

**CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES: CITOESQUELETO, BALSAS
LIPÍDICAS Y DE LA INTEGRIDAD NUCLEOPROTEICA**

REVISIÓN DE LITERATURA

STEFFANY TATIANA MUÑOZ SARMIENTO

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA

SEDE POPAYÁN, COLOMBIA

2020

**CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES: CITOESQUELETO, BALSAS
LIPÍDICAS Y DE LA INTEGRIDAD NUCLEOPROTEICA**

REVISIÓN DE LITERATURA



STEFFANY TATIANA MUÑOZ SARMIENTO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:

Médico Veterinario

Director

PhD Julián Alonso Valencia Giraldo

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA

SEDE POPAYÁN, COLOMBIA

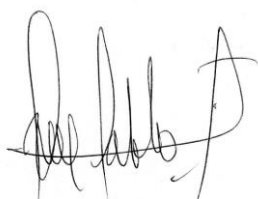
2020

**CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES: CITOESQUELETO, BALSAS
LIPÍDICAS Y DE LA INTEGRIDAD NUCLEOPROTEICA**

REVISIÓN DE LITERATURA

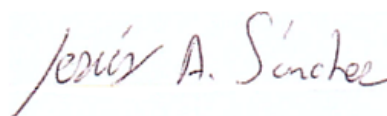
STEFFANY TATIANA MUÑOZ SARMIENTO

TRABAJO DE GRADO APROBADO



JUAN PABLO ANDRADE, Esp.

Jurado



JESÚS SÁNCHEZ VIAFARA, PhD

Jurado

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA

SEDE POPAYÁN, COLOMBIA

2020

“El científico encuentra su recompensa en lo que Henri Poincare llama el placer de la comprensión, y no en las posibilidades de aplicación que cualquier descubrimiento pueda conllevar”. Albert Einstein

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de grado es realizar un abordaje mediante revisión de literatura de los principales daños en el citoesqueleto, las balsas lipídicas de la membrana plasmática y el núcleo del espermatozoide ocasionados por los procesos de criopreservación. Para este efecto, se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos: Pub Med, Elsevier, CAB abstract y Google Sscholar, con palabras clave previamente definidas. Se obtuvieron 43 artículos, los cuales se analizaron y se discutieron en la revisión de bibliografía. La alteración en la estructura citoesquelética de los espermatozoides causada por la criopreservación, está asociada con el fenómeno de criocapacitación o capacitación prematura de los mismos, expresado en aumento de la polimerización de F-actina. Las balsas lipídicas son microdominios presentes en la membrana plasmática y juegan un papel importante en la regulación de la transmisión de señales en los espermatozoides. Se ha encontrado que la criopreservación produce agregación irreversible de proteínas, algunas de estas asociadas a balsas lipídicas y se hipotetiza que hay afección de las balsas evitando su desplazamiento hacia la zona apical del espermatozoide, lo que resulta en reducción de la capacidad fecundante. La criopreservación afecta el grado de condensación de la cromatina, produce fragmentación del ADN y, alteración en genes de importancia. En conclusión, esta revisión aporta información importante que permite hacer un énfasis alterno al daño de la membrana plasmática revisada por otros autores, proporcionando evidencia de los daños en el citoesqueleto, las balsas lipídicas y el núcleo del espermatozoide ocasionados por la criopreservación.

Palabras clave: criopreservación, citoesqueleto, balsas lipídicas, integridad nucleoproteica

ABSTRACT

This work aimed to carry out an approach through literature review of the main damages in the cytoskeleton, plasma membrane lipid rafts and the sperm nucleus caused by cryopreservation procedures. For this purpose, a search was carried out in different databases: Pub Med, Elsevier, CAB abstract and Google Scholar, with previously defined keywords. forty-three articles were obtained, which were analyzed and discussed in the literature review. The alteration in the cytoskeletal structure of spermatozoa caused by cryopreservation procedures is associated with the cryocapacitation phenomenon or “premature capacitation” of the same, expressed in increased F-actin polymerization. Lipid rafts are microdomains present in the plasma membrane and play an important role in the regulation of signal transmission in sperm. It has been found that cryopreservation produces irreversible aggregation of proteins, some of these associated with lipid rafts and it is hypothesized that the lipid rafts are affected preventing their movement towards the sperm apical zone, which results in a reduction in the fertilizing ability. Cryopreservation affects the degree of chromatin condensation, produces DNA fragmentation and changes in important genes. In conclusion, this review provides important information that allows an alternative emphasis to be made to the damage of the plasma membrane reviewed by other authors, providing evidence of the damage to the cytoskeleton, lipid rafts and the sperm nucleus caused by cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, cytoskeleton, lipid rafts, nucleoprotein integrity

