology of Reproduction*, 2003, 10.1095
62. MICHAUT Y, TOMES C , MAYORGA, L. Acrosomal exocytosis in permeabilized human sperm is mediated by the small GTP binding protein Rab3A. *Biology of Reproduction*, 2000, 62, 1084-1089
63. FICARRO SCOTT, CHERTIHIN OLGA, WESTBROOK V. ANNE, WHITE FOREST, JAYES FRIEDERIKE, KALAB PETR, MARTO JARROD A., SHABANOWITZ JEFFREY, HERR JOHN C., HUNT DONALD F. Y VISCONTI PABLO E. , Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation , *Journal of Biology and Chemistry*, 2003, Vol. 278, Issue 13, 11579-11589.
64. RABOUILLE, C., T. LEVINE, J.M. PETERS AND G. WARREN. An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediates cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell*, 1995, 82:905-914
65. KADAM, A. L., FATEH, M. AND NAZ, R. K. . Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in humans. *Journal of Reproduction and Immunology*, 1995, 29, 19-30.
66. SPALLANZANI L. *Observatione e esperienze in torno ai vercimelli spermetici del' uomo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetatile opuscolo. II. Modena.1776.*

67. POLGE C, SMITH A U, PARKES A S , Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures , *Nature*, 1949, 164 (4172):666.
68. SHERMAN, J.K ,BUNGE, R.G.,Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 1953, 172, 767–768.
69. DONNELLY, E.T., LEWIS, S.E.M., MCNALLY, J. THOMPSON, W. , In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome.,*Fertility and Sterility*,1998, 70, 305–314
70. GREEN CE, WATSON PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation, *Reproduction*, 2001 122:889-898
71. AGCA Y., GILMORE J., BYERS M., WOODS E., CRITSER J. , Osmotic Characteristics of Mouse Spermatozoa in the Presence of Extenders and Sugars, *Biology of Reproduction*, 2002, 67, 1493-1501.
72. GUTHRIE HD, Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa.*Biology of reproduction* ,2002 ,1811-1816
73. GAO DY, MAZUR P, CRISTER JK.. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Crister JK (Ed.). *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. San Diego, CA: Academic Press, 1997, pp. 263 -328.
74. BLANCO JM. ,Species variation in osmotic ,cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry , eagle , and peregrine falcon spermatozoa, *Biology of reproduction*, 2000, 1164-1171.
75. VALDIVIA ,M; SUYO, M; MANOSALVA, I; VILLEGAS, M ; QUISPE , J ; CANORIO , N ; CARRILLO , E; UIPAN ,P ,Tolerancia osmótica y

- respuesta a crioprotectores permeables en espermatozoides de alpaca, Libro de resúmenes de la XII Reunión Científica del ICBAR , 2003, 86.
76. VALDIVIA M., MANOSALVA I., QUISPE J., VILLEGAS M., CANORIO N., UIPAN P. ,Effects Of Permeating Cryoprotectants On Survive And Motility In Alpaca Spermatozoa , Thirty-Sixth Annual Meeting Of The Society For The Study Of Reproduction, Biology of Reproduction, 2003, Volume 68, Supplement 1, 279.
77. VALDIVIA ,M; SUYO, M;CANORIO , N ; CARRILLO , E; UIPAN ,P ; La integridad de la membrana espermática de alpacas post criopreservación , Libro de resúmenes de la XII Reunión Científica del ICBAR , 2004 , 80
78. VALDIVIA ,M;CANORIO , N ; CARRILLO , E; UIPAN ,P; Effects of cryoprotectans on Alpaca`s spermatozoa during cooling process; 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction, 2005, special issue; July 24–27 ;228.
79. CANORIO N. , UIPAN P., VALDIVIA M., Efecto de dos agentes crioprotectores permeables durante el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca (Lama pacos) , Libro de Resumenes de la XV Reunion Científica del ICBAR , 2006 , 56
80. HOLT, C., HOLT, W. V., MOORE, H. D. M., REED, H. C. B. & CURNOCK, R. M. ,Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. Journal of Andrology, 1997, 18, 312-323.
81. WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-

- thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995, 7:871–891.
82. KAO, S.; H. CHAO; Y. WEI. ,Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*,1998, 4: 657-666
83. RASUL ZAHID, AHMAD NASIM, ANZAR MAMAD,Changes en la motion characteristics , plasma membrane integrity , and acrosome morphology during cryopreservation of búfalo spermatozoa, *Journal of Andrology* , 2001.
84. AMANN, R. P. AND R. H. HAMMERSTEDT. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction*, 1980, 23:647.
85. JONES R. C. AND STEWART D. L. , The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa, *Journal of Reproduction and Fertility*, 1979, 56 233-238
86. COURTENS J.L., EKWALL H., PAQUIGNON M., PLÖEN L., Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing, *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, 87, 613-626.
87. HOLT WV, NORTH RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1994;51: 414–424
88. SHANNON, P., AND R. VISHWANATH.. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen

- bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science*, 1995, 39:1–10.
89. SAACKE, R. G. AND J. M. WHITE. Semen quality tests and their relationship to fertility. Proc. 4<sup>th</sup> Tech., Conf. Artificial Insemination Reproduction, 1972, p. 22.
90. CHINNAIYA G P, GANGULI N C, Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. *Zentralbl Veterinarmed A*, 1980; 27 (4):339-42 6775476 .
91. PALENCIA D.D., GARNER D.L, HUDIG D., HOLCOMBE D.W., BURNER C.A., REDELMAN D., FERNANDEZ G.C.J, KAM A., y. POWERS J.C, Determination of Activable Proacrosin/Acrosin in Bovine Sperm Using an Irreversible Isocoumarin Serine Protease Inhibitor', *Biology of Reproduction*, 1996, 55, 536-542.
92. O'CONNOR MT, AMANN R. P. AND SAACKE R. G. , Comparisons of Computer Evaluations of Spermatozoal Motility with Standard Laboratory Tests and their use for Predicting Fertility, *Journal of Animal Science*, 1981, 53:1368-1376.
93. GRAHAM, E. F., B. G. CRABO AND K. I. BROWN. Effect of some hydrogen buffers on the freezing and storage of bull spermatozoa, *Journal of Dairy Science*, 1972, 55:372.
94. CORMIER N, SIRARD M. Y BAILEY J L., Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation, *Journal of Andrology*, 1997, Vol. 18. No. 4.

95. BEDFORD SJ, VARNER DD, MEYERS SA. Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2000, Suppl 56:133-140
96. POMMER A., RUTLLANT J. AND. MEYERS S., Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions, *Biology of Reproduction*, 2003, 68, 1208–1214.
97. BAILEY JL, BERUBE B. Mechanisms of cryopreservation-induced capacitation of bovine sperm. *Journal of Andrology*, 1998, 20:13.
98. COLLIN S, SIRARD M, DUFOUR M, AND. BAILEY J L, Sperm Calcium Levels and Chlortetracycline Fluorescence Patterns are Related to the In Vivo Fertility of Cryopreserved Bovine Semen , *Journal of Andrology*, 2000, Vol. 21, No. 6.
99. BAILEY J L, JEAN-FRANC, BILODEAU O, AND CORMIER N, Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon , *Journal of Andrology*, 2000, Vol. 21, No. 1.
100. BUHR MM, CURTIS EF, KAKUDA NS. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 1994, 31:224-238.
101. CORMIER N. Y BAILEY J. L., A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 2003, 69, 177–185.
102. WHO.: “Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction”. Fourth edition .Cambridge University Press. UK. 1999.

103. LAEMMLI , UK , Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 , Nature, 1970,15;227(5259):680-5.
104. LEYTON L., DE IOANNES A., CROXATTO H.B., GRAHAM E.J. AND ELCE J.S. Two satisfactory methods for purification of human acrosin. Biochemical Cell Biology , 1986 , 64, 1020-1024
105. SANTIANI A. ,HUANCA W. , SAPANA R. , HUANCA T., SEPÚLVEDA N , SÁNCHEZ R,Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (Lama pacos) semen using two different cryoprotectants and extenders, Asian journal of Andrology,2005,7:303-309.
106. BUFFONE M.G., DONCEL G.F., BRIGGILER C.I.MARIN, VAZQUEZ-LEVIN M.H., CALAMERA J.C. ,Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation, Human Reproduction, 2004, Vol.19, No.1 pp. 139±146.
107. ROSATTI, M. I., BECONI, M. T. y CORDOBA, M. Proacrosin-acrosin activity in capacitated and acrosome reacted sperm from cryopreserved bovine semen, Biocell, 2004, vol.28, no.3, p.311-316.

