

## ALTERACIONES EN ESPERMATOZOIDES CANINOS CRIOPRESERVADOS Y SU EFECTO EN LA FERTILIDAD

**Mónica De los Reyes S.**

*Unidad de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile*

*E-mail: mdlreyes@uchile.cl*

### Resumen

Considerando que la criopreservación de los espermatozoides es una herramienta básica en la aplicación de biotecnologías reproductivas, pero que sin embargo causa alteraciones en los espermatozoides, incluyendo una disminución significativa de su capacidad fecundante, se discute en este artículo daños en la funcionalidad espermática, asociadas a una menor capacidad fecundante en espermatozoides criopreservados de perro.

**Palabras claves:** *criopreservación, espermatozoide, caninos, fertilidad*

### Introducción

La utilización de la Inseminación Artificial y la criopreservación del semen en caninos abre diferentes perspectivas en relación a la transferencia de material genético entre diferentes regiones, aumentando la variabilidad genética y la mayor utilización de machos con mejores características. Además, la adecuada preservación del semen en la especie canina permiten poder aplicar estas técnicas a otras especies de cánidos silvestres, lo que adquiere mayor importancia en aquéllas que se encuentran en peligro de extinción.

El aumento que ha experimentado la utilización de semen criopreservado, hace necesaria la investigación de los efectos que genera el proceso de criopreservación sobre los espermatozoides, que se traducirían en el detrimento de su capacidad fecundante, factor crucial en términos de logro de preñez. En este contexto, cobran importancia los estudios que permitan determinar los daños en la función espermática causados por las bajas temperaturas y que puedan afectar los procesos involucrados en la interacción gamética y fecundación.

### Efecto de las Bajas temperaturas

El enfriamiento y la congelación a que se someten los espermatozoides para lograr preservarlos por períodos cortos o largos respectivamente, constituye una herramienta básica en la implementación de biotecnologías en reproducción, como también en ensayos experimentales en investigación. Sin embargo, la criopreservación causa alteraciones en las estructuras del espermatozoide, asociado a cambios funcionales (Medeiros *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005), que se traducirían en el detrimento de su capacidad fecundante. Los espermatozoides de perro presentan una gran diferencia que se observa en el tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides eyaculados, 268 horas (Petrukina *et al.*, 2004), versus los congelados-descongelados con 12 horas en el tracto genital de la hembra (Linde-Forsberg 1999), lo que influiría en los porcentajes de fertilidad al utilizar semen congelado. La evaluación de la interacción gamética en espermatozoides criopreservados caninos (De los Reyes *et al.*, 2006), ha demostrado que el daño producto del enfriamiento afecta severamente la funcionalidad espermática en relación a su capacidad de penetración a la zona pelúcida (Strom Holst *et al.*, 2000; De los Reyes *et al.*, 2009a, b).

En estudios de nuestro laboratorio, hemos podido determinar que la viabilidad de espermatozoides de perro expresada a través de la actividad mitocondrial evaluada con la sonda fluorescente Mitotracker como la integridad acrosomal evaluada según la accesibilidad del SBTI-conjugado con AlexaFluor 488 al acrosoma de espermatozoides vivos, que en los espermatozoides refrigerados hay una disminución significativa de la viabilidad e integridad de membrana con respecto a los espermatozoides frescos, observándose también un aumento en la ruptura acrosomal de los espermatozoides refrigerados, diferencia que se mantiene al ser incubados hasta 6 horas (Manosalva *et al.*, 2004).

La reducción de la fertilidad en el semen congelado es más drástica aun en relación al semen refrigerado y es atribuida en gran medida a alteración en la membrana y su función durante el enfriamiento (Parks y Graham, 1992). Aun no está totalmente claro la naturaleza del daño en la membrana celular del espermatozoide a bajas temperaturas, pero hay evidencias que

sugieren que esta alteración sería provocada por un reordenamiento de los lípidos de la membrana, necesarios para una adecuada función (Hammerstedt *et al.*, 1990; De los Reyes, 2004). El shock térmico se puede considerar como un estado extremo de un estrés celular continuo, el que perdura bajo los 0° C, teniendo un rango de temperatura de 5 a -15°C (Wastson, 2000). 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. Los espermatozoides caninos serían menos susceptibles en comparación a otras especies (Bouchard *et al.*, 1990; De los Reyes, 2004). El enfriamiento de los espermatozoides induciría cambios morfológicos en la membrana plasmática, tales como la separación lateral de la fase lipídica con las proteínas integrales, lo cual sería sólo parcialmente revertido después de la descongelación (Buhr *et al.*, 1994). La permeabilidad de las membranas aumenta después del enfriamiento lo que podría deberse a un efecto específico sobre los canales celulares. 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.