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GENERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 MATERIALES	14
5.2 MÉTODO	15
6. RESULTADOS	17
6.1 CAPÍTULO 1: CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y CRIOINJURIA	17
6.2 CAPÍTULO 2: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y EL DAÑO EN EL CITOESQUELETO	20
6.3 CAPÍTULO 3: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y LA ALTERACIÓN EN LAS BALSAS LIPÍDICAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	22
6.4 CAPÍTULO 4: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y LA ALTERACIÓN EN EL NÚCLEO	24
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides se puede definir como uno de los métodos más eficaces para la conservación a largo plazo y la creación de bancos genéticos potencializando la eficiencia de la reproducción animal (Yeste, 2016). El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares que dañan la membrana del espermatozoide durante la descongelación (Hernández et al., 2007). En consecuencia, los procedimientos de criopreservación se orientan a minimizar los daños celulares que se producen (De Leeuw et al., 1990; Yeste, 2016). Sin embargo, la mayoría de publicaciones que se han realizado son daños en la membrana y actualmente no se ha hecho un abordaje sobre los daños en el citoesqueleto, ni tampoco en las balsas lipídicas y en el núcleo (Leahy & Gadella, 2011).

Se encuentra mínimamente revisiones de los efectos que produce la congelación sobre el citoesqueleto, balsas lipídicas y el núcleo; hay algunos indicios de que esos daños pueden afectar la fertilidad ya que el citoesqueleto es necesario durante la capacitación espermática, al igual que las balsas lipídicas tienen que desplazarse hacia la cabeza del espermatozoide para que ocurra la fecundación y que el núcleo debe estar intacto para que luego de que el espermatozoide fecunde, el ADN esté en buenas condiciones y para que no se afecte luego el desarrollo del embrión (Valencia et al., 2019).

El estrés osmótico también puede afectar la teca perinuclear que por su ubicación alrededor del núcleo, mantiene la arquitectura de la cabeza del espermatozoide y al alterarse lleva a mayor susceptibilidad de descondensación de la cromatina (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

De acuerdo a lo planteado anteriormente, el objetivo de este trabajo de grado es realizar un abordaje mediante revisión de literatura de los principales daños en el citoesqueleto, las balsas lipídicas de la membrana plasmática y el núcleo del espermatozoide ocasionados por los procesos de criopreservación.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los métodos más eficientes para preservar células espermáticas por un largo periodo de tiempo, es la criopreservación, donde células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas (Yeste, 2016). Cualquier avance que se logre en el mejoramiento de este método es fundamental para conservar material genético de alto valor, especialmente en animales que son muy eficientes a la hora de producir o en vía de extinción, con fines de recuperación de fauna silvestre y construcción de bancos de germoplasma (Hernández et al., 2007). Sin embargo, la mejora de estos esquemas sigue siendo la investigación actual, y la parte que debe entenderse es el daño que se produce en la membrana lipídica, como la descomposición de los fosfolípidos (De Leeuw et al., 1990).

Hay poca investigación sobre el citoesqueleto del espermatozoide durante la congelación. Se necesita más información y enfoque en esta investigación, es decir, como la estructura del citoesqueleto se relaciona con la regulación del volumen celular, esto es muy importante porque cuando el espermatozoide se congela, experimentará diferentes cambios osmóticos, que son cambios en la concentración de solutos; los obligan a activar los sistemas metabólicos que poseen los espermatozoides, que son sistemas reguladores de volumen, y aún se desconoce cómo interviene el citoesqueleto (Kopeika et al., 2015). Adicionalmente, no está claro si los cambios en el citoesqueleto durante el proceso de congelación están asociados con la agregación irreversible de las balsas lipídicas y la ausencia de la translocación de esta, hacia la zona apical del espermatozoide (Leahy & Gadella, 2011; Yeste, 2016).