## VIII.-ANEXO

### 1.-FOTOS

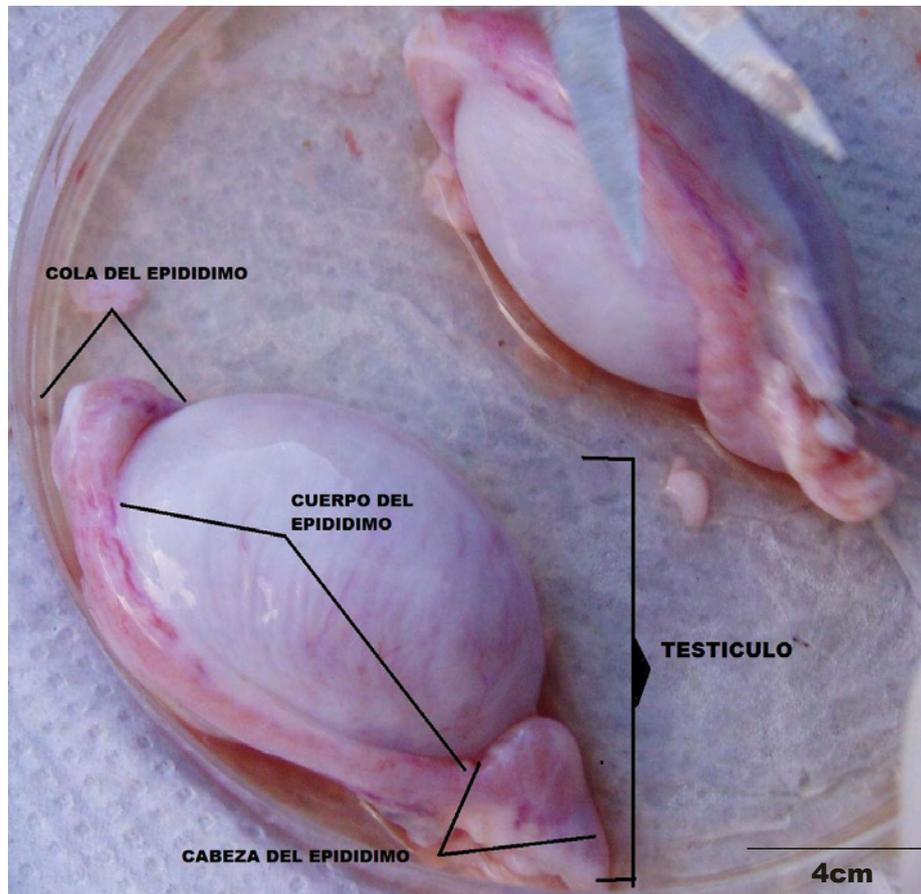


Foto 1: Colección de la muestra .Muestras de epidídimo obtenidas del camal municipal de Huancavelica. A) Camal de Huancavelica, B) Alumno colectando muestras de alpaca, C) Morfología del testículo y epidídimo de alpaca.

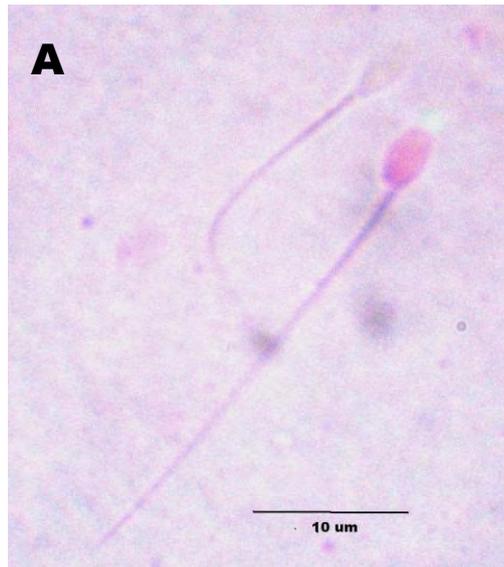


Foto 2: Parámetros de análisis: Viabilidad e integridad de membrana. (A) Espermatozoides coloreados de rosa representan a espermatozoides muertos y los espermatozoides incoloros representan a espermatozoides vivos, (B) Patrones de Flagelo enrollado que representan a espermatozoides con la membrana plasmática intacta, y espermatozoides con el flagelo recto que representan a espermatozoides con membrana plasmática alterada, Todas las observaciones son a 400X.

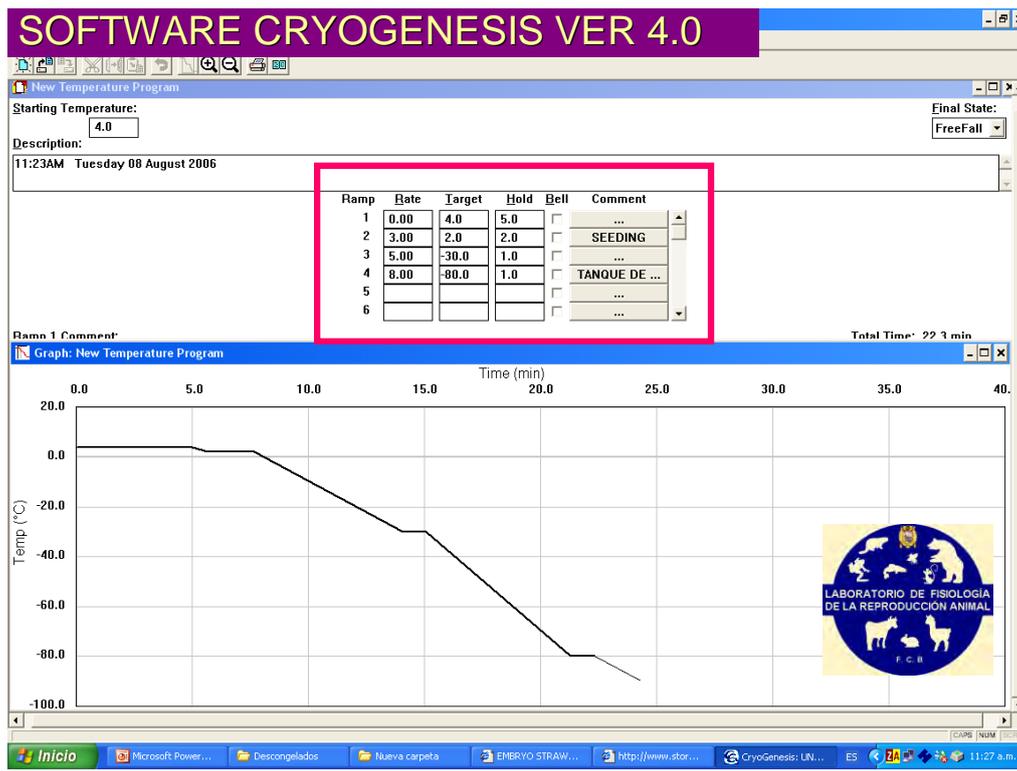


Foto 3: Proceso de criopreservación. Material usado y el software Cryogenesis Ver 4.0 (congelamiento lento mediante el uso de sistema de enfriamiento termocontrolado)