### **Criopreservación y capacitación espermática**

Estudios en espermatozoides congelados, han relacionado el efecto de someter a los espermatozoides a bajas temperaturas y el tiempo requerido en la capacitación, sugiriendo una diferente funcionalidad entre los espermatozoides frescos y aquellos que se han congelado (Watson, 2000; Fuller y Whittingham, 1997). Se ha sugerido que la criopreservación, por tanto, promovería modificaciones, que según diversos autores serían similares a la capacitación del espermatozoide. Esto podría estar dado por cambios a nivel de la membrana, especialmente en los canales de calcio, permitiendo un mayor flujo de calcio, estimulando el proceso de capacitación espermática en los espermatozoides congelados y descongelados. Este fenómeno produciría, según lo demostrado en especies como humanos (Critser *et al.*, 1987); carneros (Garde *et al.*, 1993); bovinos (Cormier *et al.*, 1997), ratón (Fuller y Whittingham, 1997) y recientemente lo estudiado en nuestro laboratorio en perros (De los Reyes *et al.*, 2009; Palomino y De los Reyes, 2009), un menor tiempo de capacitación y penetración espermática a través de la zona pelúcida, lo que podría explicar, en parte, la reducción en el tiempo de vida fértil de los espermatozoides criopreservados. El proceso de unión y penetración a la ZP es una característica de los espermatozoides viables (Strom-Holst *et al.* 2000). La criopreservación produce muerte de algunos espermatozoides y reduce la viabilidad de los que no murieron. Las diferencias en la unión y penetración entre semen fresco y criopreservado durante el co-cultivo con ovocitos de perra, indica que el tiempo de estos procesos es diferente entre estas poblaciones espermáticas, siendo más rápida o más temprana en aquellos criopreservados, no siendo capaces de retener la capacidad fecundante por más tiempo, lo que podría estar relacionado, entre otras alteraciones, a su estado acrosomal. De acuerdo a lo anterior, hemos planteado que los espermatozoides criopreservados de perro, no presentan los mismos cambios de la capacitación, más bien procederían en forma directa a la exocitosis acrosomal.

En verracos el patrón de fosforilación de la tirosina no sería el mismo en espermatozoides frescos y criopreservados (Watson, 2000). Según estudios en espermatozoides de potro, se sugeriría que aquellos que han sido criopreservados pueden ser más sensibles a estímulos que induzcan cambios asociados a la capacitación y reacción acrosómica (Pommer *et al.*, 2003).

Dentro de los eventos que ocurren durante la RA, que involucra la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide, estaría la activación y liberación gradual del contenido acrosomal, incluyendo en este proceso a la serina-proteasa acrosina, cuya presencia ha sido demostrada en los espermatozoides de diversos mamíferos.

Esta enzima es almacenada en su forma cimógena como pro-acrosina (Kim y Gerton, 2003). La pro-acrosina catalizaría su propia conversión a la forma activa durante la RA (Moreno y Barros, 2000). Se ha postulado a la acrosina como responsable de la unión secundaria del espermatozoide a la zona pelúcida (Urch y Patel, 1991; Howes *et al.*, 2001). Esta unión se lograría a través de un sitio de unión a poli-sulfatos que poseen el cimógeno. Se ha caracterizado este sitio, y mediante el uso de péptidos y anticuerpos específicos se ha logrado inhibir significativamente la penetración y fecundación en ratón y cerdo (Moreno y Barros, 2000).

En nuestros estudios hemos podido determinar mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales anti proacrosina/acrosina humana (C5F11), que tienen una reacción cruzada con espermatozoides de perro (Cortés *et al.*, 2006), como de otras especies (Moreno *et al.*, 2002), que espermatozoides frescos y congelados de perro presentan la misma marca fluorescente en la región acrosomal, sin embargo, la proporción de espermatozoides congelados inmunomarcados, es menor que en aquellos frescos, lo que podría indicar una pérdida prematura de acrosina en estos espermatozoides, probablemente por alteraciones durante el proceso de congelación y descongelación (Cortés *et al.*, 2006).

Utilizando la prueba fluorescente SBTI-Alexa488, que se une a proteasas activas (en este caso acrosina), hemos podido determinar que los espermatozoides frescos no capacitados muestran un menor porcentaje de marca brillante en la región acrosomal comparados con los espermatozoides descongelados, lo que podría sugerir en los espermatozoides congelados una posible inducción a la activación de la proacrosina (Cortés *et al.*, 2006).

