

Criopreservación espermática post mortem a partir de epidímos de Corzuela Parda (*Mazama gouazoubira*)

(Trabajo Científico presentado en las XXXIV Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias, Villa Giardino, Setiembre 2015)

Rivolta, M.; Suhevic, J.; Fratto, C.; Ghirardosi, M.; Gonzalez, L.; Malcervelli, D.; Torres, P.; Fischman, M.; Cisale, H. Cátedra de Física Biológica, Instituto de Investigación en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires
mrivolta@fvet.uba.ar

INTRODUCCIÓN

La criopreservación espermática es una biotecnología que puede asistir a la conservación de especies en riesgo de extinción. La corzuela parda o guazuncho (*Mazama gouazoubira*) es un ciervo de tamaño mediano con amplia distribución principalmente en el bosque premontano en el noroeste de Argentina (Juliá et al, 2010). Su estado de conservación es de preocupación menor (Red List, UICN). El desarrollo de nuevos conocimientos reproductivos sobre la corzuela parda, podría ser transferido a otros ciervos autóctonos, como el venado de las pampas, huemul y taruca, con el propósito de colaborar en cambiar, la crítica situación de conservación de estas especies. El objetivo de este trabajo fue aplicar una biotecnología reproductiva (criopreservación espermática), a partir de la obtención de espermatozoides epididimarios de un individuo de corzuela, al menos 48 horas *post mortem*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta experiencia fue realizada a partir de un ejemplar de corzuela encontrado muerto en un establecimiento ubicado en Cañuelas, provincia de Buenos Aires, Argentina, los primeros días del mes de julio de 2014.

Durante la necropsia se realizó la orquidectomía bilateral, en condiciones de campo, dejando los testículos dentro de la bolsa escrotal, ligada en el extremo del corte. En forma inmediata, se envolvieron en papel y se ubicaron en una conservadora con packs refrigerantes, para su traslado y finalmente se refrigeraron a 5°C. El arribo al laboratorio de calidad seminal, se produjo 48 horas después del deceso del animal.

En condiciones de laboratorio, se realizó una inspección macroscópica de los testículos y se obtuvieron datos morfométricos: largo, ancho y perímetro. La recolección de los espermatozoides se realizó por medio de cortes transversales y longitudinales de la cola de cada epidídimo con una hoja de bisturí, sobre una placa de Petri, con diluyente compuesto por Tris, ácido cítrico y fructosa a temperatura ambiente. Luego de unos minutos, se recuperaron los espermatozoides que lograron difundir al diluyente, de cada uno de los epidímos, por medio de una pipeta graduada. El volumen obtenido se diluyó en el mismo diluyente, hasta alcanzar un volumen final de 3 ml, se lo atemperó en baño termostático a 37°C por 15 minutos y se procedió a realizar la evaluación de calidad seminal: concentración espermática mediante recuento en cámara de Neubauer®, movilidad espermática total y progresiva con microscopía de contraste de fase sobre platina térmica a

37°C, integridad de membrana plasmática mediante la coloración de CFDA/PI -microscopía de fluorescencia (Lancet L 2001 A), integridad de membrana acrosomal -microscopía de contraste de fase 1000x y funcionalidad de membrana -test hipoosmótico. Debido a que las muestras obtenidas de cada uno de los epidídimos no mostraron diferencias significativas en la calidad seminal, se procedió a realizar un pool espermático. Luego se estabilizó la muestra a temperatura ambiente durante 20 minutos, pasado ese tiempo se colocó en balcón de frío a 5°C por 60 minutos (velocidad de enfriamiento 1°C/3 minutos). Se agregó 10% de yema de huevo y el agente crioprotector permeable, glicerol al 5%, se estabilizó a 5°C durante 15 minutos y luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml. Se estabilizó a -70°C por 20 minutos y se almacenó en termos de nitrógeno líquido a -196°C. A los 30 días de almacenamiento, se descongelaron las muestras a 37°C durante 30 segundos, para evaluar su calidad seminal.

