

Enrique Castellón - Andreína Cesari - Miguel Fornés

Biología de la gameta masculina

Desde lo básico a nuevos enfoques
para preguntas conocidas

Universidad Nacional
de Mar del Plata



Biología de la Gameta Masculina

*Desde lo básico a nuevos enfoques
para preguntas conocidas*

**Enrique Castellón
Andreina Cesari
Miguel Walter Fornés**



Castellón, Enrique

Biología de la gameta masculina : desde los básico a nuevos enfoques para preguntas conocidas / Enrique Castellón ; Andreina Cesari ; Miguel W. Fornés. - 1a ed. - Mar del Plata : EUDEM, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-987-4440-22-8

1. Biología. 2. Espermatozoides. I. Cesari, Andreina II. Fornés, Miguel W. III.

Título

CDD 571.845

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723 de Propiedad Intelectual.

Prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio o método, sin autorización previa de los autores.

ISBN: 978-987-4440-22-8

Este libro fue evaluado por el Dr. Mariano Buffone

Fecha de edición: mayo 2018

© 2018, Enrique Castellón, Andreina Cesari y Miguel Walter Fornés

© 2018, EUDEM

Editorial de la Universidad Nacional de Mar del Plata

EUDEM / 3 de febrero 2538 / Mar del Plata / Argentina

Imagen de tapa: Fertilización *in vitro* entre espermatozoides y ovocitos de hamster (magnificación 100 X). Se ve la unión de los espermatozoides con la zona pelúcida del ovocito.



Libro
Universitario
Argentino

Nota introductoria:

Este manual se desarrolla desde una escritura simple y amena, tomando lo básico de cada tópico para dar pie a algunos de los muchos interrogantes en el campo de la biología celular y molecular aplicada al espermatozoide de mamíferos, en particular, a los estudiados por los autores del presente manual.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. Estructura del espermatozoide | 13 |
| 1.1. Avances en la organización de la membrana espermática | 16 |
| 2. Origen del espermatozoide | 19 |
| 2.1. Organización general del testículo | 19 |
| 2.2. Túbulo seminífero y espermatogénesis | 20 |
| 2.3. Intersticio testicular | 27 |
| 2.4. Avances en el conocimiento del desarrollo del flagelo | 30 |
| 3. Maduración del espermatozoide | 35 |
| 3.1. Organización general del epidídimo | 36 |
| 3.2. Histología del epidídimo | 37 |
| 3.3. Fisiología del epidídimo | 38 |
| 3.4. Avances en la asociación de espermatozoides | 40 |
| 4. Adquisición de la capacidad fertilizante | 47 |
| 4.1. Cambios funcionales | 48 |
| 4.2. Cambios intracelulares | 50 |
| 4.3. Cambios en la superficie espermática | 52 |
| 4.4. Avances el estudio de inhibidores de serina proteasas que regulan la fisiología espermática | 54 |
| 5. Ambiente del espermatozoide | 65 |
| 5.1 Glándulas Anexas | 65 |
| 5.1.1. Vesícula seminal | 66 |
| 5.1.2. Próstata | 68 |
| 5.1.3. Glándulas bulbouretrales o de Cowper | 68 |
| 5.1.4. Glándulas uretrales de Littre | 70 |
| 5.1.5. Glándulas ampulares | 70 |
| 5.2. Semen | 72 |
| 5.2.1. Composición general del semen | 72 |
| 5.2.2. Función del fluido seminal | 73 |
| 5.2.3. Aportes de órganos y glándulas accesorias al fluido seminal | 73 |

Capítulo 5

Ambiente del espermatozoide

Lucía Zalazar y Andreina Cesari

Como ya hemos visto, el estado fisiológico del espermatozoide se va modificando a medida que este atraviesa los distintos órganos principales y secundarios de conducto masculino y entra en contacto con sus productos de secreción.

Luego que el espermatozoide sale del epidídimo y entra en el conducto deferente hacia el tramo final donde será liberado como producto de la eyaculación, entra en contacto con nuevas secreciones que provienen de las glándulas accesorias. Estas secreciones conforman el fluido seminal que tiene gran importancia en la capacidad fertilizante de la gámeta masculina.

5.1 Glándulas anexas

Las glándulas sexuales accesorias no contienen ni transportan espermatozoides pero son de gran importancia para su funcionalidad. Las secreciones de estas glándulas constituyen un pool que conforma la mayor parte del plasma seminal rico en carbohidratos, sales de ácido cítrico, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y sustancias minerales con un poder tampón relativamente elevado. La mayor proporción del fluido seminal está conformada por las secreciones de la próstata y las vesículas seminales, con un aporte menor de las glándulas peri y bulbouretrales. De aquí que el plasma seminal constituye un medio líquido especialmente apto para el desarrollo de las funciones vitales

de los espermatozoides. Las glándulas anexas del aparato genital entran en actividad tras la aparición de la pubertad, tienen un desarrollo variable de acuerdo con la especie, son palpables, en parte, por vía rectal en animales mayores, y en los machos castrados son rudimentarias.

Las secreciones de estas glándulas se vierten a la uretra en el momento de la eyaculación gracias a la contracción de las fibras de músculo liso presentes en su paránquima y que están invadidas por el sistema nervioso vegetativo.

Si bien no todas las especies poseen todas las glándulas accesorias, la mayoría de las glándulas accesorias del macho se describen como túbulo-alveolares ramificadas o compuestas. Sin embargo, la variación estructural entre especies es muy grande. En los carnívoros, puede estar presente solo la próstata, la cual cumple con las funciones secretoras de todas las glándulas ausentes (Suarez 2006).

En el hombre se encuentran las vesículas seminales, la próstata, las glándulas bulbouretrales o de Cowper y las glándulas uretrales de Littre. En roedores, además, existen las glándulas coagulantes, ampulares y prepuciales (Rugh 1990).

5.1.1 Vesícula seminal

La vesícula seminal o glándulas vesiculares son dos estructuras en forma de saco, ubicadas en la cavidad pelviana sobre la superficie postero-inferior de la vejiga urinaria. Se caracterizan por sus estructuras tortuosas formadas por epitelio estratificado columnar y células cubicas ubicadas sobre la lamina basal (Fig. 1).

