

## CRIOCAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Hugo González Figueroa<sup>1</sup>  
Hugo Mauricio González Molfino

### RESUMEN

La crioconservación de gametos y embriones considera estudios relacionados con las técnicas y crioprotectores que se usan para obtener altas tasas de sobrevivencia. También estudia los cambios celulares ocurridos durante estos procesos. En la actualidad, la crioconservación de gametos y embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en ganadería y medicina pudiendo lograrse por procedimientos de refrigeración, preservación hipotérmica, congelación estándar y vitrificación. Al conservar gametos y embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo sus actividades fisiológicas y hacer posible almacenar gametos y embriones durante un largo periodo sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos. Este hecho, convierte a la crioconservación de gametos y embriones en una biotecnología reproductiva insustituible para el comercio internacional de reproductores. La capacitación espermática es un proceso complejo que confiere al espermatozoide capacidad fecundante. Existen evidencias que una de las causas de la baja fertilidad obtenida con semen congelado, es una capacitación prematura provocada por el frío. El conocimiento de esta hipotética criocondensación resultaría de gran importancia para la comprensión de las alteraciones producidas por la exposición al frío, especialmente en especies mamíferas que muestran una gran susceptibilidad a los procesos de crioconservación. Existen evidencias que durante estos procesos, se producen alteraciones morfológicas, principalmente en la membrana plasmática y en el acrosoma del espermatozoide que disminuirían su viabilidad y por consiguiente fertilidad cuando son usados en los programas de inseminación artificial. De ahí que el presente trabajo de revisión, menciona algunos avances experimentales que tratan de relacionar la ocurrencia de la criocondensación con la baja fertilidad en especies de mamíferos, y de esta manera tener una buena base bibliográfica a partir de la cual emprender las diferentes investigaciones en la búsqueda de sustancias que inhiban los mecanismos de señalización que provocan alteraciones en las membranas plasmática y acrosómica del espermatozoide cuando se encuentran en estrés hipotérmico.

**Palabras claves:** *criocondensación espermática capacitación, criocondensación.*

### SUMMARY

The cryopreservation of gametes and embryos considers studies related to techniques and cryoprotectants used to obtain high survival rates. Also studying the cell changes occurring during these processes. Currently, cryopreservation of gametes and embryos of mammals has become a routine procedure in animal husbandry and human medicine can be accomplished by cooling, hypothermic and freezing preservation. By preserving gametes and embryos to extremely low temperatures (-196 °C in liquid nitrogen) can almost completely stop his activities. Thus it is possible to store gametes and embryos during a long period without affecting their viability and without causing genetic changes. This fact makes the cryopreservation of gametes and embryos in reproductive biotechnology in international trade irreplaceable player. Sperm capacitation is a complex process which gives the sperm fertilizing capacity. There is evidence that one of the causes of low fertility obtained with frozen semen, is a training-induced premature cold. The knowledge of this hypothetical criocondensación be of great importance for the understanding of the alterations produced by exposure to cold, especially in mammalian species show increased susceptibility to cryopreservation processes. There is evidence that during these processes, morphological changes occur mainly in the plasma membrane and the sperm acrosome would diminish its viability and therefore fertility when used in artificial insemination programs. Hence, the present review, some experimental advances mentioned attempting to relate the occurrence of criocondensación with low fertility in mammalian species, and thus have a good bibliographic database from which to pursue the various investigations in the search for substances that inhibit the signaling mechanisms that cause alterations in plasma and acrosome of sperm membranes when they are hypothermic stress.

**Key words:** *sperm cryopreservation, capacitation, cryocapacitation.*

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma.

## INTRODUCCIÓN

El espermatozoide mamífero recién eyaculado necesita adquirir capacidad fértil a través de cambios concurrentes que ocurren en el tracto genital de la hembra, denominados "capacitación" (Bedford, 1970). Aunque los mecanismos moleculares de la capacitación no están completamente aclarados, muchos estudios han demostrado la participación de numerosas modificaciones estructurales y bioquímicas en los espermatozoides, como cambios en la composición y fluidez de la membrana (Langlais & Roberts, 1985; Harrison *et al.*, 1996; Lin & Kan, 1996), aumento del calcio intracelular (Visconti *et al.*, 1995), alcalización del citoplasma (Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995), activación de canales iónicos (Florman *et al.*, 1998), y la generación de especies oxígeno reactivas (de Lamirande *et al.*, 1998) entre otros. De la misma manera, existen evidencias de que la capacitación está asociada con la fosforilación de proteínas en tirosina (Chamberland *et al.*, 2001), que se modula a través de una vía dependiente del AMPc en muchas especies, incluyendo ratón (Visconti *et al.*, 1996), humanos (Galantino-Homer *et al.*, 1997), toro (Leclerc *et al.*, 1996) entre otros. La capacitación de los espermatozoides de mamíferos también puede ocurrir *in vitro* en medios químicamente definidos o en medios suplementados con algunas macromoléculas o moléculas energéticas (Lin & Kan, 1996; Maxwell & Johnson, 1997; Gonzales-Figueroa & Gonzales-Molfino, 2001).

## PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA O REFRIGERACIÓN

La crioconservación del semen humano y de animales de importancia económica es una herramienta importante en los programas de reproducción asistida, sin embargo existen evidencias que las temperaturas bajas reducen la fertilidad de los espermatozoides refrigerados o criopreservados debido a daños subletales cuyas causas no se entienden completamente (Watson *et al.*, 1995). La reducción de la temperatura por debajo de 37°C induce una serie de alteraciones en las estructuras y funciones del espermatozoide (Amann & Pickett, 1987). Durante el proceso de congelación, el reto de las células no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60°C, que las células experimentan en dos ocasiones, durante la congelación y durante la descongelación, puesto que a -196°C no se producen reacciones térmicas, debido a que a -130°C no se encuentra el agua en estado líquido (Mazur, 1984).

Existen evidencias de que los procedimientos de crioconservación (dilución, refrigeración, congelación estándar y virificación) inducen cambios, en los esper-

matozoides, similares a los que ocurren en la capacitación fisiológica (Bailey *et al.*, 2000), por lo que a estos cambios se le conocen como "criocapacitación" y se le asocia con la baja fertilidad que se encuentra en las inseminaciones que se realizan con el semen descongelado.

Durante el proceso de refrigeración se ha detectado cambios en el espermatozoide similares a los que ocurren durante la capacitación (Watson, 1996) como alteración de la fluidez de la membrana y cambios en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del Ca<sup>2+</sup>, entre otros (Green & Watson, 2001). Además, el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa parecida a una reacción del acrosoma, pero que ocurre de manera precoz y que haría a estos espermatozoides incapaces de fecundar el ovocito (Watson, 2000). Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios que ocurren durante la capacitación *in vitro*, dando lugar a un estado de capacitación "intermedia" que haría que los espermatozoides no tengan el tiempo suficiente de viabilidad para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales *in vivo*. Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones en la organización de la membrana plasmática, que es la estructura más sensible a la refrigeración, ya que presenta áreas completamente diferentes en cuanto a la disposición de los lípidos y proteínas, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas en áreas diferentes. La conservación de dichas áreas resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada una asume una función muy específica en la fecundación (Parks & Graham (1992), La deformación acrosómica y lesiones en las mitocondrias son otras de las alteraciones que provoca la baja de temperatura (De Leeuw *et al.*, 1990).

La preservación hipotérmica consiste en colocar, inmerso en un medio sin macromoléculas, epidídimos de mamíferos, sellar la superficie con aceite mineral y mantener el tubo de cultivo a 5°C (temperatura similar a la usada en la refrigeración), recambiando el medio cada 48 horas. Usando este método se ha mantenido la sostenibilidad de los espermatozoides de cuy hasta por 15 días, los de macho cabrío hasta 12 días y los espermatozoides de alpaca hasta por 10 días inclusive. Es interesante comprobar que cultivando epidídimos colectados después de la muerte del animal, las células espermáticas permanecen, potencialmente, fértiles por varios días (Gonzales-Figueroa *et al.*, 1999).

La sostenibilidad de los espermatozoides de cuy se expresó por la supervivencia de 15 días en condiciones hipotérmicas, y además por el acortamiento en 60

minutos del tiempo de la hiperactivación después de las 24 h de preservación hipotérmica y que se mantuvo hasta los 11 días inclusive (González-Figueroa, 1988), a juzgar por la penetración en ovocitos de hámster sin zona pelúcida (tabla 1). Si bien es cierto que el frío daña la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide (Breitbart et al., 2005), en cuyo parecería existir una correlación entre la capacidad fecundante y la dispersión gradual de la matriz acrosómica en condiciones hipotérmicas (González-Figueroa & Valdivia, 1992). Los cambios morfológicos que conducen a la dispersión de la matriz se inician con una pérdida progresiva de la electrodensidad en la porción apical del acrosoma, a partir de las 72 h de incubación hipotérmica (fig.1). La membrana externa del acrosoma adopta forma globular a las 120 h, apreciándose gránulos densos y pequeñas vesículas en la matriz acrosómica (fig.2). Esta dispersión ocurre porque la preservación hipotérmica promueve una permeabilización gradual de la matriz espermática, con características muy similares a la permeabilización inducida por agentes como digitonina (Noland, 1990).