A través del estudio de la liberación del sistema proacrosina/acrosina durante la capacitación espermática y reacción acrosómica, mediante Western-Blot (De los Reyes *et al.*, 2009c) y técnicas de inmunocitoquímica (De los Reyes *et al.*, 2011), hemos evaluado en los espermatozoides caninos que han sido criopreservados (refrigerados o congelados) cambios en los patrones de liberación de la acrosina en comparación con aquellos frescos, demostrándose una liberación temprana y no sostenida en el tiempo, lo que explicaría mejor las variaciones en la capacidad fecundante entre espermatozoides frescos y congelados.

**Agradecimientos:** FONDECYT 1060602 y 1110265

#### Revisión Bibliográfica

- Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D. Youngquist, R. S. 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34:147-157.
- Buhr, M.M., Curtis, E. F., Kakuda, N. S. 1994. Composition and behavior of head membrane lipid of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31: 224-238.
- Cheng, F.P., Wu, J. T., Tsai, P.S., Chang, C.L., Lee, W.M., Fazeli, A. 2005. Effects of cryonjury on progesterone receptor of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology* 64: 844-854.
- Cormier, N., Sirard, M.A., Bailey, J.L. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18: 461-468.
- Cortés, C., Codelia, V., Manosalva, I., de Lange, J., Moreno, R.D., De los Reyes, M. 2006. Proacrosin/ acrosin quantification as an indication of acrosome integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 165-175.
- Critser, J.K., Arneson, B.W., Aaker, D.V., Huse-Benda, A.R., Ball, G.D. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa. II: Post thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil. Steril.* 47:980-984.
- De Los Reyes, M., Barros, C. 2000. Immunolocalization of Proacrosin/Acrosin in Bovines and Bovine Sperm Penetration through the Zona Pellucida. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 215-228.
- De los Reyes, M. 2004. Congelación de semen canino. En: Temas de Reproducción de Caninos y Felinos por Autores Latinoamericanos. Gobello C. (ed.) Buenos Aires-Argentina. Cap 2. pp 15-24.
- De los Reyes M., Carrion R., Barros C. 2006. In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 66: 1682-1684.
- De los Reyes, M., de Lange, J., Anguita, C., Palomino, J., Barros, C. 2009a. 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.* 110: 37 – 45.
- Palomino, J., De los Reyes, M. 2009b. A scanning electron microscopy study of frozen/thawed dog sperm during in vitro gamete interaction. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 278–283.
- De los Reyes, M., Medina, G., Palomino, J. 2009c. Western blot analysis of preacrosin/acrosin in frozen dog sperm during in vitro capacitation. *Reprod. Dom. Anim.* 44 (Suppl. 2): 350-353.
- De los Reyes, M., Palomino, J., Martínez, V., Aretio, C., Gutiérrez, M. 2011. Acrosin evaluation during in vitro capacitation of fresh and frozen-thawed dog sperm. *Biol Res.*
- Fuller, S.J., Whittingham, D.G. 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod.* 46: 314-324.
- Garde, J., Gutierrez, A., Artiga, C.G., Vázquez, I. 1993. Influence of freezing process on in vitro capacitation of ram semen. *Theriogenology* 39:225.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
- Howes, E., Pascall, J.C., Engel, W., Jones, R. 2001. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.* 114: 4127-4136.
- Kim, K.S., Gerton, G.L. 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev. Biol.* 264:141-152.
- Linde-Forsberg, C. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen –thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52: 11- 23.
- Manosalva, I., Cortes, C.J., Moreno, R., Barros, C., De los Reyes, M. 2004. Nuevas Sondas en la Evaluación de espermatozoides caninos frescos y refrigerados. *III Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile*, Temuco.
- Medeiros, C. M., Forell, O. F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57: 327-344.
- Moreno, R.D., Barros, C. 2000. A basic 18 amino acids domain is involved in the polysulfate binding domain and activation of boar proacrosin/acrosin system. *Biol. Reprod.* 62: 1536-1542.
- Moreno, R.D., Bustamante, E., Schatten, G., Barros, C. 2002. Inhibition of mouse in vitro fertilization by an antibody against a unique 18-amino acid domain in the polysulfate-binding domain of proacrosin/acrosin. *Fertil. Steril.* 77:812-817.
- Parks, J.E., Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-219.
- Petrunkina, A.M., Simon, K., Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E. 2004. Kinetic of protein tyrosine phosphorylation in sperm selected by binding to homologous and heterologous oviductal explants: how specific regulation by the oviduct?. *Theriogenology* 61: 1617-1634.
- Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, A. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitation conditions. *Biol. Reprod.* 68:1208-1214.
- Ström Holst, B., Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H., Linde-Forsberg, C. 2000. Evaluation of chilled and frozen- thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119: 201-206.
- Urch, U.A., Patel, H. 1991. The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida and with polysulfated polysaccharides. *Development* 111: 1165-1172.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:481-492.