RESULTADOS

Morfometría testicular:

En la tabla 1 se presentan los datos obtenidos sobre la morfometría testicular.

	Testículo derecho	Testículo izquierdo
Largo testicular (cm)	7,00	7,00
Perímetro testicular (cm)	10,50	10,50
Perímetro cola epidídimo (cm)	2,00	1,80

Tabla 1: Medidas morfométricas (cm) de testículos y cola de epidídimo

Evaluación de la calidad seminal precongelado:

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos al análisis de calidad seminal de los espermatozoides epididimarios recuperados de ambos testículos, derecho e izquierdo.

	Testículo derecho	Testículo izquierdo
Concentración (espermatozoides/ml)	9.10^7	22.10^7
Movilidad total espermática (%)	57,40	57,10
Movilidad progresiva espermática (%)	21,00	20,20
Integridad de membrana plasmática (%)	83,00	82,00
Funcionalidad de membrana plasmática	65,20	63,30

(%)			
Integridad de membrana acrosomal (%)		92,00	91,00

Tabla 2: Datos de los espermogramas para cada uno de los testículos

Evaluación de la calidad seminal al descongelado:

En la tabla 3 se resumen los datos obtenidos de calidad seminal, del pool de espermatozoides epididimarios criopreservados, al descongelado.

	Pool seminal
Concentración (espermatozoides/ml)	115x10 ⁶
Movilidad total espermática (%)	36,80
Movilidad progresiva espermática (%)	17,30
Integridad de membrana plasmática (%)	63,78
Integridad acrosómica (%)	63,40
Funcionalidad de membrana plasmática (%)	55,20

Tabla 3: Datos del espermograma pos descongelado

DISCUSIÓN

La técnica empleada para la recuperación espermática resultó adecuada, debido a que se obtuvieron espermatozoides epididimarios viables a partir de un individuo 48 hs *post-mortem*.

Las medidas morfométricas obtenidas coincidirían con las reportadas en la misma especie por Cardoso Costa et al 2011, esto indicaría que el animal hallado, no presentaría anomalías testiculares que pudieran suponer una alteración en su calidad seminal.

Los datos obtenidos de los espermogramas pre-congelado, no presentaron grandes diferencias entre el testículo derecho e izquierdo, posibilitando la confección del pool seminal.

La evaluación postcongelado, indicaría que la técnica de criopresevación y descongelado fueron satisfactorias, debido a que se recuperaron espermatozoides epididimarios viables.

CONCLUSIÓN

La extinción de especies animales y vegetales, es uno de los signos más preocupantes del deterioro ambiental en el mundo, ya que constituye un proceso irreversible, que nos priva para siempre de un material genético único e irremplazable.

En los últimos años los bancos de recursos genómicos han crecido con el objetivo de mantener la variabilidad genética de distintas poblaciones, mientras que la calidad de la criopreservación de los gametos determina la eficacia de tales bancos (Rola et al, 2012).

Este trabajo demostraría que es posible la recuperación de espermatozoides epididimarios viables, a partir de un individuo muerto, para luego ser sometidos a criopreservación espermática, abriendo nuevas líneas de trabajo para la transferencia de técnicas de crioconservación aplicables a especies vulnerables y/o en riesgo de extinción.

BIBLIOGRAFÍA

Cardoso Costa, k.; Pinto da Matta, S.; Gomes, M.; Rêgo de Paula, T.; Moura de Freitas, K.; de Araújo, F. (2011) Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal Reproduction Science* 127 202– 212

Juliá, J. P; Peris, J.S.(2010).Do precipitation and food affect the reproduction of brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (G. Fischer 1814) in conditions of semi-captivity? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2010) 82(3): 629-635. ISSN 0001-3765

Rola, L. D., dos Santos Zanetti, E., & Duarte, J. M. B. (2013). Evaluation of semen characteristics of the species *Mazama americana* in captivity. *Animal production science*, 53(5), 472-477.

Red List, UICN (2015) En: <http://www.iucnredlist.org/details/29620/0>. The IUCN Red List of Threatened Species. Revisado: 12 de agosto 2015.