Finalmente, el papel del citoesqueleto y la estabilidad de las proteínas nucleares aún no está claro, lo cual es importante para mantener la preservación del ADN después del proceso de congelación (Kopeika et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar un abordaje mediante revisión de literatura de los principales daños en el citoesqueleto, las balsas lipídicas de la membrana plasmática y el núcleo del espermatozoide ocasionados por los procesos de criopreservación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los diferentes daños que pueden ocurrir en el proceso de criopreservación y los beneficios que se pueden obtener.
- Evaluar el papel que tienen las balsas lipídicas de la membrana del espermatozoide y sus afecciones principales por causa del shock por frío y la crioinjuria.
- Determinar los diferentes cambios que se producen a nivel del núcleo del espermatozoide como consecuencia de los procedimientos de criopreservación.

4. JUSTIFICACIÓN

La investigación actual se centrará en el manejo de la criopreservación de los espermatozoides, ya que se desconocen diferentes fenómenos ocurridos en la célula durante la congelación, especialmente el daño a la membrana lipídica, agregación y pérdida de la integridad de las balsas lipídicas y el papel del citoesqueleto (Leahy & Gadella, 2011; Yeste, 2016). De acuerdo a lo anterior, un abordaje de revisión en el tema en cuestión abrirá caminos de discusión científica y de solución del problema mediante posibles biotecnologías como la aplicación de ciclodextrinas cargadas con colesterol para proteger la membrana, cambios en las curvas de congelación, mayor estudio del citoesqueleto y sus daños en la congelación y aplicación de antioxidantes al semen que se congelará (De Leeuw et al., 1990; Alberts et al., 2002; Hernández et al., 2007; Kopeika et al., 2015).

La información científica obtenida y sus caminos de solución mejorará a la postre la calidad de los espermatozoides al descongelarlos ya sea que se apliquen modificaciones antes, durante o después de la criopreservación, y la mejora de los espermatozoides y su calidad llevarán a mayor fertilidad de este material y a su uso en programas de mejoramiento genético en especies de interés zootécnico, transporte internacional y mayor disposición de material de alto valor genético como consecuencia, y en programas de conservación de razas criollas, y de especies en vía de extinción mediante la creación de bancos de germoplasma, mejorando así la rentabilidad y calidad de vida de ganaderos y criadores de recursos genéticos autóctonos (Bailey et al., 2008).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

- Artículos de Revistas científicas indexadas en Scopus o SCImago Journal Rank
- Bases de datos científicas:

Se utilizaron tres bases de datos científicas:

I) La base de la biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (National library of Medicine) que contiene los artículos científicos de MEDLINE especializada en ciencias de la salud, con más de 19 millones de referencias bibliográficas y más de 30 millones de citas



II) Elsevier que es la mayor editorial de libros de medicina y literatura científica del mundo.



III) CAB Abstracts es el principal servicio de información bibliográfica en inglés que brinda acceso a la literatura mundial de ciencias de la vida aplicadas. Viene con CABI Full Text, que brinda a los usuarios acceso automático a más de 495,000 artículos de revistas.



IV) Google Académico es un buscador de Google enfocado y especializado en la búsqueda de contenido y bibliografía científico-académica.



5.2 MÉTODO

Se efectuó una búsqueda sistemática y objetiva en las bases de datos mencionadas utilizando los siguientes términos: (mammalian OR mammal OR boar OR bull OR Rabbit OR goat OR Monkey OR horse) AND (sperm OR spermatozoa) AND (Lipid raft OR núcleo OR nucleoprotein OR DNA OR Cytoskeleton) AND (cryopreservation OR preservation OR cryoinjuria OR cryopreservation procedures).

En la presente revisión no se incluyeron tesis de grado ni resúmenes o suplementos de congresos. Los manuscritos arrojados fueron seleccionados por el título, para luego hacer un segundo filtro mediante la información suministrada en el abstract. Los artículos finalmente seleccionados fueron

subidos a Mendeley es una aplicación web y de escritorio desarrollada por Elsevier que permite gestionar y compartir referencias bibliográficas y documentos de investigación, encontrar nuevas referencias y documentos, colaborar en línea y realizar la citación de los artículos.

