

**FUNCIÓN DE LAS ACUAPORINAS DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN EN  
EL SEMEN DEL CABALLO, CERDO Y TORO.**



**ANGELA YURENY ANDRADE CORREDOR  
ANDRÉS FELIPE CARREÑO GARZÓN  
DANIELA ORTIZ VILLALOBOS**

**UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA  
BOGOTÁ D.C, 2022**

**FUNCIÓN DE LAS ACUAPORINAS DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN EN  
EL SEMEN DEL CABALLO, CERDO Y TORO.**



**ANGELA YURENY ANDRADE CORREDOR**

**ANDRÉS FELIPE CARREÑO GARZÓN**

**DANIELA ORTIZ VILLALOBOS**

**DIRECTOR: Dr. SEBASTIÁN BONILLA CORREAL MV, PhD**

**UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA  
BOGOTÁ D.C, 2022**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Jurado

Fecha: \_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

Esta monografía es dedicada a nuestros padres que estuvieron con

nosotros en cada paso apoyándonos y brindando fortaleza.

A nuestros tutores y profesores por brindarnos el conocimiento

necesario para hacer esto posible,

y por último a esos verdaderos amigos con los que compartimos

todos estos años luchando por un mismo objetivo

“lo esencial es invisible a los ojos” (Antoine de Saint-Exupéry)

**Angela Yureny Andrade Corredor**

**Andrés Felipe Carreño Garzón**

**Daniela Ortiz Villalobos**

## **Agradecimientos**

A nuestras familias que han sido un pilar fundamental  
para lograr nuestras metas y Propósitos.

A nuestros docentes, incluyendo a toda la Universidad Antonio Nariño  
por abrirnos sus puertas y formarnos como profesionales  
dedicados y excelentes seres humanos.

No ha sido un camino fácil, pero, agradecemos  
sus aportes, su bondad, paciencia y apoyo.

**Angela Yureny Andrade Corredor**

**Andrés Felipe Carreño Garzón**

**Daniela Ortiz Villalobos**

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	19
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo General	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. LINEAMIENTOS METODOLÓGICOS	24
5. MARCO TEÓRICO	25
5.1 Generalidades del semen de los Mamíferos	25
5.2 La Criopreservación	26
5.2.1 Daños en el Espermatozoide Después de la Criopreservación	27
5.2.2 Daños por cambios osmóticos	28
5.2.3 Daños por cambios de temperatura	29
5.2.4 Otros Efectos	30
5.3 Estructura y Transporte de Moléculas a través de la Membrana Plasmática	30
5.3 Las Acuaporinas	31
5.3.1 Clasificación de las Acuaporinas	33
5.3.2 Acuaporinas presentes en el semen de bovino	35
1. 5.3.3 Acuaporinas presentes en el semen del porcino	39
2. 5.3.4 Acuaporinas presentes en el semen del Equino.	42
6. Discusión	46
Referencias	48

## Índice de Tablas

Tabla 1: Diferencias en las dimensiones de los espermatozoides de equinos, bovinos y porcinos	25
Tabla 2. Localización celular de las AQP3 en tractos reproductivos masculinos y femeninos	34
Tabla 3. Diferencias de las acuaporinas en semen de verraco.	40
Tabla 4. Localización de las AQP más abundantes en espermatozoides de mamíferos	42
Tabla 5. Localización y función de AQP3, AQP7, AQP11 en el seme del equino, porcino y bovino .	46

## Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Estructura de la membrana celular	31
Ilustración 2. Estructura de las AQPS	33
Ilustración 3. Localización de AQP en el tracto reproductivo masculino	35
Ilustración 4 Inmunolocalización de AQP3 y AQP7 en semen fresco, congelado-descongelado y tinción sin AQP	37
Ilustración 5 Distribución de AQP en los espermatozoides de la especie bovina	38
Ilustración 6. Jabalí campeón de berkshire	39
Ilustración 7 Localización de AQP3, AQP7 y AQP11	44
Ilustración 8: Estructura tetramérica de las AQPs con cada uno de sus monómeros	45

## RESUMEN

La criopreservación del semen ha evolucionado hasta convertirse en una técnica muy utilizada en mamíferos domésticos. Para mejorar aún más la eficiencia de la criopreservación de los espermatozoides, es necesario comprender los mecanismos moleculares que subyacen a las propiedades que generan las criolesiones de los espermatozoides (Funji & et al. 2018). En este contexto Las AQP son unas importantes proteínas formadoras de canales de agua que están directamente implicadas en la osmolaridad por lo tanto, su ausencia o inhibición puede ser un importante determinante de muerte espermática durante los cambios abruptos de temperatura. (C. H. Yeung, Callies, Tüttelmann, Kliesch, & Cooper, 2010). Por lo cual se abordará la principal función de las acuaporinas en el proceso de la criopreservación en el semen de la especie equina, bovina y porcina.

La AQP3 en porcinos es la más importante debido a que según Morato et al., 2014, está involucrado en la criopreservación ya que tiene un papel importante la maduración del esperma y la regulación osmótica; En el equino su principal papel se radica en la regulación del volumen del esperma evitando deformidades en la cola del espermatozoide, de esta manera se da una migración adecuada hacia el oviducto (Qi Chen, 2011) y en el bovino no hay evidencia clara de su función. En el equino la AQP7 aumento en la fertilidad ya que tiene una estrecha relación en la calidad del esperma, según estudios relacionados Kazutaka Saito, 2004, muestra que espermatozoides sin presencia de esta AQP cuentan con baja fertilidad. Se relaciona con la resistencia de los espermatozoides al momento del choque térmico en porcinos y bovinos (Prieto-Martínez, et al., 2017). Otra AQP encontrada en las tres especies fue la 11, la cual según bonilla-Correal, 2017 en el equino está relacionada con la motilidad del esperma y la integridad de la membrana del espermatozoide y esto podría indicar que puede ser un marcador de criotolerancia. Esta AQP tiene que ver con la criotolerancia en toros, pero no en porcinos, debido a que en el semen fresco del toro no solo es un marcador de calidad después de la criopreservación, también da indicios de su fertilidad y capacidad fecundante (Utt, 2016), y en porcinos sólo es relevante en el esperma fresco.

Teniendo en cuenta lo anterior, aún faltan muchos estudios para confirmar y afirmar con más seguridad el papel y/o función de estas proteínas en el semen al momento de la criotolerancia y de esta manera generar nuevos marcadores de fertilidad más eficientes.

**Palabras clave:** Acuaporinas, AQP, criopreservación, criotolerancia, osmorregulación, Inseminación artificial

## ABSTRACT

Semen cryopreservation has evolved to become a widely used technique in domestic mammals. To further improve the efficiency of sperm cryopreservation, it is necessary to understand the molecular mechanisms underlying the properties that generate sperm cryoinjury (Funji & et al. 2018). In this context, AQPs are important water channel-forming proteins that are directly involved in osmolarity, therefore their absence or inhibition may be an important determinant of sperm death during abrupt changes in temperature. (C. H. Yeung, Callies, Tüttelmann, Kliesch, & Cooper, 2010). Therefore, the main function of aquaporins in the process of cryopreservation in the semen of the equine, bovine and porcine species will be addressed.

AQP3 in pigs is the most important because, according to Morato et al., 2014, it is involved in cryopreservation since sperm maturation and osmotic regulation play an important role; In the equine, its main role lies in the regulation of sperm volume, preventing deformities in the sperm tail, in this way there is an adequate migration towards the oviduct (Qi Chen, 2011) and in cattle there is no clear evidence of its function. In horses, AQP7 increased fertility since it has a close relationship with sperm quality. According to related studies, Kazutaka Saito, 2004, shows that spermatozoa without the presence of this AQP have low fertility. It is related to the resistance of sperm at the time of heat shock in pigs and cattle (Prieto-Martínez, et al., 2017). Another AQP found in the three species was 11, which according to Bonilla-Correal, 2017 in horses is related to sperm motility and sperm membrane integrity and this could indicate that it may be a cryotolerance marker. This AQP has to do with cryotolerance in bulls, but not in pigs, because in the bull's fresh semen it is not only a quality marker after cryopreservation, it also gives indications of its fertility and fertilizing capacity (Utt, 2016 ), and in pigs it is only relevant in fresh sperm.

Taking the above into account, many studies are still needed to confirm and affirm with greater certainty the role and/or function of these proteins in semen at the time of cryotolerance and thus generate new, more efficient fertility markers.

**Keywords:** Aquaporins, AQP, cryopreservation, cryotolerance, osmoregulation, artificial insemination

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha mejorado significativamente la capacidad fecundante del semen criopreservado debido a la aparición de nuevas técnicas de inseminación artificial como la intrauterina que requiere una cantidad mínima de esperma (Bonilla., et al 2019). Además, se han hecho investigaciones para mejorar las técnicas de análisis de la calidad espermática después de la descongelación (Alvarenga, Papa, & Ramires Neto, 2016).

Para mejorar aún más la eficiencia de la criopreservación de los espermatozoides, es necesario comprender los mecanismos moleculares que subyacen a las propiedades criobiológicas que afectan a las criolesiones durante el proceso de criopreservación de los espermatozoides (Funji & et al. 2018).

Las AQP son unas importantes proteínas formadoras de canales de agua que están directamente implicadas en la osmolaridad durante el proceso de criopreservación, por lo tanto, su ausencia o inhibición puede ser un importante determinante de muerte espermática durante los cambios abruptos de temperatura, por lo cual es fundamental conocer a fondo las funciones de estas proteínas y su presencia en el espermatozoide. Se ha identificado y comprobado que las acuaporinas son responsables de la regulación del equilibrio osmótico y de la adaptación de los espermatozoides a los cambios de osmolaridad del entorno. Estos cambios son esenciales después de la introducción del semen en el tracto reproductor femenino, dado que este tiene una osmolaridad inferior a la del aparato reproductor masculino (C. H. Yeung, Callies, Tüttelmann, Kliesch, & Cooper, 2010).

