



Revista EDUCATECONCIENCIA.

Volumen 16, No. 17.

ISSN: 2007-6347

Periodo: Octubre-Diciembre 2017

Tepic, Nayarit. México

Pp. 22-31

DOI: [https://doi.org/ 10.58299/edu.v16i17.107](https://doi.org/10.58299/edu.v16i17.107)

Recibido: 08 de Octubre

Aprobado: 31 de Octubre

**Distribución de los dominios de membrana plasmática de espermatozoides
criopreservados de cerdos**

**Distribution of the domains of plasmatic membrane of sperms criopreservados of
pigs**

Autores

María Guadalupe Orozco Benítez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.

mgorozco63@gmail.com

Rafael Martín Murray Núñez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.

ramurray_13@hotmail.com

Raúl Navarrete Méndez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.

namerdsd@gmail.com

Agapito Gómez Gurrola

Universidad Autónoma de Nayarit. México.

agomez@uan.edu.mx

Distribución de los dominios de membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de cerdos

Distribution of the domains of plasmatic membrane of sperms criopreservados of pigs

Autores

María Guadalupe Orozco Benítez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
mgorozco63@gmail.com

Rafael Martín Murray Núñez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
ramurray_13@hotmail.com

Raúl Navarrete Méndez

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
namerdsd@gmail.com

Agapito Gómez Gurrola

Universidad Autónoma de Nayarit. México.
agomeza@uan.edu.mx

Resumen

Se utilizaron 3 sementales fértiles por raza: Yorkshire, Landrace, Duroc y Cerdo Pelón Mexicano. Tres eyaculados por semental extraídos alternadamente, se estudiaron por duplicado en fresco, 5°C y descongelado. Se utilizaron lectinas WGA -FITC Concanavalina A-FITC. Se contaron 100 células, por muestra. Resultados altamente significativos ($P < 0.001$), se obtuvieron entre semen fresco y 5°C, el porcentaje de espermatozoides con dominio acrosomal disminuyó 4.33 %, los dominios ecuatorial y posacrosomal aumentaron 2.67 % y 1.67 % respectivamente. En semen descongelado se observó una disminución significativa ($P < 0.001$), el porcentaje de espermatozoides con dominio acrosomal disminuyó en 15.33 %, el dominio ecuatorial y posacrosomal aumentó significativamente en 5.00 % y 10.34 % respectivamente. No hubo diferencias significativas ($P < 0.001$), entre razas para el dominio acrosomal.

Palabras claves: dominios de membrana, lectinas, espermatozoides.

Abstract

Were used 3 fertile boar by each breed: Yorkshire, Landrace, Duroc, and Creole Mexican without hair. Three ejaculates for boar were collected in alternating form, to be

studied by duplicate (fresh, 5°C and defrosted), there was in use lectins WGA -FITC Concanavalin A-FITC. 100 cell were counted for sample. Highly significant results ($P < 0.001$), they were obtained between fresh semen at 5 ° C, the percentage of sperm with domain acrosomal diminished 4.33%, the domains equatorial and posacrosomal increased 2.67% and 1.67% respectively. In defrosted semen was observed a significant decrease ($P < 0.001$) of spernes with domain acrosomal diminished in 15.33%, the equatorial domain and posacrosomal increased significantly in 5.00% and 10.34% respectively. No significant differences ($P < 0.001$), between races for domain acrosomal.

Key words. Membrane domains, lectins, sperm.

Introducción

La membrana plasmática (MP) es afectada por el proceso de criopreservación (Noiles *et al.*, 1997; Gadella *et al.*, 1995), demostraron que ocurre una distribución de los componentes en los diferentes dominios de la membrana plasmática, en los espermatozoides criopreservados.

La MP de los espermatozoides ha sido considerada como un mosaico de dominios, cada uno con características específicas. El dominio del segmento principal del acrosoma, el correspondiente al segmento ecuatorial del acrosoma, y el de la región postacrosomal (Peterson y Russel, 1985).

Estudios de microscopía de fluorescencia y electrónica usando lectinas específicas en los espermatozoides de humanos, hámster, ratas, borregos, cerdos y caballos, han servido para demostrar que la distribución de los sitios de unión a las mismas, se restringen a ciertas regiones de los espermatozoides. En el espermatozoide, los estudios con lectinas se han realizado para comprobar la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, ya que este tipo de espermatozoides presenta dominios de MP característicos manifestados a través de los carbohidratos de superficie (Eddy, 1994, Okumura *et al.*, 2012).