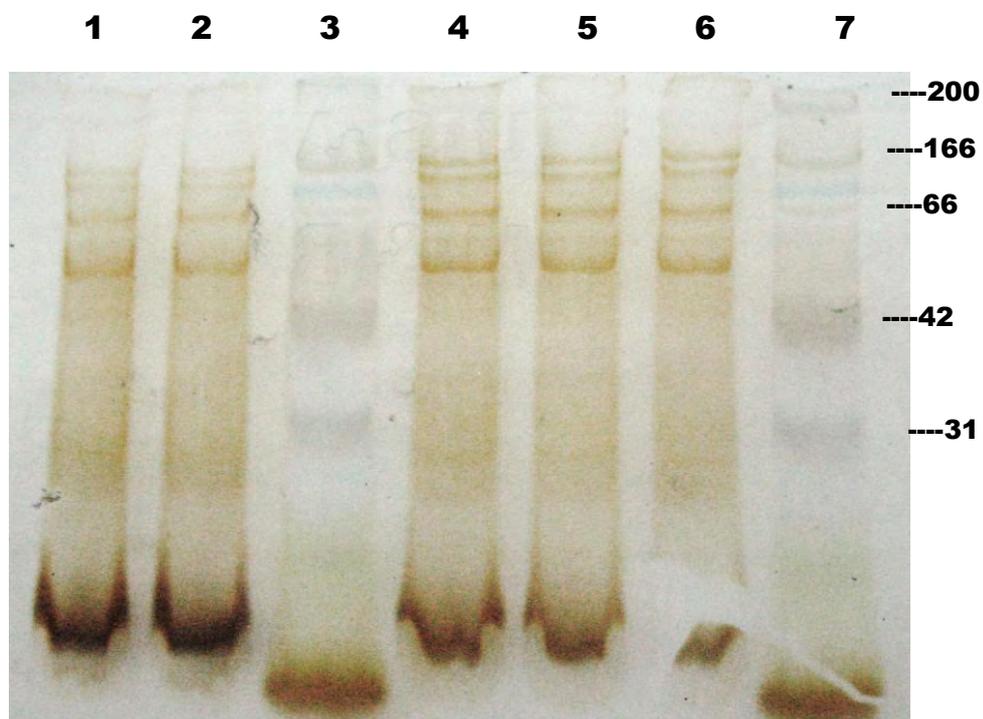


Foto 4: Patrón electroforético de proteínas de membrana coloreados con plata. Dentro del grupo de proteínas de membrana se encuentra las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina .Carril 1 y 2: Muestra de espermatozoides frescos capacitados. Carril 4, 5 y 6: Muestra de espermatozoides criopreservados. Carril 3 y 7: Marcador de peso molecular.

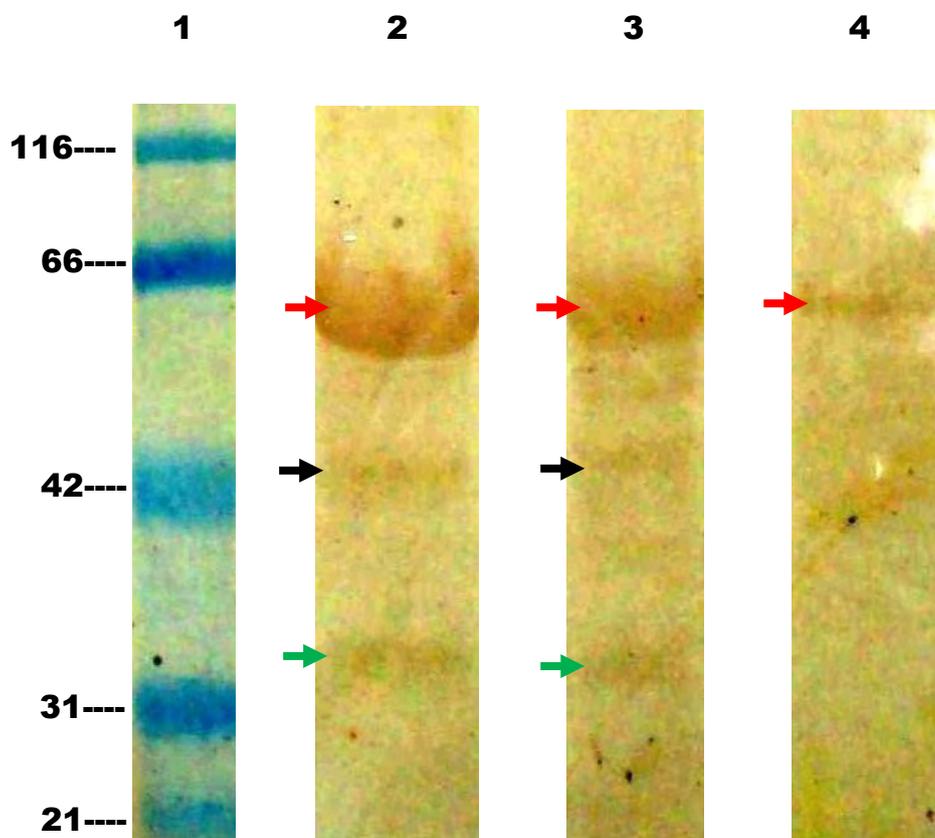


Foto 5: Identificación de las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina por Western Blot revelado con plata. Estas proteínas fueron identificadas mediante el empleo del anticuerpo PY20, se usaron muestras de marcador de peso molecular (1), muestra de espermatozoides criopreservados (carril 2), muestras de espermatozoides capacitados (carril 3), muestra de espermatozoides frescos (carril 4). Se observó diferencias en la presencia de ciertas bandas entre el grupo de espermatozoides capacitados y criopreservados (60 KDa flecha roja, 42 KDa flecha negra y 33 KDa flecha verde), por el contrario se observó que los espermatozoides frescos presentaban pocas proteínas fosforiladas (Banda de 60 KDa flecha roja).

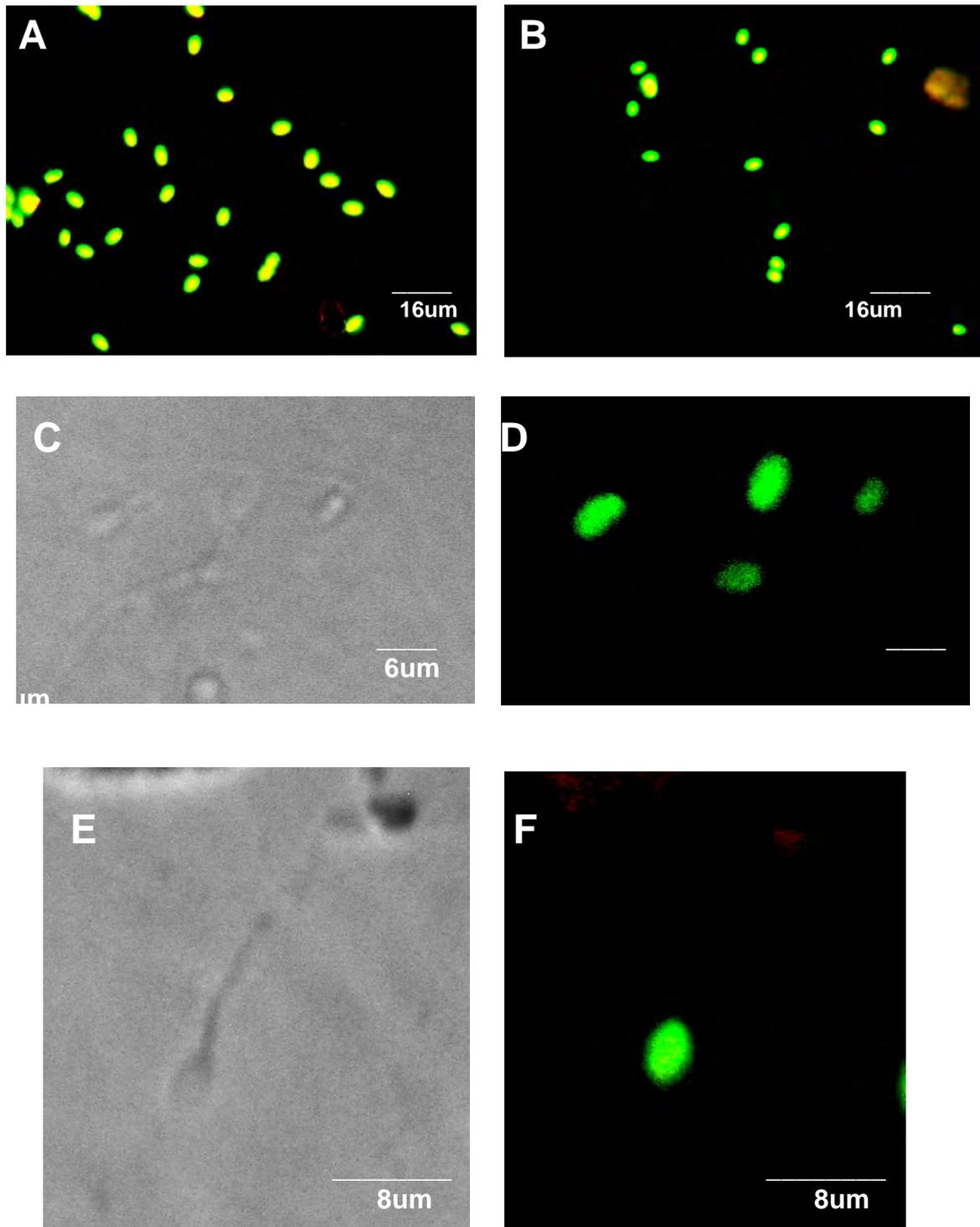


Foto 6: Patrón de inmunofluorescencia de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. Se observó fluorescencia positiva para la región de la cabeza del espermatozoide tanto en espermatozoides capacitados (A) y espermatozoides criopreservados (B). A mayor aumento (400X) espermatozoides capacitados (C y D) y espermatozoides criopreservados (E y F), imágenes C y E corresponden a las imágenes en contraste de fases.