### CRIOPRESERVACIÓN

En cuanto a los daños provocados por la congelación y la vitrificación, las evidencias demuestran que siempre las membranas celulares son más sensibles a los daños que provocan las bajas temperaturas, en relación al núcleo y al segmento intermedio del espermatozoide. En relación al acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna y la matriz acrosomal (Salamon & Maxwell, 1995). Durante los procesos de congelación y descongelación las membranas son sensibles a los cambios de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico, también deben incluirse las alteraciones del volumen de la célula, provocado por la adición del crioprotector antes de la congelación, las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, la deshidratación derivada de la congelación, las fases de transición de los fosfolípidos de membrana, así como los efectos de la elevada concentración de solutos y la formación intracelular de hielo (Parks y Graham, 1992).

Estas evidencias indican que los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica, además de la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante los procesos de congelación y descongelación (Ollero *et al.*, 1998).

En el acrosoma, las lesiones son más marcadas después de la descongelación, pero estas empiezan a evidenciarse desde la dilución, refrigeración y equilibrio (Oettlé, 1986). Estas alteraciones originan un edema en la porción anterior, que la microscopía electrónica muestra como expansiones de la matriz acrosomal en

forma de pliegues y proyecciones, similares a lo que se observa en espermatozoides de cuy mantenidos en preservación hipotérmica (fig.2).

El proceso de capacitación es otra función espermática afectada por la congelación. El espermatozoide capacitado exhibe una tasa metabólica elevada motilidad hiperactiva, y un incremento en la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (Curry, 2000). Después de la congelación, el espermatozoide pierde capacidad para controlar el eflujo de  $Ca^{2+}$  posiblemente por la disminución de la actividad de la fosfolipasa  $A_2$ , responsable de la reducción de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, lo que provocaría un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular en el espermatozoide y la capacitación prematura (Cormier et al., 1997).

De la misma manera, algunos experimentos indican que el proceso de criopreservación aumenta la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática originando la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la reducción del contenido en fosfolípidos, como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamida. Estas alteraciones y la reducción en la actividad de la enzima superóxido-dismutasa, uno de los antioxidantes más importantes de la célula, serían las responsables de una función espermática defectuosa con disminución de la motilidad (Álvarez y Storey, 1992). El contenido elevado en ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos hace al espermatozoide más susceptible a las lesiones de peroxidación, que además de afectar a la motilidad, también afectan el metabolismo espermático, lo que podría alterar la fertilidad (White, 1993).

### CONCLUSIONES

Como se puede apreciar, la refrigeración, o preservación hipotérmica y la criopreservación, provocan en los espermatozoides de mamíferos cambios morfológicos y fisiológicos muy similares a la capacitación fisiológica, pero que en la gran mayoría de casos inciden en la reducción de la fertilidad del semen expuesto a bajas temperaturas.

