

CAPACIDAD FECUNDANTE DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE *Cavia porcellus* "cuy" MANTENIDOS EN ESTRES HIPOTERMICO

Hugo Gonzales Figueroa¹
Hugo Mauricio Gonzales Molfino¹

RESUMEN

Durante el estrés hipotérmico los espermatozoides de cuy conservan sus patrones de capacitación espermática, hiperactivación, reacción del acrosoma y fecundación *in vitro*. El piruvato, componente del medio de cultivo San Marcos (SM), sería la fuente energética preferencial para mantener la supervivencia espermática en estrés hipotérmico prolongado, a lo mejor, regulando el metabolismo oxidativo en el espermatozoide. De la misma manera se constituiría en el sustrato ideal de la piruvato deshidrogenasa para iniciar la capacitación e hiperactivación cuando los espermatozoides son incubados a 37°C. El imidazol provoca reacción acrosómica espontánea en los espermatozoides hiperactivos y permite que estos puedan interactuar con ovocitos maduros, fecundarlos e iniciar el desarrollo embrionario temprano hasta blastocisto. La madurez ovocitaria se consiguió cultivando Complejos Ovocito-Cumulo (COCs) en el medio North Carolina State University 23 (NCSU-23), usado por primera vez para cuy.

En este trabajo se demuestra que la hipotermia prolongada a 5°C en un medio químicamente definido, SM, no afecta los procesos espermáticos fundamentales para la adquisición de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy.

Palabras claves: *Estrés hipotérmico, hiperactivación, reacción del acrosoma, blastocisto*

SUMMARY

During hypothermic stress, guinea pig sperm retain their of sperm capacitation, hiperactivation, acrosome reaction and *in vitro* fertilization patterns. The pyruvate, a component of San Marcos (SM) culture medium, would be the preferred energy source to keep the sperm survival prolonged stress hypothermic, perhaps by regulating the oxidative metabolism in the spermatozoon. In the same way would constitute the ideal substrate for the pyruvate dehydrogenase regulates to sperm capacitation and hiperactivation when sperm are incubated at 37 ° C. The imidazole causes spontaneous acrosome reaction in the hyperactivated sperm and allows them to interact with mature oocytes, fertilized and begin start early embryonic development to blastocyst.

Mature oocyte was achieved by cultivating Cumulus-Oocyte complexes (COCs) in the North Carolina State University 23 (NCSU-23), used for the first time in guinea pig.

In this work demonstrates that the prolonged hypothermia at 5 ° C in a chemically defined, medium SM, does not affect sperm fundamental processes for the acquisition of the capacity of fertile sperm of guinea pig.

Key words: *Hypothermic stress, hiperactivation, acrosome reaction, blastocyst.*

¹ Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal, Instituto de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide de mamífero para fusionarse con el ovocito necesita de cambios morfológicos y fisiológicos conocidos como capacitación, hiperactivación y reacción del acrosoma.

La capacitación *in vivo*, tiene lugar en el tracto genital de la hembra y se acepta que es la fase o las fases que promueve alteraciones en los patrones de motilidad «hiperactivación» (Yanagimachi, 1988; Frasser, 1977) y precede a la reacción del acrosoma (Bedford, 1970). Está comprobado que no todas las células de una población espermática inician la reacción del acrosoma después de una inducción, esta sólo ocurre en los espermatozoides hiperactivos (Yanagimachi, 1994).

La capacitación espermática, la hiperactivación y la reacción del acrosoma pueden lograrse *in vitro* utilizando medios de cultivo adecuados, químicamente definidos o semidefinidos. Un sistema de cultivo puede denominarse «medio químicamente definido» cuando en su composición sólo se encuentran sustancias químicamente puras sin fluidos biológicos y además contener algún producto biológico purificado como albúmina sérica de bovino (Biggers et al. 1971). Sin embargo algunas veces es necesario agregar fluidos biológicos para estudiar la sensibilidad y los requerimientos necesarios para los complejos mecanismos que ocurren desde la fecundación hasta el desarrollo embrionario temprano en mamíferos, denominándose, entonces, sistemas de cultivo semi-definidos (Van Thuan et al., 2002).

La capacitación y reacción del acrosoma pueden lograrse en medios químicamente definidos (Jaiswal et al., 1998). Al respecto, se han encontrado espermatozoides de cuy hiperactivos en el medio San Marcos (SM) que contiene 22,3 mM de piruvato de sodio (Gonzales-Figueroa, 1988).

