

## VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS EN AUSENCIA DE CRIOPROTECTORES PERMEABLES

Equine sperm vitrification in the absence of permeable cryoprotectors

Clara Baca-Castex<sup>1,2</sup>, Marcelo Miragaya<sup>1,3</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.4>

<sup>1</sup> *Cátedra de Teriogenología, INITRA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

<sup>2</sup> *Veterinario;*

<sup>3</sup> *Médico Veterinario, MSc, PhD*

E-mail:

clarabacacastex@fvet.uba.ar

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la vitrificación de semen equino sin crioprotectores permeables. El semen se obtuvo utilizando una vagina artificial (n=3, r=2). Las muestras fueron mejoradas mediante centrifugación coloidal con Androcoll-E™. Se diluyeron y dividieron a 2 y a 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml en diferentes medios: Control (medio Modified Whittens: MW), MW + 1% BSA (Albúmina Sérica Bovina), MW + 1% BSA + 0.25 M sacarosa y MW + 1% BSA + 0.4 M sacarosa. La vitrificación se realizó en esferas descargando 20-30 µl de la suspensión de espermatozoides sobre el nitrógeno líquido. Las esferas fueron atemperadas de manera rápida en medio MW + 1 % BSA a 37 °C. Se centrifugaron y el pellet fue resuspendido en 100 µl de MW. Los espermatozoides vitrificados-atemperados no mostraron movilidad, funcionalidad de membranas ni viabilidad. La vitrificación altera los parámetros de viabilidad espermática estudiados sin alterar el ADN, indicando la posibilidad de utilizar espermatozoides equinos vitrificados-atemperados en técnicas de reproducción asistida.

**Palabras clave:** *Equinos, Vitrificación, Espermatozoides.*

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate equine sperm vitrification without permeable cryoprotectors. Semen was recolected using an artificial vagina (n=3, r=2). Samples were improved by coloidal centrifugation with Androcoll-E™. Selected sperm were split and diluted to 2 and 5 x 10<sup>6</sup> sperm/ml in different media: Control (Modified Whittens medium: MW), MW + 1% BSA (Bovine Serum Albumin), MW + 1% BSA + 0.25 M sucrose and MW + 1% BSA + 0.4 M sucrose. Vitrification was performed in spheres by discharging

20-30 µl of the sperm suspension over liquid nitrogen. Spheres were warmed in a rapid way in MW medium + 1 % BSA at 37 °C. Centrifugation was performed and the pellet was resuspended in 100 µl of MW medium. Vitrified-warmed sperm did not show motility, membrane functionality nor viability. Vitrification alter sperm viability parameters studied without altering DNA, indicating the possibility of using vitrified-warmed equine sperm in assisted reproductive techniques such as intracytoplasmic sperm injection.

**Keywords:** *Equine, Vitrification, Sperm.*

## INTRODUCCION

Una tecnología que surge recientemente en el campo de la criobiología reproductiva es la vitrificación, proceso mediante el cual el líquido se modifica sin la formación de cristales de hielo. En contraste con el congelamiento tradicional, la vitrificación tiene una serie de ventajas técnicas útiles en la práctica: es más simple, rápida y más económica. El mayor problema de la vitrificación es la toxicidad de los medios, dada por las altas concentraciones de crioprotectores (CP) utilizadas. Las técnicas clásicas de vitrificación con altas concentraciones de CP (30 a 50 %) no pueden ser utilizadas para la criopreservación de semen debido al efecto letal del shock osmótico sobre los espermatozoides. La vitrificación de espermatozoides en ausencia de crioprotectores es un método nuevo utilizado con éxito en humanos y caninos (Isachenko *et al.*, 2003; Nawroth *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2011b). Esta técnica requiere el mejoramiento previo de la muestra, además de tasas muy altas de enfriamiento y descongelado. Nuestro objetivo fue evaluar la vitrificación de espermatozoides equinos en ausencia de crioprotectores permeables.

