

ESPERMATOZOIDES CANINOS CONGELADOS: ¿POR QUE SON TAN DEBILES?



Mónica De los Reyes S (DVM; MSe)

El enfriamiento y la congelación a que se someten los espermatozoides para lograr preservarlos, constituye una herramienta básica en la implementación de biotecnologías en reproducción, como también en ensayos experimentales de investigación. Sin embargo, los efectos que genera el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides, que se traducen en el detrimento de su capacidad fecundante, ha sido un factor relevante en el desarrollo de las biotecnologías como la inseminación artificial, fecundación in vitro y la producción y transferencia de embriones, lo que aún son bastante escasas en la especie canina.

Los espermatozoides de perro presentan una gran diferencia que se observa en el tiempo de sobrevivencia entre los espermatozoides eyaculados, 268 horas, versus los congelados-descongelados con una sobrevivencia aproximada de 12 horas en el tracto genital de

la hembra, lo que influye en los porcentajes de fertilidad al utilizar semen congelado. La evaluación de la interacción gamética en espermatozoides criopreservados caninos tendiente a la fecundación, ha demostrado que el daño producto del enfriamiento afecta severamente la funcionalidad espermática en relación a su capacidad de penetración a la zona pelúcida, que es una cubierta extracelular que rodea al ovocito. En estudios recientes, hemos podido determinar que la viabilidad de espermatozoides de perro expresada a través de la actividad mitocondrial y en la integridad acrosomal, que en los espermatozoides criopreservados tienen una disminución significativa de la viabilidad e integridad de membrana con respecto a los espermatozoides frescos, observándose también un aumento en la ruptura acrosomal.

Las alteraciones estructurales y funcionales se producirían como consecuencia del estrés térmico, osmótico y tóxico al que se someten los componentes de las membranas espermáticas durante el proceso de congelación. El estrés térmico puede considerarse como un estado máximo de alteración celular, el que

se cree perduraría bajo los 0° C y que entre los 5 y -15° C tendría su máxima expresión, considerándose este rango de temperatura como el momento en el cual se generarían la mayor cantidad de modificaciones de las membranas. También se afirma que los daños de membrana ocurren entre los -15 y -60° C, durante la congelación y descongelación y no durante su conservación en nitrógeno líquido a -196° C. La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, funciones que permiten al espermatozoide adaptar su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito y sus envolturas. Por esto, la mantención de la integridad de membrana no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también para su capacidad fértil.

Aunque no está totalmente claro la naturaleza del daño en la membrana celular del espermatozoide, como también de las membranas acrosomales y mitocondriales, entre otras; hay evidencias que sugieren que esta alteración sería provocada por un reordenamiento de los



lípidos de la membrana, necesarios para la adecuada función de ésta. La susceptibilidad a las bajas temperaturas varía de acuerdo con la especie, la relación entre los ácidos grasos saturados y polinsaturados unidos a los fosfolípidos de la membrana, condicionaría el grado de sensibilidad al shock térmico. Esta relación baja en los espermatozoides caninos, por lo que serían menos susceptibles en comparación a otras especies. No obstante, los espermatozoides, independiente de la especie, experimentan daños durante el proceso de congelación y descongelación que se traducen en cambios morfológicos en las membranas, tales como la separación lateral de la fase lipídica con las proteínas integrales, debido a que más del 90% del agua osmóticamente activa es removida desde la célula afectando su estructura, lo que sería parcialmente revertido durante la descongelación.

La permeabilidad de las membranas aumenta después del enfriamiento lo que podría deberse a un efecto específico sobre los canales celulares, ya que las proteínas de membrana que se encuentran unidas por fosfolípidos experimentan cambios estructurales que se traducen en una alteración funcional, como ocurre con las proteínas que actúan como canales de iones, haciendo que la membrana se torne más permeable luego de la congelación. Las fracturas celulares generadas por la criopreservación sugieren que la agrupación de las proteínas de membrana durante la fase de separación de lípidos al no ser totalmente reversible, altera su función de reconocimiento de receptores y la interacción ligando-receptor, lo que afectaría la relación del espermatozoide con el epitelio oviductal y las cubiertas

ovocitarias.

La regulación del calcio se afecta por el enfriamiento, lo que tendría consecuencias en términos de la función celular, que en casos severos, puede ser incompatible con la viabilidad del espermatozoide. La disminución en la fertilidad observada en el semen criopreservado resultaría por tanto, además de la disminución de la viabilidad, a posibles alteraciones en la funcionalidad espermática (capacidad fértil), de la población de espermatozoides que lograron sobrevivir al proceso.

Otra causa de las alteraciones estructurales y funcionales que experimentan los espermatozoides son las tasas de congelación y descongelación empleadas, las cuales determinan en parte la sobrevivencia de los espermatozoides. De estas tasas depende la formación y disolución de cristales de hielo intra y extracelulares durante el proceso de criopreservación, perjudiciales para los espermatozoides. Durante la congelación, se produce una deshidratación celular progresiva, que se traducirá en un adecuado funcionamiento celular pos descongelación, el que se logrará sólo cuando la tasa de congelación es lo suficientemente lenta como para permitir una progresiva salida del agua desde el interior de la célula, por osmosis, previniéndose la formación de hielo intracelular y cuando es lo suficientemente rápida como para minimizar el efecto negativo de la exposición de la célula a altas concentraciones de solutos.

