

Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen

Armando Palacios Angola*

Siendo el agua la fuente esencial para las funciones vitales de cualquier organismo, no es raro pensar que la falta o solidificación de ésta cause incompatibilidad para la vida.^{4,25,40} 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 potencial vital.⁴⁰ A temperaturas de -196°C no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, aún más, 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.²⁵

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:

- 1) Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.^{1,2,25,32}
- 2) Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización.²
- 3) Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito.^{2,32}
- 4) Capacidad de movimientos progresivos.^{2,32}

Está comprobado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C , el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática,^{2,10,40} 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 choque térmico.^{1,2,10} 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.^{4,10}

El problema en la crioconservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a -196°C , sino sortear el daño que ocurre durante el congelamiento y descongelamiento, al pasar la célula por una zona de temperatura crítica entre -15°C y -60°C .^{2,12,25,29,40} durante la cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriamiento, tales como formación de cristales intra y extracelularmente, deshidratación y distorsión de la membrana.¹⁰

Bajo condiciones normales, el daño que una célula sufre durante el congelamiento depende de la velocidad de enfriamiento a la que ocurra dicho proceso. Mientras disminuye la temperatura, antes de llegar a -5°C , los líquidos aún no sufren cambios, pero al bajar de esta temperatura, se comienzan a formar cristales extracelulares de agua pura, logrando que por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela (agua precongelada). El término precongelamiento define al momento umbral antes de que una célula o su ambiente sea congelado.^{12,25} Dentro de la célula hay también agua precongelada, la cual se difunde hacia el exterior de la célula para que la concentración de las sales en el interior y el exterior de la célula se equilibren, sucediendo así la deshidratación celular. Si el agua no sale rápidamente hay formación de cristales intracelulares, que dañan mecánicamente a la célula. Si la tasa de enfriamiento es lenta, la alta concentración de sales que queda en la porción no congelada dentro de la célula puede dañarla, además de deshidratarla, por lo que se hace importante encontrar el ritmo óptimo de enfriamiento.²

Con la finalidad de entender mejor este proceso se hace necesario remontarse a la fisiología de la membrana espermática. La configuración bilaminar de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, junto con las proteínas integrales y periféricas, conforman una barrera hidrofóbica difícil de atravesar. Los fosfolípidos

*Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Rancho 4 Milpas, Apdo. Postal 227. 54600 Tepozotlán, Edo. de México.

de la membrana se pueden mover lateralmente en la membrana, por lo que se dice que la membrana es un mosaico fluido. La fluidez de la membrana puede alterarse por varios factores, entre ellos la temperatura. Al bajar ésta se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas. Sin embargo, hay regiones en las que todavía existen líquidos, y aquellas proteínas que fueron separadas del bloque cristalino se reagrupan, de forma que se construyen brechas de comunicación en la membrana.^{2, 4, 29}

Una hipótesis que también se plantea⁴⁰ explica que al descender la temperatura por debajo de 0°C disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba de sodio-potasio de la membrana plasmática (ATP dependiente) también disminuye su actividad. Esto causa que el potasio que atraviesa la membrana para salir, fluya a una tasa mayor que el potasio que entra, por lo que la concentración de K intracelular disminuye, y la relación Na-K se altera. Esto causa una despolarización parcial de la membrana, abriéndose por ello los canales de calcio, el cual activa enzimas fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas. Otra alternativa de explicación plantea que la célula se vuelve menos tolerante a los cambios bruscos de volumen y concentración cuando está a temperaturas por debajo de -5°C.¹¹

