

RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMAL COMO MEDIO PARA PRESERVAR MATERIAL GENÉTICO

EPIDYDIMAL SPERMATOZOA RECOVERY LIKE A TOOL FOR GENETIC MATERIAL CONSERVATION

C M Tittarelli¹, M C Stornelli¹, F Gimenez¹, C A Savignone²,
R L de la Sota¹, M A Stornelli^{1*}

Instituto de Teriogenología¹, Cátedra de Histología y Embriología², Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

CC 296 B1900AVW. La Plata. Argentina

Tel +54-221-4236663/4, ext 457, fax: +54-221-4257980. astornel@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

La recuperación espermática postmortem así como la criopreservación y almacenado de espermatozoides epididimales son técnicas importantes para preservar gametas y obtener reservas de material genético en animales valiosos o en vías de extinción. Los bancos de material genético son potencialmente capaces de mejorar la posibilidad de conservación de animales en vías de extinción ya que permiten utilizar material genético luego de la muerte de los animales. Es así que la recuperación de espermatozoides epididimales es sumamente útil en especial en relación a las dificultades que implica la recolección de semen en animales silvestres. Sin embargo existen variados factores que influyen en este procedimiento. La viabilidad de los espermatozoides epididimales depende de diversos factores incluyendo el tiempo transcurrido desde la muerte hasta la recuperación y procesamiento de los espermatozoides. En este trabajo se analizan los resultados obtenidos en relación al manejo y almacenado de los epidídimos así como a la recuperación espermática epididimal en diferentes especies. Se discuten los factores que influyen en la calidad de los espermatozoides epididimales y las metodologías utilizadas para mejorar la calidad de las células recuperadas.

Abstract

Post-mortem spermatozoa recovery and Freeze-storage of epididymal sperm are important techniques for the preservation of gametes in animals and obtaining germplasm reserves from genetically valuable animals or endangered species. Genome resource banks are potentially capable of improving the propagation of endangered species in order that allows introduction of an exchange of genetic material after an animal has died. In the same way post-mortem seminal recovery from the cauda epididymis is useful, particularly in view of the difficulties involved in semen collection from wild animals. However, there are many factors that influence the outcome of this technique. Viability of epididymal spermatozoa is variable and depends on several factors; including the interval from death until spermatozoa recovery and processing. In this paper result obtained from epididymis handling conditions and epididymal spermatozoa recovery in several species are reviewed. Factors influencing the epididymal spermatozoa quality and methods used for improvement are discussed.

Palabras clave espermatozoide-epidídimo-criopreservación

Key Words spermatozoon -epididymis- cryopreservation

INTRODUCCIÓN

La muerte inesperada de animales de alto valor genético ya sea zootécnico, o de interés para los zoológicos (animales en vías de extinción) así como la dificultad para obtener semen fresco en especies silvestres ha impulsado el desarrollo y la aplicación de técnicas de reproducción asistida que permiten preservar la biodiversidad animal. Es así que los investigadores han dirigido sus esfuerzos a la preservación tanto de gametas como de células somáticas con el fin de crear bancos de material genético para ser usado en el futuro.

La obtención de espermatozoides epididimales (EE), potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epidídimo puede ser la única opción para preservar el material genético de un macho de alto valor reproductivo, luego de la muerte o castración por motivos médicos. Este hecho es especialmente relevante en animales en vías de extinción. La recuperación post-orquiectomía o post-mortem de gametas a partir de los órganos reproductivos y la posterior criopreservación de las mismas, es una herramienta sumamente interesante tanto para resguardar el material genético como para crear bancos de reserva de este material.

Desarrollo biotecnológico

Hace 76 años, Walton 1930 recuperó espermatozoides vivos de vasos deferentes de conejos. A partir de allí, se han realizado estudios sobre recuperación y criopreservación espermática epididimal en ratones (An y col 1999; Sato y col 2004,.) , ciervos (Yonai y col 1998; Hishinuma y col 2003), equinos (Bruemmer y col 2002), ovinos (Kaabi y col 2003), caninos y felinos (Hay y col 1993, Pope y col 1998, Baterman y col 2000, Peña y col 2000; Pushett y col 2000; Stilley y col 2000,.) . El avance de la biotecnología ha demostrado que los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de EE en especies domésticas pueden ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizados en animales silvestres en vías de extinción. De esta manera aumentarían las posibilidades de preservación de material genético sumándose al esfuerzo mundial para evitar las pérdidas de especies en el planeta.. (Díaz y col 2000).