Los dominios de membrana son regiones dinámicas que presentan grupos específicos de lípidos, proteínas y glicoconjugados los cuales pueden experimentar cambios de manera independiente o coordinada durante la vida o los procesos fisiológicos de la célula. Los dominios son establecidos durante la espermiogénesis, sin embargo éstos

pueden cambiar en organización y composición durante la vida de la célula, como son los procesos de maduración epididimal, la capacitación y la RA (Yanagimachi, 1994; Gadella, 1995, Okumura *et al.*, 2012 Zigo, *et al.*, 2013).

En la membrana de los espermatozoides existen glicoconjugados, que han sido estudiados mediante la capacidad que presentan de unirse a proteínas de origen vegetal (lectinas). Las lectinas se encuentran en las plantas y se unen específicamente a los azúcares de la superficie de las membranas celulares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con su sustrato, y a las de los anticuerpos con sus antígenos. Las lectinas marcadas con diferentes fluorocromos han sido utilizadas para analizar la expresión, la distribución y las alteraciones de los glicoconjugados de la membrana. (Sharon, 1997; Hernández *et al.*, 1999).

En el espermatozoide, los estudios con lectinas se han realizado para comprobar la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, ya que este tipo de espermatozoides presenta dominios de MP característicos manifestados a través de los carbohidratos de superficie (Eddy, 1994).

También, diversos investigadores han utilizado la unión de lectinas a la superficie del espermatozoide para evidenciar los cambios que ocurren en la MP, durante la capacitación y reacción acrosomal (Aguas, 1989).

Materiales y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, localizada geográficamente al suroeste del estado de Nayarit, a una altitud de 1021 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 18°C, cuenta con un clima templado seco y una precipitación pluvial de 900 mm por año.

Se utilizaron 12 sementales fértiles, entrenados para la recolección de semen, de las razas comerciales Yorkshire, Landrace, Duroc, y la raza criolla Cerdo Pelón Mexicano,

con una edad aproximada de 2 años. Los sementales permanecieron estabulados en una corraleta individual, alimentados con la dieta de la granja y agua ad libitum se evaluaron tres sementales por cada grupo racial: Yorkshire (n=3), Landrace (n=3), Duroc (n=3) y la raza criolla Pelón mexicano (n=3). Tres eyaculados por semental fueron extraídos en forma alterna, para ser estudiados por duplicado en tres diferentes temperaturas, durante el proceso de congelación (fresco a 35°C, 5°C y descongelado).

La colección del semen se realizó mediante la técnica de mano enguantada. Para la congelación se utilizó el método descrito por Westendorf (Westendorf, 1970, Bwanga, 1990) Sólo se congelaron eyaculados con más del 80 % de motilidad, menos del 15 % de morfoanomalías, y una concentración espermática de 300×10^6 por mL. Se evaluaron muestras de semen fresco, 5°C y descongelados tomando 0.5mL de semen para cada temperatura analizada, 15 días después de la congelación se descongelaron las pajillas en un baño María a 56°C durante 16 segundos. El contenido de la pajilla se depositó en un tubo de ensayo con 0.5 mL de diluyente BTS a 37°C dentro del baño María.

Para la evaluación de los dominios de MP se utilizaron lectinas WGA - FITC Concanavalina A-FITC). Las muestras fueron lavadas por centrifugación/resuspensión 3 veces con PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM y Na_2HPO_4 9.6 mM, pH 7.4), para retirar el diluyente y/o exceso de yema de huevo.

Se tomó una alícuota de la muestra que contenía una concentración espermática de 35×10^6 /mL y se adicionó formaldehído al 3 % v/v, durante 30 minutos, posteriormente por centrifugación/resuspensión 2 veces se lavó la muestra con PBS a 1500 rpm/5 minutos, se desechó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento en Cloruro de Amonio (NH_4Cl 50 mM), se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1500 rpm/5min, se reconstituyó el sedimento con PBS al volumen inicial el cual se utilizó para hacer los frotis sobre portaobjetos limpios y desengrasados, teniendo en cuenta de preparar un control, que se preparó al mismo tiempo que las muestras problemas pero a éste no se le aplicó la lectina.