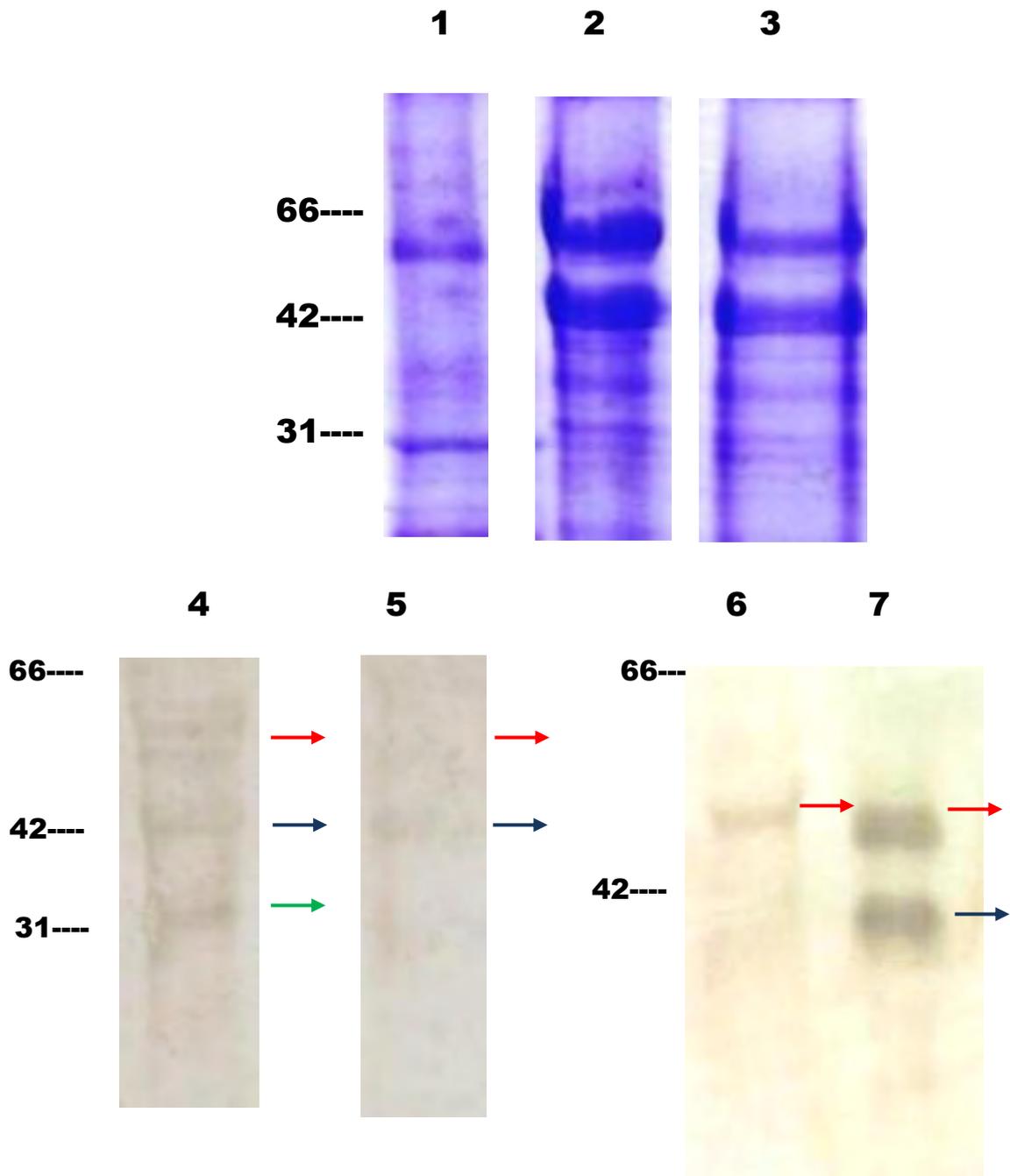


Foto 7: Identificación del estado del Sistema Proacrosina-Acrosina. Carril 1, 2 y 3 muestran el patrón electroforetico de muestras de extractos proteicos de espermatozoides frescos (Carril 1), espermatozoides criopreservados (Carril 2) y espermatozoides capacitados (Carril 3). Los carriles 4, 5, 6 y 7 muestran las bandas identificadas por el anticuerpo Anti-acrosina C5F10 mediante la técnica de Western Blot: muestra de espermatozoides criopreservados (Carril 4 y 7), muestra de espermatozoides frescos (Carril 6), muestra de espermatozoides capacitados (Carril 5). Flechas rojas indican la banda para proacrosina, flechas azules indican la banda para acrosina ( $\alpha$ -acrosina), flecha verde indica la banda para acrosina ( $\beta$ -acrosina).

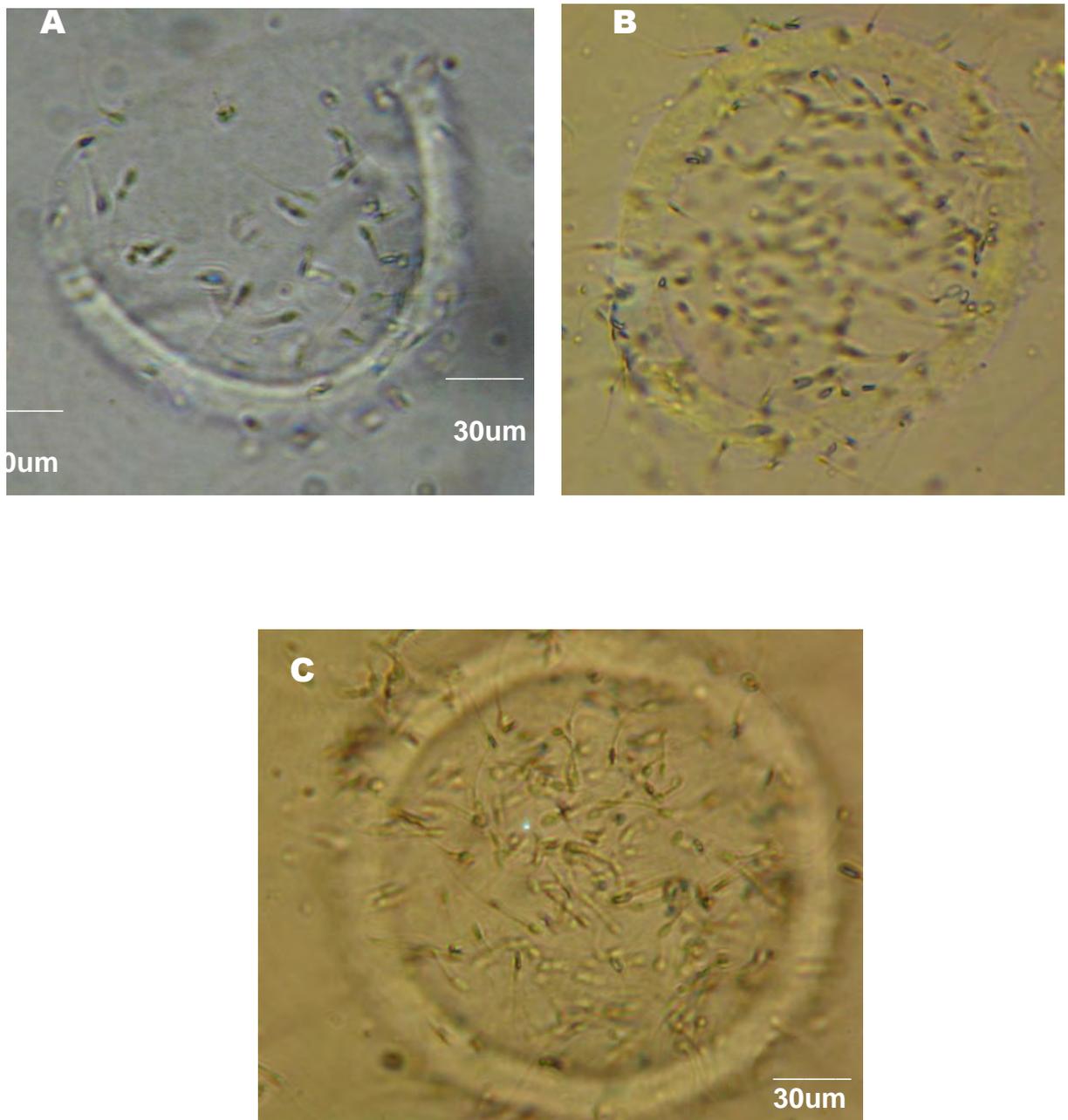


Foto 8: Prueba de unión a zona pelúcida. Se observó y evaluó el número de espermatozoides pegados para cada caso (Espermatozoides capacitados y criopreservados) en un intervalo de tiempo determinado. (A) Toma ejemplo para el grupo de espermatozoides criopreservados hecha a los treinta minutos, (B) Toma ejemplo para el grupo de espermatozoides criopreservados hecha a la hora de incubación, (C) Toma ejemplo para el grupo de espermatozoides criopreservados hecha a las dos horas de observación.