Las hembras de los mamíferos tienen ovarios bifuncionales que cumplen una función exocrina cuando liberan ovocitos y una endocrina cuando producen: estrógenos, progesterona, inhibina y activina. El crecimiento folicular tiene un control intraovárico y otro gonadotrófico, regulados por señales paracrinas y endocrinas (Manikkan et al., 2002). Los ovocitos y las células foliculares forman una unidad estructural y funcional denominada complejo cúmulo-ovocito (COC).

El estrés hipotérmico, consiste en colocar caudas de epidídimos de cuy sumergidas en el medio SM a temperaturas entre 4-6°C por varios días (Gonzales-Figueroa, 1988).

Se ha reportado que el uso de sistemas de cultivo definidos *in vitro*, permiten un mejor esclarecimiento

de los mecanismos moleculares que promueven o inhiben el desarrollo embrionario. Sustancias como aminoácidos, sustratos energéticos, citrato y vitaminas pueden tener una influencia decisiva en el desarrollo embrionario (Keskinetepe & Brackett, 1996).

En el presente trabajo se relaciona la permanencia prolongada de espermatozoides epididimarios de cuy en estrés hipotérmico con la capacitación espermática, reacción del acrosoma y fecundación *in vitro* en el medio San Marcos (SM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

Las caudas de epidídimo y los ovarios de cuy fueron obtenidos de animales sacrificados para el consumo humano en el mercado mayorista de Lima.

Supervivencia espermática en cauda de epidídimos mantenidas en estrés hipotérmico

Las caudas de epidídimo seleccionadas fueron colocadas en tubos de polipropileno que contenían 30 ml de medio SM, cubriéndose la superficie del tubo con una capa de aceite mineral. Cada tubo contenía 4 caudas, que se mantuvieron entre 4 a 6°C, siendo el medio renovado cada 48 horas.

Para verificar la supervivencia de los espermatozoides se extraía en tiempos diferentes de estrés hipotérmico una cauda. Con una tijera de punta fina se disectaba la parte distal de la cauda que era colocada en 200 μ l de medio SM en un disco de cultivo Falcon. Con la ayuda de pinzas de punta fina era trozada para facilitar la salida de los espermatozoides, formándose una «suspensión patrón». El movimiento masal de los espermatozoides en la «suspensión patrón» observado a través de un microscopio estereoscópico, nos indicaba la supervivencia espermática.

Capacitación espermática

A partir de la «suspensión patrón» se hacía una dilución cuya concentración final tenía 10^5 espermatozoides/ μ l. Se prepararon microgotas de 100 μ l de medio SM cubiertas de aceite mineral. Estas eran temperadas a 37° C entre 15 a 20 minutos antes de agregarle 10 μ l de la dilución espermática, para luego ser incubadas a 37° C entre 1 a 2 horas. Al término del periodo de incubación se contaba, a través de un microscopio compuesto de campo claro, 100 espermatozoides libres, determinándose el número de espermatozoides hiperactivos que tenían movimientos rápidos y el batimiento del flagelo asincrónico.

Evaluación de la reacción del acrosoma

Al término de 60 minutos de incubación, se agregó a la microgota, que contenía espermatozoides hiperactivos, 10 μ l de una solución de imidazol (5mM),

para incubarse nuevamente. Entre los 15 y 30 minutos de incubación, se evaluó el número de espermatozoides reaccionados. Sólo en los espermatozoides recién obtenidos (control) la reacción del acrosoma se logró después de 2 horas de capacitación.

Recuperación y selección de ovocitos

Se utilizaron ovarios de hembras de cuy de los cuales se recuperaron los complejos cúmulo-ovocito (COCs) mediante el método de cortes transversales. Utilizando una jeringa hipodérmica de 10 ml y una aguja de 21G se aspiró los folículos que tenían entre 4 - 6 mm de diámetro, los que fueron colocados en un tubo de polipropileno (50 ml) mantenido a una temperatura de 37° C en baño María. Luego de 10 minutos de reposo, se extrajo el sedimento del fondo del tubo llevándolo a una placa Petri, a la que se le agregó 25 mM Hepes-buffer TCM-199 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para la selección de los COCs se tomaron en cuenta indicadores morfológicos del cúmulo: número de capas, compactación y transparencia, y del citoplasma del ovocito, el color (densidad) y el tamaño de los gránulos.