Dependiendo del ritmo de enfriamiento, los eventos que suceden son distintos. Cuando el ritmo de congelamiento es rápido (reducción de temperatura mayor a 10-20°C/min) al agua intracelular no le da tiempo de salir, por lo que se forman cristales que, al aumentar el ritmo de congelamiento, se hacen cada vez más pequeños, hasta hacerse imperceptibles aun con el microscopio electrónico. Esto es saludable para la célula mientras permanezca en ese estado. No obstante, esos microcristales son termodinámicamente inestables, por lo que al ser descongelados, tienden a agruparse (recristalización) y formar cristales más grandes, que sí son letales para la célula, por lo que la solución es un ritmo de descongelación rápido.^{23, 40} No se conoce bien la forma como el proceso de recristalización daña a la célula. Se cree que no es físico el daño, es más, se piensa que directamente es inocuo, pero que genera cambios letales en el sistema celular, los que son de carácter letal.²⁵

Con un ritmo de congelamiento lento (reducción de temperatura menor a 5°C/min) se puede evitar el congelamiento celular,²⁵ porque este ritmo permite que el agua intracelular y extracelular encuentren su equilibrio, ya que el agua intracelular puede salir continuamente, mientras el exterior se va congelando. Llega un momento, el de la temperatura de nucleación de hielo de la célula^{2, 4, 12, 40} en que ésta prácticamente no tiene agua y no se congela. Hay evidencias que indican que cuando aproximadamente el 90% del agua es removida, el 10% restante no es capaz de congelarse a ninguna temperatura. Pero ante esta situación, la proporción de hielo extracelular es tan grande que le causa daño a la membrana por su lado externo.²⁵

Acción de los crioprotectores intra y extracelulares

Teóricamente se podría hacer más resistente a un espermatozoide reduciéndole el número de poros en la membrana y reduciéndole las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos. Presumiblemente ésta es la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche en los diluyentes,^{2, 6, 15, 17, 28, 31, 33, 39} y de crioprotectores, como por ejemplo el dimetil sulfóxido, la betaina y el glicerol.^{5, 7, 9, 14, 19, 21} Aunque no se tiene bien determinado si la acción del glicerol tiene efectos externos o internos en la célula, hay evidencias de que la presencia de un aditivo crioprotector reduce la concentración de sales intracelulares a una temperatura dada, debido a que incrementa la fracción no congelada en el exterior de la célula.^{25, 29} El problema que se presenta con estos crioprotectores es que también produce toxicidad,^{1, 11, 29, 32, 36} y que esta toxicidad disminuye la concentración de otros aditivos que pueden ser usados en el diluyente y por lo tanto limita la eficiencia de ellos.^{11, 36}

En los diluyentes utilizados, tanto para semen refrigerado como para semen congelado, ha sido necesario incluir leche descremada o yema de huevo, sobre todo esta última. A pesar de haber sido utilizada desde hace varias décadas,^{31, 37, 39} lo único que se conoce sobre el efecto de la yema de huevo es que su inclusión mejora la fertilidad del semen. Tiene bondades conocidas pero perjuicios desconocidos, principalmente actividades de tipo enzimático potencialmente dañinas.^{16, 26, 39}

Uno de los obstáculos que se presentan para realizar la evaluación del semen en estudios de diluyentes con base en yema de huevo, es la consistencia de la misma, la cual interfiere, tanto por la viscosidad que produce en el diluyente, como por la poca nitidez que tiene el campo visual del microscopio. La densidad del diluyente con yema de huevo puede influir en la dirección o movimiento espermático. De hecho, los estudios de viabilidad espermática en humanos requieren efectuar lavado de las células para evitar distorsiones en la medición,^{24, 27, 30} aunque esto, eventualmente, puede causar pérdida en la motilidad.