En el hombre, el desarrollo de las vesículas seminales comienza a las 12 semanas del desarrollo fetal a partir del mesonefro al igual que el epidídimo y el conducto deferente. La morfogénesis de las vesículas seminales es dependiente de los andrógenos testiculares, por lo que no hay un órgano homólogo en la mujer (Suarez 2006).

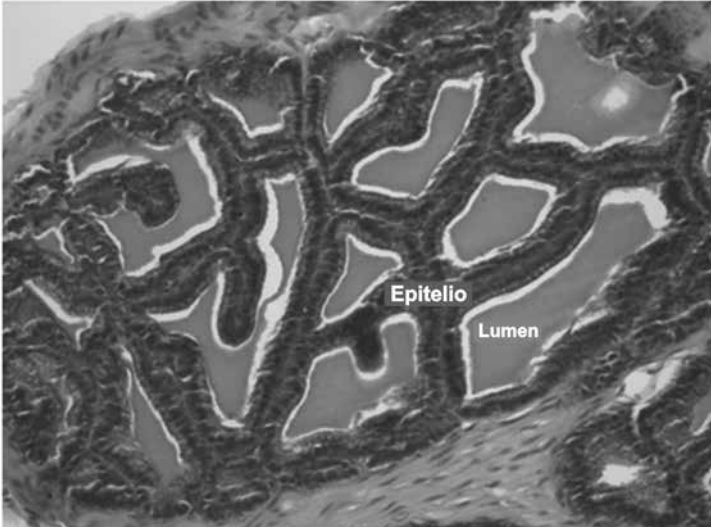


Figura 1. Histología de la vesícula seminal. Sección transversal de una vesícula seminal humana. Se muestra la región del lumen y el epitelio que contiene los gránulos secretorios. Magnificación= 400X. (Foto: F. Cifuentes Ph.D., LACyM).

Las vesículas seminales del individuo maduro se encuentran revestidas de epitelio secretor que produce un material mucoide rico en fructosa, proteínas y pequeñas cantidades de ácido ascórbico, inositol, ergotonina, aminoácidos, fosforilcolina y prostaglandinas. En medicina legal, tiene gran importancia el contenido de flavinas en la secreción de estas glándulas. Las flavinas son pigmentos fluorescentes que delatan la presencia de manchas de semen.

La morfología glandular y los productos de su secreción son dependientes de los niveles de testosterona. Su secreción participa en el volumen del eyaculado. Contiene células musculares lisas, que al contraerse durante la eyaculación vuelcan sus productos acumulados en el conducto

deferente (Suarez 2006).

Mediante un mecanismo secretor denominado “apócrino”, las vesículas seminales de algunas especies (conejo, toro, caballo) son responsables de la formación de partículas membranosas denominadas “vesiculosomas”, muy similares a los prostasomas (Aumüller y col. 1999).

En los rumiantes, las glándulas tienen aspecto compacto. En los equinos, en cambio, se observan estructuras saculares externas verdaderas y el conducto central está muy dilatado. En los roedores, la secreción de estas glándulas es rica en moco y contribuye a la formación del tapón vaginal. En todos los carnívoros, las glándulas vesiculares están ausentes.

5.1.2 Próstata

La próstata es una de las principales glándulas anexas o accesorias del tracto reproductor masculino (Fig. 2). Su presencia es común a todos los mamíferos, sin embargo, difiere en sus características anatómicas, histológicas, bioquímicas y funcionales entre las distintas especies. Su secreción constituye una fracción variable del volumen seminal y proporciona una serie de sustratos, iones y enzimas que son importantes para la sobrevivencia y función espermática. Dada su importancia, desarrollaremos este tema en un capítulo aparte (Capítulo 6).

5.1.3 Glándulas bulbouretrales o de Cowper

Estas glándulas están presentes en casi todos los mamíferos, con excepción de los caninos. En el desarrollo embrionario se originan a partir de proyecciones del sino urogenital que invaden el mesénquima adyacente de la uretra primitiva. Tiene un origen similar a la próstata y, al igual que

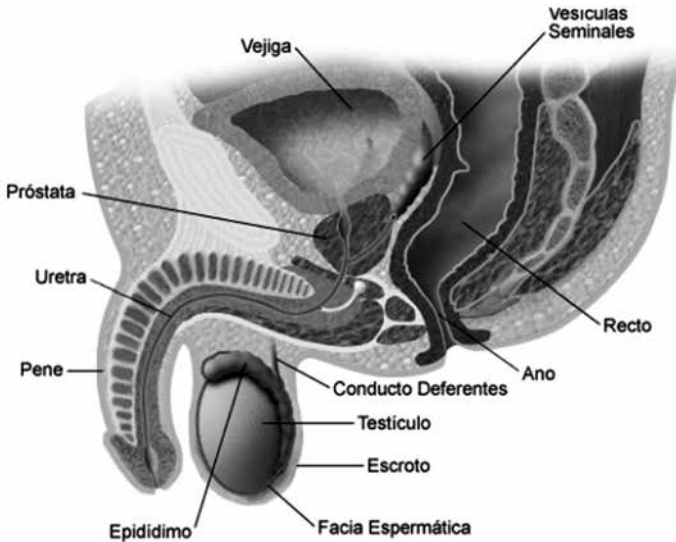


Figura 2. Esquema de tracto reproductor masculino mostrando la ubicación de la próstata y su relación con las demás estructuras. (Imagen tomada de internet:<http://urologiaperuana.blogspot.com/2011/06/cancer-de-prostata.html>)

ésta, se encuentra bajo el control de los andrógenos.

Una vez maduras, son glándulas ovoides y pares, de 2-3 cm de largo en el hombre. Sus secreciones son vaciadas en la uretra y continúan hacia el plasma seminal. En los roedores, se cree que son importantes en la formación del tapón mucoso luego de la copula. Están envueltas en el músculo bulbo-cavernoso y desembocan por separado en la uretra con la que se encuentran en contacto a la altura del estrecho posterior de la pelvis. Tienen una estructura lobulosa y los lóbulos se encuentran divididos por tabiques ricos en tejido conectivo. Su secreción tiene como función limpiar y lubricar la uretra antes de la cópula, con el objetivo de facilitar

el tránsito de los espermatozoides por este segmento que constituye una vía común de los sistemas genital y urinario.