**2.-FIGURAS:**

Figura 1: Diferencias encontradas entre los porcentajes de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática entre los espermatozoides frescos, capacitados y criopreservados

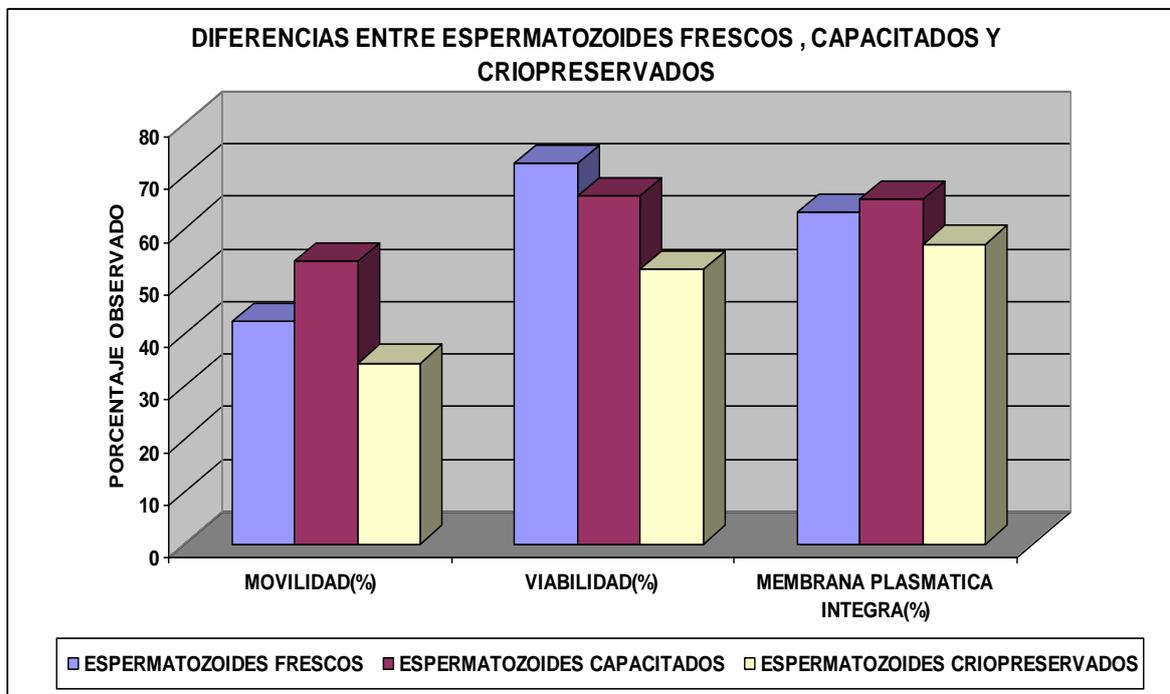


Figura 2: Resultados de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática obtenidos después del proceso de descongelamiento cuando se uso el agente crioprotector Dimetilsulfoxido a las concentraciones de 0.5M, 0.25M y 0.125M.

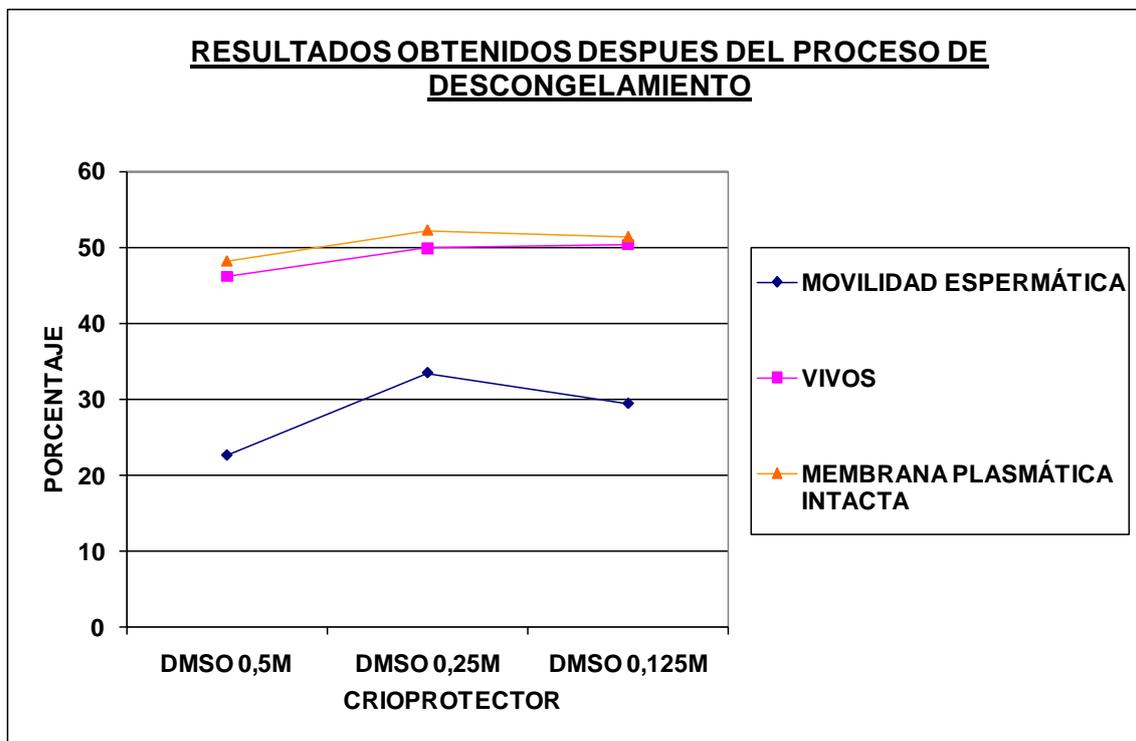


Figura 3: Resultados de movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática obtenidos después del proceso de descongelamiento cuando se uso el agente crioprotector Dimetilacetamida a las concentraciones de 0.75M, 0.37M y 0.18M.