Recientemente han surgido investigaciones en las que se utilizan alternativas proteínicas dentro del diluyente en lugar de la yema de huevo, así pues, se ha utilizado albúmina sérica bovina,^{3, 22, 35} suero equino^{20, 34} suero bovino,^{13, 38} proteína de soya,⁸ calostro,¹⁸ alcohol polivinílico,⁶ etc. Todos ellos proveen la oportunidad de hacer estudios *in vitro* con buena visibilidad ante el microscopio, aunque los diversos ingredientes proteínicos que se mencionan han sido utilizados de manera experimental sólo en diluyentes para semen fresco o refrigerado, y no para semen congelado, excepto la albúmina sérica bovina.³

Abstract

It is very important to bear in mind when cryopreserving semen, that the goal is to maintain the

following sperm properties like: a) Necessary metabolism to produce energy, b) Plasmatic proteins to survive in the female reproductive tract at the time of fertilization, c) Acrosomal enzymes for the penetration to the ovum, and d) Capacity of progressive movement, in order to fertilize. The main aspect on freezing semen, is to sort the physical and chemical sperm damage that is presented during the cell going through the critic temperature between -15°C and -60°C in the freezing-as well as in the thawing processes. Due to it, in each sperm cell, several problems are produced like the formation of intra- and extracellular crystals, membrane dehydration and distorsion. In this sense, it is important to know the effects of freezing rates. On one hand, when the freezing rate is high ($> 10\text{-}20^{\circ}\text{C}/\text{min}$), intracellular water cannot leave the cell, and very little crystals are formed. There is no problem, while the cell stays like this, but these crystals are thermo-dynamically unstable and in the thawing process they form bigger crystals that are lethal for sperm. On the other hand, with a low freezing rate ($< 50^{\circ}\text{C}/\text{min}$), due to the water leaving the cell, while its surrounding is frozen, intra- and extracellular water cannot find its balance until there is almost no water to freeze and the cell does not freeze, but the amount of extracellular ice is so big, that it causes damage to the membrane on its external side.

Literatura citada

- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F. and Vazquez, I.A.: Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28: 36-42 (1991).
- Amann, R.P. and Pickett, B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine vet. Sci.*, 7: 145-173 (1987).
- Arns, M.J., Webb, G.W., Kreider, J.L., Potter, G.D. and Evans, J.W.: Use of different nonglycosable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37°C and 5°C in a bovine serum albumin medium. *J. Reprod. Fertil.*, 35 (Suppl.): 135-141 (1987).
- Beall, P.T.: States of water in biological systems. *Cryobiology*, 20: 324-334 (1983).
- Bustamante, G.C.: Acción del sulfóxido de dimetil y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Tesis de maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.*, 1980.
- Clay, C.M., Slade, N.P., Amann, R.P. and Squires, E.L.: Effect of dilution, polyvinil alcohol (PVA) and bovine serum albumin (BSA) on stallion spermatozoa motility. Proceedings of the 10th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Urbana, Illinois 1984. 167-169. *Animal Reproduction and Artificial Insemination Association. Urbana, Illinois* (1984 b).
- Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P. and Pickett, B.W.: Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C , freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22: 25-34 (1984).
- Coulter, G.H. and Foote, R.H.: Lipid deficient extender for bovine spermatozoa: Its development and use in measuring freezing-induced lipid loss. *J. Dairy Sci.*, 58: 82-87 (1975).
- Cristanelli, M.J., Amann, R.P., Squires, E.L. and Pickett, B.W.: Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-egg yolk extender and on freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 24: 681-686 (1985).
- Daw, A., Farrant, J. and Morris, G.J.: Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. *Cryobiology*, 10: 126-133 (1973).
- Fahy, G.M.: The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13 (1986).
- Franks, F., Mathias, S.F., Galfre, P., Webster, S.D. and Brown, D.: Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiology*, 20: 298-309 (1983).
- Gómez, J.A.: The use of bovine blood serum as an extender for bull semen. M.Sc. thesis. Dep. Anim. Sci. *Texas A&M University. College Station, Texas*, 1968.
- Guay, P., Rondeau, M. and Boucher, S.: Effect of glycerol on motility, viability, aspartate aminotransferase release and of stallion semen before and after thawing. *Equine vet. J.*, 13: 177-182 (1981).
- Heiskanen, M., Pirhonen, A., Koskinen, E. and Mäenpää, P.H.: Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. *J. Reprod. Fertil.*, 35 (Suppl.): 103-107 (1987).
- Jasko, D.J.: Evaluation of stallion semen. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1993. 99-118. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.* (1993).
- Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L., Amann, R.P. and Pickett, B.W.: Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1993. 77-98. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.* (1993).
- Jiménez, D.A., Chandler, J.E., Adkinson, R.W., Barta, O., Ingraham, R.H. and Saxton, A.: Effect of serum sources and colostral whey on bovine semen quality and spermatozoa immunoglobulin G immunofluorescence. *J. Dairy Sci.*, 69: 2704-2710 (1986).
- Jones, R.: The use of dimethylsulfoxide, glycerol and reconstituted skim milk on the preservation of ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18: 887-900 (1965).
- Klem, M.E., Kreider, J.L. and Potter, G.D.: Influence of blood protein on the motility and viability of equine spermatozoa. Proceedings of the Horse Short Course. Dep. Anim. Sci. Texas A&M University. College Station, Texas. 1984. 37-38. *Texas A&M University. College Station, Texas* (1984).
- Koskinen, E., Junnila, M., Katila, T. and Soini, H.: A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen. *J. vet. Med.*, 36: 110-114 (1989).
- Kreider, J.L., Tindall, W.C. and Potter, G.D.: Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. *Theriogenology*, 23: 399-408 (1985).
- Lehninger, A.L.: Bioquímica. 2a ed. *Omega, Barcelona, España*, 1985.
- Levine, R.J., Ravi, M.M., Brown, M.H., Hurtt, M.E., Bentley, K.S. and Moho, K.L.: Computer assisted semen analysis: Results vary across technicians who prepare videotapes. *Fertil. Steril.*, 52: 673-677 (1989).
- Mazur, P.: Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247: 125-142 (1984).
- Montes, R.C.: Comparación de tres fuentes biológicas para producir anticuerpos contra progesterona para utilizarse en radioinmunoanálisis o enzimoimunoanálisis. Tesis de doctorado. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.*, 1991.
- Mortimer, D., Serres, C., Mortimer, S.T. and Jouannet, P.: Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res.*, 20: 313-327 (1988).