6. RESULTADOS

REVISIÓN DE LITERATURA

Después del proceso de búsqueda y selección, la presente revisión de literatura se realizó con 43 artículos científicos de revistas internacionales anexadas.

6.1 CAPÍTULO 1: CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y CRIOINJURIA

La criopreservación de espermatozoides se puede definir como uno de los métodos más eficaces para la conservación a largo plazo y la creación de bancos genéticos potencializando la eficiencia de la reproducción animal (Yeste, 2016). De otro lado, esta técnica permite minimizar los efectos de un repentino brote de enfermedad contagiosa o desastre natural y reduce los riesgos de transmisión de enfermedades sexuales. (McIntosh et al., 2006). Adicionalmente, es indispensable para un buen programa de inseminación artificial, ya que la manipulación de espermatozoides frescos, otorga una viabilidad corta del material (Bailey et al., 2008)

Aunque las ventajas de criopreservar espermatozoides son indiscutibles, los procedimientos llevados a cabo en la implementación de esta tecnología afectan considerablemente la función y supervivencia de los espermatozoides, disminuyendo el rendimiento reproductivo (Yeste, 2016). A este respecto, el tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares que dañan la membrana del espermatozoide durante la descongelación (Hernández et al., 2007). Estos efectos tienen implicaciones considerables debido a que la

integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son esenciales en el proceso de fertilización del ovocito (Valencia et al., 2019)

Durante el proceso de enfriamiento y congelación, el espermatozoide está sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico. Dichos cambios ocurren al alcanzar temperaturas entre 5 y 15°C, en las cuales el agua en fase líquida pasa a sólida en forma de cristales, con la aparición espontánea del primer núcleo de hielo o nucleación. Sin embargo, es conocido que realizar este proceso con una curva de congelación lenta permite mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, incluidos: la formación de cristales de hielo, el daño tóxico y osmótico, evitando alteraciones de las organelas intracelulares y del citoesqueleto (Mazur, 1990).

Por otra parte, la membrana plasmática es la estructura que delimita a la célula, inicialmente conceptualizada como una barrera inerte, divisoria del interior y exterior celular, en la actualidad se le reconoce como un elemento dinámico y fundamental en el mantenimiento de la integridad de la célula (Leahy & Gadella, 2011). Su plétora de componentes lipídicos y proteicos propicia su participación en muy diversos e importantes procesos, por ejemplo: transporte y permeabilidad selectiva de sustancias e iones, excitabilidad, movilidad, diferenciación, exocitosis reconocimiento intercelular y transducción de señales extracelulares (Yeste, 2016).

El desafío más importante de la criopreservación del semen es la sensibilidad intrínseca de los espermatozoides a los protocolos de enfriamiento y congelación, que cambian drásticamente la organización lipídica de la membrana, propician la pérdida, desnaturalización y desplazamiento de proteínas de membrana, generan daño de la membrana mitocondrial y reducen la motilidad, la viabilidad y la integridad del acrosoma (reacción acrosómica prematura) (Schiller et al., 2000; Thuwanut et al., 2008), lo que provoca una disminución de la calidad y capacidad fecundante (Cormier & Bailey, 2003). En consecuencia los procedimientos de criopreservación se orientan a

minimizar los daños celulares que se producen, tanto en la congelación, como en la descongelación
(De Leeuw et al., 1990; Yeste, 2016).

6.2 CAPÍTULO 2: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y EL DAÑO EN EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es una estructura tridimensional que forma parte importante en todas las células eucariotas, entre otras cosas proporciona un avanzado nivel de organización intracelular. Está compuesto de una vasta red de filamentos proteicos que actúan de manera dinámica y determinan la forma y la organización de organelos dentro del citoplasma (Alberts et al., 2002).