Su desarrollo varía de acuerdo con la especie, siendo más voluminosas en el cerdo, mientras que en el caballo y el toro tienen aproximadamente el tamaño de una nuez, para disminuir proporcionalmente en pequeños rumiantes y en el gato, en tanto que están ausentes en el perro.

5.1.4 Glándulas uretrales de Littre

Son estructuras tubulares localizadas en las invaginaciones de la mucosa de la uretra. En la mujer, las glándulas homologas se denominan “Glándulas de Skene”, cuyo origen embrionario es similar al de la próstata.

Las glándulas de Littre están a su vez constituidas por dos tipos de glándulas: las intra mucosas, que son pequeñas, muy numerosas en la región cavernosa de la uretra y localizadas en la lámina propia; y las extra mucosas, de mayores dimensiones con conductos que suelen abrirse en la uretra formando ángulos agudos. Ambos tipos de glándulas segregan una sustancia mucoide que conjuntamente con la secreción de las glándulas de Cowper tienen la función de limpiar y lubricar la uretra antes del paso de los espermatozoides.

5.1.5 Glándulas Ampulares

La *ampulla* o ampolla del conducto deferente consiste en una zona engrosada de la porción distal de este conducto. El nombre “ampolla” es un tanto incorrecto por cuanto no hay una significativa dilatación de la luz central, si no un aumento del grosor de la pared, causada por una ampliación del espesor de la lámina propia submucosa, la cual adquiere estructuras descritas como glándulas túbulo-alveolares ramificadas, las cuales pueden tener aspecto sacular en los rumiantes.

Las glándulas ampulares secretan un líquido blanco lechoso similar al de las glándulas vesiculares, cuya función no es del todo clara. En los rumiantes, estas glándulas pueden actuar como reservorios de espermatozoides viables, por lo que se puede justificar una función nutritiva para las secreciones ampulares.

Existen variaciones entre especies: equinos, caninos y rumiantes tienen ampollas bien desarrolladas; en los cerdos el desarrollo es pobre y los felinos no la poseen.

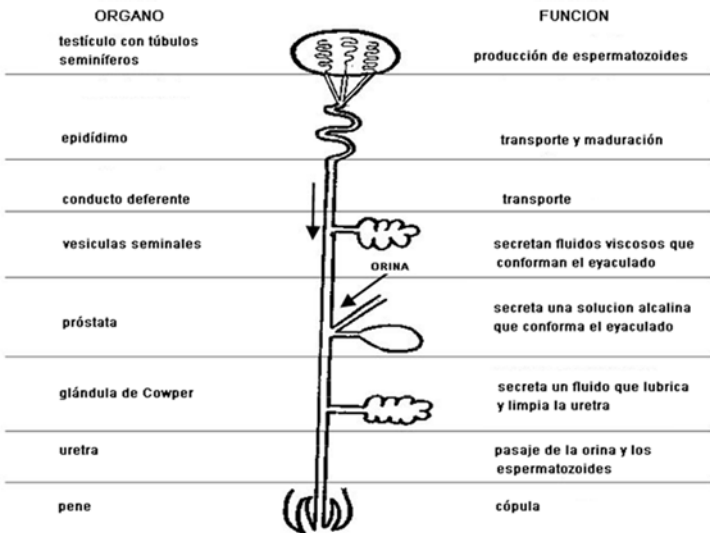


Figura 3. Representación esquemática de la ubicación y función de los órganos del tracto reproductor masculino en los mamíferos. La distribución de los órganos varía con la especie. (Adaptado de http://en.wikibooks.org/wiki/Anatomy_and_Physiology_of_Animals/Reproductive_System, consultado el 15 de junio de 2013).

5.2 Semen

5.2.1 Composición general del semen

El semen en humano es también conocido como fluido seminal y está compuesto en un 10% por espermatozoides y en un 90% por plasma seminal (PS). Este último en mamíferos contiene las secreciones provenientes de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbouretrales o de Cowper y glándulas uretrales), del epidídimo y del conducto deferente. En el caso de animales como rata, ratón, conejo, cobayo y mono, además, poseen la glándula de la coagulación que también libera sus secreciones al plasma seminal.

El plasma seminal está compuesto principalmente por un 75% de agua y solutos que constituyen un medio isotónico, cercano a la neutralidad, en el que la osmolaridad se mantiene gracias a componentes orgánicos. Si bien la composición exacta depende de la especie y, a la vez, ésta cambia luego de la eyaculación, se pueden encontrar electrolitos (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+}), proteínas, péptidos y aminoácidos, carbohidratos (principalmente fructosa), lípidos (fosfolípidos y colesterol) formando microvesículas, prostaglandinas, ácidos (cítrico, piruvico, ascórbico y úrico), carnitina y acetilcarnitina, adrenalina, dopamina, entre otros. Recientemente se reportó también la presencia de RNAs y micro-RNAs extracelulares que provienen de varios órganos del sistema reproductor masculino en concentraciones mayores a las reportadas para otros fluidos biológicos (1.75 mg/L) (Li y col. 2012), cuya función y origen no ha sido completamente elucidada.

5.2.2 Función del fluido seminal

El plasma seminal provee un medio nutritivo y protege a los espermatozoides durante el tránsito de estas gametas a través del tracto reproductor de la hembra: modula la respuesta inflamatoria tras la cópula (suprime la activación del sistema del complemento, la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y la fagocitosis) (Troedsson y col. 2005), sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los PMN que están presentes en el útero. El PS juega un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis 2006), participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática; además de servir como vehículo para los espermatozoides eyaculados (Muiño-Blanco y col. 2008). Dada la composición del semen el mismo tiene pH alcalino y por esta propiedad permite neutralizar el medio ácido (microflora propia que produce ácido láctico) de la uretra y la vagina de la hembra. Las aminas básicas, tales como putrescina, espermina, espermidina y cadaverina (mencionadas en detalle en la próxima sección) contrarrestan el ambiente ácido de la vagina, y protegen el ADN espermático de la posible desnaturalización ácida.