28. Palacios, A., Valencia, J. y Zarco, L.: Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen de equino. *Vet. Méx.*, 23: 315-318 (1992).
29. Parks, J.E. and Graham, J.K.: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222 (1992).
30. Pedigo, N.G., Vernon, M.W. and Curry, T.E.: Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil. Steril.*, 52: 659-666 (1989).
31. Phillips, P.H. and Lardy, H.A.: A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23: 399-404 (1940).
32. Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiwe, M.C., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26: 341-354 (1989).
33. Province, C.A., Squires, E.L., Pickett, B.W. and Amann, R.P.: Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, 23: 925-934 (1985).
34. Pruitt, J.B.: Fertility of stallion semen extended with a sucrose-BSA extender. M.Sc. thesis. Dep. Anim. Sci. *Texas A&M University*. College Station, Texas, 1985.
35. Reid, J.L.: An application of a bovine serum albumin extender for stallion semen. M. Agriculture thesis. College of Agriculture. *Texas A&M University*. College Station, Texas, 1986.
36. Rudolph, A.S., Crowe, J.I., Spargo, B. and Crowe, L.M.: Interaction of cryoprotectants with lipid bilayers. *Cryobiology*, 23:543 (1986) (Abstract).
37. Salisbury, G.W., Fullers, H.K. and Willett, E.L.: Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.*, 24: 910 (1941).
38. Senger, P.L., McCutchan, J.F. and Hillers, J.K.: Influence of blood serum from bulls and heifers on head-to-head agglutination and acrosomal maintenance in bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 25: 433-437 (1981) (Abstract).
39. Watson, P.F.: The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J. Reprod. Fertil.*, 42: 105-111 (1975).
40. Watson, P.F.: Problems in the cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*, 23: 547 (1986) (Abstract).