## MATERIALES Y METODOS

El semen se recolectó utilizando una vagina artificial modelo Missouri y un súcubo artificial (n=3, r=2). Las muestras de semen obtenidas fueron mantenidas a 37 °C hasta su utilización y fueron mejoradas mediante centrifugación coloidal en Androcoll-E™ (Morrell, 2012). La muestra seleccionada se dividió en alícuotas y se diluyó a  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml (a) y a  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml (b) en diferentes medios de vitrificación: Control (medio Modified Whittens: MW) (McPartlin *et al.*, 2008) (1), MW + 1% BSA (Bovine Serum Albumin) (2), MW + 1% BSA + 0,25 M de sacarosa (3) y MW + 1% BSA + 0,4 M de sacarosa (4). La vitrificación se realizó utilizando el método de esferas (Isachenko *et al.*, 2008), descargando 20 a 30  $\mu$ l de la suspensión espermática directamente sobre el nitrógeno líquido (Figura 1). Las muestras permanecieron almacenadas un mínimo de 24 hs previo a su evaluación (Figura 2). Las esferas fueron atemperadas de forma rápida, sumergiendo 5 esferas, una por vez, directamente en 5 ml de medio MW + 1 % BSA a 37 °C, acompañado por una suave agitación en vórtex. Esta suspensión de espermatozoides atemperada se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de medio MW para su evaluación.

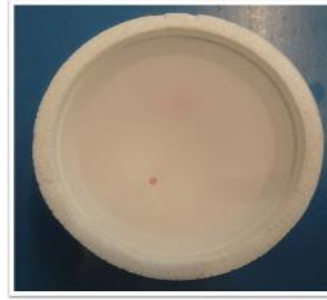


Figura 1: Formación de esferas.

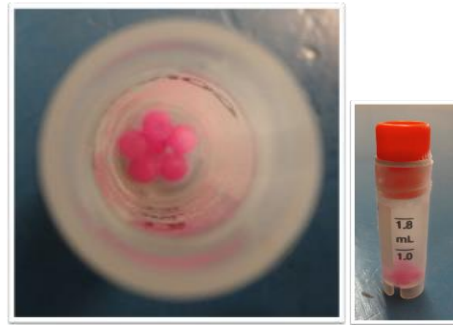


Figura 2: Almacenamiento de esferas.

Se analizaron los siguientes parámetros: movilidad, funcionalidad de membrana (HOS test), viabilidad espermática (tinción CFDA-Pi) y fragmentación de la cromatina espermática (SCD o técnica del halo).

La movilidad espermática se evaluó de manera subjetiva por observación directa colocando la muestra sobre platina termostatazada mantenida a 37° C y empleando microscopía de contraste de fase. El HOS test se realizó según Neild *et al.* (1999); se incubaron 100  $\mu$ l de semen en 1 ml solución de lactosa 50 mOsm durante 30 minutos en baño térmico a 37° C y finalizada la incubación, el porcentaje de espermatozoides con presencia de endósmosis o "swelling" de la cola se evaluó utilizando un microscopio de contraste de fase (400 X). La viabilidad espermática se evaluó según el protocolo previamente descrito por Neild *et al.* (1999) (Neild *et al.*, 1999) de tinción con fluorocromos Diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e Ioduro de Propidio (Pi) para evaluar el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana que retienen al CFDA y excluyen el Pi. La fragmentación de la cromatina espermática se evaluó mediante el test de dispersión de la cromatina espermática (SCD - Sperm Chromatin Dispersion Test o técnica del halo) (Carretero *et al.*, 2010). Brevemente: los espermatozoides son inmersos en una matriz de agarosa y expuestos a soluciones ácidas y de lisis logrando la desproteinización del ADN. Luego las muestras son deshidratadas en sucesivos baños de alcohol, secadas al aire y teñidas con Giemsa. Los espermatozoides con ADN intacto

presentan halo y los de ADN fragmentado no presentan halo (Figura 3).

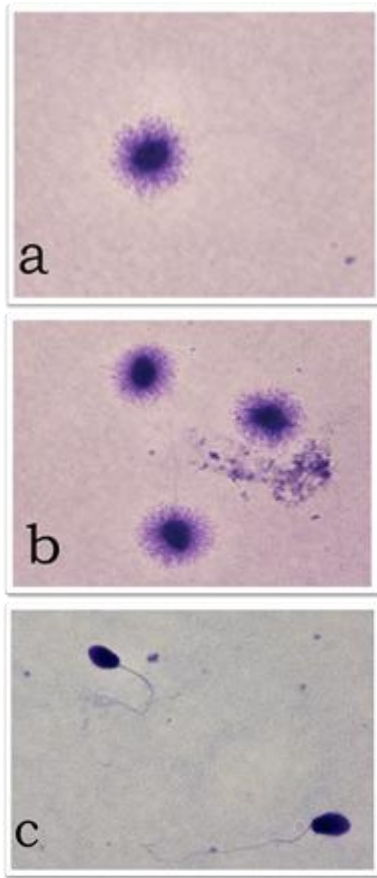


Figura 3: Espermatozoides con ADN intacto (a y b) y espermatozoides con ADN fragmentado (c).