5.2.3 Aportes de órganos y glándulas accesorias al fluido seminal

El testículo de humanos aporta al fluido seminal aproximadamente entre 200 y 500 millones de espermatozoides. Mientras que la contribución de espermatozoides al plasma seminal en ratones es de 10-50, en la rata el eyaculado tiene entre 10-60 millones de espermatozoides por ml (Sherwood

1997, <http://www2.oakland.edu/biology/lindemann/spermfacts.htm> , consultado el 15 de junio de 2013,)

Las glándulas bulbouretrales y uretrales de mamíferos contribuyen al 3-6 % del contenido del semen (Fig. 4). Los compuestos provenientes de estas glándulas son la galactosa, ácido siálico, galactosamina, espermina, la cual tiene actividad antimicrobiana y el mucus, el cual favorece el tránsito de los espermatozoides a través de la vagina y el cérvix mediante la disminución de la viscosidad del tracto reproductor.

Por otro lado, el 25-30% del total del semen es aportado por la próstata (Fig. 4) y consta principalmente de las enzimas fibrinolisisina, pepsinógeno, lisozima, amilasa, hialuronidasa, fosfatasa ácida y el ya mencionado antígeno específico de próstata (PSA), que está involucrado en la catálisis de la reacción bioquímica que provoca la licuefacción del semen coagulado. También forman parte del semen y son de origen prostático el ácido cítrico, fibrinógeno, iones calcio, magnesio y zinc (ayuda a estabilizar el ADN en las células espermáticas).

Por otra parte, los prostasomas son vesículas membranosas que son secretadas por las células epiteliales de la glándula prostática al plasma seminal mediante exocitosis o diacitosis (Ronquist y Brody 1985). Sus membranas lipoproteicas se caracterizan por tener una estructura muy ordenada y fuerte similar a los raft de membrana. Los prostasomas se fusionan a las células espermáticas en el medio ácido de la vagina de la hembra y modifica la composición de la membrana del espermatozoide. Estarían implicados en el aumento de la motilidad de los espermatozoides (Stegmayr y Ronquist 1982; Fabiani y col. 1994 y 1995), la licuefacción del semen (Carlini y col. 1997), la protección contra el ataque de las defensas inmunes de la hembra durante el trayecto del espermatozoide hacia el ovocito. Una amplia variedad de proteínas han sido encontradas en los prostasomas: enzi-

mas, proteínas estructurales y de transporte (actina, profilina y anexinas), proteínas asociadas a transducción de señales (calmodulina, ubiquitina), chaperonas, ATPasas (permiten el transporte de calcio hacia el interior de los prostasomas), proteína kinasa, fosfatasa, fosfodiesterasa, PSA, entre otras.

El aporte de la vesícula seminal al semen es del 60-75% de la composición total del fluido seminal (Fig. 4). Entre los componentes de mayor importancia se mencionan: aminoácidos, citrato, flavinas, vitamina C, fructosa, fosforilcolina, prostaglandinas, las cuales están involucradas en la supresión de la respuesta inmune desencadenada por la hembra cuando el semen atraviesa el tracto reproductor de la hembra (Remes Lenicov 2012). Las prostaglandinas también influyen sobre el tránsito de los espermatozoides en el tracto reproductor masculino y femenino facilitando el movimiento de los espermatozoides, ayudando a la contracción del musculo liso del útero y disminuyendo la viscosidad del moco del cérvix; además de intervenir en la implantación del óvulo fertilizado. También forman parte del semen, proteínas provenientes de las vesículas seminales, muchas de las cuales se unen a la superficie espermática. Las proteínas secretadas por las vesículas seminales se pueden clasificar de acuerdo a su función en:

- Proteínas de transporte: transferrina lactoferrina, etc.
- Proteínas estructurales: semengolina y fribronectina
- Proteínas decapacitantes
- Proteínas inmunosupresoras: translutaminasa, lactoferrina, prostaglandinas
- Enzimas: anhidrasa carbonica, n-acetilglucosaminidasa, 5'-nucleotidasa, proteasas, fosfatasa, kinasas, serina proteasas
- Inhibidores de enzimas: inhibidores de proteasas
- Antioxidantes, que protegen al espermatozoide en el eyaculado de las especies reactivas de oxígeno

Además de las proteínas incluidas en esta clasificación, en ratones se han reportado proteínas secretorias de la vesícula (SVS I a VII), espermadhesinas (proteínas de unión a heparina) y proteínas que contienen dominios de fibronectina II, denominadas BSP (por Bovine Seminal Plasma donde se encontraron por primera vez). Estas últimas tienen la capacidad de interactuar con fosfatidilcolina de la superficie espermática, con lipoproteínas (de alta y baja densidad) y con heparina. Estas características les confieren a las BSPs la capacidad de participar en la desestabilización y la estabilización de la membrana espermática. Las BSP son ubicuas en el plasma seminal de mamíferos y están funcionalmente relacionadas con la capacitación. En cuanto a las espermadhesinas se conoce que interactúan con fosfatidiletanolamina de la membrana espermática, liberándose durante la capacitación, lo cual podría servir para el reconocimiento espermato-cito-ovocito.

Las secreciones provenientes de la vesícula seminal contribuyen a la funcionalidad de los espermatozoides, como es la coagulación del semen dentro de los primeros cinco minutos. La formación del coágulo ayuda a mantener al semen en la vagina. Luego el semen se licua formando un líquido viscoso (cinco a veinte minutos) y permite que los espermatozoides puedan avanzar hacia ovocito.

En el caso de los roedores, como ratas, ratones y cobayos, el plasma seminal cuenta además con secreciones proteicas de la glándula coagulante o lóbulo anterior de la próstata (estructura muy desarrollada en la rata) que está localizada en la parte ventral de las vesículas seminales y adosada a ellas. La misma secreta al semen principalmente dos proteínas, una de ellas una transglutaminasa conocida como vesiculasa (Groos y col., 1999). La importancia de esta proteína es que junto a otras proteínas de las secreciones provenientes de la vesícula seminal permite, al momento de

la expulsión del eyaculado, la coagulación del semen formando el ya mencionado tapón vaginal en la hembra, evitando el escurrimiento del semen por la misma, facilitando el pasaje de los espermatozoides a través del cérvix uterino y evitando que pueda ser fecundada por otro macho. Se ha demostrado una homología entre el lóbulo medio de la próstata en humanos y la glándula coagulante del ratón.