En relación con los daños en el citoesqueleto del espermatozoide, los procesos de congelación-descongelación producen desestructuración de los microtúbulos que conforman el flagelo del espermatozoide, determinadas por el daño osmótico que se produce principalmente durante la descongelación. (Alberts et al., 2002). De otro lado, el estrés osmótico también determina variaciones morfométricas de la cabeza del espermatozoide, que puede estar relacionado a cambios en el citoesqueleto por polimerización de la F- actina (Breitbart & Finkelstein, 2018). Al respecto, se ha encontrado que el enfriamiento de los espermatozoides causa hinchazón acrosómica, mientras que la criopreservación induce la pérdida del contenido acrosómico (Jones & Stewart, 1979; Kumar et al., 2013)

Además de la alteración en la estructura citoesquelética de los espermatozoides causada por la criopreservación, es bien conocido un fenómeno de capacitación prematura de los mismos durante el proceso de enfriamiento que involucra alteraciones en la membrana plasmática. A este respecto, se ha encontrado que durante los procedimientos de criopreservación ocurren cambios en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y aumento de la F-actina por su polimerización, los cuales son similares a la capacitación fisiológica, pero que pueden llevar al fracaso de la fertilización (Naresh, 2016). El aumento de F-actina durante la capacitación de los

espermatozoides depende de la activación de proteínas como la PLD y CaMK-II, y la inhibición de proteínas como la gelsolina y la cofilina, llevando a la elongación de los filamentos (Breitbart & Finkelstein, 2018). Añadido a esto, la actina y la α -tubulina son las principales proteínas del citoesqueleto responsables de la regulación del volumen celular (Pedersen et al., 2001)

La actina es un citoesqueleto bien conocido como proteína, se describió que tiene como función adicional ser mensajero secundario en la transmisión de señales (Leahy & Gadella, 2011). La polimerización de actina es un proceso en el que unidades de actina globular (G-actina) se conectan entre sí para crear actina filamentosa (F-actina) (Pollard et al., 2000).

En el proceso de polimerización intervienen diferentes proteínas que regulan el montaje y desmontaje de F-actina, así como su organización en una red compleja, cuyo objetivo es la participación en diferentes funciones celulares (Pollard & Borisy, 2003). Dentro de estas funciones se puede resaltar que la motilidad de los espermatozoides y su hiperactivación están mediadas por la polimerización de la actina dependiente fosfolipasa D. Adicionalmente, se ha encontrado que la reducción de la síntesis del fosfatidilinositol, el cual es claramente asociado con la reacción acrosómica, inhibe la polimerización de la actina (Itach et al., 2012).

Se considera que antes de la fertilización, el espermatozoide se capacita en el tracto reproductivo femenino, la fosforilación de proteína tirosina y polimerización de actina son los dos procedimientos importantes que ocurren durante la capacitación de espermatozoides de mamíferos. La polimerización de la actina se inicia en la región de la cola y progresa hacia la región durante la capacitación de los espermatozoides, teniendo en cuenta que la fosforilación de tirosina regula la polimerización de actina (Breitbart & Finkelstein, 2018).

6.3 CAPÍTULO 3: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y LA ALTERACIÓN EN LAS BALSAS LIPÍDICAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las balsas lipídicas son microdominios presentes en la membrana plasmática ordenados por la alta concentración de colesterol y esfingolípidos presentes en ellos (Brown & London, 1998). Estas estructuras juegan un papel importante en la regulación de la transmisión de señales en la mayoría de los tipos de células, incluidos los espermatozoides (Gavella et al., 2012; Munro, 2003), formando centros de organización que afectan la distribución de proteínas de membrana, y que permiten la activación de receptores y de cascadas de señalización molecular (Cross, 2004). Cuando ocurre la activación de un receptor dentro de una de balsa lipídica, el complejo de señalización molecular o la cascada de transducción también son modulados por enzimas como las fosfatasa de membrana que no son componentes de la balsa como tal y que tienen efecto en el proceso de señalización (Schmitz & Grandl, 2008). Además, las balsas lipídicas son también implicadas en la adhesión celular (Khalil et al., 2006)

La flotilina y la caveolina son dos tipos de proteínas importantes asociadas con las balsas lipídicas y tienen la capacidad de reclutar moléculas de señalización, jugando así un papel importante en la transducción de señales (Allen et al., 2007; Possidonio et al., 2014). De otro lado se ha demostrado que la flotilina desempeña un papel importante en la regulación de colesterol en la membrana plasmática (Otto & Nichols, 2011), y tiene funciones muy importantes en los procesos de formación de caveolas en la membrana plasmática (Babuke & Tikkanen, 2007), adhesión celular, endocitosis, fagocitosis y señalización (Bickel et al., 1997). Las caveolas son un tipo especial de balsas lipídicas que son ricas en colesterol y en esfingolípidos (Fielding & Fielding, 2000) que

desempeñan un papel importante en diferentes funciones fisiológicas como el transporte de colesterol y la transducción de señales (Sousa et al., 2006).