## RESULTADOS

Los espermatozoides vitrificados atemperados no presentaron movilidad, HOS ni viabilidad espermática en ninguna de las 2 concentraciones para los 4 tratamientos aplicados. En cuanto a la fragmentación del ADN, los valores de ADN intacto (media  $\pm$  desvío estándar) fueron:  $96,04 \pm 2,54$ ;  $94,99 \pm 3,02$ ;  $95,21 \pm 3,84$  y  $94,53 \pm 4,91$  para los tratamientos a1, a2, a3, a4 y  $96,33 \pm 2,14$ ;  $95,17 \pm 3,64$ ;  $96,17 \pm 2,05$ ;  $94,89 \pm 2,66$  para b1, b2, b3, b4 respectivamente (ver Tabla 1).

## DISCUSION

Este estudio representa el primer trabajo de vitrificación en espermatozoides equinos, en ausencia de crioprotectores permeables mediante el método de esferas y utilizando concentraciones de 2 y 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

Como ocurre en el semen vitrificado-atemperado de humanos y caninos (Isachenko *et al.*, 2011a; Isachenko *et al.*, 2008; Isachenko *et al.*, 2011b; Sánchez *et al.*, 2011a; Sánchez *et al.*, 2011b), la vitrificación de espermatozoides equinos permite criopreservar espermatozoides que conservan la integridad de la cromatina espermática. Sin embargo, utilizando la vitrificación sin crioprotectores permeables en equinos, no se obtienen espermatozoides con movilidad, funcionalidad de membranas ni viabilidad.

Tabla 1: Valores de ADN intacto (media  $\pm$  desvío estándar) para las distintas concentraciones y diferentes tratamientos.

	MW (1)	MW + 1% BSA (2)	MW + 1% BSA + 0,25 M de sacarosa (3)	MW + 1% BSA + 0,4 M de sacarosa (4)
5 x 10 <sup>6</sup> esperm./ml (a)	$96,04 \pm 2,54$	$94,99 \pm 3,02$	$95,21 \pm 3,84$	$94,53 \pm 4,91$
2 x 10 <sup>6</sup> esperm./ml (b)	$96,33 \pm 2,14$	$95,17 \pm 3,64$	$96,17 \pm 2,05$	$94,89 \pm 2,66$

## CONCLUSION

El proceso de vitrificación alteraría los parámetros de viabilidad espermáticos estudiados sin alterar el ADN, indicando la posibilidad de utilizar espermatozoides de equinos vitrificados atemperados en técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI).

El desarrollo de técnicas de reproducción asistida que facilitan la entrada de los espermatozoides a los ovocitos, como ICSI, permiten la utilización de espermatozoides conservados que no sean íntegramente funcionales o para aquellos casos en los que las muestras sean escasas.

## REFERENCIAS

- Carretero MI, Arraztoa CC, Caldevilla M, Ferrante A, Lombardo D, Neild D. Chromatin Dispersion test in equine spermatozoa. *InVet* 2010; 12, 249.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 2003; 6, 191-200.
- Isachenko E, Isachenko V, Sanchez R, Katkov I, Kreienberg R. Cryopreservation of spermatozoa: old routine and new perspective. In: Donnez J, Kimm SS, eds. *Principles and Practice of Fertility Preservation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press 2011a; 177-198.
- Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat AG, Risopatron M.J, Sanchez R. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 2008; 136, 167-173.
- Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *J Androl* 2011b; 33, 462-468.
- McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guass S.J. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology* 2008; 69, 639-650.
- Morrell, J.M. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32, 436-440.
- Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, Orth I, Isachenko E. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters* 2002; 23, 93-102.
- Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51, 721-727.
- Sanchez R, Isachenko V, Petrunkina AM, Risopatron J, Schulz M, Isachenko E. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl* 2011a; 33, 559-562.
- Sanchez R, Risopatron J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Kreienberg R, Isachenko E. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 2011b; 43, 233-241.