Maduración *in vitro* de los COCs

Como medio de maduración se utilizó el (NCSU-23; North Carolina State University 23) (Petters y Wells, 1993) suplementado con 0.57 mM de cisteína, 10% fluido folicular porcino, 10 IU/ml de gonadotropina corionica equina, 10 IU/ml de gonadotropina coriónica humana y 50 µg/ml sulfato de gentamicina (Sigma) las que fueron colocadas en placas cubiertas con aceite mineral e incubadas por 12 - 14 horas a 39°C con 5% CO₂, 90% humedad. Transcurrido este tiempo, los ovocitos se colocaron en el mismo medio libre de hormonas por un periodo adicional de 10-12 horas.

Al término del cultivo de maduración, las células del cúmulo fueron separadas empleando un vortex por 4 minutos en una solución buffer fosfato PBS (Dulbecco's) sin Ca²⁺ y Mg²⁺ con hialuronidasa (0,1%)colocándolos después en el medio TCM-199 con buffer Hepes (25mM). En este medio fueron seleccionados aquellos ovocitos maduros, que presentaron el primer corpúsculo polar

Fecundación *in vitro*.

Al medio que contenía los ovocitos maduros, se les agregó 10 ul del cultivo de espermatozoides con reacción del acrosoma. Se incubaron entre 24 y 120 horas a 39°C con 5% CO₂ y 90% de humedad

Pruebas estadísticas

Se emplearon las pruebas estadísticas de análisis de varianza (ANOVA) para comparar si los patrones de capacitación espermática y reacción del acrosoma son significativamente distintos en los diferentes momentos del estrés hipotérmico y la prueba de Tukey por medio de la cual se realizó una comparación de los grupos por pares, para establecer cual grupo marca la diferencia.

RESULTADOS

Hiperactivación y reacción del acrosoma

Los espermatozoides que permanecieron en estrés hipotérmico entre 24 a 264 horas, adquirirían el estado capacitado y perdían su acrosoma cuando fueron incubados a 37° C. En el cuadro N° 1 se puede observar que no existe diferencia significativa, en cuanto a hiperactivación entre los espermatozoides que permanecieron hasta 120 horas en estrés hipotérmico, sin embargo esta diferencia se aprecia en los que estuvieron por 264 horas en hipotermia. Con respecto al tiempo de inicio de la hiperactivación, los espermatozoides recién extraídos de la cauda demoran 2 horas mientras los que permanecieron en estrés hipotérmico, lo logran a los 6º minutos del inicio de la incubación a 37° C.

En el cuadro N°2, se presentan los porcentajes de reacción del acrosoma a través del tiempo de permanencia en hipotermia. La reacción del acrosoma se evaluó 30 minutos después de agregar imidazol 5mM a las microgotas de espermatozoides hiperactivos. Como se puede apreciar, el la reacción del acrosoma es muy similar a las 24 hrs. (67,20 %), 72 hrs (66.88%) y 120 hrs.(66,80%) en estrés hipotérmico, sin embargo existe una disminución de reacción del acrosoma (47.90 %) en los que estuvieron por 264 horas a baja temperatura.

Maduración de ovocitos

Los tipos de COCs seleccionados de ovarios de hembra fueron madurados por 13 horas en el NCSU 23 con hormonas y después 12 horas en el medio sin hormonas. Se utilizaron 283 COCs y se observó la expansión del cúmulo sólo en 158 (55.8%). La expansión del cúmulo es el indicador morfológico de maduración.

Fecundación *in vitro*

Espermatozoides sin acrosoma se agregaron a los ovocitos con cúmulo expandido y después de 24 horas se verificaba la presencia de embrión de 2-células y a las 120 horas si se había formado blastocistos .

Se fecundaron ovocitos con espermatozoides que no habían permanecido en hipotermia y con espermatozoides de 72 y 120 horas de hipotermia. En cada caso se utilizaron 50 ovocitos. En la tabla N°1 se muestran los resultados preliminares obtenidos donde se puede apreciar que el estrés hipotérmico no es un factor limitante de la fecundación ni del desarrollo embrionario temprano en cuy.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que los espermatozoides epididimarios de cuy en estrés hipotérmico adquieren capacidad fértil hasta 264 horas inclusive en el medio SM, en relación a los medios de cultivo que contienen entre 0.25 a 0.33 mM de piruvato en los cuales el tiempo máximo de viabilidad alcanza sólo a 120 horas (Gonzales Figueroa, 1988). Esto sugiere que el piruvato, en una concentración elevada (22,3 mM), sería la fuente energética preferida para mantener la supervivencia espermática en estrés hipotérmico. Conjuntamente con las sustancias que se encuentran en el fluido de la cauda del epidídimo que inhiben capacitación y reacción del acrosoma cuando los espermatozoides se encuentran almacenados en la cauda (Bavister et al., 1978).

