

Artículo original:

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EQUINAS: EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN

Evaluation of the role of equine sperm membranes: effect of cryopreservation

D. Neild

*Cátedra de Teriogenología,
Instituto de Investigación y tecnología en
Reproducción Animal (INTRA),
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Buenos Aires, Argentina.*

*E-mail:
deborab.neild@gmail.com*

*Palabras Clave:
Equino, semen, criopreservación, membrana
espermática*

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides tienen muchos compartimentos funcionales diferentes y todos, o la mayor cantidad posible, deberían ser evaluados para poder intentar predecir el desempeño reproductivo de ese macho. La carga más importante del espermatozoide es su ADN, porque forma el genoma haploide complementario al del ovocito, y la unión de ambas gametas constituye el genoma diploide único del potrillo. Los defectos del ADN probablemente no sean totalmente compensables, a pesar que el ovocito puede llevar a cabo cierta reparación del mismo (Zini *et al.*, 2005) y por lo tanto se cree que probablemente influye en las altas tasas de mortalidad embrionaria temprana que se observan en esta especie. Por otro lado, las membranas espermáticas deben estar intactas y funcionales para asegurar la fertilización del ovocito *in vivo*.

Es por esta razón que en los últimos años el estudio tanto del ADN como de las membranas espermáticas han cobrado importancia en la evaluación seminal. Es esencial un estudio profundo de las membranas espermáticas para conocer más sobre la capacitación, reacción acrosomal, unión con la zona pellucida y con el oolema, todos eventos fundamentales para la fertilización.

EVALUACIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EN EL LABORATORIO DE ESPERMATOLOGÍA

En un comienzo, en el laboratorio espermatoológico la evaluación de las membranas se limitaba a las tinciones vitales de extendidos de semen, que indicaban la viabilidad espermática y la integridad de la membrana citoplasmática. Ejemplos de ellos son las tinciones tripán azul, eosina-nigrosina, eosina-azul de anilina y la tinción triple. Con el advenimiento de la microscopía de epifluorescencia, en la actualidad la mayoría de los laboratorios utilizan la combinación de dos o más fluorocromos para evaluar las diferentes membranas espermáticas. A esto se suma el uso de la citometría de flujo, que permite analizar miles de células de forma objetiva y rápida para más de un parámetro en forma simultánea. Se ha adaptado la prueba de endósmosis o hipoosmótica (HOS test) a la especie equina (Neild *et al.*, 1999) y relacionado con la fertilidad a campo (Neild *et al.*, 2000) observando una alta correlación con la movilidad progresiva y una muy significativa diferencia entre padrillos fértiles y subfértiles para esta prueba. Se observó además que la movilidad espermática era más sensible a los cambios de temperatura ambiental que la funcionalidad de membrana citoplasmática, indicando que posiblemente esta prueba sea más fehaciente a la hora de predecir como va a cumplir su rol ese eyaculado. Padrillos con menos del 40% de endósmosis podrían

considerarse como machos con fertilidad reducida y que necesitan una evaluación más exhaustiva de su eyaculado para intentar detectar el problema. En cuanto a la correlación con el número de servicios/preñez, es necesario aumentar el número de padrillos evaluados para corroborar si existe una relación entre estos dos parámetros.

EVALUACIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EN CONDICIONES DE CAPACITACIÓN

La pérdida de la asimetría lipídica o "scrambling" parece ser un componente importante de la capacitación en la mayoría de las especies estudiadas (Flesch y Gadella, 2000). Se ha descrito la composición lipídica de la membrana citoplasmática equina y como reaccionan algunos lípidos a la presencia de bicarbonato y albúmina sérica bovina en los medios de capacitación (Colenbrander *et al.*, 2002). El bicarbonato está prácticamente ausente de los fluidos que acompañan a los espermatozoides epididimarios maduros (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001; Asari *et al.*, 1996) mientras que en el oviducto son expuestos a concentraciones de alrededor de 25 mM (Rodríguez-Martínez, 2001). Esta variación induce cambios en los fosfolípidos de las membranas espermáticas en 10-20 minutos, evidenciadas por la tinción con merocyanina 540 (Rathi *et al.*, 2001; Colenbrander *et al.*, 2002) y la aparición de la

fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana externa de la bicapa lipídica, que puede ser evidenciada con la tinción con Anexina V (Brum *et al.*, 2008). Un cambio más lento (40 minutos de iniciado el proceso) es el observado con el antibiótico fluorescente Filipin. Este evidencia el movimiento del colesterol que va de estar distribuido homogéneamente en toda la cabeza espermática a concentrarse en la región apical (Colenbrander *et al.*, 2002). Se utiliza también la evaluación de la fosforilación en residuos tirosina para evidenciar la capacitación espermática (Pommer *et al.*, 2003).

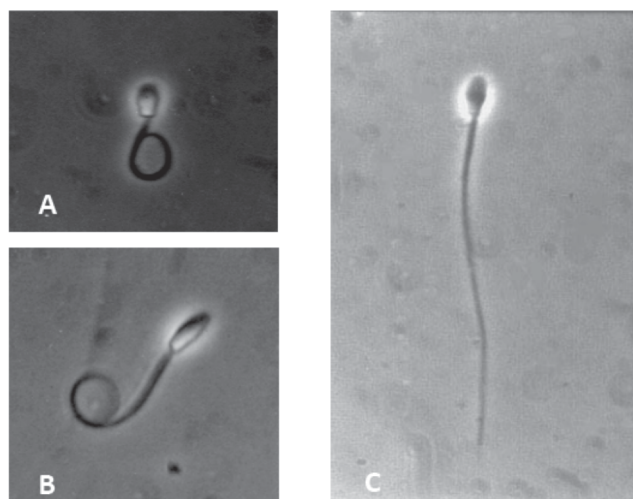


Figura 1. Evaluación de las membranas espermáticas equinas. Funcionalidad de membrana con la prueba hipoosmótica o HOS test. A y B: espermatozoides con endósmosis o “swelling” (membranas funcionales). C: espermatozoide sin endósmosis (membrana afuncional).

EVALUACIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS LUEGO DE LA CRIOPRESERVACIÓN

Hay indicios de que como consecuencia del proceso de congelamiento-descongelamiento los espermatozoides equinos sufren estos mismos cambios de capacitación, incluyendo la modificación de la estructura de la membrana plasmática, la fosforilación de proteínas en residuos tirosina y una baja producción de anión superóxido (Rathi *et al.*, 2001; Pommer *et al.*, 2003; Neild *et al.*, 2005a). Se ha observado también que las características fisiológicas de los espermatozoides descongelados son similares a las características de la capacitación avanzada (Watson, 1995), fenómeno conocido como “criocapitación” (Neild *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2006). Si los espermatozoides criopreservados comienzan la capacitación y reacción acrosomal antes de ser inseminados, probablemente esto resultaría en una disminución de su capacidad de interactuar con el tracto genital de la hembra y subsecuentemente penetrar la zona pellucida y fertilizar al ovocito (Petrunkina *et al.*, 2007) y además explicaría su menor supervivencia (Pommer *et al.*, 2003). Podría ocurrir también que los espermatozoides criopreservados simplemente sean más susceptibles a los inductores de la capacitación (Sieme *et al.*, 2008). Se ha observado diferentes grados de alteraciones de membrana (en cuanto a función y reactividad) en diferentes etapas de un protocolo de criopreservación y en función del padrillo (Neild *et al.*, 2003). También se estudió el efecto del congelamiento-

descongelamiento sobre la peroxidación lipídica utilizando un derivado fluorescente de los ácidos grasos, que se incorpora a la bicapa lipídica de las membranas (Neild *et al.*, 2005b). Se observó que los espermatozoides criopreservados tenían una mayor sensibilidad a la lipoperoxidación aún con niveles más bajos de estrés oxidativo, sufriendo más peroxidación que el semen fresco. La lipoperoxidación se observó principalmente en la pieza intermedia de los espermatozoides, coincidiendo con los trabajos de Baumber *et al.* (2000) quienes observaron que altos niveles de especies reactivas del oxígeno no afectaban la integridad de las membranas acrosomales en el equino.