En el espermatozoide, las balsas lipídicas desempeñan un rol especialmente en los procesos de capacitación, reacción acrosómica e interacción con el ovocito (Gadella et al., 2008). Éstas, después de la maduración del espermatozoide en el epidídimo están distribuidas en toda la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide, y al parecer, durante el proceso de capacitación, deben ser redistribuidas hacia la región apical para facilitar la reacción acrosómica y la unión a la zona pelúcida del ovocito (van Gestel et al., 2005). En este sentido, se ha encontrado que, durante la reacción acrosómica, la flotilina-2 presenta una redistribución en el esperma de ratón, reafirmando el rol de las balsas lipídicas en la interacción espermatozoide-membrana del óvulo (Miranda et al., 2009).

Se ha encontrado evidencia que durante el proceso de criopreservación puede haber alteración de las balsas lipídicas de la membrana, y pérdida de la función de las proteínas por agregación irreversible (Leahy & Gadella, 2011; Yeste, 2016), como consecuencia de la redistribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática durante la congelación (De Leeuw et al., 1990). Estos eventos mencionados llevan a que las balsas no puedan desplazarse hacia la región apical de la cabeza del espermatozoide, alterando el proceso normal de reacción acrosómica y unión al ovocito (Leahy & Gadella, 2011), lo que resulta en la reducción del potencial de fertilización de los espermatozoides congelados-descongelados (Chen et al., 2014; Cheng et al., 2015).

6.4 CAPÍTULO 4: PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y LA ALTERACIÓN EN EL NÚCLEO

La cromatina es la interacción entre el ADN y las nucleoproteínas, las cuales son principalmente protaminas (85%) 1 y 2 que son específicas del espermatozoide, y entre un 2 a 15% de histonas (Ward, 2009). Durante la espermatogénesis en el testículo hay una condensación de la cromatina a través del reemplazo de nucleoproteínas como las histonas por protaminas (Yeste, 2015), lo que reduce significativamente el volumen nuclear. Luego, dicha condensación se completa durante la maduración en el epidídimo mediante la formación de puentes disulfuro localizados en los radicales de cisteína de las protaminas, convirtiéndose el núcleo del espermatozoide mucho más condensado en comparación con las células somáticas (Yeste, 2015; López-Fernández et al. 2008). La protaminación entonces, mantiene el genoma paterno inerte, transcripcionalmente inactivo y protegido (Johnson et al., 2011).

Existen algunos hallazgos que muestran que los procedimientos de criopreservación pueden romper las cadenas de ADN y afectar el grado de compactación de la cromatina (Kopeika et al., 2015). Al parecer dichas alteraciones, en el caso del porcino, están relacionadas al cambio de localización de las histonas y protaminas en el núcleo, y con la ruptura de los puentes disulfuro, que incluso se logran evidenciar con reducción de la temperatura hasta 5 °C (Flores et al., 2011). Otros hallazgos demuestran que el ADN se puede fragmentar debido a la alta formación de radicales libres durante la congelación que se forman por peroxidación lipídica de la membrana (Kim y Parthasarathy, 1998). Adicionalmente, el ADN se puede fragmentar por los cambios osmóticos drásticos que ocurren durante la criopreservación por la adición de glicerol (Kopeika et al., 2015). Este estrés osmótico también puede afectar la teca perinuclear que es una estructura de

citoesqueleto que se encuentra alrededor del núcleo y que mantiene la arquitectura de la cabeza del espermatozoide, llevando, por tanto, a mayor susceptibilidad de descondensación de la cromatina por efecto de la criopreservación (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

La alteración de la condensación de la cromatina espermática y la fragmentación de la cadena de ADN lleva a la lesión sobre genes determinantes para la fertilización y el desarrollo del embrión (Valcarce et al., 2013).