Por otro lado, la adición y remoción del crioprotector también genera un importante estrés osmótico y tóxico sobre la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. El daño dependerá, entre otras cosas, del crioprotector

utilizado y de la permeabilidad de la membrana celular a éste. El glicerol es el crioprotector más utilizado para la congelación de espermatozoides de perro, así como en otras especies, este crioprotector es osmóticamente activo e ingresa a la célula reemplazando al agua, generando cambios volumétricos durante la congelación y descongelación celular que en ocasiones exceden los fisiológicamente tolerables.

Elementos del citoesqueleto también son sensibles a las bajas temperaturas. Producto de la criopreservación se genera la depolimerización prematura de los filamentos de actina, que se cree sería un paso esencial que permitiría el acercamiento de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa promoviendo la reacción acrosomal. Por esto se ha postulado que la congelación contribuiría a una fusión desorganizada de ambas membranas.

Estudios en espermatozoides congelados, han relacionado el efecto de someter a los espermatozoides a bajas temperaturas y el tiempo requerido en la capacitación, señalando una diferente funcionalidad entre los espermatozoides frescos y aquellos que se han congelado. Se ha sugerido que la criopreservación, por tanto, promovería modificaciones, que según diversas investigaciones serían similares a la capacitación del espermatozoide, proceso fisiológico que ocurre en las cercanías del ovocito y le permite al espermatozoide adquirir su capacidad fecundante. Esto podría estar dado por modificaciones a nivel de la membrana, especialmente en los canales de calcio, permitiendo un mayor flujo de calcio provocando cambios similares a la capacitación espermática en los espermatozoides congelados y descongelados. Este

fenómeno estaría relacionado por tanto a un menor tiempo de capacitación y de acuerdo a lo que hemos observado en los últimos estudios en espermatozoides caninos en nuestro laboratorio, la penetración espermática a través (Figura 1) de la zona pelúcida del ovocito sería también diferente, lo que podría explicar, en parte, la reducción en el tiempo de vida fértil de los espermatozoides criopreservados.

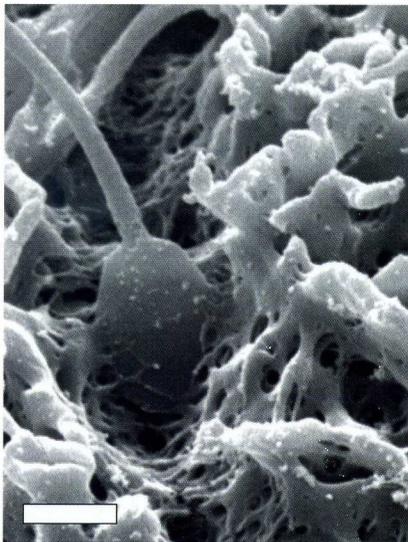


Figura 1: Penetración de un espermatozoide canino *in vitro* al ovocito. (Barra = 2 micrones)

Según estudios en espermatozoides de otras especies, se sugeriría que aquellos que han sido criopreservados pueden ser más sensibles a estímulos que induzcan estos cambios asociados a la capacitación y reacción acrosómica. Este hecho lo hemos podido comprobar en espermatozoides caninos, a través de una enzima acrosomal, la “acrosina”, presente en el acrosoma de espermatozoides intactos, la cual ha sido involucrada en la unión y penetra-



ción del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito. Esta enzima se activa y libera desde el acrosoma durante el proceso de reacción acrosómica luego de la capacitación y previo a la fecundación. Los estudios financiados por el Proyecto FONDECYT 1060602, a nuestro laboratorio, demuestran que la activación de esta enzima se produce más temprano en los espermatozoides congelados con respecto a los espermatozoides eyaculados frescos (Figura 2), lo que estaría altamente correlacionado a una penetración espermática a las cubiertas del ovocito en forma más precoz. Sin embargo, este mismo hecho implica que los espermatozoides congelados tengan una menor retención de su capacidad fecundante en el tiempo, disminuyendo por tanto su potencial fértil.

Los estudios de criopreservación en caninos en relación a los factores asociados a la funcionalidad

espermática son necesarios para la correcta interpretación de los cambios experimentados por estos espermatozoides en el proceso de fecundación, de modo que en un futuro próximo se puedan optimizar las técnicas de criopreservación de los espermatozoides caninos, tendientes al desarrollo biotecnológico reproductivo en esta especie.

LECTURA SUGERIDA

- Cortés CJ, Codelia VA, Manosalva I, de Lange J, De Los Reyes M, Moreno RD, 2006: Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 165-175.
- De los Reyes M, de Lange J, Anguita C, Palomino J, Barros C, 2008: In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro mature canine oocytes using fresh, chilled and frozen dog semen. *Anim. Reprod. Sci.* (en prensa).
- Nöthling JO, Shuttleworth R, 2005: The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63: 1469–1480
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM, 2006: Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen *Reprod. Dom. Anim.* 41: 74–78.
- Strom-Holst B, Larsson B, Rodríguez-Martínez H, Lindforsberg C, 2000: Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119: 201-206.