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inseminación artificial (IA), en los últimos años participa activamente en la conservación genética aprovechando en gran proporción el eyaculado (Mina., 2008) para este fin los espermatozoides son sometidos a métodos de criopreservación lo que permite que el eyaculado sea utilizado en diferentes hembras ubicadas en distintos sitios por medio de IA (Funji, et al., 2018). Además de esto la utilización de estas técnicas ayuda a evitar la transmisión de enfermedades venéreas (Loomis & Graham., 2008).

La criopreservación es el método más eficaz para el almacenamiento de espermatozoides a largo plazo. Sin embargo, el proceso de congelación-descongelación daña a los espermatozoides, ya que genera daños en la membrana plasmática, altera el núcleo, reduce de la actividad mitocondrial y disminuye la motilidad del espermatozoide (Yeste et al., 2016). Estos daños se dan principalmente por el cambio de fase del agua intracelular y extracelular durante las bajas temperaturas (Yeste et al., 2016).

El transporte de agua celular del medio interno a externo es dado a través de la membrana celular, donde uno de los principales mecanismos son canales creados por proteínas llamadas acuaporinas (AQP) (Tamayo & Fuentes, 2016). Estas proteínas se han descrito en humanos y otras especies, considerándose hasta el momento de 13 AQP (AQP0 – AQP12) en las células de mamíferos, clasificadas en tres grupos diferentes (AQPx ortodoxas, acuagliceroporinas (AGP), y super AQPs). Que difieren en su secuencia y permeabilidad a los solutos (Delgado, et al., 2019).

El proceso de congelación y descongelación genera estrés osmótico el cual se asocia a los efectos adversos sobre la motilidad, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial de las células espermáticas, lo cual ha sido evaluado en equinos y podría estar asociada con el estrés oxidativo (Ball & Vo, 2001). “Este fenómeno se debe principalmente a factores propios del equino y a que la selección del reproductor se hace de acuerdo con su rendimiento en las diferentes disciplinas ecuestres, más no a su capacidad reproductiva” (Clulow, Maxwell, & Morris, 2007). algo que sí se considera al momento de seleccionar reproductores de bovinos y porcinos.

Debido a que la mayoría de las industrias se han propuesto diseñar herramientas para facilitar el comercio del semen utilizado para la inseminación artificial, se ha implementado la criopreservación. “Los procedimientos de criopreservación se orientan a intentar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular” (Moreno & Galarza, 2019).

Se debe tener en cuenta que las acuaporinas presentes en los espermatozoides de los mamíferos tales como los equinos, porcinos y bovinos, tienen una importancia

considerable debido a que su estudio y entendimiento podría ser utilizado en ámbitos como la criopreservación e inseminación artificial.

Expuesto lo anterior el desarrollo de la presente revisión bibliográfica pretende informar sobre la función de las acuaporinas en los tres mamíferos anteriormente mencionados específicamente durante la criopreservación en el cual se identifique claramente la importancia en la osmorregulación y así corroborar que el intercambio de agua y solutos es crucial durante la crioconservación, por lo que varios espermatozoides pueden seguir viables al momento del choque térmico.

Teniendo en cuenta lo anterior se plantea lo siguiente:

¿De qué manera las acuaporinas del semen del caballo, toro y cerdo contribuyen en la calidad del esperma y cuáles son las que interviene de manera específica teniendo en cuenta la osmorregulación durante el proceso de criopreservación?

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Identificar la principal función de las acuaporinas en el proceso de la criopreservación en el semen de la especie equina, bovina y porcina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Describir la función y ubicación de las principales AQPs en el momento de la congelación y descongelación de los espermatozoides.
- Analizar, el papel que desempeñan las AQPs y su importancia durante la criotolerancia de los espermatozoides en la especie Equina, bovina y porcina.
- Reconocer las similitudes que existen en el espermatozoide de las tres especies según la función que las AQPs durante la criopreservación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La presente revisión bibliográfica tiene como finalidad informar sobre las acuaporinas, presentes en el espermatozoide del caballo, toro y porcino. Tomando como referencia diferentes investigaciones, artículos, libros, escritos, entre otros, haciendo énfasis en su papel en el espermatozoide al momento de la criopreservación.

Las AQP son unas importantes proteínas formadoras de canales de agua descubiertas en 1992, estas tienen una estructura tetramérica, compuesta por cuatro monómeros, lo que le confiere una mayor estabilidad y se caracterizan por la presencia en la parte central de un poro de paso cuyo tamaño es variable según el tipo de acuaporina (Bonilla et al 2019). Están directamente implicadas en la osmolaridad durante el proceso de criopreservación, por lo tanto, su ausencia o inhibición puede ser un importante determinante de muerte espermática durante los cambios abruptos de temperatura (Yeung, *et al.*, 2010).

Como método de conservación de germoplasma masculino una de las biotecnologías utilizadas es la criopreservación de semen de esta forma se consigue guardar y difundir material genético, para esto se han diseñado diferentes metodologías de conservación que buscan mejorar la viabilidad espermática (Ribeiro, *et al.*, 2014). Como ya se mencionó las AQPs cumplen un papel importante durante este proceso, por tener relativamente poco tiempo desde su descubrimiento existen muchos mecanismos que aún no son comprendidos, lo que hace necesario revisar diferentes investigaciones para intentar comprender la función que tienen ellas en el espermatozoide.

#### 4. LINEAMIENTOS METODOLÓGICOS

Se realiza una revisión de literatura como técnica analítica para recopilar información actualizada. reuniendo información de los últimos 20 años enfocada en el rol de las AQPs en las células espermáticas del equino, bovino y porcino.

Para recopilar información se utilizaron buscadores como PUB MED, SCIELO, GOOGLE ACADÉMICO, SCIENCE DIRECT, ELSERVER y recursos bibliográficos de universidades, las palabras de búsqueda fueron: función de acuaporinas, acuaporinas en células reproductivas de machos, AQPS, Criopreservación, Osmorregulación, Inseminación y sus respectivas traducciones en inglés y portugués. Específicamente artículos publicados en los últimos 20 años ya fueran de investigación, revisión, tesis o monografías.

**Criterios de inclusión y exclusión:** Fueron incluidos artículos científicos de revisión, tesis y monografías que en su resumen mencionan la función de las AQPs en el espermatozoide y fueron descartados artículos que se enfocarán en el papel de las AQPs en otro tipo de células.

Por ser una temática poco estudiada en el diseño de esta revisión se decidió hacer un abordaje de manera general incluyendo características generales del semen de los mamíferos, criopreservación, principales daños de los espermatozoides durante y después de la criopreservación, estructura y transporte de moléculas a través de membranas celulares, función y clasificación de las AQPs, finalizando con particularidades de estas en el espermatozoide del equino, bovino y porcino.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Generalidades del semen de los Mamíferos

El espermatozoide es una célula especializada de tipo sexual, su cabeza contiene la información genómica y presenta un flagelo que le da movilidad, esto contribuye a la diversidad morfológica de las especies; Se debe tener en cuenta que no todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan los procesos de capacitación y reacción acrosomal al mismo tiempo dentro del aparato reproductor de la hembra (Ávalos, *et al.*, 2018).

Existen tres procesos fisiológicos para que el espermatozoide obtenga su capacidad fertilizante, Maduración epididimaria, proceso que ocurre durante su tránsito en el epidídimo, capacitación y reacción acrosomal lo cual ocurre después del eyaculado dentro del aparato reproductor de la hembra transportándose hacia el oviducto (Yanagimachi, 1994).

Las principales características que debe tener un espermatozoide para llegar a fecundar se basan en la motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Hidalgo, Tamargo, & Diez, 2005). Por lo cual la evaluación del semen puede abarcar una serie de parámetros morfológicos y funcionales donde podemos observar volumen, color, olor, concentración, motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de formas anormales y porcentaje de acrosomas; con este tipo de evaluaciones podemos saber el número de espermatozoides por ml de semen, apreciación visual de la consistencia del eyaculado, también se pueden detectar los eyaculados en los que (Castelo, *et al.*, 2008), los espermatozoides están muertos o son muy poco móviles-(Tabla 1) (Ball & Vo, 2001).

*Tabla 1: Diferencias en las dimensiones de los espermatozoides de equinos, bovinos y porcinos (Pesch & Bergmann, 2006).*

ESPECIE	LARGO (µm)	CABEZA (µm)			PIEZA INTERMEDIA (µm)		PIEZA PRINCIPAL (µm)	
		Largo	Ancho	Forma	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Equina	60	5	2.4	Paleta	8	0,5	30	0,49
Porcina	50-60	8.5	4.25	Paleta	10	*	30	*
Bovina	75-90	9.15	4.25	paleta	14,84	0,67	50	0,51

## 5.2 La Criopreservación

Proceso por el cual células y/o tejidos son expuestos a muy bajas temperaturas donde su objetivo principal es la conservación de células vivas, logrando interrumpir el desarrollo de degeneración celular (Belascoain, Diaz, & Hüter, 2016).

Una de las biotecnologías de mayor difusión mundial es la criopreservación del semen del macho esto permite la utilización de este material en animales geográficamente aislados o el uso de semen de animales que ya finalizaron su vida útil reproductiva cuando son colectados a tiempo (Castelo y et al., 2008; Arango *et al.*, 2020), incluso luego de su fallecimiento (Loomis P. , 2001). El uso de esta biotecnología ayuda a los productores a adquirir genética de mejor calidad y mejora su estatus sanitario ya que puede disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades sexuales (Castelo, *et al.*, 2008), esta metodología permite la comercialización y distribución del semen a nivel internacional promoviendo el mejoramiento genético (Loomis P. , 2001).