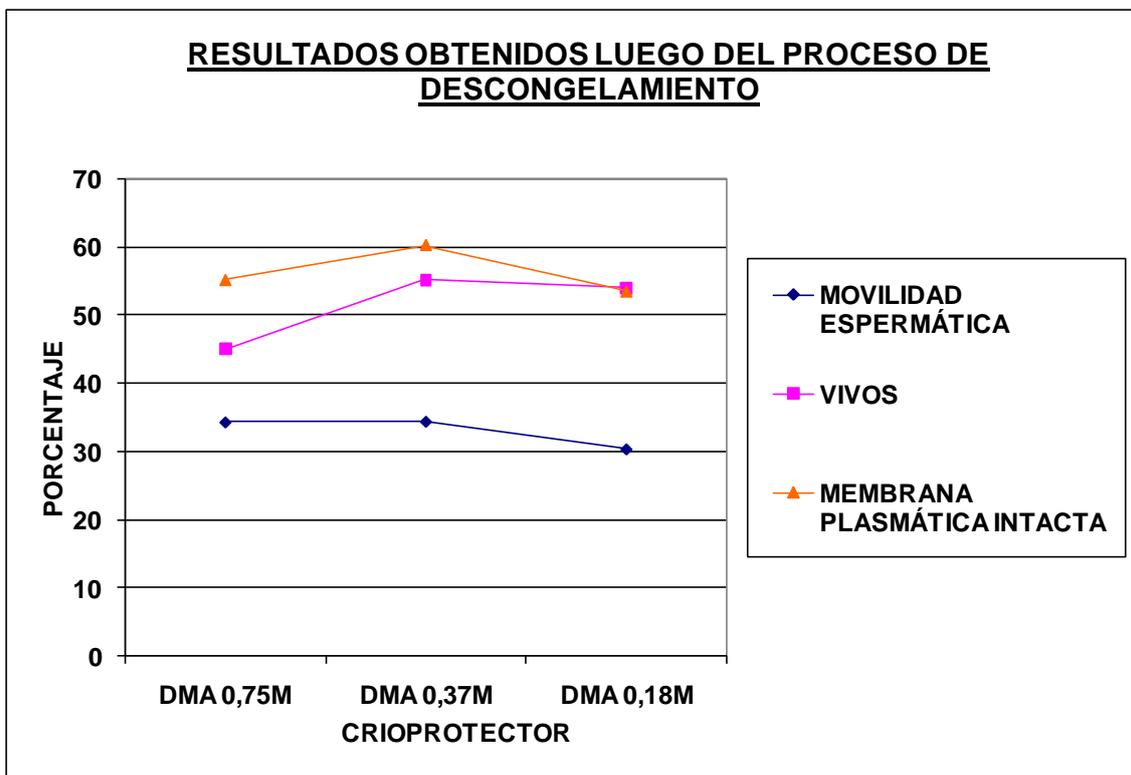


Figura 4: Diferencias encontradas en el número de espermatozoides que presentaban fluorescencia positiva para el anticuerpo 4G10 en la región de la cabeza.

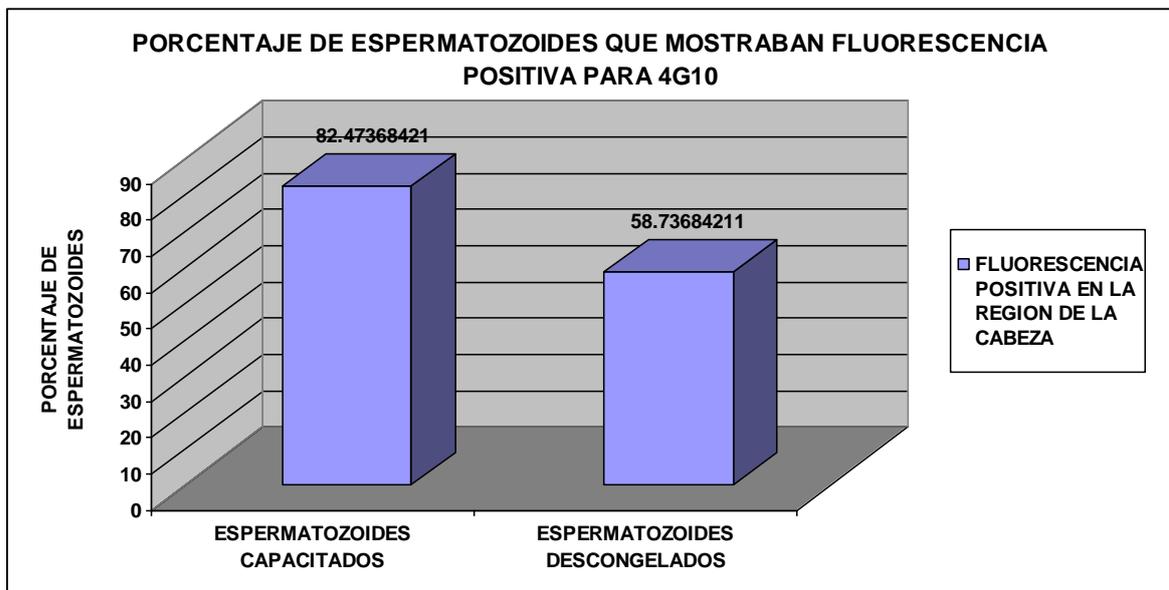
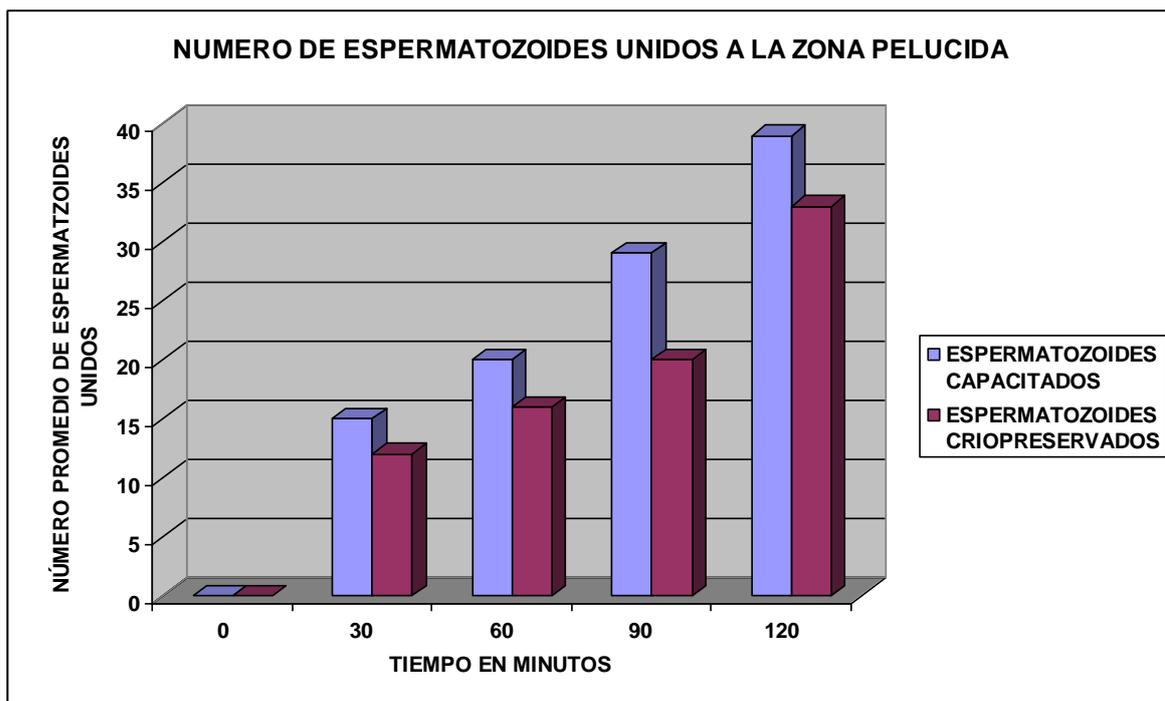


Figura 5: Diferencias encontradas entre el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida entre espermatozoides capacitados *in vitro* y espermatozoides criopreservados, las evaluaciones fueron realizadas en intervalos de tiempo de treinta minutos, hasta completar un periodo total de ciento veinte minutos.



### 3.-TABLAS

**Tabla N°1:** Resultados obtenidos de las muestras iniciales.

<b>PARAMETRO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>A</b>	<b>21.73</b>
<b>B</b>	<b>13.85</b>
<b>C</b>	<b>6.67</b>
<b>Promedio de movilidad</b>	<b>42.25</b>
<b>D</b>	<b>57.75</b>
<b>Vivos</b>	<b>72.45</b>
<b>Membrana Plasmática Integra</b>	<b>63.15</b>

Donde:

A: Patrón de movilidad, progresivamente rápidos

B: Patrón de movilidad, progresivamente lentos

C: Patrón de movilidad, se mueven en su sitio, no avanzan.

D: Patrón de movilidad, no se mueven

Promedio de movilidad: Suma de los valores de A, B y C

**Tabla N°2:** Resultados obtenidos después del proceso de descongelamiento. Se realizó el descongelamiento a 50°C por siete segundos cuando se usó el medio de criopreservación Yolk-Citrato suplementado con los agentes crioprotectores a diferentes concentraciones.