Desde las primeras observaciones realizadas por Walton hasta la actualidad, se han realizado diversos estudios para determinar si los EE pueden ser usados para producir embriones viables y nacimiento de crías vivas. Iwamatsu y col 1971, comunicaron fertilizaciones exitosas de ovocitos de ratón utilizando EE. Fuller y col 1996 informaron la obtención de fetos normales de ratones luego de FIV con EE

refrigerados a 4°C inmediatamente después de la colección. Los mismos investigadores obtuvieron crías vivas de ratas mediante el uso de EE y, más recientemente, a partir de espermatozoides recuperados de epidídimos (EPI) de ratones congelados y descongelados (Songsasen y col 1997). También en caprinos, se logró la producción de embriones hasta la etapa de blastocisto utilizando EE mediante FIV como así también, el nacimiento de crías vivas por inseminación artificial (IA) (Song y col 1988, Blash y col 2000). Por otra parte en bovinos, Graff y col 1996, obtuvieron preñeces implementando FIV realizada con EE y, más recientemente, Foote 2000, logró el nacimiento de crías vivas mediante IA de EE. Así mismo en equinos, Barker y col 1957 obtuvieron nacimientos de potrillos por IA con espermatozoides de EPI criopreservados y descongelados. Por último, en cebras, Meintjes y col 1997, comunicaron el uso de EE en FIV logrando el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocito.

Si bien se han realizado muchos trabajos sobre la recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo (Hay y col 1993; Stilley y col 2000), existen escasas comunicaciones en relación al efecto que poseen sobre la viabilidad espermática las diferentes condiciones de almacenado de los EPI (Savignone y col 2004; Tittarelli y col 2006). El tiempo, la temperatura y el medio utilizado en el transporte de los EPI pueden causar cambios que alteren la viabilidad de las células espermáticas. Estas variables deben ser tenidas en cuenta ya que ante la muerte repentina de un animal, la única opción para salvar las células reproductivas puede ser el transporte de los testículos y EPI a un laboratorio equipado para la recuperación y criopreservación espermática.

Aguado y col 1994, evaluaron la viabilidad de espermatozoides ovinos recuperados de EPI almacenados a temperatura ambiente por 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Estos autores obtuvieron mayor viabilidad espermática (precongelado y al descongelado) cuando la recuperación se realizó dentro de las 3 horas post-mortem. Por otra parte, bajo condiciones similares, Garde 1994, y col no encontraron diferencias en la capacidad fecundante de los espermatozoides de carnero obtenidos dentro de las primeras 24 horas luego de la muerte. Sin embargo, se evidenció un marcado descenso de la viabilidad espermática al prolongar el período de almacenado. En ciervos (*Cervus elaphus*) y muflones (*Ovis musimon*) se demostró que almacenando los EPI por más de 40 horas a temperatura ambiente, tanto la viabilidad como la capacidad fecundante descendía al aumentar el intervalo de tiempo entre la muerte del animal y la recuperación espermática (Garde y col

1994_b). Al comparar las dos especies mencionadas se observó una marcada diferencia en la capacidad de penetración de ovocitos de hámster, siendo significativamente más bajo el índice de penetración en los espermatozoides de ciervos. En estos estudios, no se analizó el efecto de la temperatura sobre la calidad de los espermatozoides obtenidos. Sin embargo, Foote 2000, comunicó que los espermatozoides de toros permanecieron viables al ser usados en IA aún después de haberlos almacenado por 60 horas a 5°C. Kikuchi y col 1998 en cerdos y Kishikawa y col 1999 en ratones, sugieren que, ante la muerte repentina de un animal, cuando no es posible recuperar y criopreservar inmediatamente las células, el almacenamiento temporal de los EPI a 4°C puede ayudar a conservar las gametas. De igual manera, Kaabi y col 2003 comunicaron que la capacidad fecundante de espermatozoides ovinos criopreservados y descongelados obtenidos de EPI almacenados a 5°C por 24 horas fue similar a los espermatozoides criopreservados y descongelados de eyaculado. Sus informes indican que la refrigeración del epidídimo permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparados con el almacenamiento de estos órganos a temperatura ambiente. El almacenamiento de los EPI a 4°C evita un rápido descenso de la motilidad de los espermatozoides en ratones (Kishikawa y col 1999) y ciervos (Hishinuma y col 2003). Los mejores resultados obtenidos en diferentes pruebas de contrastación, especialmente en la motilidad, cuando se almacenan EPI refrigerados podrían ser explicados por la disminución del metabolismo celular de los espermatozoides almacenados a 4°C o 5°C (Salamon y col 2000). En relación a estas observaciones, Sankai y col 2001, encontraron que la motilidad de espermatozoides de ratones disminuía con el aumento de la temperatura de almacenamiento, sugiriendo que estos cambios se relacionan con la variación en la actividad metabólica celular.

Stilley y col 2000 comprobaron en caninos que a temperatura ambiente (22°C) se produce autólisis de los tejidos a las 54 horas post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 horas. Además, observaron que cuando los EPI se almacenan refrigerados a 4°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día.

