



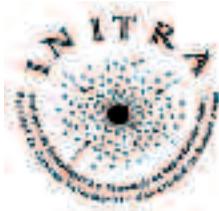
UBA
Universidad de Buenos Aires

SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.
www.fvet.uba.ar



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires



VITRIFICACIÓN: ¿UNA NUEVA ALTERNATIVA DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA?

Arraztoa, C.C. y Neild, D.M. Cátedra de Teriogenología - INITRA

Introducción

La criopreservación es ampliamente utilizada como un método de almacenamiento de diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo gametos femenino, masculino y embriones⁽⁶⁾. Los primeros intentos exitosos de criopreservar espermatozoides se remontan a las décadas de 1930 y 1940 y desde entonces, espermatozoides de diferentes especies mamíferas, en especial la bovina y la humana, han sido criopreservados satisfactoriamente⁽¹³⁾. La criopreservación de espermatozoides es un recurso importante para la conservación y el comercio de material genético⁽¹²⁾, facilita la distribución de genes deseables, debido a la facilidad de su transporte y permite el control de la transmisión de ciertos patógenos⁽⁹⁾. Además, contribuye a la conservación de especies en peligro de extinción y ayuda a superar problemas de infertilidad⁽¹⁷⁾. Sin embargo, el método convencional de congelación espermática puede producir daño mecánico a la célula como consecuencia de la formación de cristales extra e intracelulares y/o daño osmótico debido a la gran deshidratación. También puede provocar daños químicos y físicos en las membranas espermáticas por los cambios ocasionados en los lípidos durante los eventos de transición de fase o aumentos en la peroxidación de los mismos⁽⁷⁾, aunque el alcance de estos efectos varía según la especie⁽¹²⁾. Ante la problemática expuesta, la vitrificación se presenta como una alternativa para evitar los daños durante el enfriamiento y la formación de cristales que suceden durante el congelamiento profundo⁽¹¹⁾. La vitrificación es un proceso mediante el cual el líquido pasa al estado vítreo o sólido sin la formación de cristales de hielo⁽¹⁰⁾. Más aun, es un procedimiento simple que requiere menor tiempo y tiene mayor costo-beneficio que la congelación convencional, ya que no necesita un equipo costoso ni un operador altamente capacitado para ejecutarla y tanto el proceso de vitrificación como el de atemperado se realizan en segundos⁽¹⁶⁾. Desde el primer informe

exitoso de vitrificación de embriones de ratón⁽¹⁴⁾, la técnica ha sido extensamente estudiada y aplicada con éxito en gametos femeninos y embriones de diferentes mamíferos, incluyendo al hombre. Sin embargo, este método no pudo extrapolarse de forma directa a los gametos masculinos, debido a la sensibilidad osmótica que presentan los espermatozoides mamíferos al ser expuestos a las altas concentraciones de crioprotectores utilizadas en la vitrificación convencional⁽⁷⁾. Dicha exposición provocaría un efecto osmótico deletéreo⁽¹⁶⁾, produciendo toxicidad y posibles alteraciones químicas en los espermatozoides⁽⁵⁾. Esto llevó a la idea de explorar métodos de vitrificación que no demandaran altas concentraciones de crioprotectores potencialmente tóxicas para el espermatozoide mamífero. Tres factores afectan el proceso de vitrificación: la velocidad de enfriamiento, la viscosidad y el volumen de la muestra. Aumentando la viscosidad de la muestra o la velocidad de enfriamiento o disminuyendo el volumen de la muestra, aumentan las probabilidades de éxito durante el proceso de vitrificación⁽¹⁾. Surgió entonces la alternativa de vitrificar espermatozoides utilizando velocidades de enfriamiento y atemperado muy rápidas, en un tamaño de muestra muy pequeño para evitar así las elevadas concentraciones de crioprotectores⁽⁵⁾. En base a esto, se ha desarrollado una nueva técnica de vitrificación en espermatozoides humanos, prescindiendo del uso de crioprotectores y sumergiendo la muestra de semen mejorada, directamente en el nitrógeno líquido^(6, 13) utilizando así tasas de enfriamiento muy altas⁽⁵⁾. Por otro lado, un atemperado incorrecto puede asimismo disminuir la supervivencia de los espermatozoides al proceso⁽⁹⁾, por lo tanto este paso debe realizarse también de forma ultrarrápida.

Nuestra experiencia

El Instituto INITRA cuenta en la actualidad con un Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT: 2013-0725): "Aspectos morfo-

lógicos, bioquímicos y funcionales de las gametas porcinas sometidas a procesos de criopreservación: *indicadores de competencia*", donde uno de sus objetivos se centra en evaluar, a través de parámetros bioquímicos, morfológicos y funcionales, la viabilidad de espermatozoides porcos vitrificados. Hasta el momento se ha ensayado la vitrificación de espermatozoides porcos en presencia y ausencia de crioprotectores permeables (4% de DMF o glicerol), utilizando como medio base sin crioprotector el medio Tyrode Albumin Lactate Pyruvate (TALP). Se han vitrificado espermatozoides con el método de cryoloop⁽⁶⁾ (Figura 1) y con el método de esferas⁽⁸⁾ (Figura 2), a una concentración espermática de 20 y 5 x 10⁶ esp./ml, respectivamente.

