



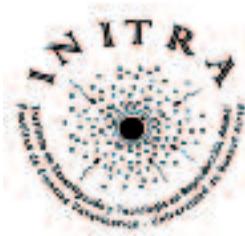
**UBA**  
Universidad de Buenos Aires

## **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



## **DESARROLLANDO TECNOLOGÍAS PARA LA CONSERVACIÓN DE CÉRVIDOS AUTÓCTONOS**

Sestelo, A.<sup>(2)</sup>, Fernández, S.<sup>(1)</sup>, Filosa, A.<sup>(1)</sup>, Córdoba, M.<sup>(1)</sup>.

Actualmente vivimos una crisis ambiental sin precedentes debido a nuestra mala utilización de los recursos naturales, llevando la extinción de especies a una tasa 1.000 veces mayor que la evolución natural. Los ambientes naturales, cada vez más fragmentados, llevan al aislamiento y reducción de las poblaciones silvestres con la consecuente consanguinidad y pérdida de variabilidad genética, proceso que se revierte fácilmente a través de la incorporación de nueva genética. Es por ello que desde hace años se ha planteado el uso de biotecnologías reproductivas y la generación de Bancos de Recursos Genéticos (BRG) como herramientas para el manejo de poblaciones silvestres, tanto cautivas como de vida libre. De todas formas, para que su aplicación sea efectiva es necesario tener un adecuado conocimiento de la fisiología reproductiva de cada especie, maximizando los esfuerzos invertidos en la mantención de la biodiversidad, por lo que la generación de BRG criopreservados se convierte en una alternativa viable en la que se optimiza la disponibilidad de espacio y se mantiene una alta representación de la diversidad genética de cada especie. Si bien, dentro de todas las estrategias aplicadas a la conservación, la protección de los hábitat naturales es sin lugar a dudas la prioritaria, hay ocasiones en las que se recomienda el empleo de estrategias complementarias ya que resulta imposible detener las causas que están provocando el declive de las poblaciones en su ambiente, debido a que éstas se han reducido por debajo de lo que se considera una población viable.

La criopreservación de gametas (ovocitos y espermatozoides), embriones y tejidos representan una estrategia adecuada para preservar la biodiversidad genética, y en un futuro, regenerar especies en peligro de extinción. Las biotecnologías reproductivas así como los bancos de germoplasma criopreservado constituyen una estrategia para preservar la biodiversidad genética de especies amenazadas<sup>1,2</sup>. La criopreservación del semen nos permite disponer de muestras de semen de alto valor genético a nuestra disposición por un tiempo indefinido<sup>3</sup>.

Algunas especies nativas de la familia cérvidos que se encuentran actualmente en situación de riesgo en América del Sur son: el Ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*), la Corzuela colorada (*Mazama americana*), el Huemul (*Hippocamelus bisulcus*), el Venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*), entre otros. Cabe señalar que los cérvidos tienen una reproducción estacional, influenciada por el fotoperíodo negativo, más notorio en nuestras latitudes. En la época de reproducción, conocida como brama debido al característico sonido que emiten los machos, además se encuentran altos niveles sanguíneos de testosterona que son evidentes en los machos junto con un aumento de volumen testicular, produciendo un aumento de la concentración de espermatozoides, la motilidad progresiva y el vigor de los eyaculados<sup>4</sup>.

De esta manera, se hace evidente que existen ventajas al aplicar técnicas de reproducción asistida en especies silvestres, dado que es posible

(1) Cátedra de Química Biológica, Facultad Ciencias Veterinarias-UBA, INITRA.

(2) Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires.

superar barreras físicas, comportamentales, de aislamiento geográfico, entre otras, que imposibilitan la reproducción entre individuos de una misma especie.