<b>PARAMETRO</b>	<b>DMA 0,75M</b>	<b>DMA 0,375M</b>	<b>DMA 0,18M</b>	<b>DMSO 0,5M</b>	<b>DMSO 0,25M</b>	<b>DMSO 0,125M</b>
<b>A (%)</b>	5.48	7.83	8.42	3.75	6.27	6.74
<b>B (%)</b>	9.63	11.22	7.32	7.74	11.90	9.31
<b>C (%)</b>	19.51	15.38	14.66	11.19	15.29	13.39
<b>PROMEDIO DE MOVILIDAD (%)</b>	34.63	34.42	30.40	22.68	33.45	29.44
<b>D (%)</b>	65.34	65.58	67.10	78.11	66.56	70.57
<b>VIVOS (%)</b>	45.02	55.32	54.11	46.11	49.90	50.34
<b>MUERTOS (%)</b>	54.48	44.69	45.89	53.89	50.10	49.66
<b>MEMBRANA PLASMÁTICA INTEGRA (%)</b>	55.23	60.28	53.58	48.11	52.19	51.31
<b>MEMBRANA PLASMÁTICA ALTERADA (%)</b>	44.77	39.78	46.42	51.90	47.81	48.69

Donde:

A: Patrón de movilidad, progresivamente rápidos

B: Patrón de movilidad, progresivamente lentos

C: Patrón de movilidad, se mueven en su sitio, no avanzan.

D: Patrón de movilidad, no se mueven

Promedio de movilidad : Suma de los valores de A, B y C.

**Tabla N°3:** Resultados obtenidos después del proceso de capacitación.

<b>PARAMETRO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>A (%)</b>	<b>23.5</b>
<b>B (%)</b>	<b>20.1</b>
<b>C (%)</b>	<b>10.1</b>
<b>PROMEDIO DE MOVILIDAD (%)</b>	<b>53.7</b>
<b>D (%)</b>	<b>46.3</b>
<b>VIVOS (%)</b>	<b>67.8</b>
<b>MUERTOS (%)</b>	<b>32.2</b>
<b>MEMBRANA PLASMÁTICA INTEGRA (%)</b>	<b>65.7</b>
<b>MEMBRANA PLASMÁTICA ALTERADA (%)</b>	<b>34.3</b>

Donde:

A: Patrón de movilidad, progresivamente rápidos

B: Patrón de movilidad, progresivamente lentos

C: Patrón de movilidad, se mueven en su sitio, no avanzan.

D: Patrón de movilidad, no se mueven

Promedio de movilidad: Suma de los valores de A, B y C.

**Tabla N°4:** Resultados obtenidos de la inmunolocalización de proteínas fosforiladas. Se muestra el promedio de los porcentajes de espermatozoides que mostraban fluorescencia positiva en la región de la cabeza para el anticuerpo antifosfoproteínas 4G10.

<b>PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON FLUORESCENCIA EN LA REGIÓN DE LA CABEZA</b>	
<b>ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS</b>	<b>ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS</b>
82.47368421	58.73684211

**Tabla N°5:** Resultados obtenidos de la capacidad de unión a zona pelúcida. Los resultados pertenecen a los grupos de espermatozoides capacitados y espermatozoides criopreservados, analizados en periodos de tiempo de 30 minutos, hasta completar los 120 minutos.

<b>TIEMPO (MINUTOS)</b>	<b>ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS</b>	<b>ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS</b>
	<b>Número promedio de espermatozoides pegados a la zona pelúcida</b>	<b>Número promedio de espermatozoides pegados a la zona pelúcida</b>
0	0	0
30	15.2	12.05
60	21.42	16.15
90	32.05	20.68
120	49.68	33.47

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### I.-DIFERENCIAS DE MEDIAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS DE ESPERMATOZOIDES FRESCOS, ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS Y ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS.

#### 1.-Datos de movilidad observados:

INDIVIDUO	MOVILIDAD TOTAL OBSERVADA (%)		
	ESPERMATOZOIDES FRESCOS INICIALES	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	42	53	34
2	41	52	33
3	41	53	35
4	40	53	34
5	40	58	33
6	42	57	37
7	43	53	36
8	45	54	36
9	47	53	32
10	40	54	36
11	41	55	37
12	45	55	32
13	46	53	33
14	41	48	33
15	41	54	33
16	41	60	36
17	42	50	38
18	43	53	33
19	42	53	34
PROMEDIO	42.26315789	53.73684211	34.47368421
DESVIACION ESTÁNDAR	2.077447827	2.642433753	1.836918345

## 2.-Datos de viabilidad observados:

INDIVIDUO	VIABILIDAD OBSERVADA (%)		
	ESPERMATOZOIDES FRESCOS INICIALES	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	75	70	50
2	68	68	52
3	75	67	53
4	68	68	54
5	76	75	54
6	72	70	50
7	75	65	58
8	60	52	45
9	80	63	50
10	65	66	45
11	72	70	55
12	78	68	58
13	79	60	55
14	67	61	59
15	68	65	56
16	73	75	53
17	78	60	45
18	78	68	50
19	70	65	53
PROMEDIO	72.47368421	66.10526316	52.36842105
DESVIACION ESTÁNDAR	5.430044209	5.435426354	4.258462507

### 3.-Datos de integridad de membrana plasmática observados:

INDIVIDUO	INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA OBSERVADA (%)		
	ESPERMATOZOIDES FRESCOS INICIALES	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	65	67	59
2	58	65	50
3	65	67	63
4	66	68	55
5	64	68	59
6	63	65	60
7	65	68	60
8	65	67	55
9	55	59	48
10	45	55	60
11	66	68	58
12	70	74	62
13	66	68	55
14	55	52	62
15	69	69	60
16	66	68	55
17	65	67	49
18	67	70	59
19	65	64	55
PROMEDIO	63.15789474	65.73684211	57.05263158
DESVIACION ESTÁNDAR	5.955978862	5.205148149	4.40294957

**4.-Análisis estadístico realizado usando como variables la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática entre los grupos de estudio (espermatozoides frescos, espermatozoides capacitados, espermatozoides criopreservados).**

A) Tipo de distribución de parámetros medidos (movilidad, viabilidad e integridad de membrana), se observa que todos los parámetros presentan una distribución normal Kolmogorov-Simimov  $Z \leq 0.05$

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MOVILIDAD2	VIABILIDAD2	MEMBRANA2
N		57	57	57
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.4520	.6966	.6709
	Std. Deviation	.09285	.12814	.07935
Most Extreme Differences	Absolute	.155	.095	.169
	Positive	.141	.094	.096
	Negative	-.155	-.095	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		1.171	.721	1.277
Asymp. Sig. (2-tailed)		.129	.676	.076

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B) Según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variables la movilidad, viabilidad e integridad de membrana

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MOVILIDAD2	Between Groups	.448	2	.224	352.804	.000
	Within Groups	.034	54	.001		
	Total	.483	56			
VIABILIDAD2	Between Groups	.673	2	.336	73.679	.000
	Within Groups	.247	54	.005		
	Total	.919	56			
MEMBRANA2	Between Groups	.123	2	.062	14.521	.000
	Within Groups	.229	54	.004		
	Total	.353	56			

**MOVILIDAD2**Tukey HSD<sup>a</sup>

TIPOS DE ESPERMATOZOIDES	N	Subset f or alpha = .05		
		1	2	3
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS	19	.3520		
ESPERMATOZOIDES FRESCOS NORMALES	19		.4365	
ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	19			.5676
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 19.000.

**VIABILIDAD2**Tukey HSD<sup>a</sup>

TIPOS DE ESPERMATOZOIDES	N	Subset f or alpha = .05		
		1	2	3
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS	19	.5519		
ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	19		.7243	
ESPERMATOZOIDES FRESCOS NORMALES	19			.8137
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 19.000.

**MEMBRANA2**Tukey HSD<sup>a</sup>

TIPOS DE ESPERMATOZOIDES	N	Subset f or alpha = .05	
		1	2
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS	19	.6081	
ESPERMATOZOIDES FRESCOS NORMALES	19		.6856
ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	19		.7191
Sig.		1.000	.260

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 19.000.

## II.-DIFERENCIAS DE MEDIAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS SEGÚN EL TIPO DE AGENTE CRIOPROTECTOR USADO.

1.-Análisis estadístico realizado usando como variables la movilidad, viabilidad e integridad de membrana entre los grupos de estudio (agentes crioprotectores: DMSO 0.5M, DMSO 0.25M, DMSO 0.125M, DMA 0.75M, DMA 0.375M, DMA 0.18M)

A) Tipo de distribución del parámetro medido (Número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida), se observa que todos los parámetros presentan una distribución normal Kolmogorov-Simimov  $Z \leq 0.05$

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MOVILIDAD2	VIABILIDAD2	MEMBRANA2
N		24	24	24
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.3563	.5440	.4448
	Std. Deviation	.12530	.12230	.11690
Most Extreme Differences	Absolute	.201	.265	.152
	Positive	.129	.265	.122
	Negative	-.201	-.179	-.152
Kolmogorov -Smirnov Z		.986	1.299	.747
Asymp. Sig. (2-tailed)		.286	.068	.633

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B) Según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variables la movilidad, viabilidad e integridad de membrana.