A manera de resumen las principales alteraciones del espermatozoide por efecto de la criopreservación se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales daños del espermatozoide causados por la criopreservación

ESTRUCTURAS ESPERMÁTICAS	DAÑOS POR LA CONGELACIÓN	REFERENCIA
MEMBRANA CELULAR	<ul style="list-style-type: none"> *Se desestabiliza y pierde su permeabilidad selectiva debido a que hay una interrupción de las interacciones de lípidos y proteínas. *Ruptura de la membrana *Hay salida de colesterol de la membrana 	Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S. y Hoshi, K. (2002). Relación entre potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides, motilidad de los espermatozoides y fertilidad potencial. <i>Asian J. Androl.</i> 4, 97-103.
CITOESQUELETO	<ul style="list-style-type: none"> * Pérdida y/o daño de actina *Induce fosforilación de proteína tirosina y polimerización de actina 	Naresh, S. (2016). Effect of cooling (4 °C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. <i>Cryobiology</i> , 72(1), 7–13. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.12.004
BALSA LIPÍDICA	<ul style="list-style-type: none"> *Están implicadas en la adhesión celular 	Khalil, M. B., Chakrabandhu, K., Xu, H., Weerachatanukul, W., Buhr, M., Berger, T., Carmona, E., Vuong, N., Kumarathasan, P., Wong, P. T. T., Carrier, D., & Tanphaichitr, N. (2006). Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. <i>Developmental Biology</i> , 290(1), 220–235. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.030

<p style="text-align: center;">NÚCLEO</p>	<ul style="list-style-type: none"> *Fragmentación del ADN *Daños de la estructura nucleoproteica *Daño de las protaminas y de las cisteínas *Cambios en la cromática *Daños de genes importantes 	<p>Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. <i>Theriogenology</i>, 85(1),47-64. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.04</p>
--	---	---

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con la literatura revisada podemos concluir que existe evidencia parcial que muestra que los procedimientos de criopreservación, además de efectos negativos sobre la membrana del espermatozoide, genera daños en el citoesqueleto, en proteínas asociadas a las balsas lipídicas y en el núcleo espermático. Las alteraciones en el citoesqueleto por la criopreservación producen un fenómeno parecido a la capacitación fisiológica del espermatozoide, el cual le va a afectar su capacidad de fecundar. Igualmente, las alteraciones en el núcleo pueden llevar a problemas en el desarrollo del embrión.

Como recomendación general los hallazgos encontrados sugieren realizar estudios experimentales que permitan entender los daños en el citoesqueleto, las balsas lipídicas y el núcleo del espermatozoide, en aras de buscar mecanismos de prevención o cambios en los protocolos de congelación para dar solución a esta problemática.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson A., Lewis J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26862/>
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 128–140.
<https://doi.org/10.1038/nrn2059>
- Babuke, T., & Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology*, 86(9), 525–532.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.03.003>
- Bailey, J. L., Lessard, C., Jacques, J., Brèque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., & Galantino-Homer, H. L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70(8), 1251–1259. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.014>
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae- associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–13802.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793>
- Breitbart, H., & Finkelstein, M. (2018). Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(2), 372–377.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.001>

- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *14*, 111–136.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.111>
- Chen, X., Zhu, H., Hu, C., Hao, H., Zhang, J., Li, K., Zhao, X., Qin, T., Zhao, K., Zhu, H., & Wang, D. (2014). Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*, *147*(3), 321–330. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0313>
- Cheng, C. Y., Chen, P. R., Chen, C. J., Wang, S. H., Chen, C. F., Lee, Y. P., & Huang, S. Y. (2015). Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing-thawing treatment. *Animal Reproduction Science*, *152*, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.011>
- Cormier, N., & Bailey, J. L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *69*(1), 177–185. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011056>
- Cross, N. L. (2004). Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of Reproduction*, *71*(4), 1367–1373. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030502>
- De Leeuw, F. E., Chen, H. C., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, *27*(2), 171–183. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90009-S)
- Fielding, C. J., & Fielding, P. E. (2000). Cholesterol and caveolae: Structural and functional relationships. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1529*(1–3), 210–222. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00150-5)