## Nuestra experiencia

En el marco de la problemática que explicitamos anteriormente, buscamos trabajar con un modelo biológico, para lo que seleccionamos al Ciervo dama (*Dama dama*), para aplicar luego los hallazgos en los cérvidos en vías de extinción. El objetivo es criopreservar sus espermatozoides en distintas condiciones, estudiar esa célula criopreservada y comprobar su funcionalidad. Es así que trabajamos con muestras de semen de ejemplares en cautiverio (machos entre 4 y 5 años) que fueron extraídas por electroeyaculación durante la estación reproductiva. Los ciervos fueron anestesiados con una combinación de citrato de carfentanilo (0,010 mg/kg) y xilazina (0,125 mg/kg) IM, y se suplementó con isoflurano por inhalación si era necesario. El carfentanilo se revertió con naltrexona (1,0 mg/kg) y laxilazina con yohimbina (0,125 mg/kg). El semen se recogió en un tubo cónico de vidrio, fue evaluado inmediatamente para el volumen y el pH (utilizando tiras reactivas; pH 5,0 - 10,0, Neutralit®, Merck). Las muestras fueron evaluadas previamente al congelamiento determinando el volumen, pH, motilidad, concentración y viabilidad. Luego se congelaron en nitrógeno líquido en pajuelas de 0,25 ml, utilizando el diluyente FTG (Tris, Fructosa, Glicina, Ácido cítrico, Yema de huevo y Glicerol)<sup>5</sup>. Cabe señalar que el diluyente FTG fue diseñado por nuestro grupo de trabajo donde la glicina cumple un rol importante para conservar las membranas espermáticas. Dicho diluyente fue utilizado posteriormente para criopreservar semen de Venado de las pampas con buenos resultados. Para comprobar la funcionalidad espermática planteamos varios parámetros que consideramos que reflejan la habilidad fertilizante. Es así que se evaluó el semen congelado-descongelado la inducción de la capacitación y reacción acrosomal *in vitro* e integridad de membrana por HOS test (test hiposmótico<sup>5</sup>). La integridad de membrana (HOS test) de las muestras obtenidas durante la estación reproductiva fue de  $82,37 \pm 8,65\%$ , con una motilidad progresiva promedio de  $57,89 \pm$

$5,17\%$ . La condensación del DNA de estas muestras fue de  $80,00 \pm 10,00\%$  de espermatozoides con DNA compacto (determinado por la técnica de azul de toluidina<sup>6</sup>).

Se utilizó en una primera etapa como agente inductor de la capacitación espermática heparina (60  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>5, 8, 9,10</sup> aunque si bien capacitaba obteníamos menores porcentajes que en la especie bovina ( $p < 0,05$ ) y actualmente estamos induciendo la capacitación *in vitro* con ácido hialurónico durante 60 min (1000  $\mu\text{M/ml}$ ) con un porcentaje de capacitación de  $16,25 \pm 3,22\%$ . Se estudió también las membranas mitocondriales por citometría de flujo a través del uso del fluorocromo (JC1) donde se observa una mayor actividad de las mitocondrias con heparina vs su control y al tratamiento ácido hialurónico. Los cambios en la motilidad progresiva analizados a través de *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), fueron  $21,8 \pm 2,7\%$  y  $23,0 \pm 1,9\%$  con el tratamiento de heparina y ácido hialurónico respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de las experiencias contribuyen a establecer parámetros espermáticos donde se evalúa integralmente: las membranas mitocondriales con fluorocromo (JC1), HOS test motilidad por CASA, inducción de procesos espermáticos y estado de compactación del ADN nuclear así asegurando el conocimiento de su habilidad fertilizante, con el fin de optimizar el desarrollo de biotecnologías reproductivas para la conservación de especies amenazadas de la familia *Cervidae*.

Hay que destacar que cuando se trabaja con especies silvestres, uno de los principales problemas es el número limitado de individuos y por lo tanto de muestras de semen para investigar los aspectos básicos de la criopreservación. Desarrollar sobre la criopreservación de gametas provenientes de especies silvestres implica la necesidad de tener en cuenta las variaciones especie específicas en la fisiología de las células durante el congelamiento y descongelamiento. Razón por la cual los protocolos utilizados en especies domésticas deben ser adaptados a las características de cada especie silvestre. En este trabajo logramos adecuar las concentraciones de inductores *in vitro* utilizados para la especie bovina y de técnicas que aseguren la funcionalidad, es decir criopreservar para descongelar una

célula funcional. La criopreservación en nitrógeno líquido tiene muchas ventajas frente a otras formas de conservación de material genético, ya que puede ser fácilmente movilizado, permite largos períodos de conservación y puede ser utilizada en reproducción asistida.