Los frotis se dejaron secar sobre una platina caliente a 37°C, posteriormente se introdujeron dentro de un vaso de Copplin con PBS para lavarlos agitando vigorosamente durante 3 minutos, se secó el exceso de líquido en cada frotis con papel filtro, y se procedió a la tinción con lectinas (WGA –FITC y Concanavalina A-FITC). Se utilizó un frotis para cada lectina mencionada y, se tiñó con 50 microlitros de lectina (a una concentración de 10 µg/mL en PBS) las muestras fueron incubadas en cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C en completa oscuridad. Pasado este tiempo los frotis se lavaron 4 veces, dentro de un vaso de Copplin con PBS que se agitó vigorosamente durante 3 minutos, se sacaron los frotis y se secó el exceso del líquido. Por último se aplicó 25 µL de medio de montaje (Glicerol-PBS 9:1, pH 8) y se cubrió con un cubreobjetos, se selló con esmalte de uñas transparente los lados del cubreobjetos. Se dejó secar en completa oscuridad y se observó en un microscopio de Fluorescencia, Marca Olympus BX51 Modelo BX51TRF con cámara de video Olympus DP70. Se contaron 100 células espermáticas en diferentes campos ópticos, para cada muestra analizada.

Los espermatozoides fueron clasificados como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los espermatozoides

Región	descripción
Dominio acrosomal	Fluorescencia en región acrosomal
Dominio ecuatorial	Fluorescencia en región ecuatorial
Dominio posacrosomal	Fluorescencia en región posacrosomal

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza descrita por (Steel *et al* 1997), en los casos en que el contraste de medias fue significativo ($P < 0.05$) estas medias fueron separadas mediante prueba de Tukey. Todos los datos fueron procesados con el paquete estadístico (SAS 2001).

Resultados y Discusión

Los cambios de temperatura en el proceso de criopreservación provocan que los patrones de distribución de los gliconcojugados se modifiquen; estos cambios de reorganización de los dominios de la MP del espermatozoide se observaron utilizando lectinas (WGA-FITC y CoA-FITC). Al evaluar la distribución de los dominios de la (MP) en el proceso de criopreservación en semen fresco, a 5°C y descongelado, los resultados mostraron cambios altamente significativos ($P < 0.001$) en los patrones de fluorescencia.

Cuadro 1. Efecto de la temperatura en el proceso de criopreservación sobre la distribución de los dominios de membrana plasmática del espermatozoide en la raza Yorkshire, Landrace, Duroc y Pelón Mexicano.

	Temperatura de criopreservación °C		
	Fresco	5°C	Descongelado
N	36	36	36
Distribución de los dominios de membrana %			
Acrosomal	92.16 ^a	87.83 ^b	76.83 ^c
Ecuatorial	4.66 ^c	7.33 ^b	9.66 ^a
Posacrosomal	3.16 ^c	4.83 ^b	13.50 ^b
EEM ±	1.12***	0.40***	0.79**
N	12	12	12
Dominio acrosomal (%)			
Yorkshire	91.66	86.66	76.66
Landrace	93.00	90.00	78.66
Duroc	92.66	86.66	76.00
Pelón Mexicano	91.33	88.00	76.00
EEM ±	0.38	0.57	0.50

Semen Fresco (temperatura de recolección)

Semen descongelado.

*** $P < 0.001$.

EEM (error estándar de la media).

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con lo reportado por Jiménez *et al.* (2003), quienes revelaron que conforme disminuía la temperatura en el proceso de criopreservación, la intensidad de la fluorescencia, disminuía y los patrones de fluorescencia se modificaban al congelar espermatozoides de cerdo. Tanto la WGA como la Concanavalina A, se unen a azúcares de superficie, como son la manosa, glucosa y ácido sialico, que están distribuidos predominantemente sobre la superficie de membrana plasmática del espermatozoide. WGA se une al ácido sialico y N acetilglucosamina y CoA se une a D-manosil y D-Glucosyl (Jiménez *et al.*, 2003, Okumura *et al.*, 2012)

En la membrana de los espermatozoides existen glicoconjugados que han sido estudiados mediante la capacidad de unirse a proteínas de origen vegetal (lectinas) marcadas con un fluorocromo, para analizar la expresión, distribución y alteraciones de los glicoconjugados de la membrana (Sharon, 1997; Hernández *et al.*, 1999; A. Nohe *et al.*, 2004, Okumura *et al.*, 2012 Zigo, *et al.*, 2013).