- Flores, E., Ramió-Lluch, L., Bucci, D., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., & Rodríguez-Gil, J. E. (2011). Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*, *76*(8), 1450–1464. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.039>
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 473–480. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082583bg>
- Gavella, M., Lipovac, V., Garaj-Vrhovac, V., & Gajski, G. (2012). Protective effect of gangliosides on DNA in human spermatozoa exposed to cryopreservation. *Journal of Andrology*, *33*(5), 1016–1024. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.015586>
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, M. L., Mota, D., & Trujillo, M. E. (2011). The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology*, *62*(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.11.006>
- Hernández, M., Ekwall, H., Roca, J., Vazquez, J. M., Martinez, E., & Rodríguez-Martínez, H. (2007). Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*, *54*(1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.11.004>
- Itach, S. B. S., Finklestein, M., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2012). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by Phospholipase D-dependent actin polymerization. *Developmental Biology*, *362*(2), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.002>
- Johnson, G. D., Lalancette, C., Linnemann, A. K., Leduc, F., Boissonneault, G., & Krawetz, S.

- A. (2011). The sperm nucleus: Chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, *141*(1), 21–36. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0322>
- Jones, R. C., & Stewart, D. L. (1979). The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, *56*(1), 233–238. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560233>
- Khalil, M. B., Chakrabandhu, K., Xu, H., Weerachayanukul, W., Buhr, M., Berger, T., Carmona, E., Vuong, N., Kumarathanan, P., Wong, P. T. T., Carrier, D., & Tanphaichitr, N. (2006). Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental Biology*, *290*(1), 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.030>
- Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, *21*(2), 209–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
- Kumar, R., Singh, V., Chhillar, S., & Atreja, S. (2013). Effect of supplementation of taurine or trehalose in extender on immunolocalization of tyrosine phosphoproteins in buffalo and cattle (karan fries) cryopreserved spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, *48*(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/rda.12088>
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, *142*(6), 759–778. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0310>
- Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, *17*(1), 53–92. <https://doi.org/10.1007/BF02989804>

- McIntosh, K. A., Harding, J. C. S., Parker, S., Ellis, J. A., & Appleyard, G. D. (2006). Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *18*(4), 380–384. <https://doi.org/10.1177/104063870601800410>
- Miranda, P. V., Allaire, A., Sosnik, J., & Visconti, P. E. (2009). Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of Reproduction*, *80*(5), 897–904. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075242>
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*, *115*(4), 377–388. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00882-1)
- Otto, G. P., & Nichols, B. J. (2011). The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science*, *124*(23), 3933–3940. <https://doi.org/10.1242/jcs.092015>
- Pedersen, S. F., Hoffmann, E. K., & Mills, J. W. (2001). The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *130*(3), 385–399. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00429-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00429-9)
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). *M m c a f d n c*.
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Erratum: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments (Cell 112 (453-465)). *Cell*, *113*(4), 549. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00357-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00357-X)
- Possidonio, A. C. B., Soares, C. P., Portilho, D. M., Midlejš, V., Benchimol, M., Butler-Browne, G., Costa, M. L., & Mermelstein, C. (2014). Differences in the expression and distribution of flotillin-2 in chick, mice and human muscle cells. *PLoS ONE*, *9*(8).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103990>

- Schiller, J., Arnhold, J., Glander, H. J., & Arnold, K. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - Effects of freezing and thawing. *Chemistry and Physics of Lipids*, *106*(2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00148-1)
- Schmitz, G., & Grandl, M. (2008). Update on lipid membrane microdomains. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *11*(2), 106–112. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f44c2c>
- Sousa, A. P. M., Gomes-Santos, C. S. S., & Ramalho-Santos, J. (2006). Localization of snares, NSF and caveolin 1 in human spermatozoa: Relationship with seminal parameters. *Archives of Andrology*, *52*(5), 347–353. <https://doi.org/10.1080/01485010600667050>
- Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., & Axnér, E. (2008). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, *70*(2), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.005>
- Valcarce, D. G., Cartón-García, F., Riesco, M. F., Herráez, M. P., & Robles, V. (2013). Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*, *1*(5), 723–730. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x>
- Valencia, J., Yeste, M., Quintero-Moreno, A., & Henao, F. J. (2019). A new test based on the hypotonic resistance and functional competence to evaluate the sperm quality, cryotolerance and in vitro fertilizing ability in pigs. *Theriogenology*, *140*, 84–92.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.022>

van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction*, *11*(8), 583–590.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gah200>

Ward, W. S. (2009). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, *16*(1), 30–36.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>

Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, *85*(1), 47–64.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>