Los espermatozoides cuando abandonan el testículo, lo hacen morfológicamente completos, pero no funcionalmente (Austin, 1952). La funcionalidad total se adquiere en el tránsito por el epidídimo y por el tracto reproductor de la hembra o mediante la capacitación espermática *in vitro*. Durante la capacitación ocurren cambios en los patrones de batimiento del flagelo espermático, fenómeno conocido como hiperactivación (Yanagimachi, 1969). El aumento de la motilidad de los espermatozoides hiperactivos presumiblemente les ayuda a superar la barrera de la mucosa del tracto reproductivo femenino y es crucial para lograr la fecundación de los gametos. Durante la capacitación los espermatozoides experimentan una pérdida de colesterol de la membrana, probablemente desde un microdominio de membrana (glicoesfingolípido, colesterol y proteína), que asociada al ingreso de bicarbonato de sodio desde el medio (aparato reproductor femenino o su equivalente *in vitro*) generan la activación de un mecanismo original de transducción de señales. Esta vía conduce a fosforilación de residuos de tirosina en proteínas específicas ricas en este aminoácido (Boarelli et al, 2007). Es interesante tener en cuenta que a partir de las 24 horas de estrés hipotérmico, la capacitación espermática se logra 60 minutos después del inicio de la incubación a 37°C, en relación a las 2 horas que demora este proceso en los

espermatozoides recién obtenidos del epidídimo. Esto podría deberse a la formación de microdominios lipídicos, provocado por el estrés hipotérmico, pero que no compromete la integridad funcional de los espermatozoides. Los valores de hiperactivación entre 24 a 120 horas en estrés hipotérmico son similares con respecto a los espermatozoides de 264 horas donde se evidencia una baja porcentual significativa de hiperactivación.

Existen proteínas fosforiladas en tirosina como la piruvato deshidrogenasa A2 (PDHA2) que es requerida para la hiperactivación y la reacción del acrosoma en espermatozoides de hamster (Kunar et al., 2008) y otra, la dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD) que se mantiene fosforilada en tirosina durante la capacitación de espermatozoides de mamíferos (Mitra &. Shivaji, 2004). La presencia de estas enzimas, servirían para regular la oxidación del piruvato, y de esta forma provocar la hiperactivación en el medio SM (22.3 mM de piruvato). A juzgar por nuestros resultados estas enzimas no se deterioran durante la permanencia de los espermatozoides de cuy en estrés hipotérmico, puesto que los espermatozoides de 24 horas y los de 264 horas mantienen los patrones de hiperactivación y reacción del acrosoma.

Sólo los espermatozoides hiperactivos inician la reacción del acrosoma inducida por el imidazol presente en el medio de cultivo. Existen evidencias que algunas sustancias como el bicarbonato de sodio, promueven la reacción acrosómica espontánea en espermatozoides de hámster (Boatman & Robbins, 1991), es probable que el imidazol, sea un regulador del pH del medio de cultivo y la variación de pH sea una de las causas de la reacción acrosomal, pero no se puede descartar que el imidazol pueda provocar, también, la formación de microdominios lipídicos que facilitarían la excitosis acrosómica.

El desarrollo embrionario está influenciado directamente por mecanismos que ocurren durante la maduración del ovocito. Si bien es cierto que muchos ovocitos inmaduros son capaces de completar la meiosis *in vitro*, sólo un pequeño porcentaje de ellos adquieren una correcta competencia de desarrollo, para continuar hasta el estado de blastocisto. Los ovocitos recolectados de ovarios procedentes de mataderos son una fuente extremadamente heterogénea en términos de calidad y competencia de desarrollo (Brackett & Zuelke, 1993). De los 283 COCs de cuy seleccionados 158 (55.8%) maduraron en el medio NCSU 23 expandiendo el cúmulo, indicador importante de la capacidad de competencia ovocitaria (Krisner, 2004). Es interesante mencionar que es la primera vez que

se usa este medio de cultivo para madurar con relativo éxito ovocitos de cuy.