Diversas investigaciones, describen cambios en los carbohidratos de la superficie de membrana del espermatozoide, durante la capacitación y la reacción acrosomal (Medeiros *et al.*, 2002; Matás *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2003, Nimlamool 2013).

Koehler, (1981) observó el reemplazamiento lípido-lípido y glucolípidos tanto en la membrana plasmática como en la estructura de la membrana flagelar.

Es por ello, que el uso de crioprotectores en la criopreservación de las células espermáticas es de suma importancia, para poder mantener los glicoconjugados (dominios) de membrana del espermatozoide, ya que son importantes en los procesos destinados a la fertilización (Rota *et al.*, 1999, Rosati 2012).

Conclusión

El cambio de temperatura provocó una redistribución de los glicoconjugados de la MP del espermatozoide provocando una disminución significativa ($P < 0.001$) en los patrones de fluorescencia de las regiones de los dominios.

No se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$), entre los grupos raciales estudiados para el dominio acrosomal por el efecto de la temperatura.

Referencias

- A, Nohe and N. O. Petersen. (2004). Analyzing for co-localization of proteins at a cell membrane. The single way down from single genes, and protein to single molecules. *Curr. Pharm. Biotech.* 5: 213-220.
- Aguas, Pinto Da Silva Pedro (1989). Bimodal redistribution of surface transmembrane glycoproteins during Ca^{2+} dependent secretion (acrosome reaction) in boar spermatozoa. *Journal of Cell Science.* 93: 467-479
- Eddy E.M. and Obrien A.D. (1994). The spermatozoon. In: Knobil E. and Neil J.D. *The Physiology of reproduction.* Vol 1. Raven Press. New York
- Gadella, B.M.; López Cardozo; M. Van Golde, L.M.G. Colenbrander; B. y Gadella, T.W.J. (1995). Glycolipidos migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *Cell. Sci.* 108: 935-945
- Hernández, D.P.; Martín G.O; Rodríguez de Pablos V.Y. y Ganem B.F.A. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 15 (2):91-95.
- Jiménez, I.; González-Márquez, H. Ortiz R; Herrera JA; García, A; Betancourt, M; Fierro R (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59:1171-1180
- Koehler, J. (1981). Lectins as probes of the spermatozoa surface. *Arch. Androl.* 6:197-217.
- Matás, C.; Marco, Ma.; Gadea, J. (2002). The effect of different treatments of fresh and frozen semen on acrosome reaction. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 243. Abstr
- Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T.; Rodríguez, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation; Why isn't it better? *Theriogenology* 57:327-344.
- Nimlamool, W. (2013). The sperm equatorial segment: an organizing center for sperm protein relocalization and facilitation of fertilization.
- Noiles, E.E.; Thompson, K.A.; Storey, B.T. (1997). Water permeability of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology.* 35:79-92.
- Okumura, H., Fukushima, H., Momoda, M., Ima, Y., Matsuda, T., & Ujita, M. (2012). Diverse lectin-binding specificity of four ZP3 glycoprotein isoforms with a discrete

- isoelectric point in chicken egg coat. *Biochemical and biophysical research communications*, 424(3),586-592.
- Peterson, R.N. y Russel N.D. (1985). The mammalian spermatozoon: a model for the study of regional specificity in plasma membrane organization and function. *Tissue and cell* 17:769-791.
- Rosati, F. L. O. R. I. A. N. A. (2012). Sperm-egg interaction in ascidians. *Biology of fertilization*. 2, 361-388.
- Rota, A.; Peña, A.I.; Linde-Fosberg, C.; Rodríguez-Martínez, H. (1999). In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reprod. Science*. 57: 199-215
- Sharon, N. (1997). Lectinas. *Investigación y Ciencia*. 11:90-100.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In the *Physiology of Reproduction*. 2a. Edition. Raven Press. New York.
- Zigo, M., Jonáková, V. Šulc, M., & Maňásková-Postlerová.P. (2013). Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International journal of biological macromolecules*, 61, 322-328.