Por otra parte Kikuchi y col 1998 comunicaron que la motilidad de espermatozoides porcinos almacenados a 4°C por 1 ó 2 días baja significativamente comparada con la de los espermatozoides no refrigerados tomados como control. Este hecho podía relacionarse con la sensibilidad de los espermatozoides porcinos a las bajas temperaturas, habiéndose

comunicado que a temperaturas menores a 15°C ocurre cambio de fase en las membranas espermáticas (Ito y col 1948). Más recientemente se estableció como crítica, en porcinos, una temperatura inferior a 12°C (Althouse y col 1998). Yu y col 2002 observaron que la motilidad de EE caninos almacenados a 4°C bajó significativamente (de 50% a 30%) dentro de las primeras 5 horas de almacenamiento, aunque no hubo disminución significativa de la integridad de membrana ni en la integridad acrosomal dentro de las 48 horas de refrigeración. Estos resultados evidenciarían que existen diferencias entre las distintas especies en el mantenimiento de la viabilidad de los EE almacenados post-mortem en los EPI.

Trabajos preliminares realizados en chinchillas (Savignone y col 2004) comunican mejores parámetros espermáticos al recuperar espermatozoides de EPI almacenados a 4°C durante 24 h en TYH o MRA® comparados con los almacenados en SF. Los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en SF tuvieron menor motilidad, vigor y endósmosis positiva comparados con los almacenados en TYH o MRA®. Así mismo, los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron mayor motilidad, vigor, endósmosis positiva y acrosomas intactos comparados con los recuperados de EPI almacenados en MRA®. Estudios realizados en caninos y felinos mostraron que todos los parámetros evaluados fueron significativamente inferiores a las 72 h comparados con los resultados obtenidos al recuperar a las 24 h. (Tittarelli y col 2006) En caninos los EE almacenados en TYH tuvieron mayor porcentaje de acrosomas normales comparados con los espermatozoides de epidídimos almacenados en SF. En felinos, se observó mayor motilidad, integridad de membrana y vigor en los espermatozoides de epidídimos almacenados en TYH con respecto a los espermatozoides almacenados en SF. Estas diferencias entre especies de la viabilidad espermática al almacenar los epidídimos en distintos medios podrían asociarse al diferente tamaño y espesor de la pared de los epidídimos de chinchillas, gatos y perros (Kitt y col 1985). Si bien los EE son almacenados dentro del epidídimo, de manera que durante el refrigerado estarían protegidos del shock térmico directo (Sankai y col 2001, Yu y col 2002), la incorporación de un medio de almacenamiento mejoraría la protección de los espermatozoides al shock térmico. Las bajas temperaturas a las que son sometidos los espermatozoides pueden producir shock de frío con los consecuentes daños irreversibles en las células. La yema de huevo utilizada en los diluyentes de semen, brinda un efecto protector de las células debido a los fosfolípidos y proteínas de baja densidad que posee. Es así que

almacenar los epidídimos en un medio con yema de huevo podría mejorar la protección del shock de frío que el órgano ejerce sobre los espermatozoides y aumentar la viabilidad de los mismos al ser recuperados luego de un período de almacenado (Savignone y col 2004, Tittarelli y col 2006).

Por otra parte el medio de almacenado actuaría previniendo la deshidratación del epidídimo mejorando la conservación del mismo y de esta manera conservando las características del medio interno del órgano lo cual resultaría en una mejor conservación de los EE (Sankai y col 2001). La autólisis post-mortem consecutiva a la hipoxia produce cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana celular, por lo tanto, el mantenimiento de la integridad celular del epidídimo, almacén de las células espermáticas, permitiría recuperar mayor cantidad de espermatozoides viables. De esta manera, un medio de almacenado que permita preservar los tejidos epididimales y enlentecer la muerte celular favorecería en forma indirecta la sobrevivencia de los espermatozoides dentro del epidídimo.

CONCLUSIONES

Los avances ocurridos en este tipo de biotecnología hacen posible que ante la muerte repentina o castración inevitable, la recuperación espermática epididimal y la criopreservación de gametas permita resguardar el material genético animal. Además, aún cuando no sea posible recuperar y criopreservar inmediatamente las gametas, el almacenado temporal de los EPI a 4°C al menos en solución fisiológica durante 24 ó 48 horas, permite recuperar espermatozoides viables en un laboratorio de Andrología equipado para la recuperación y criopreservación espermática. Estos hechos hacen posible recuperar material valioso que de otra forma se perdería, posibilitando la conservación de especies en el planeta.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado en parte por un subsidio de la UNLP V11/134 a RLS.

BIBLIOGRAFÍA

Aguado MJ, J Garde, JM Madriadano, S Perez, D, Garrido V. Montoro. 1994. Congelación post mortem de semen de epidídimo de morrueco. En: resúmenes de las VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial; Murcia, España; p 283.