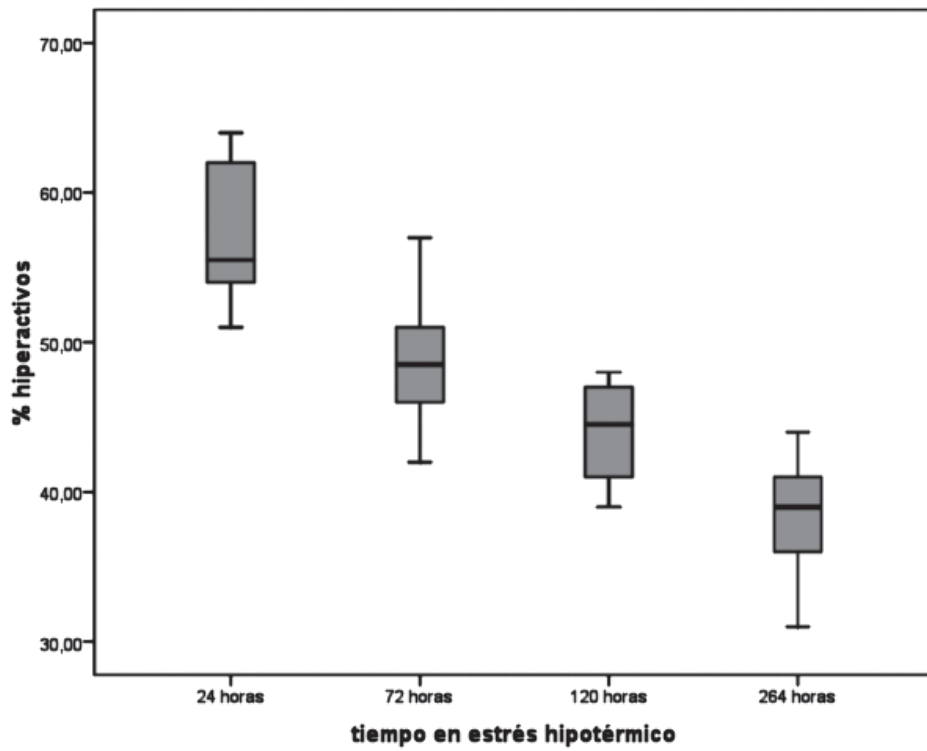
La eficiencia del medio de maduración ovocitaria, sirvió para comprobar que los espermatozoides que sobreviven en estrés hipotérmico prolongado, son capaces de fecundar ovocitos maduros y además iniciar el desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto.

Se puede afirmar que sistemas de cultivo químicamente definidos, como el medio SM, permiten que los espermatozoides de cuy sobrevivan en estrés hipotérmico sin alterar su capacidad fértil.

LITERATURA CITADA

- AUSTIN, CR. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Science Research* 4:581-596
- BAVISTER, D., Rogers, B.J. & Yanagimachi, R. 1978. The effects of cauda epididymal plasma on the motility and acrosome reaction of hamster and guinea pig spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction* 19: 358-363
- BEDFORD, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction Suppl.* 2: 128-158
- BIGGERS, J.D.; Whitten, W. & Whitingham, D. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In: Daniel JC Jr. (ed.). *Methods in Mammalian Embryology*. San Francisco: WH. Freeman and Company. pp: 86-116
- BOARELLI, P.V.; Cattaneo, C.B.; Monclus, M.A. & Fornés, M. 2007. Detección de la capacitación espermática basada en la visualización de los componentes lipídicos de microdominios de membrana. *Revista Médica Universitaria* 3(2)
- BOATMAN, D.E. & Robbins, R.S. 1991. Bicarbonate: carbón-dioxide regulation of sperm capacitation, hiperactivated motility and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 44: 806813
- BRACKETT, B. & Zuelke, K. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39:43-64
- FRASSER, L.R. 1977. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation *Journal Experimental of Zoology*. 202: 439-444
- GONZALES-FIGUEROA, H. 1988 Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función de la estabilidad territorial de la cauda del epidídimo. *Tesis Doctor CC.BB. UNMSM pp.140*
- JAISWAL, B.S.; Cohen-Dayag, A.; Tur-Kaspa, I. & Eisenbach, M. 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Letters* 427: 309-313
- KESKINTEPE, L. & Brackett, B.G. 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction* 55,:333-339
- KRISHER, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development *Animal of Science*. 82:14-23.
- KUNAR, V.; Kota, V. & Shivaji, S. 2008. Hamster sperm capacitation: role of pyruvate dehydrogenase A and dihydrolopoamide dehydrogenase. *Biology of Reproduction* 79: 190-199
- MANIKKAM, M.; Li, Y.; Mitchell, B.; Mason, D. & Freeman, L. 2002. Potassium channel antagonist influence porcine granulosa cell proliferation, differentiation and apoptosis. *Biology of Reproduction* 67: 88-98.
- MITRA, K. & Shivaji, S. 2004. Novel Tyrosine-Phosphorylated Post-Pyruvate Metabolic Enzyme, Dihydrolopoamide Dehydrogenase, Involved in Capacitation of Hamster Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 70, 887-89963: 2278-2299
- VAN THUAN, N.; Harayama, H. & Miyake, M. 2002. Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existente os aminoacids *in vitro*. *Bioogy of Reproduction* 67: 1688-1698
- VISCONTI, P.E.; Galantino-Homer, H.L.; Moore, G.D.; Bailey, J.L.; Ning, X.; Fornes, M. & Kogf, G.S. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* 19:242-248.
- YANAGIMACHI, R. 1969; *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 18:275-286.
- YANAGIMACHI, R. 1988: Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neill J, eds. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd. New York. 135-185 pp.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian acrosome reaction in: *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. and Neill, J., Eds.) pp. 189-317, Raven Press, New York, NY.