Resulta necesario entonces realizar más estudios sobre la fisiología espermática para entender los mecanismos por los cuales la criopreservación altera la función espermática, siendo de particular importancia la caracterización de los mecanismos y dinámica de la regulación del volumen celular, la interacción espermatozoide-oviducto, la capacitación y la señalización celular.

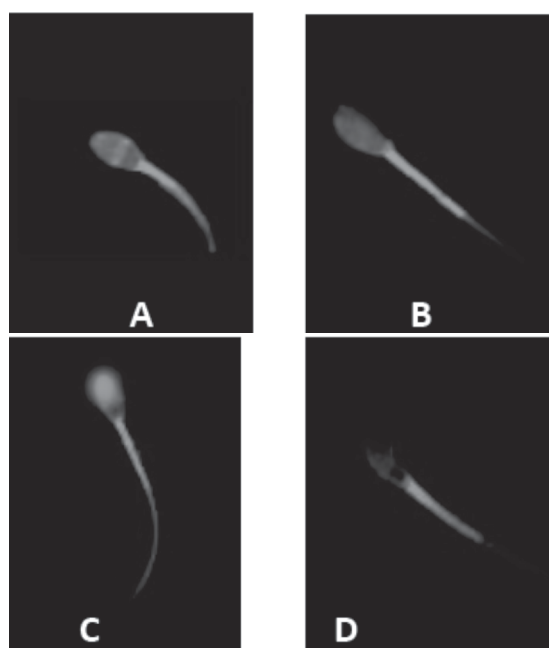


Figura 2. Evaluación de las membranas espermáticas equinas. Capacitación de membrana con la tinción con Clortetraciclina o CTC. A y B: espermatozoides nocapacitados; C: espermatozoide capacitado; D: espermatozoide reaccionado

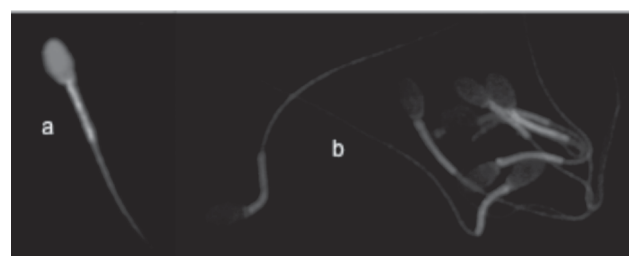


Figura 3. Evaluación de las membranas espermáticas equinas. Peroxidación de los lípidos de membrana evaluados con BODIPY C-11. a: espermatozoide sin peroxidación lipídica; b: espermatozoides peroxidados.

REFERENCIAS

1. Asari M, Sasaki K, Miura K, Ichihara N, Nishita T. 1996. Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 439-443.
2. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, 21(6): 895-902.3. Brum AM, Sabeur K, Ball BA. 2008. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69: 1041-1055.
4. Colenbrander B, Brouwers JFHM, Neild D, Stout TAE, da Silva P, Gadella BM. 2002. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, 58: 341-345.
5. Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta Rev.*, 1469: 197-235.
6. Neild DM, Chaves MG, Flores M, Mora N, Beconi MT, Agüero A. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51: 721-727.
7. Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, González E, Agüero A. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32:351-355.
8. Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59: 1693-1705.
9. Neild DM, Gadella BM, Agüero A, Stout TAE, Colenbrander B. 2005a. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 89: 47-56.
10. Neild DM, Brouwers JFHM, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. 2005b. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 72: 230-238.
11. Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 134: 3-17.
12. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol. Reprod.*, 68(4): 1208-1214.
13. Rathi R, colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* 65: 462-470.
14. Rodríguez-Martínez H, Tienthal P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod. Suppl.* 58: 129-145.
15. Sieme H, Harrison RA, Petrunkina AM. 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim. Reprod. Sci.*, 107(3-4): 276-92.
16. Thomas AD, Meyers SA, Ball BA. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 1531 - 1550
17. Watson PF. 1995. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.