Existen técnicas convencionales y automatizadas de criopreservación de semen (Ribeiro, *et al.*, 2014), en las que se modifican las concentraciones y la naturaleza de los crioprotectores, así como en los diferentes tipos de soportes para el almacenamiento del semen (Restrepo, *et al.*, 2012), que buscan cada día mejorar la viabilidad de este.

Para mantener la calidad del semen en el proceso de criopreservación se debe tener en cuenta principalmente las velocidades de descenso de la temperatura así como las concentraciones de los crioprotectores y los métodos de soporte de almacenamiento utilizados (Medeiros, *et al.*, 2002). Los principales crioprotectores utilizados son el glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol, entre otros (Ávila-Portillo, *et al.*, 2006).

Los criopreservantes se caracterizan por ser sustancias hidrosolubles con baja toxicidad los cuales pueden disminuir el punto eutéctico, los crioprotectores se pueden diferenciar en agentes penetrantes y no penetrantes (Ávila, *et al.*, 2006).

Los agentes penetrantes son de bajo peso molecular lo que le permite ser permeable a través de la membrana celular (Ávila, *et al.*, 2006), esta característica permite protección celular antes las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta (Fernández *et al.*, 2009).

Uno de los crioprotectores penetrante utilizados en este proceso es el el glicerol que cuenta con características de bajo peso molecular lo que le permite el paso a la célula mediante los canales de la AQP 7 reemplazando osmóticamente el agua

intracelular durante el proceso de congelamiento (Carlotto,2009), este crioprotector puede tener cierta desventaja ya que puede producir efectos tóxicos y contraceptivos en espermatozoides de algunas especies (Canorio et al, 2015).

Otro protector con característica penetrante es el dimetilsulfóxido encargado de difundirse por medio de la membrana plasmática lo que permite la protección celular ante daños que puedan pasar por la congelación (Fernández et al, 2009), este crioprotector es de toxicidad baja aunque se reportan casos de disminución en la tasas de supervivencia de después de la congelación, conservación y descongelación (Miyagi, 2015).

Por último mencionaremos al etilenglicol el cual pertenece al grupo de criopreservantes penetrantes, este comparte la característica de bajo peso molecular permitiendo mejorar la permeabilidad y baja toxicidad dando mayor supervivencia espermática a y motilidad progresiva al momento de la descongelación en comparación con el glicerol (Neira et al, 2007).

Al contrario de los agentes penetrantes, los no penetrantes son de alto peso molecular siendo efectivos a velocidades altas de congelación(Ávila, et al, 2006), de cierto modo no son crioprotectores por el hecho de que no penetran la célula pero la protegen al acelerar la deshidratación celular (Bosio, 2001).

### **5.2.1 Daños en el Espermatozoide Después de la Criopreservación**

Uno de los propósitos de la criopreservación es asegurar la supervivencia de los espermatozoides, pero, en un número variable suele generar daños irreversibles a la membrana plasmática y acrosomal, causando muerte celular y/o infertilidad (Rubio, Quintero, & González, 2009). Por lo cual el proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de estas membranas, tanto a lo referente a morfología como funcionalidad. Aunque cabe recalcar que, si los espermatozoides son de la misma especie, pero de diferente individuo, pueden resistir de manera distinta los efectos negativos de la criopreservación (Rubio, Quintero, & González, 2009; Bonilla et al,2019). Por lo cual factores independientes de la criopreservación que pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides como la estación del año, dieta del macho, raza, cantidad de eyaculado, cantidad de plasma seminal que difieren de individuo a individuo (Yeste et al, 2016).

El principal problema al momento que se congela y descongela es el daño causado por la bajas temperaturas que genera distintos daños irreversibles a espermatozoide lo cual se asocia con el cambio de fase del agua intracelular y extracelular (Yeste et al, 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional, lo que

podiera afectar la capacidad fecundante al momento de realizar la inseminación artificial.

Estudios realizados los últimos años dan a entender que el hecho de afectar la supervivencia de los espermatozoides tiene que ver con factores físicos y biológicos que involucran la integridad de la membrana por lo cual es crucial su comportamiento al momento de exponerse a bajas temperaturas donde se puede dar un choque térmico, estrés oxidativo, reorganización de la capa lipídica, cambios osmóticos entre otros (Grotter, et al., 2019).

Se debe tener en cuenta que al utilizar hielo seco se logran cantidades de espermatozoides con un aceptable nivel de integridad de membrana plasmática y acrosomal y bajo nivel de criocapacitación, pero se evidencia baja movilidad debido a la pérdida de enzimas vinculadas con las vías metabólicas productoras de ATP (Pérez, et al., 2019).

### **5.2.2 Daños por cambios osmóticos**

La célula posee una velocidad óptima de congelación que asegura la supervivencia luego de la criopreservación, en el momento en que se produce el estrés y hay formación de cristales de hielo que está asociado a los cambios de presión osmótica de la fracción no congelada se debe a un aumento o disminución de la congelación del esperma (Stornelli, et al 2005).

En el proceso de criopreservación puede que se produzcan algunos cambios como puede ser el choque térmico o la formación de cristales de hielo dentro de la célula, esto se pueden llevar a cabo si la curva de congelación es demasiado rápida llevando a una deshidratación celular progresiva (Novoa, 2013).

La permeabilidad de la célula es un factor importante durante el proceso de congelación y descongelación del esperma ya que las células que cuentan con mayor permeabilidad necesitan que el proceso de congelación sea con mayor rapidez aunque puede formar más cristales de hielo lo que induce a un adecuado deshielo que permita la disminución de estos (Crabo, 2001).

La calidad del semen se presenta con una calidad baja al producirse daño en la estructura de membrana y el estrés osmótico, las cuales afectan el citoplasma, el citoesqueleto y la composición genética (Castro, 2016). Esto puede proporcionar un aumento en la permeabilidad de la membrana por lo que se puede generar una mayor entrada de agua o iones, por lo que puede afectar el porcentaje de preñez (Leahy, Gadella, 2011).

### 5.2.3 Daños por cambios de temperatura

La célula y el medio extracelular permanecen sin congelar y se enfrían. Estas temperaturas están entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ , lo que causa que se forme hielo en los alrededores de la célula, en el caso de las sustancias dentro de la célula permanecen descongeladas y se disminuye su temperatura debido al potencial químico del agua. En estado refrigerado (intracelular) es mayor que en estado congelado (extracelular) (L.C.Jaramillo-J.A.Castro., 2016). El agua excretada de la célula se congela a un punto de solidificación total. Este fenómeno está relacionado con la importancia de la velocidad de enfriamiento que establecerá el éxito del proceso (Doyong & Critser, 2000).

En caso de lesión por choque térmico la membrana celular cambia de un estado líquido a un estado sólido porque los fosfolípidos exhiben diferentes temperaturas de transición y se produce una separación de fases, por lo cual los lípidos se remodelan (Loomis P. , 2001). Al integrar las proteínas de la membrana, algunas moléculas de colesterol se agrupan y se liberan, lo que conduce a la interrupción de las interacciones lípido-proteína y a la pérdida de la función de algunas proteínas esenciales como los canales iónicos y las acuaporinas. Este daño afecta la integridad y la función de la membrana plasmática al alterar el flujo de agua de iones como el calcio, el bicarbonato y de otras moléculas importantes como los crioprotectores (Leahy & Gadella, 2011).

En estos casos, el daño a la membrana plasmática hace que los espermatozoides sean más propensos a sufrir una degeneración acrosomal o una exocitosis, lo que reduce la vida útil de los espermatozoides y su capacidad para fertilizar. Por lo tanto el tiempo entre la inseminación y la ovulación debe ser menos prolongado que el utilizado para la inseminación artificial ya sea con semen fresco o refrigerado y la ovulación debe ser detectada mediante ecografía ya que este es un paso esencial para la inseminación (A.D. Thomas, 2006).

Estos daños por la crioconservación se pueden ver también en el ADN y han sido reportados en varias especies como lo son los caprinos los primates y hasta los humanos (Martines, 2010), La propuesta de la hipótesis de este daño mecánico se debe al desarrollo intracelular de hielo, en contraposición con el daño de fractura de ADN que pudiera generar la radiación. Por otro lado, también se puede notar el origen de estos daños a radicales libres de oxígeno (Martines, 2010).

#### **5.2.4 Otros Efectos**

Los daños ocasionados por la fragmentación del ADN se denominan por las anomalías de la estructura de la cromátida espermática debido a los cambios de temperatura a la que la célula sexual está sometida al momento de la criopreservación (Zilli, et al., 2003). Lo que se asocia con el fallo en la fertilización en respuesta a la oxidación y por consiguiente daño en el ADN, esto sugiere que la fragmentación del ADN se genera por el estrés oxidativo que modifica las histonas presentes en el mismo (Sakkas, et al., 2002; Ziech, et al., 2011).

Los métodos usados para disminuir las modificaciones de la cromatina tienen relación con evaluación correcta de las diferencias de resistencia al daño entre las muestras de semen y la utilización de métodos de congelación y descongelación menos dañinos por lo tanto la elección de muestras de semen menos susceptibles al daño de membrana da como resultado mayor resistencia a la criopreservación (Cabrita, et al., 2005).

Por otro lado la mitocondria podría considerarse crucial para la funcionalidad y viabilidad de espermatozoide ya que su daño genera disminución en el ATP que puede ser considerado la energía de la célula sexual continuando con pérdida de la movilidad y velocidad espermática después de la descongelación (Cabrita et al., 2005 a; Figueroa et al., 2013).