Cuadro 1. ESPERMATOZOIDES HIPERACTIVOS EN ESTRÉS HIPOTERMICO



Cuadro 2. REACCIÓN DEL ACROSONA EN ESPERMATOZOIDES DE CUY EN ESTRES HIPOTERMICO.

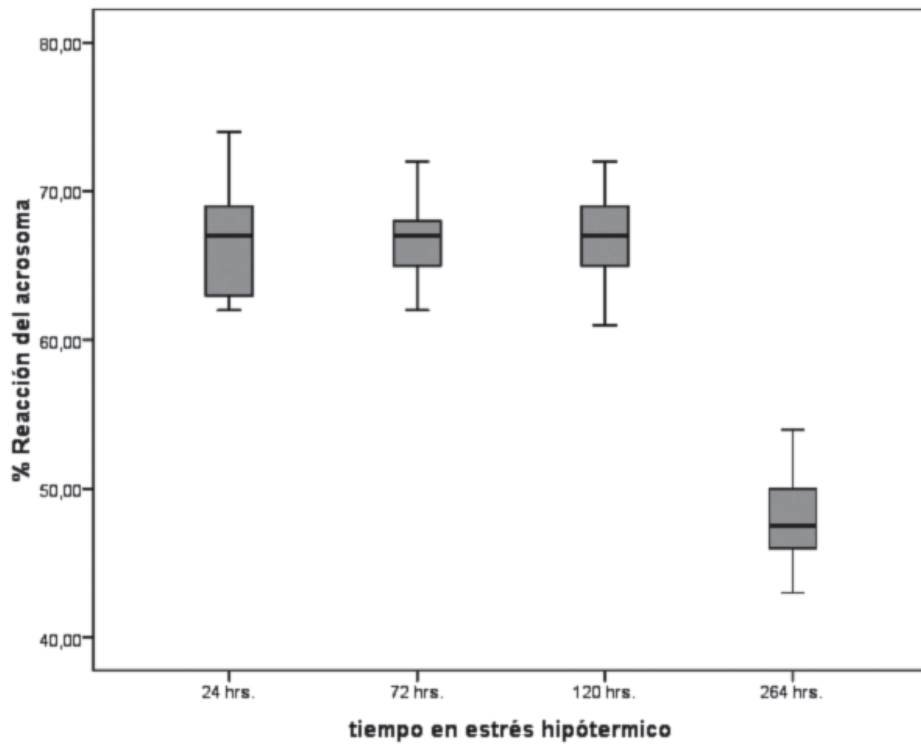


Tabla 1. Embriones obtenidos *in vitro* con espermatozoides que permanecieron en estrés hipotérmico

| Tiempo en estrés hipotérmico | Número de ovocitos maduros | 2-células | blastocisto |
|------------------------------|----------------------------|-----------|-------------|
| Control (0 hrs) | 50 | 31 (62 %) | 19 (38.0 %) |
| 72 hrs | 50 | 23 (46 %) | 15 (30.0 %) |
| 120 hrs | 50 | 19 (38 %) | 17 (34.0 %) |