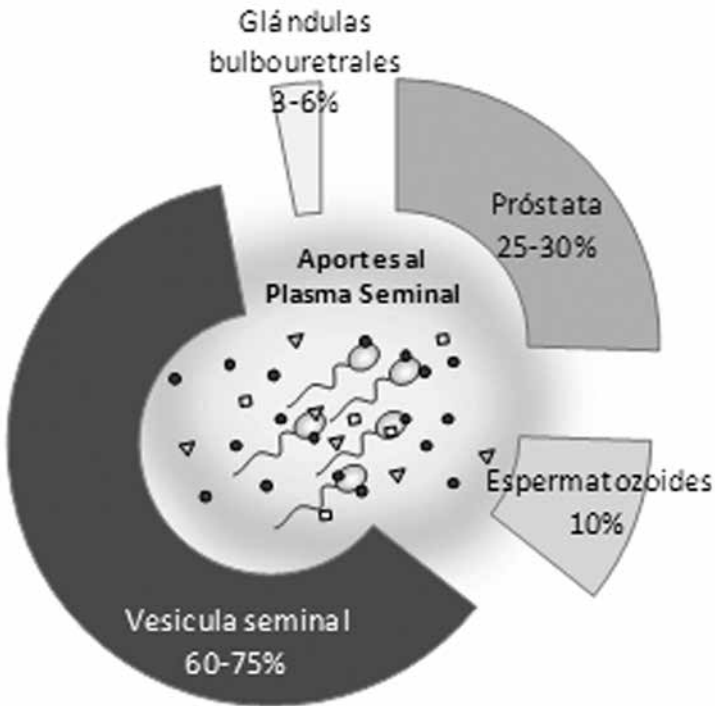


Figura 4. Aporte al plasma seminal de componentes provenientes de órganos y glándulas accesorias.

5.2.4 Características generales del eyaculado

El volumen promedio de semen de una eyaculación en humanos es de 1,5 a 5 mililitros. Cuando el volumen es constantemente menor a 1,5 ml se da una condición de hipospermia, y cuando es frecuentemente mayor a 5,5 ml la condición se conoce como hiperspermia. La variación en el volumen depende de la abstinencia sexual previa y del nivel de excitación durante la actividad sexual. El color del semen en los mamíferos en general es normalmente blancuzco o levemente amarillento, por las flavinas provenientes de la vesícula seminal.

Según la Organización Mundial de la Salud se considera normal a aquel semen humano que cumpla con los siguientes parámetros: volumen entre 2 ml a 5 ml, pH de 7.2 a 8.0, concentración mínima de espermatozoides de 15×10^6 espermatozoides/ml, es decir un total mayor a 40×10^6 espermatozoides por eyaculado, movilidad total mayor al 40% (motilidad progresiva + no progresiva), motilidad lineal progresiva de al menos el 32% (medido dentro de los 60 minutos tras haber colectado la muestra), y viabilidad (espermatozoides vivos) no inferior al 75%. Al menos el 58% de los espermatozoides debe mostrar una morfología normal. Niveles normales de fructosa son de alrededor de 13 μmol por muestra y la licuefacción completa del semen debe efectuarse dentro de los primeros 60 minutos.

Los factores que pueden causar infertilidad en el macho son: la baja calidad del semen (bajo número de espermatozoides, baja movilidad de los mismos, espermatozoides con morfología anormal), las anomalías estructurales (eyaculación retrógrada, bloqueo o extracción de los testículos u otras estructuras reproductivas pueden tener efecto negativo sobre la fertilidad), desequilibrios hormonales que podrían interferir con la producción de espermatozoides, trastornos genéticos, sedentarismo, diabetes, entre otros.

5.2.5 Avances en la utilización de plasma seminal para mejorar la calidad del semen congelado en especies de interés pecuario

Federico Andrés Hozbor y Alba Verónica Ledesma

En los últimos años, se ha prestado especial interés en la capacidad del plasma seminal (PS) para modular la aptitud fertilizante de los espermatozoides, y cómo se relacionan con los procesos asociados a la biotecnologías reproductivas. Uno de los problemas que se ha abordado, está relacionado con la sobrevivencia y funcionalidad de los espermatozoides luego de la congelación. Durante la criopreservación, las gametas masculinas deben enfrentar tres puntos críticos: 1) el descenso de temperatura, 2) el incremento en la osmolaridad de los medios intra y extracelulares, y 3) la formación y disolución de cristales de hielo (Watson 2000).

El primer obstáculo para el espermatozoide tiene lugar durante la etapa de enfriamiento, particularmente entre los 5 y 20 °C, y se lo conoce como “estrés por frío” o “cold shock”. En condiciones fisiológicas, la membrana plasmática del espermatozoide responde al modelo del mosaico fluido, pero a medida que desciende la temperatura, sus fosfolípidos cambian de fase líquido/cristalino a gel, tomando una disposición más compacta. Esto ocasiona una alteración de la arquitectura de la membrana, formándose microdominios lipídicos con una estructura de “no bicapa” y ambientes modificados de proteínas (Watson 2000; Loomis 2011). Como consecuencia de ello, la permeabilidad de la membrana al agua y a los solutos se ve alterada, generándose un flujo de calcio hacia el interior de la célula. Esto desencadena una cascada de señalización característica de la capacitación normal (Bailey y col. 2000) que conduce a la reacción acrosomal y una rápida

muerte celular (Cormier y col. 1997; Gillan y Maxwell 1999; Loomis 2011). La composición lipídica de la membrana varía entre especies, y esto determina que respondan de diferente manera al estrés por frío (Holt 2000), siendo más sensibles aquellas cuyas membranas tengan bajo contenido de colesterol y mayor relación de ácidos grasos poliinsaturados/saturados (ejemplos: toro, carnero vs. conejo y hombre) (Bailey y col. 2000).

Los trabajos de Chang (1951; 1957), en los que se demostró que el PS puede revertir el estado de capacitación espermática, sirvieron de base a una serie de investigaciones orientadas a estudiar el rol del PS sobre la estabilización de las membranas espermáticas, así como en la identificación y aislamiento de dichos factores. Se han elegido como modelos biológicos a los espermatozoides de cerdos y ovinos, por ser más sensibles al estrés por frío. En los párrafos siguientes haremos hincapié en los trabajos realizados en espermatozoides de carneros, destacando similitudes y diferencias con otras especies domésticas.