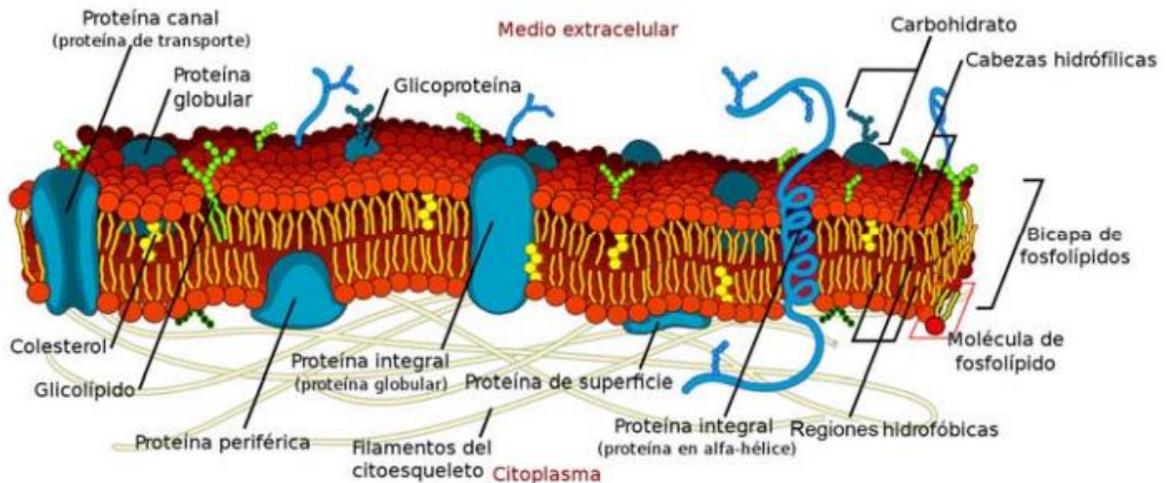
#### **5.3 Estructura y Transporte de Moléculas a través de la Membrana Plasmática**

La membrana plasmática se caracteriza por ser una barrera semipermeable la cual tiene la función específica de seleccionar el contenido celular del exterior de ella, regula el intercambio del interior al exterior celular y por último permite la comunicación entre células (Sala-Valdés, 2010).

La estructura de la membrana celular tiene diferentes modelos como lo es la Capa Lipídica, la Bicapa Lipídica además el del del Mosaico Fluido, la membrana celular está constituida generalmente por lípidos y proteínas lo que le permite la organización de bicapa (Mesa et al, 2010).

La bicapa lipídica está constituida por 3 lípidos de membrana: Fosfolípidos, Glucolípidos y Colesterol los cuales construyen la mitad del tamaño de la membrana, formados de una forma hidrofóbica y otra hidrofílica lo que puede el transporte de los solutos (Lopez, 1986).

El modelo de mosaico fluido hace referencia a que la membrana es una bicapa lipídica donde las proteínas integrales se incorporan de tal manera que sus grupos iónicos y polares se localizan en la fase acuosa y los grupos no polares en la parte hidrofóbica de la bicapa (Sala-Valdés, 2010).



*Ilustración 1: Estructura de la membrana celular (Sala, 2010).*

Como se había mencionado anteriormente la membrana tiene un transporte selectivo el cual es definido por un transporte pasivo o activo, la mayoría de moléculas que atraviesan estas membranas lo hacen por medio de transporte activo ya que es esencial para moléculas cargadas (Arrazola, 1994), componentes con característica hidrofóbica son capaces de pasar por la membrana por medio del transporte pasivo gracias a su solubilidad en la fase lipídica, mientras que hay moléculas hidrófilicas por esta razón su transporte debe ser de forma específica, utilizando así el transporte activo (García, 2008).

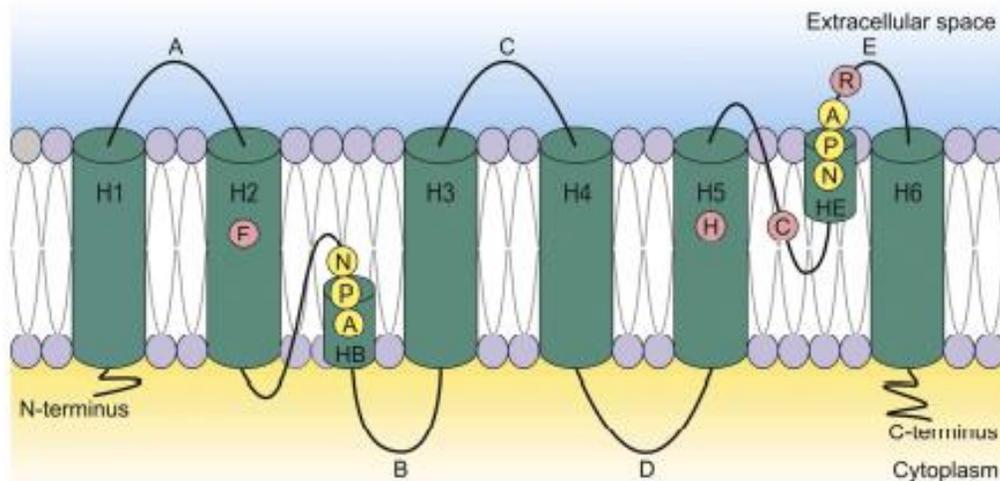
### 5.3 Las Acuaporinas

Las AQP's fueron descubiertas por primera vez en 1992 por Peter Agre, investigador de la Universidad Johns Hopkins, recibió el Premio Nobel de Química, En 2003, por haber identificado una proteína que da lugar al paso de agua a través de la membrana celular, por lo cual la denominó "acuaporina". En 1992 durante la tarea de purificar el antígeno Rh de eritrocitos humanos, los análisis señalaban la

presencia de características similares a las halladas en células tubulares renales (revisado por Yeste et al., 2017). Fue investigada y resultó ser una proteína tetramérica que opera como canal selectivo para el tránsito de agua. Al inyectar material genético de eritrocitos a un ovocito de anfibio (célula impermeable al agua), adquirió la capacidad de permitir el paso de moléculas de agua, por lo cual se confirmó la hipótesis. Posteriormente a su clonación y secuenciación, fue sugerido el nombre de acuaporina-1 (AQP1) para esta proteína. Después de esto la investigación alrededor de estas proteínas se ha incrementado y se han investigado gran parte de sus características moleculares y funcionales y se han descubierto varios miembros adicionales de esta familia (Coppo J.A, 2008). Se investigaron e identificaron hasta 13 AQPs distintas en varios tejidos y órganos, las cuales han recibido el mismo nombre seguido de un número secuencial en relación con la cronología de su descubrimiento (Yeste et al, 2017).

La acuaporina (AQP) es una proteína de membrana encargada de transportar el agua a través de los compartimientos de las células, formada por un haz de seis hélices  $\alpha$ , que dejan una estrecha abertura en su interior por la que pueden pasar moléculas de agua, forman tetrámeros, es decir, se agrupan de cuatro en cuatro y transportan el agua y forman una línea de 10 moléculas de agua (Rodríguez y Carrera,2014). Estas acuaporinas delimitan un canal de 2 nm de largo por 0,3 nm de ancho, por lo cual solamente puede ser atravesado por moléculas de agua. Las AQP están reguladas por diversos factores intracelulares, entre los cuales son fundamentales el pH y la fosforilación, principalmente mediada por proteinquinasa-A. La mayoría son inhibibles por compuestos mercuriales, aunque el Hg puede activar algunas AQP (Coppo, J.A, 2008).

La permeabilidad de las membranas celulares hacia el agua y las hormonas en los sistemas reproductivos de machos y hembras juega un rol esencial en la foliculogénesis, la espermatogénesis y la osmo adaptación del espermatozoide, el cual experimenta una disminución osmótica natural en su viaje desde el tracto reproductor del macho hacia el de la hembra, esto indica la importancia de canales especializados que transporten el agua de manera rápida y eficiente hacia el interior/exterior de la célula (Fuentes-Mascorro, Gisela, 2016). El espermatozoide maduro es una célula muy permeable al agua. Su membrana plasmática posee las Acuaporinas, unos canales selectivos para el paso de agua y otras sustancias como los crioprotectores.



*Ilustración 2: Estructura de las AQP (Oberska & Michałek 2021).*

### 5.3.1 Clasificación de las Acuaporinas

Según la función de su permeabilidad, la familia de las acuaporinas se clasifica en tres subfamilias: las AQP ortodoxos, las Acuagliceroporinas y las súper AQP (Delgado, et al. 2019), estas se diferencian fundamentalmente en que las primeras sólo son permeables a agua en forma selectiva, las segundas también permiten el paso de glicerol y otros solutos de bajo peso molecular y la tercera están presentes en los espermatozoides (Agre, Sasaki, & Chrispeels, 1993).

Acuaporinas: Acuagliceroporinas: Las AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10.

La AQP3 tiene como función permitir el paso de agua y otros pequeños solutos, como el glicerol y la urea, a través de la membrana plasmática. La AQP7 permite la salida de glicerol de los adipocitos o células grasas. La AQP9 permite el paso de una amplia gama de solutos no cargados y también estimula el transporte de urea y la permeabilidad osmótica al agua. La AQP10 se encuentra en duodeno y yeyuno. Su localización es apical sugiriendo un rol en la capacidad de absorción de estas células (Sales, Lobo, Carvalho, Moura, Rodríguez, 2013).

Acuaporinas: Ortodoxas AQP 0, AQP 1, AQP 2.

La AQP0 fue descrita antes que la AQP1 pero se asoció con esta familia de proteínas posteriormente. Se encuentra en las células fibrilares del cristalino, encontrándose en este de forma abundante. Su principal función es mantener la adhesión entre las células (Bonilla, et al 2019, M.2004).

La AQP1 es la AQP más ampliamente estudiada por darse su descubrimiento primero que las demás. Es la más abundante, y fue localizada en primera instancia en el eritrocito, sin embargo, se ha detectado su presencia en diferentes porciones de la nefrona, entre estas el túbulo proximal y el Asa de Henle (Bonilla et al 2019,M.2004).