Althouse GC, ME Wilson, C Kuster, M. Parsley. 1998. Characterization of lower temperature limitations of fresh-extender porcine semen. *Theriogenology* 50, 535-543.

An TZ, S Wada, K Edashige, T Sakuray , M Kasai. 1999. Viable spermatozoa can be recuperated from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34

Barker CAV, JCC Gandier. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci* 21, 45-51.

Baterman HL, MA Hay , GF Mastromonaco, DP Ryckman and KL Goodrowe. 2000. Characterization of canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 53, :486 abstr.

Blash S, Melican D, Gavin W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899-905.

Bruemmer JE, H Reger, G Zibinski, EL Squires. 2002. Effects of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407

Diaz GB, RA Ojeda. 2000. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos); Pp 106. Mendoza, SAREM.

Footo RH. 2000. Letter to the editor. *J Androl* 21, 355

Fuller SJ, DG Whittingham. 1996. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J Reprod Fertil* 108, 139-45.

Garde J, M Aguado, V Montoro, MD Perez Guzman, O García, S Perz, et al. 1994a . Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morrueco. Resultados preliminares. En: resúmenes de las XVIII Jornadas de la SEOC, España; pp. 533-7.

Garde J, SS Perez; M Aguado, D Garrido, E Ayllon, V Montoro, et al. 1994b. Evolución post-mortem de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflon. En: resúmenes de las XIX Jornadas de la SEOC, Burgos, Spain, pp. 542-5.

Graff KJ, JE Chandler, BC Reggio, JM Lim, A Canal, JA Carter JA, et al. 1996. Pregnancies obtained from IVF with noncapacitated epididymal bovine spermatozoa. In: Proceedings 3rd International Meeting of Biotechnology and Animal Reproduction, Cairo, Egypt, pp.19-21.

Hay MA and KL Goodrowe. 1993. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert Suppl* 47, 297-305.

Hishinuma M, K Suzuki, J Sekine. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59, 813-820.

Ito S, T Niewa, A Kudo. 1948. Studies on the artificial insemination in swine. *Zootech Exp Sta Min Agr For (Chiba)*, 55. (citado por Althouse, 1998).

Iwamatsu Y, MCC Chang. 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 26, 197-208.

Kaabi M, P Paz, M Alvarez, E Anel, JC Boixo, H Rouissi, P Herraéz, L Anel. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem *Theriogenology* 60, 1249-1259.

Kikuchi K, T Nagai, N Kashiwazaki, H Ikeda, J Noguchi, A Shimada and col. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50, 615-623.

Kishikawa H, H Tateno, R Yanagimachi. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J Reprod Fertil* 116, 217-22

Kitt T, L Schulz y col. 1985. Tratado de Anatomía Patológica General. 2^{da} ed. Labor, Barcelona;

- Meintjes M, C Bezuidenhout, P Bartels, DS Visser, J Meintjes, NM Loskutoff, et al. 1997. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's Zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*). *J Zoo Wildl Med* 28, 251-9
- Peña A, C Linde-Forsberg. 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54, 703-718.
- Pope CE, CA Johnson, MA McRae, GL Keller, BL Dresser. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 53, 221-36
- Pushett DA, O Lacham-Kapln, IM Gunn, AO Trounson. 2000. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species. *Theriogenology* 53, 400 (abstract)
- Salamon S, WM Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62, 77-111.
- Sankai T, H Tsuchiya and N Ogonuki. 2001, Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55, 1759-1768.
- Sato M, A Ishikawa. 2004. Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival. *Theriogenology* 61, 1455-1469.
- Savignone C, C Tittarelli, E Arnaudín, MC Stornelli, MA Stornelli, RL de la Sota. 2004. Survival of chinchilla laniger spermatozoa stored in the epididymides at 4°C and transported in three different media. Proceedings of the 5th International Symposium on Companion and Exotic Animals; aug 4-6; San Pablo, Brazil. pp 261 – 262.
- Song HB, D Melican, W Gavin. 1988. In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J Anim Sci* 30, 636-42.
- Songsasen N, KJ Betteridge, SP Leibo. 1997. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* 56, 143-52
- Stilley K, CE Pope, SP Leibo, et al. 2000. Survival of canine epididymal sperm stored at 4°C in the testicles. *Theriogenology* 53, 489 abstr.
- Tittarelli C, C Savignone, E Arnaudín, M C Stornelli, M A Stornelli; R de la Sota. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* «en prensa».
- Walton A. 1930. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *J Exp Biol* 201-219.
- Yonai M, M Geshi, T Nagai. 1998. The effect of storage temperature of epididymis with testes on motility of sika deer (*Cervus nippon*) and equine spermatozoa. *Tohoku J Anim Sci Technol* 47, 20-23
- Yu I, SP Leibo. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179–1190.