Rol de las proteínas del plasma seminal

Numerosos trabajos han demostrado que el PS reduce la pérdida de viabilidad y movilidad espermática que ocurren durante las etapas de dilución (Pursel y col. 1973) y refrigeración en la criopreservación (Catt y col. 1997; Barrios y col. 2000). Esto se debería a que en ambos pasos del proceso se produce una desestabilización de las membranas (Maxwell y Johnson 1999). Uno de los componentes mayoritarios del PS son las proteínas y han sido indicadas como responsables de revertir (Ashworth y col. 1994; Maxwell y Johnson 1999; Barrios y col. 2000) o prevenir (Pérez-Pe y col. 2001) los daños ocasionados durante la criopreservación. La capacidad del PS para revertir los daños ocasionados por el frío, acompaña la

estacionalidad reproductiva propia del ovino, el cual se ve reflejado en su perfil proteico (Pérez-Pe y col. 2001; Domínguez y col. 2008). En estos trabajos se observó que un grupo de proteínas del PS se incrementaba en la estación reproductiva (otoño).

Se han identificado varias proteínas de bajo peso molecular (5-22 KDa) con capacidad de revertir los daños ocasionados por el estrés por frío (Barrios y col. 2005; Domínguez y col. 2008). En carneros han sido estudiadas las RSVP14 y RSVP20, de 14 y 20 KDa respectivamente, clasificadas dentro de las fibronectinas con dominio tipo II (Fn-2) (Caballero y col. 2012) y sintetizadas exclusivamente en las vesículas seminales (Fernandez-Juan y col. 2006). Las Fn-2 fueron descritas por primera vez en bovinos, por lo que comúnmente se las conocía como proteínas BSP (bovine seminal plasma) (Caballero y col. 2012). Proteínas homólogas han sido identificadas en el plasma seminal de porcinos (Sanz y col. 1993; Calvete y col. 1997), equinos (Menard y col. 2003), bovinos (Manjunath y col. 2002), caprinos (Villemure y col. 2003), y ovinos (Bergeron y col. 2005; Jobin y col. 2005; Bernardini y col. 2009). Actualmente las siglas BSP han sido redefinidas como “binder seminal plasma” para incluir en esta familia de proteínas a las de todos los mamíferos (Leahy y Graaf 2012). Nuestros trabajos (Bernardini y col. 2011) determinaron en ovinos que además de RSVP20, hay otro grupo de proteínas (lactoferrina, proteína secretoria del epidídimo E1 y SNAP-29) con capacidad de revertir los daños de membrana en espermatozoides criopreservados. Contrariamente, en bovinos, se determinó que las BSP favorecen la capacitación. Esto sería posible debido a su afinidad por la heparina y lipoproteínas de alta densidad (reconocidos factores capacitantes), y su efecto estimulante sobre el eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática (Manjunath y Thérien 2002).

En conejos, la adición de PS posdescongelación, mejoró la motilidad y la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides criopreservados (Bernardini y col. 2009b). Al igual que en el ovino, los perfiles proteicos del PS mostraron variación estacional, tanto en la proporción relativa de proteínas analizadas según su peso molecular como en la abundancia de proteínas individuales (Bernardini y col. 2010).

Por otro lado, el plasma seminal del macho caprino contiene fosfolipasas (EYCE y SBUII) sintetizadas en las glándulas bulbouretrales. Estas enzimas hidrolizan la lecitina de la yema de huevo (presente en los diluyentes seminales) en ácidos grasos y lisolecitina, que alteran la membrana plasmática de los espermatozoides induciendo la reacción acrosómica y la decondensación de la cromatina (Purdy 2006). Por lo tanto, para criopreservar semen caprino se debe proceder a la eliminación del PS mediante lavados o emplear diluyentes a base de lecitina de soja.

Rol de los lípidos del plasma seminal

Los lípidos como colesterol, esteroides análogos y ciertos fosfolípidos, podrían ser considerados componentes crioprotectores naturales del plasma seminal. Sin embargo, es limitada la información disponible sobre la función potencialmente protectora del componente lipídico del plasma seminal. Bernardini (2008) halló que en ovinos, los fosfolípidos mayoritarios (fosfaditilcolina, fosfaditilserina, fosfatidiletanolamina), fosfatidilinositol y colesterol del PS disminuían después de la estación reproductiva (otoño). En bovinos, el colesterol presente en PS está asociado a la calidad espermática, con una significativa variación estacional (Beer-Ljubić y col. 2009).

Si bien no es el tema de este apartado, podemos mencionar que se han realizado trabajos usando lípidos exógenos (principalmente colesterol) para modificar la fluidez de la membrana y disminuir los daños ocasionados por el estrés por frío a través del uso de β -ciclodextrinas (He y col. 2001; Purdy y Graham 2004; Moore y col. 2005; Moce y col. 2010). Recientemente se ha demostrado que el agregado de colesterol o colestanol a las membranas de espermatozoides mejora la supervivencia espermática posdescongelación en toro (Moraes y col. 2010), carneros (Mocé y col. 2010) y padrillos (Moore y col. 2005). Sin embargo, todavía no se han realizado estudios de fertilidad *in vivo*.

Plasma Seminal y fertilidad de espermatozoides criopreservados

Los estudios sobre fertilidad *in vivo* realizados con espermatozoides criopreservados tratados con PS son escasos y contradictorios. Maxwell y Evans (1999) y McPhie y col. (2000), reportaron que en ovinos la adición de PS a espermatozoides congelados/descongelados y depositados en el cuello uterino, incrementó las tasas de gestación. Estos resultados se contraponen con los de O' Meara y col. (2007), quienes no hallaron diferencias en la tasa de preñez. En aquellos trabajos donde se reportó un efecto positivo sobre la fertilidad, se eliminó el diluyente antes de agregar el PS. Esto nos hace pensar que podría producirse algún tipo de competencia por los sitios de unión en la superficie espermática.