## ANOVA

				Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Motilidad	Between Groups	(Combined) Linear Term	Contrast Deviation	440.942	5	88.188	59.435	.000
				90.653	1	90.653	61.096	.000
				350.289	4	87.572	59.020	.000
	Within Groups			26.708	18	1.484		
Total				467.650	23			
Viabilidad	Between Groups	(Combined) Linear Term	Contrast Deviation	958.128	5	191.626	23.460	.000
				3.551	1	3.551	.435	.518
				954.578	4	238.644	29.217	.000
	Within Groups			147.025	18	8.168		
Total				1105.153	23			
Integridad de membrana	Between Groups	(Combined) Linear Term	Contrast Deviation	697.852	5	139.570	21.522	.000
				176.808	1	176.808	27.264	.000
				521.044	4	130.261	20.086	.000
	Within Groups			116.731	18	6.485		
Total				814.583	23			

## Motilidad

Tukey HSD<sup>a</sup>

Agente crioprotector	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
DMSO 0.5M	4	22.1050			
DMA 0.18M	4		26.9850		
DMSO 0.125M	4			29.7275	
DMSO 0.25M	4			30.8325	
DMA 0.75M	4				34.3275
DMA 0.37M	4				34.4425
Sig.		1.000	1.000	.790	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

## Viabilidad

Tukey HSD<sup>a</sup>

Agente crioprotector	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
DMA 0.18M	4	40.5000		
DMSO 0.5M	4	45.3025	45.3025	
DMA 0.75M	4	45.7375	45.7375	
DMSO 0.25M	4		48.7350	
DMSO 0.125M	4		50.3825	
DMA 0.37M	4			60.9150
Sig.		.150	.172	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

### Integridad de membrana

Tukey HSD<sup>a</sup>

Agente crioprotector	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
DMSO 0.5M	4	47.3600		
DMA 0.18M	4	50.4400	50.4400	
DMSO 0.125M	4	51.2350	51.2350	
DMSO 0.25M	4	52.2375	52.2375	
DMA 0.75M	4		55.0400	
DMA 0.37M	4			64.3775
Sig.		.122	.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

### III.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y COMPARACIÓN DE DATOS DE FLUORESCENCIA OBSERVADOS PARA PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE TIROSINA (PATRÓN OBSERVADO PARA LA REGIÓN DE LA CABEZA)

#### 1.-Tabla de datos usados para el análisis:

INDIVIDUO	PATRÓN DE FLUORESCENCIA POSITIVA PARA LA REGIÓN DE LA CABEZA(%)	
	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	88	56
2	78	67
3	78	68
4	89	68
5	75	56
6	76	55
7	70	50
8	82	56
9	85	59
10	90	60
11	75	54
12	86	53
13	80	55
14	83	65

15	84	60
16	85	61
17	87	59
18	89	60
19	87	54
PROMEDIO	82.47368421	58.73684211
DESVIACION ESTÁNDAR	5.757781412	5.237069847

**2.-Análisis estadístico realizado usando como variable la fluorescencia presentada en la región de la cabeza entre los grupos de estudio (espermatozoides capacitados y espermatozoides criopreservados).**

A) Tipo de distribución del parámetro medido (fluorescencia en la región de la cabeza), se observa que todos los parámetros presentan una distribución normal Kolmogorov-Simimov  $Z \leq 0.05$

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		FLUORES CENCIA2
N		38
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.8030
	Std. Deviation	.19489
Most Extreme Differences	Absolute	.169
	Positive	.169
	Negative	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z		1.044
Asymp. Sig. (2-tailed)		.226

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B) Según la prueba estadística de T-Student, se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variable la fluorescencia en la región de la cabeza.

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
FLUORESCENCIA2	Equal variances assumed	4.928	.033	12.624	36	.000	.34738	.02752	.29157	.40319
	Equal variances not assumed			12.624	31.034	.000	.34738	.02752	.29126	.40350

#### IV.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y COMPARACIÓN DE DATOS DEL NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES UNIDOS A LA ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS

##### 1.-Tablas de datos

INDIVIDUO	UNIÓN A ZONA PELÚCIDA A 30 MINUTOS DE INCUBACIÓN		UNIÓN A ZONA PELÚCIDA A 60 MINUTOS DE INCUBACIÓN	
	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	15	12	20	16
2	13	10	17	15
3	13	11	18	12
4	12	10	25	14
5	18	15	22	16
6	15	8	24	15
7	18	10	19	20
8	10	15	16	18
9	13	15	15	18
10	16	15	24	19
11	15	16	25	20
12	15	10	20	18
13	15	12	23	15
14	14	10	25	14
15	17	9	22	13
16	15	10	21	14
17	18	10	28	14
18	19	16	25	19
19	18	15	18	17
PROMEDIO	15.21052632	12.05263158	21.42105263	16.15789474
DESVIACION ESTÁNDAR	2.393949488	2.69719369	3.610413788	2.432720423

INDIVIDUO	UNIÓN A ZONA PELÚCIDA A 90 MINUTOS DE INCUBACIÓN		UNIÓN A ZONA PELÚCIDA A 120 MINUTOS DE INCUBACIÓN	
	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS	ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS	ESPERMATOZOIDES DESCONGELADOS
1	37	15	59	25
2	35	24	45	34
3	34	17	54	30
4	35	16	56	34
5	36	18	39	30
6	32	25	45	26
7	34	27	58	27
8	28	18	56	38
9	25	19	32	34
10	28	20	45	35
11	45	22	56	37
12	24	23	45	27
13	28	16	56	37
14	25	19	37	34
15	36	20	45	37
16	40	20	32	40
17	21	21	56	37
18	34	25	60	34
19	32	28	68	40
PROMEDIO	32.05263158	20.68421053	49.68421053	33.47368421
DESVIACION ESTÁNDAR	6.013629743	3.801354022	10.07225359	4.682929058

**2.-Análisis estadístico realizado usando como variable el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida entre los grupos de estudio (espermatozoides capacitados y espermatozoides criopreservados).**

A) Tipo de distribución del parámetro medido (número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida), se observa que el parámetro presenta una distribución normal Kolmogorov-Simimov  $Z \leq 0.05$ .

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		30 MINUTOS DE INCUBACION	60 MINUTOS DE INCUBACION	90 MINUTOS DE INCUBACION	120 MINUTOS DE INCUBACION
N		38	38	38	38
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	13.6316	18.7895	26.3684	41.5789
	Std. Deviation	2.98121	4.04139	7.60306	11.29131
Most Extreme Differences	Absolute	.203	.104	.124	.161
	Positive	.152	.104	.124	.161
	Negative	-.203	-.086	-.105	-.136
Kolmogorov-Smirnov Z		1.253	.640	.765	.992
Asymp. Sig. (2-tailed)		.087	.808	.603	.279

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B) Según la prueba estadística de T-Student, se encontró diferencias significativas entre los grupos de estudio, se usó como variable la fluorescencia en la región de la cabeza.

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
30 MINUTOS DE INCUBACION	Equal variances assumed	1.603	.214	3.817	36	.001	3.15789	.82736	1.47994	4.83585
	Equal variances not assumed			3.817	35.500	.001	3.15789	.82736	1.47912	4.83667
60 MINUTOS DE INCUBACION	Equal variances assumed	3.668	.063	5.270	36	.000	5.26316	.99877	3.23756	7.28875
	Equal variances not assumed			5.270	31.551	.000	5.26316	.99877	3.22760	7.29872
90 MINUTOS DE INCUBACION	Equal variances assumed	3.298	.078	6.965	36	.000	11.36842	1.63214	8.05828	14.67856
	Equal variances not assumed			6.965	30.404	.000	11.36842	1.63214	8.03699	14.69985
120 MINUTOS DE INCUBACION	Equal variances assumed	15.356	.000	6.361	36	.000	16.21053	2.54827	11.04239	21.37866
	Equal variances not assumed			6.361	25.434	.000	16.21053	2.54827	10.96680	21.45425