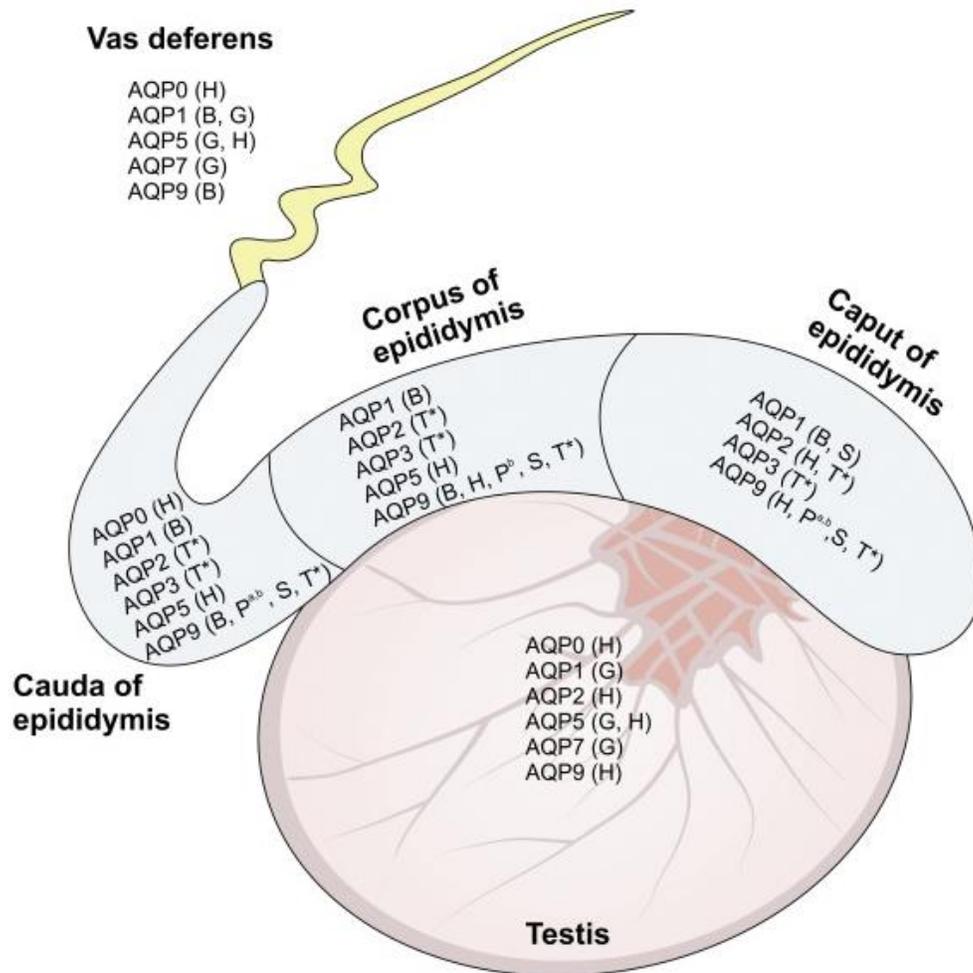
La AQP2 está solo se encuentra en los conductos apicales y colectores renales. Se inhibe por compuestos mercuriales y su función depende de la acción de la hormona antidiurética. Cuando ésta se encuentra ausente los poros se internalizan y se detiene la transcripción de los genes que la codifican (Huang et al., 2006).

#### Super Acuaporinas

Estas están presente en los espermatozoides de los sementales toros y verracos, AQP11 y AQP12 son miembros del grupo super AQPs, que se localizan en las membranas de orgánulos intracelulares y están involucrados en el transporte de agua y glicerol-(Tabla 2) ( F, Noto 2019).

*Tabla 2: Localización celular de las AQPs en tractos reproductivos masculinos y femeninos (Huang et al. 2006a; Sales et al. 2013).*

<b>ACUAPORINA</b>	<b>Distribución en tejidos reproductivos</b>
<b>AQP0</b>	Testículos
<b>AQP1</b>	Vagina, ovario, placenta, útero, membrana fetal, embrión, testículo, conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y próstata.
<b>AQP2</b>	Útero, ovario, conductos eferentes, epidídimo y conducto deferente.
<b>AQP3</b>	Útero, cuello uterino, ovario, placenta, membrana fetal, embrión, epidídimo y próstata.
<b>AQP4</b>	Útero, cuello uterino y ovario.
<b>AQP5</b>	ovario, útero, cuello uterino, oviducto, células granulosas, embrión y epidídimo
<b>AQP6</b>	Embrión
<b>AQP7</b>	Ovario, embrión, testículo, epidídimo, espermátidas, testículo, espermatozoides epididimarios y espermatozoides eyaculados
<b>AQP8</b>	Útero cuello uterino, ovario, oviducto, placenta, membranas fetales, embrión, testículo y epidídimo
<b>AQP9</b>	Ovario, oviducto, útero, células granulosas de folículos, placenta, membrana fetal, testículo, conductos eferentes, epidídimo y próstata
<b>AQP10</b>	Testículos, conductos eferentes y epidídimo
<b>AQP11</b>	Testículos
<b>AQP12</b>	N/A



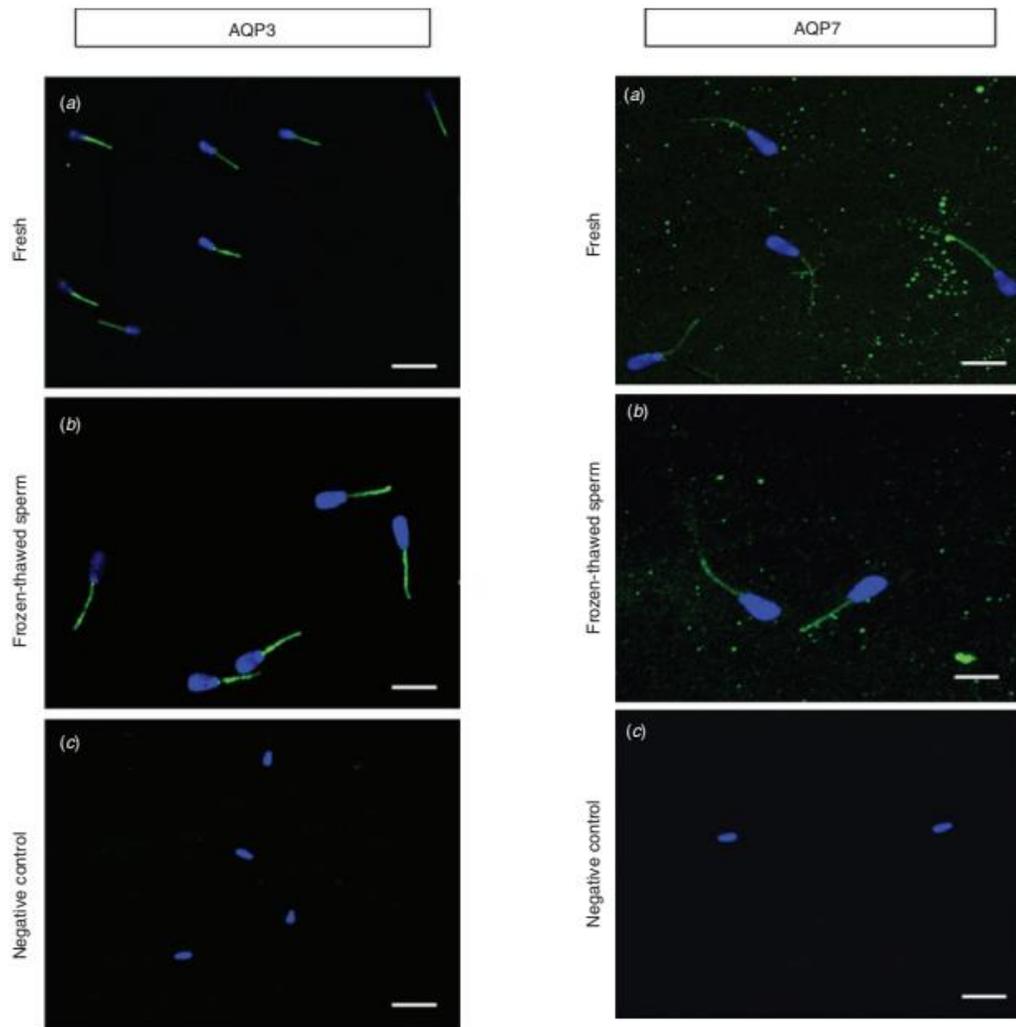
*Ilustración 3* localización de AQP en el tracto reproductivo masculino (Oberska & Michałek 2021).

### 5.3.2 Acuaporinas presentes en el semen de bovino

Según Oberska y Michelek (2021), solo se ha confirmado la presencia de AQP1, AQP3, AQP7, AQP9 y AQP11 en el esperma de los bovinos (Arrighi et al., 2016; Kasimanickam et al., 2017; Prieto-Martínez et al., 2017a; Fujii et al., 2018; Morató et al., 2018). La AQP1 se ha descrito en la superficie apical de las células no ciliadas de los conductos eferentes, la capa de músculo liso de los conductos deferentes, el endotelio de los vasos sanguíneos y pequeños haces nerviosos a lo largo del tracto genital (Arrighi et al., 2016).

Por otro lado, la AQP9 se ha estudiado en búfalos y se ha encontrado en la superficie apical de las células principales de la cauda del epidídimo y en la superficie apical de las células epiteliales en los conductos deferentes (Arrighi et al., 2016). La cantidad de AQP9 cambia con la temporada de reproducción del búfalo ya que durante la temporada de reproducción aumenta, esta es una diferencia observada entre la temporada reproductiva y no reproductiva que podría indicar que esta proteína está implicada en la reabsorción del líquido luminal y por lo tanto puede ser un factor que interviene en la calidad relativamente menor del espermatozoide en la temporada no reproductiva (Oberska & Michałek, 2021).