Figura 1. A) Muestra de 20 µl de semen cargada en un cryoloop. B) Cryoloops de cobre y criovial.

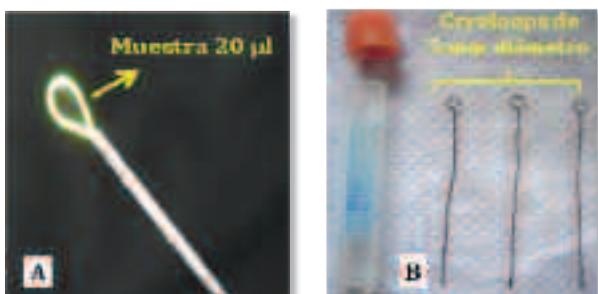
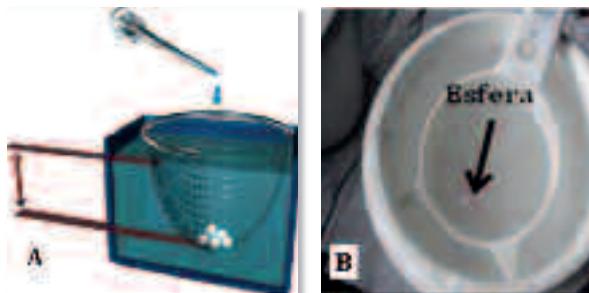


Figura 2. A) Esquema de vitrificación en esferas⁽⁸⁾. B) Foto de esfera intercambiando calor con el nitrógeno líquido.



Las muestras se conservaron en crioviales un mínimo de 24 h hasta su atemperado y evaluación. Para vitrificar, se utilizó semen porcino fresco y semen conservado a 17°C, luego de ser mejorado por filtración a través de lana de vidrio. Se ensayaron dos tipos de atemperado: una forma rápida, sumergiendo el cryoloop o la esfera directamente en medio TALP a 37°C durante 30 seg, y una forma ultrarrápida, sumergiendo la muestra en medio TALP a 75°C durante 7 seg, seguido de 30 seg a 37°C, aplicando en ambos casos una suave agitación durante el proceso. Los parámetros seminales evaluados en las muestras vitrificadas y previas a vitrificar fueron: movilidad progresiva (utilizando platina térmica y microscopio de contraste de fase), viabilidad



COMPAÑIA FARMACEUTICA

BIOLOGICOS FARMACOS



Etica, calidad y prestigio en Medicina Veterinaria

Planta Santa Fe: Balcarce 951 - Tel. Fax (0342) 4538777 - 4556773 - (3000) Santa Fe - Argentina
 Planta La Plata: Ruta 36 esquina 78 - Tel. (0221) 4962392 - (1901) Lisandro Olmos - Buenos Aires - Argentina
 E-mail: allignanihnos@ciudad.com.ar - Web: www.allignanihnos.com.ar

Linea REPRODUCTIVA

Estradiol 10



Estradiol 17β



Progesterona



OXITOCINA



GnRH



Prostaglandina



Progesterona MAD-4



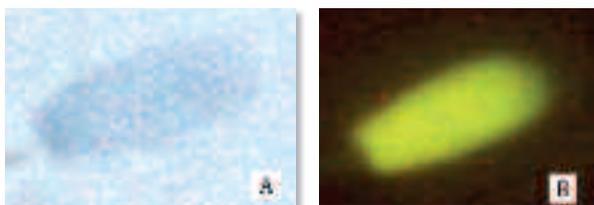
Tricovac



CALIDAD Y RESPONSABILIDAD QUE MARCAN DIFERENCIAS

espermática (tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e Ioduro de propidio-CFDA/PI), funcionalidad de membrana (prueba hipoosmótica-HOS), integridad acrosomal (fijación de la muestra en solución salina formolada y microscopio de contraste de fase), condensación de la cromatina espermática (tinción de azul de toluidina-AT) y la susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización ácida (tinción de naranja de acridina-NA) (Figura 3). Se aplicó un test de Friedman para el análisis estadístico, considerando significativo un P valor $< 0,05$ ⁽²⁾.

Figura 3. A) Espermatozoide porcino con ADN condensado (AT). B) Espermatozoide porcino con cromatina intacta no desnaturalizada (NA).



