

## ***Daños Producidos en el Espermatozoide durante la congelación.***

Siendo el agua la fuente esencial para las funciones vitales de cualquier organismo, no es raro pensar que la falta o solidificación de esta cause incompatibilidad para la vida. Sin embargo, la permanencia de una célula en estado de congelación se contrapone a lo anteriormente dicho, ya que con el método de congelamiento se puede preservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que el metabolismo se reduzca “absolutamente”, sin que pierda su potencia vital. A temperaturas de -196 °C no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, aun mas, no hay evidencia de que puedan haber cambios de índole genético. No obstante, dicha estabilidad solamente puede ser mantenida a temperaturas por debajo de los -130° C, ya que, a temperaturas mayores, puede haber agua no congelada intracelularmente la cual permite funciones metabólicas, causando degradación de la célula (Palacios, 1994).

Al pensar en criopreservar semen se debe tener claro que el objetivo es mantener los siguientes requerimientos y propiedades de un espermatozoide para poder fertilizar:

- Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.
- Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización.
- Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito.
- Capacidad de movimientos progresivos (Palacios, 1994).

### *Deshidratación celular y shock térmico.*

“Shock térmico” es el término que describe la respuesta de estrés con que responde el espermatozoide a una disminución de temperatura. El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con que esta ocurra (Morel, 1999). Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad optima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Stornelli *et al*, 2005).

Esta comprobado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero no es sino cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un shock térmico. Esto se puede detectar al microscopio por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de motilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Palacios, 1994).

En términos generales, los daños que sufre el espermatozoide durante los procesos de criopreservación son principalmente físico-químicos; debido al estrés osmótico que sufre la célula al deshidratarse, la distorsión de la membrana y a la formación de cristales de hielo (Palacios, 1994). Los procesos bajo los que ocurren estos 3 fenómenos se detallan a continuación.

En un espermatozoide sin protección se formará hielo intra y extracelular si se enfría a temperaturas bajo cero. El hielo crece sin control formando grandes cristales de hielo intracelular que acaban destruyendo la célula. El daño se produce por dos mecanismos: por la acción de “arado” que ejerce el hielo en crecimiento y por el daño osmótico que causa la acumulación de sales y otros solutos que se originan al irse fijando las moléculas de agua a los núcleos de hielo (Ortega, 2008).

Estos cristales de agua pura se comienzan a formar al bajar de -5°C, y por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos quedan separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aun no se congela (agua pre-congelada). El termino pre-congelamiento define al momento umbral antes de que una célula o su ambiente sea congelado (Palacios, 1994). Este fenómeno lleva a un aumento en la presión osmótica, y al ser el agua dentro del espermatozoide más lenta en formar cristales que el agua fuera de este (Morel, 1999), ocurre una salida de agua al medio extracelular por

gradiente osmótico, a través de la membrana plasmática. Como resultado de esto el espermatozoide se deshidrata.

La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada (Stornelli *et al*, 2005). Por tanto las condiciones hipertónicas a las que sometemos al espermatozoide durante la congelación originan una pérdida osmótica de agua que dependerá de la curva de congelación.

Por otro lado, el proceso de congelación da lugar también a cambios de fase en la membrana celular y pueden alterar receptores de membrana y/u otras proteínas interfiriendo en su capacidad de reconocimiento, de transporte de agua e iones a través de los canales o poros de membrana, etc. (Ortega, 2008).

Cuando los espermatozoides están alterados, los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  que entran a las células espermáticas son retirados por medio de transporte activo. A  $5^\circ\text{C}$  la permeabilidad al  $\text{Ca}^{++}$  crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de  $\text{Ca}^{++}$ . así, el  $\text{Ca}^{++}$  se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Palma, 2001). Este daño se manifiesta en una disminución de la motilidad espermática, y posiblemente afectando la morfología del acrosoma (Morel, 1999). Se postula que el acrosoma sufre más con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperada de la reducción de la motilidad (Palma, 2001).

#### *Daño Oxidativo.*

El espermatozoide, como toda célula, aprovecha sus nutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) a través de procesos oxidativos, de los cuales obtiene energía para mantener su viabilidad y funciones. El más importante es el que se lleva a cabo en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, principal fuente de ATP y también de radicales libres (ROS) (Villa, 2009).

Los ROS son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas; pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Membrillo *et al*, 2003). Los espermatozoides del equino generan ROS en forma natural, pero esta generación aumenta con la congelación y descongelación. La criopreservación somete al espermatozoide a un estrés oxidante y posible daño del ADN (Membrillo *et al*, 2003).

El aumento de los ROS puede dañar a los espermatozoides y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante, que causa peroxidación de los lípidos de la membrana, modificación de su fluidez y alteración de su permeabilidad, lo que puede conducir a la muerte celular. La membrana de los espermatozoides contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le brinda una alta susceptibilidad a los problemas de daño oxidativo (oxidación o peroxidación), alterando la posibilidad de fecundación (Villa, 2009). Además, la generación de ROS por espermatozoides dañados tiene un importante impacto sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides en almacenamiento (Membrillo *et al*, 2003).

Aunque los espermatozoides son protegidos por sistemas de defensa antioxidante, estos pueden ser rebasados bajo situaciones en las que las ROS son generadas en exceso, lo que conduce al estrés oxidativo (Membrillo *et al*, 2003).

Por otro lado, mientras la producción incontrolada de ROS tiene un efecto negativo en la funcionalidad espermática, la producción controlada de ROS juega un papel fisiológico importante en ciertos eventos tales como; capacitación espermática, reacción acrosomal, hiperactivación y la fusión espermatozoide- ovocito (Morte *et al*, 2007).

*...por Paula Innocenti.*