En cuanto a AQP3 y AQP7 están presentes en la cola y cabeza del espermatozoide siendo AQP3 la que está presente en la parte principal de la cola y la AQP7 en la cabeza y cola con dos patrones de localización. Por lo cual se demostró que estas dos AQP están posiblemente relacionadas en la tolerancia a la congelación-Descongelación en los espermatozoides del toro específicamente en la cola del espermatozoide (Funji, et al., 2018). Se debe tener en cuenta que AQP3 y AQP7 pertenecen a las acuagliceroporinas las cuales participan en el transporte de agua y glicerol (Verkman, 2001). Por otro lado, según el estudio de Morató et al, (2018) la AQP11 fue evidenciada en toda la cola y la cabeza del toro y los niveles relativos fueron más altos exhibiendo una mayor criotolerancia; Se encontró que esta AQP puede ser un marcador de calidad de espermatozoide debido a que cuanto mayor sea el contenido de AQP11 en el semen fresco, mayor será la posibilidad de sobrevivir a la congelación-descongelación por ende mayor criotolerancia. Además, el mayor peso molecular del espermatozoide de toro AQP11 podría deberse al hecho de que algunos AQP están glicosilados (Morató, et al., 2018).



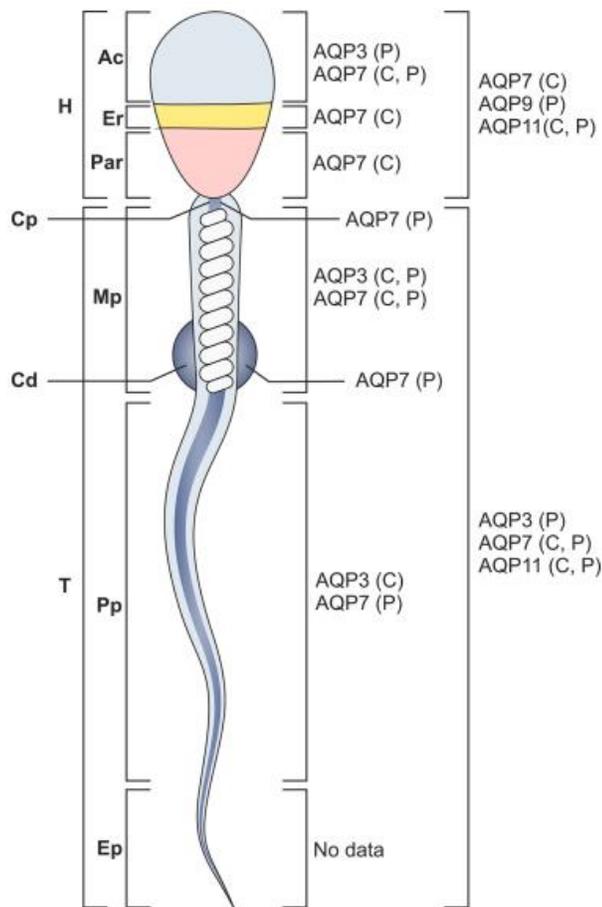
*Ilustración 4* Inmunolocalización de AQP3 y AQP7 en semen fresco, congelado-descongelado y tinción sin AQP (Prieto-Martínez et al. 2016).

También se ha descrito que la AQP11 en el semen fresco del toro no solo es un marcador de calidad después de la criopreservación, también da indicios de su fertilidad y capacidad fecundante (Utt, 2016).

Con relación a AQP7 en un estudio hecho por Ma, et al., (2011) se evidenció que esta AQP también puede ser un marcador para la selección de semen de más calidad asociándolo con 10 rasgos de calidad de semen; La abundancia relativa de esta AQP puede ser mayor en eyaculados con alta capacidad de congelación ya sea antes o después de la congelación (Prieto-Martínez, et al., 2017). En otro estudio más reciente hecho por Kumar, et al., (2015), afirma que el gen de AQP7 puede usarse como marcador molecular para seleccionar características de buena

calidad del semen entre toros cruzados debido a que los que presentaban este gen relacionado con AQP7 tenía un volumen y motilidad de semen significativamente mayor, aunque se deben hacer más estudios que confirmen esta teoría.

Existen diferencias notables entre cerdos y bovinos se denota cuando la relación entre AQP3, AQP7 y AQP11 en la criotolerancia es distinta debido a que AQP3 está relacionada con la resistencia a la congelación-descongelación en cerdos pero no en toros y contrariamente la AQP11 tiene que ver con la criotolerancia en toros pero no en porcinos, aunque, la AQP7 se relaciona con la resistencia de los espermatozoides al momento del choque térmico en las dos especies (Prieto-Martínez, et al., 2017). Aunque faltan estudios para confirmar la importancia de estas AQPs en estas especies.



*Ilustración 5 Distribución de AQP en los espermatozoides de la especie bovina (Oberska y Michelek. 2021; Boj et al., 2015 ).*

### 1. 5.3.3 Acuaporinas presentes en el semen del porcino

Se sabe poco de la osmolalidad del líquido epididimario de verraco, se cree que el entorno de alta osmolaridad en el epidídimo es fundamental en la adquisición de solutos por los espermatozoides (Tooley, 2001).



*Ilustración 6. Jabalí campeón de berkshire, show 2005 (Wikimedia commons).*

El epidídimo tiene tres regiones distintas, y las células del epidídimo varían de una zona a otra, creando un microambiente fluido y variable que permite que los espermatozoides maduren gradualmente. Se identificaron tres clases como caput (cabeza), corpus (cuerpo) y cauda (cola). como se puede identificar en la figura 5 (Lopes, 2011).

El medio microfluídico proporciona la solución ideal para la maduración de los espermatozoides a través de las células secretoras, como las células principales, las células endoteliales, las células apicales y la comunicación de los tipos de células epiteliales de este tejido (y otros tipos de células epiteliales) con los espermatozoides (Tooley, 2001), las funciones más notables del epitelio epididimario es la generación de un aumento sustancial en la concentración de solutos dentro del líquido epididimario debido a la reabsorción del agua (Lopes, 2011).

Esto es posible debido al paso del agua a través de los canales iónicos y acuaporinas. Las proteínas llamadas acuaporinas permiten que entre 10 y 100 veces más agua atraviesen la membrana e impiden El paso de iones y pequeñas moléculas no cargadas (Agre, 2004).

Las tres AQP encontradas en el semen de verraco se localizan en diferentes lugares estas cumple un papel importante en está sección hablaremos de ellas tres dando énfasis en su funcionamiento y localización.

Las AQP3 en el verraco se distribuyen y localizan en diferentes lugares de esta se identificaron dos patrones diferentes, una estaba restringiendo a la pieza media del esperma y en la región acrosómica. La función de la AQP3 está involucrada en la criotolerancia del espermatozoide del jabalí y verraco (R.Moratón, 2014).

Las AQP7 en verracos presentaron su localización en la pieza de conexión y parcialmente a la pieza media del esperma de verraco. Se detectó AQP7 tanto en la región post acrosomal como en la pieza media (Yeste et al,2016).

Las AQP11 en verracos se encontraron en la cabeza y la cola de los espermatozoides, solo el contenido relativo de esta se correlacionó significativamente y positivamente con diferentes parámetros de calidad del esperma en espermatozoides frescos de verraco (Yeste et al,2016).

Las AQP3, AQP7 y AQP11 se encuentran en el semen de verraco y son importantes para la maduración del esperma y la regulación osmótica. El intercambio de agua es un evento importante en la crioconservación, que es el método más efectivo para el almacenamiento de esperma a largo plazo. Sin embargo, el proceso de congelación y descongelación hace que el esperma se dañe y quede incapacitado como fertilizante (R.Moratón, 2014). Suponiendo que la calidad del semen congelado depende en parte de la corrección de los cambios de osmolaridad durante este proceso, las AQP pueden desempeñar un papel importante en la congelación del semen porcino. La AQP11 tiene que ver con la calidad del esperma fresco del verraco, AQP3 ayuda con la criotolerancia del espermatozoide de este mismo (Agre, 2004).

*Tabla 3: Diferencias de las acuaporinas en semen de verraco.*

AQP.	Localización	Funcion	Clasificación
AQP7	La cola y gota citoplasmática. (Yeste et al, 2001).	Permite la salida de glicerol de los adipocitos o células grasas. (Sales, Lobo, Carvalho, Moura, Rodríguez, 2013).	Acuagliceroporinas

AQP11	En la cola del espermatozoide eyaculado. (Yeste et al, 2001).	Involucrada en el transporte de agua y glicerol. ( F, Noto 2019).	super acuaporinas
AQP3	En la pieza media del espermatozoide. (Yeste et al, 2001).	Tienen como función permitir el paso de agua y otros pequeños solutos, como el glicerol y la urea, a través de la membrana plasmática. (Sales, Lobo, Carvalho, Moura, Rodríguez, 2013).	Acuagliceroporinas

En la anterior tabla se da a conocer las diferentes funciones de las acuaporinas vistas en el espermatozoide del verraco y jabalí y sus diferentes clasificación esto nos llevó a ver que La presencia y localización de AQP3, AQP7 y AQP11 en semen fresco de jabalí y verraco ha sido investigada en trabajos previos, no se ha establecido la relación de estas tres proteínas con la capacidad de coagulación del semen de jabalí para manipular (R.Moratón, 2014). Hasta ahora, estudios separados han encontrado diferentes marcadores de congelación para el semen de jabalí y verraco. Sin embargo, puede haber otras proteínas involucradas en la tolerancia al frío del espermatozoide de jabalí. Como se mencionó anteriormente, las AQP son esenciales para regular el transporte de agua y CPA a través de la membrana celular y prevenir la lesión osmótica (I.vilagran, 2017).

De hecho, la permeabilidad de la membrana plasmática al agua y la APC determinan la tolerancia de las células a la crioconservación, ya que esta permeabilidad está implicada en las principales formas de daño celular inducido por la crioconservación, incluido el daño intracelular al hielo (Agre, 2004).