En conejos, el incremento de la viabilidad y movilidad espermática observado *in vitro*, no se vio reflejado en la funcionalidad espermática. Los estudios sobre fertilidad y prolificidad *in vivo* con espermatozoides incubados posdescongelación con 10% de PS homólogo (de la misma especie),

evidenciaron un efecto negativo del PS sobre los dos parámetros (Gómez Vítolo 2012). Algo similar ha sido reportado en cerdos, donde la suplementación con 10% de PS revirtió la capacitación en espermatozoides criopreservados, pero no incrementó el número de gametas masculinas en los reservorios útero-tubáricos ni la tasa de pariciones (Kirkwood y col. 2008).

Debemos tener presente que en los eyaculados coexisten subpoblaciones espermáticas que poseen diferentes estados de maduración, capacitación y edad (Abaigar y col. 1999; Muiño Otero 2008) y que esta heterogeneidad se reduce durante la criopreservación (Ollero y col. 1997). Pensamos que los factores capacitantes y decapitantes del PS pueden jugar un papel decisivo en la fertilidad del semen, a través de la regulación de las subpoblaciones espermáticas. Evidentemente, al perderse la heterogeneidad espermática durante la criopreservación, modificamos la capacidad de regulación del PS. Esto nos obliga a trabajar en la identificación de la acción de cada componente para posteriormente poder manipular la sobrevida y funcionalidad espermática.

Reconocimiento: *Una gran parte de la investigación de nuestro laboratorio ha sido financiada por los proyectos PIP-CONICET 114-201001-00273, 112-200801-00232 y EXA 566/12.*

Referencias

Abaigar, T.; Holt, W.V.; Harrison, R.A.P.; del Barrio, G. (1999). "Sperm Subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) Semen as Revealed by Pattern Analysis of Computer-Assisted Motility Assessments". *Biology of Reproduction*. 60: 32–41.

Ashworth, P.J.; Harrison, R.A.; Miller, N.G.; Plummer, J.M.; Watson, P.F. (1994). "Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma". *Reprod Fertil Dev*. 6(2), 173-80.

Aumüller, G.; Wilhelm, B.; Seitz, J. (1999). "Apocrine secretion--fact or artifact?". *Ann Anat*. 181(5), 437-46.

Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F.; Cormier, N. (2000). "Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon". *Journal of Andrology*. 21 (1), 1-7.

Barrios, B.; Fernández-Juan, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2005). "Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock". *J. Androl*. 26(4), 539-49.

Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tatoo, A.; Osada, J.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2000). "Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane". *Biol Reprod*. 63:1531-1537.

Beer-Ljubić, B.; Aladrović, J.; Marenjak, T.S.; Laskaj, R.; Majić-Balić, I.; Milinković-Tur, S. (2009). "Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation". *Theriogenology*. 72(8), 1132-40.

Bergeron, A.; Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2005). "Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma". *Mol. Reprod. Dev*. 71, 461–470.

Bernardini A.; Hozbor F.; Sanchez E.; Fornés M.W.; Alberio R. H.; Cesari A. (2011). "Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage". *Theriogenology*. 76(3), 436-47.

Bernardini, A. L.; Hozbor, F.; Alberio, R.; Fornés, M. y Cesari, A. (2008). "Efecto de proteínas del plasma seminal sobre la motilidad y ultraestructura de espermatozoides de carnero postdescongelación". *Actas de LIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)*, 19 al 22 de noviembre (pp 191). *Medicina Vol 68 Supl II*, Mar del Plata, Argentina.

Bernardini, A.; Cesari, A.; Alberio, R.; Hozbor, F. (2010). "Seasonal study of the protein profile of seminal plasma from Californian and New Zealand white breed rabbits". *Acta del 4th Congreso de Cunicultura de las Américas*. Del 22 al 24 de septiembre. Córdoba, Argentina.

Bernardini, A.; Hozbor, F.; Manes, J.; Ríos, G.; Sánchez, E.; Alberio, R. y Cesari, A. (2009). "Efecto de proteínas del plasma seminal en la motilidad y fertilidad de espermatozoides ovinos crioconservados". *Acta de 6tas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica*. 14 al 15 de agosto. Mar del Plata, Argentina.

Bernardini, A.; Manes, J.; Ríos, G.; Alberio, R. y Hozbor, F. (2009b). "Efecto del diluyente y del agregado de plasma seminal sobre espermatozoides de conejo crioconservados". *Acta de 6tas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica*. 14 al 15 de agosto. Mar del Plata, Argentina

Burroughs, C.A.; Graham, J.K.; Lenz, R.W.; Seidel, G.E. Jr. (2013). "Seminal plasma effects on sex-sorting bovine sperm". *Theriogenology*. 79(3), 551-7.

Caballero, I.; Parrilla, I.; Almiñana, C.; del Olmo, D.; Roca, J.; Martínez, E.A.; Vázquez, J.M. (2012). "Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies". *Reprod. Domest. Ani*. 47(3), 12-21.

Calvete, J.; Sanz L.; Reinert, M.; Dostalova, Z.; Töpfer-Petersen E. (1995). "Heparin-binding proteins on bull, boar, stallion, and human spermatozoa. Advances in spermatozoa phylogeny and taxonomy". Paris: Mém. Mus. Natn, His nat. 515-524.

Carlini, E.; Palmerini, C.; Cosmi, E.; Arienti, G. (1997). "Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity". Arch. Biochem. Biophys. 343, 6-12.

Catt, S.L.; O'Brien, J.K.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1997). "Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry". Reprod Domest Anim. 32, 251-258.

Chang, M.C. (1957). "A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm". Nature. 179, 258 – 259.

Chang, M.C. (1951). "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited inThe fallopian tubes". Nature. 168, 697-698

Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L. (1997). "Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation". J Androl. 18(4), 461-468.

Domínguez, M.P.; Falcinelli, A.; Hozbor, F.; Sanchez, E.; Cesari, A.; Alberio, R.H. (2008). "Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm". Theriogenology. 69, 564–573.

Fabiani, R.; Johansson, I.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. (1994). "Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings". Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 57, 181-188.

Fabiani, R.; Johansson, L.; Lundkvist, O.; Ronquist, G. (1995). "Prolongation and improvement of prostatic promotive effect on sperm forward motility". Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 58, 191-198.