Considerando que la crioconservación es el método más usado en los programas de reproducción asistida, es necesario conocer si las alteraciones moleculares y celulares se producen simultáneamente o en distintas fases de los procesos de enfriamiento, llámense refrigeración o preservación hipotérmica y/o congelación/descongelación, con la finalidad de mejorar estos procesos y reducir los daños provocados por la criocapacitación y entender de una mejor manera que mecanismos moleculares y celulares son los alterados.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ, JG. & STOREY, BT.** 1992. Evidence for increased lipid peroxidation damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232-241.
- AMANN, RP. & PICKETT, BW.** 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
- BAILEY, JL, BILODEAU, JF, & CORMIER, N.** 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21:1-7.
- BEDFORD, JM.** 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl.* 2: 128-158.
- BREITBART, H, COHEN, G. & RUBINSTEIN, S.** 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129: 263-268.
- CHAMBERLAND, A, FOURNIER, V, TARDIF, S, SIRARD, MA, SULLIVAN, R, & BAILEY, JL.** 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology.* 55:823-835.
- CORMIER, N, SIRARD, MA, & BAILEY, J.L.** 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468.
- CURRY, MR.** 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod.* 5: 46-52.
- DE LAMIRANDE, E, TSAI, C, HARAKAT, A, & GAGNON, C.** 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl.* 19:585-594
- DE LEEUW, FE, COLENBRANDER, B, & VERKLEIJ, AJ.** 1990. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1: 95-104.
- FLORMAN, HM, ARNOULT, C, KAZAM, IG, LI, C & O'TOOLE CM.** 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod.* 59:12-26.
- GALANTINO-HOMER, HL, VISCONTI, PE, & KOPF, GS.** 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3959-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 56:707-719.
- GONZÁLES-FIGUEROA, H.** 1988. Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epididimo. Tesis Doctoral UNMSM 141 pp.
- GONZALES-FIGUEROA, H. LONGA, J. JURADO, E. & GONZALES-MOLFINO, HM.** 1999. Preservación hipotérmica de epidídimos de mamíferos. *Scientia* 1:171-185.
- GONZÁLES-FIGUEROA, H. & VALDIVIA, M.** 1992. Modificaciones de la matriz acrosomal del espermatozoide de cobayo, en condiciones hipotérmicas. Res.V Cong.Iberoamer. Biol.Cel. Pp 114.
- GONZALES-FIGUEROA, H. & GONZALES-MOLFINO, HM.** 2001. Capacidad fértil del espermatozoide de mamífero *Scientia.* 3:99-111.
- GREEN, CE, & WATSON, PF.** 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.
- HARRISON, RA, ASHWORTH, PJ, & MILLER, NG.** 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev.* 45:378-391.
- LANGLAIS, J, & ROBERTS, KD.** 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam Res* 12:183-224.
- LECLERC, P, DE LAMIRANDE, E, & GAGNON, C.** 1996. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod.* 55:684-692.
- LIN, Y, & KAN, FW.** 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Biol Reprod.* 55:1133-1146.
- MAXWELL, WM, & JOHNSON, LA.** 1997. Chlor-tetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev.* 46:408-418.
- NOLAND, TD.** 1990. Regulation of acrosomal matrix dispersion in digitonin-permeabilized guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod.* 42: 252-259.
- MAZUR, P.** (1984) - Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
- OETTLÉ, EE.** 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* 12: 145-150.
- OLLERO, M, BESCÓS, O, CEBRIAN-PERÉZ, JA, & MUIÑO-BLANCO, T.** 1998. Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Therio* 49: 547-555.
- PARKS, JE, & GRAHAM, JK.** 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38: 209-222.
- SALAMON, S, & MAXWELL, WMC.** 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38: 1-36.
- VISCONTI, PE, BAILEY, JL, MOORE, GD, PAN, D, OLDS-CLARKE, P, & KOPF, GS.** 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa, I: correlation

between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-1137.

**VISCONTI, PE, MOORE., GD, BAILEY., JL, LECLERC., P, CONNORS., SA, PAN., D, OLDS-CLARKE., P, & KOPF., GS.** 1995. Capacitation of mouse spermatozoa, II: protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121:1139-1150.

**VREDENBURGH-WILBERG, WL, & PARRISH., JJ.** 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev.* 40:490-502.

**WATSON, PF, PLUMMER., JM, JONES., PS, &**

**BREDL., JC.** 1995. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 41:513-520.

**WATSON, P.F.** 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31:135-140.

**WATSON, P.F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.

**WHITE, IG.** 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.

**Tabla 1: Fecundación heteróloga de los espermatozoides de cuy mantenidos en preservación hipotérmica con ovocitos de hámster sin zona pelúcida.**

Días (h)	Nº ovocitos inseminados (Nº de experimentos)	Nº de ovocitos fecundados (%)	Promedio (rango) de dispersión de cromatina espermática/ovocito
0 (0)	76 (6)	76 (100)	4,3 (1-5)
1 (24)	45 (4)	45 (100)	5,4 (1-8)
3 (72)	22 (2)	22 (100)	4,9 (1-15)
6 (144)	88 (7)	81 (92)	5,0 (1-8)
11 (264)	76 (7)	56 (74)	3,0 (1-11)

**Figura 1.** Espermatozoides de cuy en preservación hipotérmica por 48 h, se observa la forma globular que adopta la membrana plasmática en la parte posterior de la cabeza del espermatozoide (8400 X).



**Figura 2** Espermatozoides de cuy de 148 y 336 horas respectivamente de preservación hipotérmica. En la figura de la izquierda, se observa la forma globular que adopta la membrana externa del acrosoma (8400 X). En la figura de la derecha, se observa la dispersión completa de la matriz acrosómica (22 600 X).