Además, AQP3 participa en la permeación de los espermatozoides, lo cual es importante después del agotamiento osmótico natural de los gametos masculinos cuando ingresan a los femeninos-(Tabla 3) (I.vilagran, 2017).

## 2. 5.3.4 Acuaporinas presentes en el semen del Equino.

Las AQP<sub>s</sub> tienen una gran importancia en el proceso de congelación y descongelación ya que están relacionadas con la disfunción del agua (Br. Parada, 2019), el número de AQP<sub>s</sub> identificadas hasta el momento en los espermatozoides varía según la especie (Sanches et al, 2015).

*Tabla 4. Localización de las AQP más abundantes en espermatozoides de mamíferos (Bonilla et al, 2019).*

AQP	LOCALIZACIÓN	ESPECIE	REFERENCIA
AQP3	Pieza intermedia de esperma	Humano Ratón Cerdo Vacas	Chen et al. ( <a href="#">2011</a> ); Laforenza et al. ( <a href="#">2016</a> ); Prieto-Martínez et al. ( <a href="#">2015</a> ); Prieto-Martínez, Morató et al. ( <a href="#">2016</a> ).
AQP7	Espermátides alargadas, cola de espermatozoides testicular y epidídimo	Rata	Calamita, Mazzone, Bizzoca et al. ( <a href="#">2001</a> ); Ishibashi et al. ( <a href="#">1997</a> ); Suzuki-Toyota et al. ( <a href="#">1999</a> ).
	Espermátidas, cabeza y cola del espermatozoide	Humano	Laforenza et al. ( <a href="#">2016</a> ); Moretti et al. ( <a href="#">2012</a> ); Saito et al. ( <a href="#">2004</a> ); Yeung et al. ( <a href="#">2010</a> ).
	Cola y gota citoplásmica de espermatozoides epididimarios. Piezas de conexión, intermedias y principales de los espermatozoides eyaculados	Cerdo	Prieto-Martínez, Vilagran et al. ( <a href="#">2016</a> ); Vicente-Carrillo et al. ( <a href="#">2016</a> ).
	pieza intermedia	Vacas	Kasimanickam et al. ( <a href="#">2017</a> ); Prieto-Martínez et al. ( <a href="#">2015</a> ).

AQP11	Espermátidas alargadas y cola de esperma eyaculada	Rata	Yeung y Cooper ( <a href="#">2010</a> ).
	Cola de esperma eyaculado	Humano Cerdo	Laforenza et al. ( <a href="#">2016</a> ); Prieto-Martínez, Morató et al. ( <a href="#">2016</a> ).

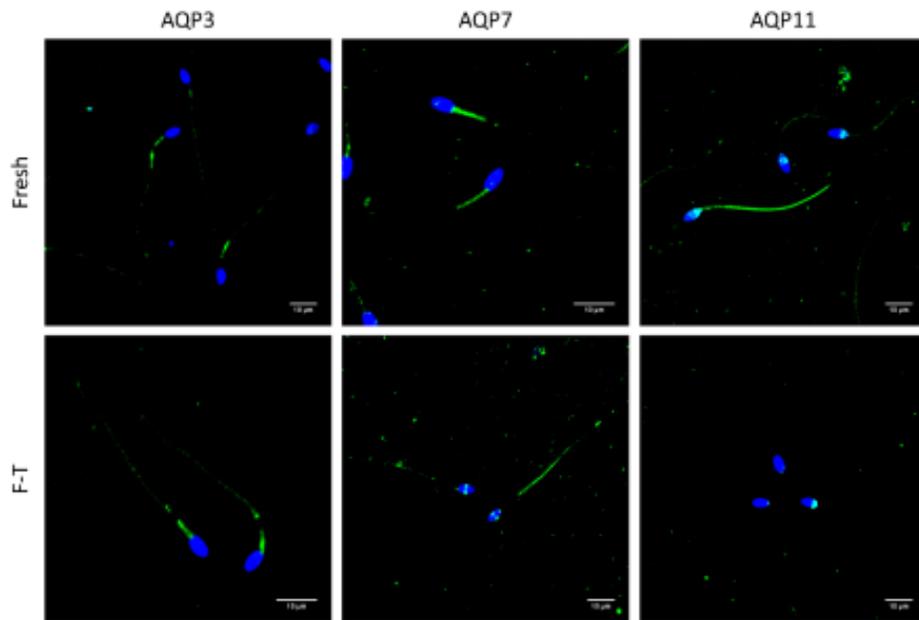
En el equino la ubicación de la AQP3 está en la parte medial del espermatozoide (Huang, et al, 2006), con función principal de la regulación del volumen del esperma evitando deformidades en la cola del espermatozoide, esto con el fin de garantizar una migración adecuada hacia el oviducto asegurando la capacidad de fertilidad- (Tabla 4) (Qi Chen, 2011).

Otra AQP presente es la acuaporina 7 la cual está ubicada en la cola de los espermatozoides testiculares y en la parte media de los espermatozoides eyaculados contando con espermátidas redondas y alargadas (Hermo, 2013), esta acuaporina muestra una función de aumento en la fertilidad ya que tiene una estrecha relación en la calidad del esperma, estudios relacionados con la función de esta acuaporina en diferentes especies muestra que espermatozoides sin presencia de esta AQP cuentan con baja fertilidad (KAZUTAKA SAITO, 2004).

Por último mencionaremos la AQP11 presente en en el espermatozoide del equino está localizada en la pieza principal y post-región acrosómica del espermatozoide, la cual está relacionada con la motilidad del esperma y la integridad de la membrana del espermatozoide porque esta acuaporina podría estar correlacionada como marcador de criotolerancia (Bonilla et al 2019-Correal, 2017).

En el proceso de la criopreservación puede que estas AQP tengan un pequeño cambio en la ubicación en el espermatozoide (Bonilla et al, 2019), donde juegan un papel fundamental en cuanto a su capacidad de resistencia frente a los protocolos de congelación y descongelación.

Como se ha descrito las AQPs se pueden localizar en las células de sertoli y Leydig como también en las células epiteliales de los conductos que recubren las luz donde tienen función principal de aumentar la concentración de contenido espermático (klein, 2013), en la espermatogénesis en cuanto a el equilibrio luminal, otra de sus funciones es la maduración del epidídimo además de transporte de espermatozoides y almacenamiento de este (Correal et al, 2017), estas funciones pueden estar disminuidas según la temporada en la que se encuentre el semental ya que en tiempos de reproducción puede que la cantidad de AQPs esté disminuida (M Yeste et al, 2017).



*Ilustración 7: Localización de AQP3, AQP7 y AQP11 (Bonilla et al, 2019).*

Se debe tener en cuenta que las AQP3 y AQP7 están en el grupo de las acuagliceroporinas AGP (Di Giorgio, 2013), que se caracteriza por tener permeabilidad de agua, glicerol, urea y algunos electrolitos, mientras que la AQP11 se encuentra dentro del grupo de superacuaporinas que se involucran en el transporte de agua intracelular, y la homeostasis intravesicular (Bonilla et al, 2019).

Luego de la eyaculación el espermatozoide queda expuesto a cambios que pueden dañar la motilidad espermática, por lo que el espermatozoide puede perder integridad y función (Yeste et al, 2017). Además se ha demostrado que la criopreservación induce a diferentes tipos de daños, entre los que se encuentran la fragmentación del ADN espermático, la disminución del potencial de membrana mitocondrial, daños en el acrosoma y la producción de radicales libres de oxígeno, por lo que es importante dilucidar la importancia de cada una de las AQP presentes en este proceso (Yeste et al., 2015).

En equinos el proceso de criopreservación reduce la capacidad fecundante cuando se compara con el semen fresco efecto poco observado en otras especies (Loomis y Graham, 2008; Squires, 2013), por otro lado, no existen criterios de selección para fertilidad con semen congelado en la especie equina, como sucede en bovinos donde se determina la habilidad espermática para resistir al proceso de criopreservación (Loomis y Graham, 2008).



*Ilustración 8: Estructura tetramérica de las AQPs con cada uno de sus monómeros (Kazutoshi,2014*

## 6. DISCUSIÓN

En la célula uno de los componentes más importantes es el agua participando en los diferentes mecanismos de regulación en los procesos biológicos respondiendo a los gradientes osmóticos (Coppo, 2017). En el momento en que Peter Agre junto a sus colegas descubrieron la AQP3 abrieron una nueva puerta a descubrimientos brindando una base para comprender el transporte de agua mediante la difusión facilitada (revisado por Agre P. , 2004 y Agre P. , 2006). Su distribución particular del espermatozoide de los mamíferos es limitada aunque cada vez hay estudios más detallados en diferentes especies.

En este contexto uno de nuestros objetivos se basaba en hacer una recopilación de diferentes estudios donde evidenciará la relación y las similitudes que hay en el espermatozoide en el equino, bovino y porcino destacando su importancia, función y localización.

**Tabla 5:** Localización y función de AQP3, AQP7, AQP11 en el seme del equino, porcino y bovino

AQP	ESPECIE	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	REFERENCIAS
AQP3	<b>EQUINO</b>	Pieza medial del espermatozoide.	Regulación del volumen del esperma evitando deformidades en la cola del espermatozoide.	<b>(Huang, et al., 2006)</b> (Qi Chen., 2011).
	<b>BOVINO</b>	Cabeza y cola.	No hay evidencia clara del papel durante la criopreservación.	(Funji, et al., 2018)
	<b>PORCINO</b>	Pieza medial del esperma y en la región acrosómica.	Maduración del esperma y la regulación osmótica.	(Morato., 2014).