Fernández-Juan, M.; Gallego, M.; Barrios, B.; Osada, J.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiñoblanco, T. (2006). "Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract". *Reproduction*. 132, 721-732.

Gillan, L.; Maxwell, W. (1999). "The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract". *J Reprod Fertil*. 54(1), 271-283.

Gomez Vítolo, M.A. (2012). "Calidad seminal de espermatozoides criopreservados de conejo incubados con plasma seminal homólogo". Tesis de licenciatura. FCEyN (UNMdP).

Groos, S.; Wilhelm, B.; Renneberg, H.; Riva, A.; Reichelt, R.; Seitz, J.; Aumüller, G. (1999). "Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland". *Cell Tissue Res*. 295(3), 495-504.

He, L.; Bailey, J.L.; Buhr, M.M. (2001). "Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential". *Biol Reprod*. 64, 69-79.

Holt, W.V. (2000). "Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences". *Theriogenology*. 53, 47-58.

Kirkwood, R.N.; Vadnais, M.L.; Abad, M. (2008). "Practical application of seminal plasma". *Theriogenology*. 70 (8), 1364-7.

Leahy, T.; de Graaf, S. (2012). "Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during Processing". *Reprod Domest Anim*. 47 (4), 207-13.

Li, H.; Huang, S.; Guo, C.; Guan, H.; Xiong, C. (2012) "Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms". *PLoS One*. 7(4), e34566.

Loomis, P.R. (2006) "Advanced methods for handling and preparation of stallion semen". *Vet Clin North Am Equine Pract*. 22(3), 663-76.

Loomis, P.R. (2011). "Response of Spermatozoa to Cooling and Theory of Cell Damage". Actas del XVII Congreso Internacionales SIVE, Palacongressid' Abruzzo, Montesilvano (PE). Italy. Del 4-6 Febbraio.

Manjunath, P.; Thérien, I. (2002). "Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation". J Reprod. Immunol. 53(1-2), 109-19.

Maxwell, W. M.; Evans, G.; Mortimer, S.T.; Gillan, L.; Gellatly, E.S.; McPhie, C.A. (1999). "Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma". Reprod Fertil Dev. 11(2), 123-6.

Maxwell, W.M.; Johnson, L.A. (1999). "Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma". Theriogenology. 52, 1353-1362.

McPhie, C.; Evans G.; Maxwell W.M.C. (2000). "Effect of supplementation of fresh and frozen-thawed semen with seminal plasma on fertility of ewes after cervical and intrauterine insemination". Actas del 14 th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm 2

Menard, M.; Nauc, V.; Lazure, C.; Vaillancourt, D.; Manjunath, P. (2003). "Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid". Mol Reprod Dev. 66(4), 349-57.

Moce, E.; Purdy, P.H.; Graham, J.K. (2010). "Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival". Anim Reprod Sci. 118, 236-247.

Moore, A.I.; Squires, E.L.; Graham, J.K. (2005). "Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival". Cryobiology. 51 (3), 241-9.

Moraes, E.A.; Graham, J.K.; Torres, C.A.; Meyers, M.; Spizziri B. (2010). Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod.* 118, 148– 154.

Muiño Otero, R. (2008). “Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas”. Tesis de Doctorado, Universidade de Santiago de Compostela, Facultade de Veterinaria, Departamento de Patoloxía Animal: Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. ISBN: 978-84-9750-988-6.

Muiño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A.(2008). “Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress”. *Reprod Domest Anim.* 43 (4), 18-31.

O’Meara, C.M.; Donovan, A.; Hanrahan, J.P.; Duffy, P.; Fair, S.; Evans, A.C.O.; Lonergan, P. (2007). “Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes”. *Theriogenology.* 67 (7), 1262-1268.

Ollero, M.; Cebrian-Perez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (1997). “Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma”. *Journal of Andrology.* 18 (6), 732-739.

Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56: 425-434.

Purdy, P.H. (2006). “A review on goat sperm cryopreservation”. *Small Ruminant Research.* 63, 215–225.

Purdy, P.H.; Graham, J.K. (2004). “Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm”. *Cryobiology.* 48(1), 36-45.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L. (1973). “Effect of Dilution, Seminal Plasma and Incubation Period on Cold Shock Susceptibility of Boar Spermatozoa”. *J Anim.Sci.* 37, 528-531.

Remes Lenicov, F.; Rodriguez Rodrigues, C.; Sabatté, J.; Cabrini, M.; Jancic, C.; Ostrowski, M.; Merlotti, A.; Gonzalez, H.; Alonso, A.; Pasqualini, R.A.; Davio, C.; Geffner, J.; Ceballos, A. (2012). "Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells". *J Immunol.* 189(10), 4777-86.

Ronquist, G.; Brody, I. (1985). "The prostasome: its secretion and function in man". *Biochim Biophys Acta.* 822(2), 203-18.

Rugh, R. (1990). *The Mouse: its reproduction and development.* Oxford University Press. USA.

Sanz, L.; Calvete, J.J.; Mann, K.; Gabius, H.J.; Topfer-Petersen, E. (1993). "Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for sperm adhesins in fertilization". *Mol. Reprod. Dev.* 35(1), 37-43.

Sherwood, L. (1997). "Human physiology: from cells to systems". Belmont, CA Wadsworth Pub. Co en "Mechanisms of Sperm Motility, Dr. Charles Lindemann" [en línea]. Consultado el 15 de junio de 2013 en <http://www2.oakland.edu/biology/lindemann/spermfacts.htm>.

Stegmayr, B.; Ronquist, G. (1982). "Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomas". *Urol Res.* 10(5), 253-257.

Suarez, S.S. "Gamete and Zygote Transport". In: Neill, J.D. editor. (2006). *Physiology of Reproduction.* San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 113-145.

Troedsson, M.H.; Desvousges, A.; Alghamdi, A.S.; Dahms, B.; Dow, C.A.; Hayna, J.; Valesco, R.; Collahan, P.T.; Macpherson, M.L.; Pozor, M.; Buhi, W.C. (2005). "Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination". *Anim. Reprod. Sci.* 89(1-4), 171-86.

Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. (2003). "Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma". *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 39.

Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Animal Reproduction Science.* 60–61, 481–492.