La viabilidad de espermatozoides de diferentes especies de ciervos suele ser baja de ahí que los porcentajes presentados de motilidad y de capacitación sean menores que los que se pueden observar en otras especies como la bovina. Las membranas resultan ser más sensibles que las de otras especies de rumiantes domésticos al efecto del congelamiento y post descongelamiento. La integridad de las membranas está determinada por las propiedades de las mismas, que depende de la composición de lípidos y proteínas. Es por ello que consideramos importante la evaluación de las membranas, incluidas la mitocondrial, a través de JC1 lo que aseguraría tener espermatozoides móviles post descongelamiento que le aportan la energía para el movimiento.

En conclusión, considerando el contexto de conservación global, la mayor utilidad de las biotecnologías reproductivas consiste en facilitar el "manejo genético" de poblaciones cuyo reducido tamaño limita su viabilidad. Permitiendo la conservación de la diversidad genética que existe hoy en día así como facilitando el intercambio de material genético entre poblaciones, tanto en cautividad como en su hábitat natural. Sin embargo, es importante reconocer que más allá de cualquier esfuerzo que realicemos en materia de conservación, necesitamos un cambio cultural en nuestra relación con la naturaleza con respecto al uso de recursos naturales y así brindar una oportunidad para la continuidad de la vida en la tierra.

## Referencias bibliográficas

1. Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res.* 2007; 53, 81-89.
2. Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Estes, M.C., Anel, E., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., et al. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 2006; 66, 1165-1172.
3. Gizejewski, Z. Effect of season on characteristics of red deer /*Cervuselaphus L.*/ semen collected using modified artificial vagina. *Reproductive Biology* 2004; 4(1), 51-66.
4. Soler, A.J., Astore, V., Sestelo, A., Rivolta, M., Jácome, L.N., Garde, J.J. Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. *Theriogenology* 2003; 60, 511-520.
5. Fernández, S., Sestelo, A., Rivolta, M., Córdoba, M. Capacitation and acrosome reaction induction on thawed Damadama deer spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent supplement. *Zoological Science* 2013; 30(12), 1110-6.
6. Carretero, M.I., Giuliano, S.M., Casaretto, C.I., Gambarotta, M.C., Neild, M.D. Evaluación del AND espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet* 2009; 11(1), 55-63.
7. Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2, 371-372.
8. Córdoba, M., Mora, N., Beconi, M.T. Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 65, 882-892.
9. Sestelo, A., Fernández, S., Rivolta, M., Lombardo, D., Córdoba, M. Seminal parameters, testosterone serum concentration and cryopreserved sperm function of fallow deer Damadama in captivity. *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, Deer Branch NZVA* 2013; N° 30, 57-61.

Súmele ventajas  
a la Inseminación a Tiempo Fijo

**DISPOCEL** *Monouso*

0,6g

DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA BOVINOS

**DISPOCEL** *MAX*

1,2g

DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA BOVINOS



**Dextrogenol**  
D-Cloprostenol



**Benzoato de Estradiol VF**



**Dalmarelin**  
Lecirelina - GnRH



**NUEVO**  
**Cipionato de Estradiol VF**



VON FRANKEN S.A.I.C.  
Gral. Lavalle 2247/49 - (1602) Florida - Pcia. de Bs. As. - Rep. Argentina  
Tel. (54-11)4797-5544 (L. Rotativas) - Fax (54-11)4797-8257  
E-mail: consultas@fatrovonfranken.com.ar - [www.fatrovonfranken.com.ar](http://www.fatrovonfranken.com.ar)

**FATRO**  
*von franken*