AQP7	<b>EQUINO</b>	Cola y en la parte media.	Aumento en la fertilidad.	(Hermo., 2013)  (Kazutaka Saito., 2004)
	<b>BOVINO</b>	Cabeza y cola.	Resistencia de los espermatozoides al momento del choque térmico.	(Prieto-Martínez, et al., 2017)
	<b>PORCINO</b>	Región post acrosomal y la pieza media.	Resistencia de los espermatozoides al momento del choque térmico.	(Yeste et al., 2016) (Prieto-Martínez, et al., 2017)
AQP11	<b>EQUINO</b>	Pieza principal y post-región acrosómica.	Motilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana del espermatozoide.	(Bonilla-Correal., 2017)
	<b>BOVINO</b>	Cabeza y cola (todo el espermatozoide)	marcador de calidad después de la criopreservación, (fertilidad y capacidad fecundante)	(Utt., 2016)  (Moráto et al., 2018)
	<b>PORCINO</b>	cabeza y la cola	sólo es relevante en el espermatozoide fresco	(Yeste et al, 2016)

Finalmente cabe resaltar que faltan aún muchos estudios para confirmar y afirmar con más seguridad el papel y/o función de estas proteínas en el semen de los mamíferos al momento de la criotolerancia y de esta manera generar nuevos marcadores de fertilidad más eficientes.

## REFERENCIAS

- Agre, P. (2004). Aquaporin Water Channels (Nobel Lecture). *Angewandte*, 43(33), 4290. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200460804>
- Agre, P. (2004). Nobel Lecture. Aquaporin water channel. *Biosci Rep*, 24, 127-263.
- Agre, P. (2006). The Aquaporin Water Channels. *Proc Am Thorac Soc*, 3, 5-13.
- Alvarenga, M. A., Ozanam, F., & Ramirez, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 521-530. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Arango-Múnera, J. D., Castrillón-Zuluaga, V., Correa-Rendón, N., Suarez-Delgado, M., & Carrillo-Gonzalez, D. (2020). Criopreservación de semen canino (*Canis familiaris*) en pajilla francesa en el municipio de Medellín, Antioquia. *Revista Colombiana De Ciencia Animal*, 12(1), 754. doi:<https://doi.org/10.24188/recia.v12.n1.2020.754>
- Arrighi, S., Bosi, G., Accogli, G., & Desantis, S. (2016). Seasonal and Ageing-Depending Changes of Aquaporins 1 and 9 Expression in the Genital Tract of Buffalo Bulls (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 515-523. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12713>
- Ávalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Mexico: Casa abierta al tiempo. Obtenido de [https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion\\_manipulacion.pdf](https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf)
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008&lng=en&tlng=es).
- Ball, B., & Vo, A. (2001). Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and the Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability, and Mitochondrial Membrane Potential. *American Society of Andrology*, 22(6), 1061-1069. doi:<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x>
- Belascoain, M., Diaz, E., & Hüter, S. (2016). TÉCNICAS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS. *TESIS PARA ESPECIALIZACION* . Obtenido de <https://silo.tips/download/tecnicas-para-la-criopreservacion-de-embriones-bovinos#>

- Bonilla, S. (2019). Identificación, localización y función de las acuaporinas en el espermatozoide equino y su relación con la criopreservación. [Tesis doctoral, *Universitat Autònoma de Barcelona*]. Obtenido de <https://ddd.uab.cat/record/233517>
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., & Herraéz, M. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, *50*(2), 144-53. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.12.003.
- Castelo, T. d., Rodriguez-Frota, T., & Rodrigues-Silva, A. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta veterinaria de brasil*, *2*(3), 67-75. Obtenido de <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/885>
- Clulow, J., Maxwell, G. E., & Morris, L. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, *85*(6), 232-235. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00151.x>
- Coppo, J.-A. (2017). *Fisiología comparada del medio interno 2a ed.* Salta: EUCASA.
- Delgado, A., Llavanera, M., Fernandez, L., Recuero, S., Mateo, Y., Bonet, S., . . . Yeste, M. (2019). Aquaglyceroporins but not orthodox aquaporins are involved in the cryotolerance of pig spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(77). doi:<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0388-8>
- Doyong, G., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*, *41*(4), 187-196. doi:<https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Figueroa, E., Risopatron, J., Sanchez, R., & Isachenko, E. (2013). Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, *372-375*, 119-126. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.019>
- Funji, T., Harayama, H., Fukuda, S., Kagueyama, S., Nito, A., Yoshino, H., . . . Sawai, K. (2018). Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*, *64*(4), 327-335. doi:<https://doi.org/10.1262/jrd.2017-166>
- Gao, D., & Critser, J. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*, *41*(4), 187-196. Obtenido de <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Garcia, J. (2008). Efecto del quitosano sobre la membrana celular del *Rhizopus stolonifer*. *TESIS MAESTRIA. Instituto politecnico internacional.*

- Grotter, L., Cattaneo, L., Marini, P., Kjelland, M., & Ferre, L. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665. doi:10.1111/rda.13409
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Diez, C. (2005). Anlisis del semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria*.(2), 29-45. Obtenido de <https://ria.asturias.es/RIA/handle/123456789/192>
- Kasimanickam, R., .Kasimanickam, V., Arangasamy, A., & Kastelic, J. (2017). Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. *Theriogenology*, 89, 162-168. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.011>
- Kumar, S., Deb, R., Singh, U., Ganguly, I., Mandal, D., Singh, R., . . . Sharma, A. (2015). SNPs at exonic region of aquaporin-7 (AQP7) gene may affect semen. *Journal of Genetics*, 94, 108-112. doi:<https://doi.org/10.1007/s12041-014-0436-2>
- Leahy, T., & Gadella, B. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142(6), 759-778. doi:<https://doi.org/10.1530/REP-11-0310>
- Loomis, P. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 191-200. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00156-7)
- Loomis, P., & Graham, J. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 119-128. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>
- Ma, T.-H., Liu, J.-F., Zhao, R.-F., Jiang, H., Dai, L.-S., Zhao, Y.-M., . . . Zhang, J.-B. (2011). Association analysis of aquaporin 7 (AQP7) gene variants with semen quality and fertility in bulls. *J. Vet. Anim. Sci*, 35(1), 63-66. doi:10.3906/vet-0908-33
- Manzur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *ell Biophysics*, 17, 53-92. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02989804>
- Mazur, P., Leibo, S., & Chu, E. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimentsl Cell Research*, 71(2), 345-355. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)

- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344. doi:[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- Mina, D. (2008). *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. USA: Institute of Rural Studies, University of Wales, Aberystwyth, UK. doi:10.1079/9781845934507.0000
- Morató, R., Prieto-Martínez, N., Muiño, R., Hidalgo, C. O., Rodríguez-Gil, J. E., Bonet, S., & Yeste, M. (2018). Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 30(8), 1099-1108. doi:10.1071/RD17340
- Moreno, J. S., & Galarza, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18-38. Obtenido de <http://www.revistaecuatorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116>
- Oberska, P., & Michałek, K. (2021). Aquaporins: New markers for male (in)fertility in livestock and poultry? *Animal Reproduction Science*, 234, 106828. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106807>
- Pérez, M., Petrinelli, A., Rodríguez, P., Satorre, M., & Breininger, E. (2019). Comparación de dos métodos de criopreservación de semen porcino. Efectos sobre la calidad seminal. *Revista veterinaria*, 30(1), 23-27. doi:<https://dx.doi.org/10.30972/vet.3013893>
- Prieto-Martínez, N., Morató, R., Vilagran, I., Rodríguez-Gil, J., & Bonet, S. (2017). Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: detection and localisation of aquaglyceroporin 3. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29(4), 703-711. doi:<https://doi.org/10.1071/RD15164>
- Restrepo, G., Duque, J. E., & Montoya, J. D. (2012). EFFECT OF TWO PROTOCOLS OF CRYOPRESERVATION ON FERTILIZING CAPACITY OF STALLION (*Equus caballus*) SEMEN. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 65(2), 6711-6718. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472012000200015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472012000200015&lng=en&nrm=iso). ISSN 0304-2847.
- Restrepo-Betancur, G., Pizarro-López, E., & Alberto-Rojano, B. (2012). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 128-136. Obtenido de

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-44492012000100013&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000100013&lng=en&tlng=es)

- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., & Mello, M. &. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rubio, J., Quintero, A., & González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Maracaibo*, 19(4), 382-389. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000400010&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010&lng=es&tlng=es).
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., & Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*, 66(4), 1061-7. doi:10.1095/biolreprod66.4.1061
- Sala-Valdés, M. (2010). Conexiones de los Microdominios de Tetraspaninas con el citoesqueleto de actina y su función en los procesos de Migración y Sinapsis Inmune. *Tesis doctoral inédita. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología*.
- Tamayo, H., & Fuentes, G. (2016). Participación de las acuaporinas en el espermatozoide. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(3), 1-4. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/305851739>
- Tooley, C. (2001). The influence of high osmolality upon the maturation of spermatozoa in the boar epididymis. *the university of notingham*, 1(1), 6. Obtenido de file:///C:/Users/danie/Downloads/the-influence-of-high-osmolality-upon-the-maturation-of-spermatozoa--carrie-tooley.pdf
- Utt, M. D. (2016). Prediction of bull fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 37-44. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.011>
- Verkman, A. (2001). Applications of aquaporin inhibitors. *Drug News Perspect*, 14(7), 412-20. doi:10.1358/dnp.2001.14.7.858424
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371-372. doi:10.1017/S0967199400002240
- Yeste, M. (2011). Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2(1), 88-99. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00144.x>

- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Yeste, N. P.-M.-I. (2016). Relación de las acuaporinas 3 (AQP3), 7. *ANDROLOGY*, 1(1), 12. doi:10.1111 / andr.12410
- Yeung, C., Callies, C., Tüttelmann, F., Kliesch, S., & T.G, C. (2010). Aquaporins in the human testis and spermatozoa – identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *International Journal of Andrology*, 33(4), 629-641. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00998.x>
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. (2011). Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(1-2), 167-173. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015>
- Zilli, I., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., & Vilella, S. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47(3), 227-35. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.10.002