Los resultados obtenidos indican que los únicos parámetros seminales que no presentaron diferencias significativas en las muestras de semen porcino vitrificadas-atemperadas con respecto a las muestras previas a vitrificar, fueron la condensación e integridad de la cromatina espermática. La vitrificación no conservó las variables espermáticas de movilidad, viabilidad, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal. Según los resultados obtenidos, la vitrificación de muestras de semen fresco porcino conservaría mejor la calidad de la cromatina espermática que la vitrificación a partir de semen porcino conservado a 17°C. La vitrificación con el método de esferas en medio sin crioprotectores no solo conservaría la calidad de la cromatina espermática sino que también permitiría obtener células vivas, aunque en una pequeña proporción. El atemperado a 37°C durante 30 seg, permitiría obtener espermatozoides con mejor calidad de la cromatina espermática, además de ser un método más práctico y sencillo⁽²⁾. Resultados semejantes se han obtenido al vitrificar espermatozoides de Lama glama⁽³⁾, de equinos⁽⁴⁾ y de conejo⁽¹⁵⁾.

Los resultados obtenidos representan los primeros reportes en vitrificación espermática porcina y constituyen un paso más en el camino hacia el desarrollo de una metodología simple y económica en la conservación de gametos masculinos de esta especie. La vitrificación en esferas, sin presencia de crioprotectores surge entonces como una nueva técnica de criopreservación espermática en porcinos, capaz de conservar células con una cromatina condensada e intacta. Al mantener la calidad del ADN, dichas células podrían conservar la capacidad de producir cigo-

tos porcinos *in vitro* mediante la aplicación de la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI), biotecnología que no precisa muestras de concentración, morfología o movilidad espermáticas determinadas, sino un núcleo espermático genéticamente intacto⁽¹⁸⁾.

Bibliografía

1. Arav A., Yavin S., Zeron Y., Natan D., Dekel I., Gacitua H. 2002. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 77-81.
2. Arraztoa C., Miragaya M., Pendola C., Gambarotta M., Neild D.M. 2012 a. *InVet*, 14(2): 254.
3. Arraztoa C., Miragaya M., Carretero M.I., Santa Cruz R., Gambarotta M., Neild D. 2012 b. *InVet*, 14(2): 253.
4. Baca Castex, C.; Arraztoa, C.; Miragaya, M. 2014. *InVet*, en prensa.
5. Isachenko E., Isachenko V., Katkov I., Dessole S., Nawroth F. 2003. *Reproductive BioMedicine Online*, 6: 191-200.
6. Isachenko E., Isachenko V., Katkov I., Rahimi G., Schöndorf T., Mallmann P., Dessole S., Nawroth F. 2004a. *Human Reproduction*, 19 (4): 932-939.
7. Isachenko V., Isachenko E., Katkov I., Montag M., Dessole S., Nawroth F., Van der Ven H. 2004b. *Biology of Reproduction*, 71: 1167-1173.
8. Isachenko E., Isachenko V., Weiss J., Kreienberg R., Katkov I., Schulz M., Lulat A., Risopatrón M., Sánchez R. 2008. *Reproduction*, 136: 167-173.
9. Johnson I., Weitze K., Fiser P., Maxwell W. 2000. *Animal Reproduction Science*, 62: 143-172.
10. Katkov I., Isachenko V., Isachenko E., Kimc M., Lulatd A., Mackaye A., Levine F. 2006. *International Journal of Refrigeration*, 29: 346-357.
11. Kumar Gupta M., Jun Uhm S., Taek Lee H. 2007. *Theriogenology*, 67: 238-248.
12. Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P., Roble R. 2005. *Theriogenology*, 63: 411-421.
13. Nawroth F., Isachenko V., Dessole S., Rahimi G., Farina M., Vargiu N., Mallmann P., Dattena M., Capobianco G., Peters D., Orth I., Isachenko E. 2002. *CryoLetters*. 23: 93-1.
14. Rall W., Fahy G. 1985. *Nature*, 313:573-575.
15. Rosato M. e Iaffaldano N. 2013. *Theriogenology*, 79: 508-516.
16. Sánchez R., Risopatrón J., Schulz M., Villegas J., Isachenko V., Kreinberg R., Isachenko E. 2011. *Andrología*, XX: 1-9.
17. Watson P. 2000. *Animal Reproduction Science*, 60 (61): 481-492.
18. Yanagimachi R. 2005. *Ann. NY Academy Science*, 1061: 203-207.



S.R.L.
PRODUCTOS
AGROGANADEROS



especialistas en
REPRODUCCIÓN ANIMAL
con más de 15 años de experiencia



contamos con productos de las más prestigiosas marcas
recomendados por profesionales, veterinarios, criadores
e investigadores a nivel mundial.

GUZMAN SRL

**30 años ayudando al cuidado
de la salud animal!**

*Representante directo en Argentina
Soporte técnico especializado*



SIUI mindray CHISON

Ecógrafos y Analizadores veterinarios

GUZMAN SRL

Tel: (011) 5263 2083
ventas@guzmansrl.com.ar / www.guzmansrl.com.ar
www.facebook.com/guzman.srl

PRODUCTOS AGROGANADEROS S.R.L.

Planes 629 - Capital Federal
Tel/Fax: (011) 4983 2279 / Tel: (011) 4982 5411
pagroganaderos@speedy.com.ar / www.pro-agroganaderos.com.ar