

CONSIDERACIONES SOBRE CONGELACION Y CONSERVACION DE SEMEN

DURAN DEL CAMPO, A.

D.M.V.

Acevedo Díaz 1241.

Montevideo - Uruguay.

Conferencia dictada en la Sociedad de Bulatría del Uruguay el 30/6/81.

RESUMEN.

En una primera parte trataremos de poner al día lo que sucede durante el proceso de congelación de una solución salina con células; el mecanismo de formación de cristales derivados de la congelación de agua primero y otros elementos después, así como la influencia de la temperatura, la velocidad de enfriamiento y el tipo de la solución en la forma, tamaño y número de esos cristales; su formación intra y extra celular y la consiguiente hipertonidad de las sales que las rodean.

Así mismo precisaremos la causa de la muerte de dichas células, cuando el proceso se realiza a una velocidad de enfriamiento inadecuada y tam-

bién los riesgos de la descongelación por razones idénticas y que traen consigo la llamada recristalización migratoria.

En una segunda parte, trataremos de dar una visión de los peligros a que se conduce al semen, cuando, por manejo inadecuado, sea durante la conservación o la inseminación, el mismo es expuesto por demasiado tiempo a temperaturas por encima de las críticas.

Veterinaria: 18 (79): 29 - 37, en - mar, 1982

INTRODUCCION.

1) El estudio de la congelación de células vivas se inicia muchísimos años atrás, pero recién es en 1950 que Smith y Polge en Inglaterra, lograron con éxito congelar semen de toro.-

A esta experiencia inicial siguieron muchísimas más y hoy prácticamente se congela semen con mayor o menor éxito, a los machos de todas las especies domésticas, incluido el hombre y muchas especies de zoológico - más de 100.-

Así como muchos investigadores - la gran mayoría - prefirieron aplicar la investigación sobre bases prácticas, tratando de mejorar los métodos de congelación en las distintas especies, en un esfuerzo por incrementar los porcentajes de fertilidad, otro grupo, dedicó su esfuerzo a tratar de comprender las razones, por las que el espermatozoide moría o lograba sobrevivir a tan baja temperatura, o sea, el mecanismo íntimo de la congelación.-

Este hecho resulta casi paradójal, dado que no fue investigando las causas que mataban los espermatozoides o las células, que se llegó al descubrimiento de los métodos de congelación, sino que, al contrario, descubiertos el

método en un acto totalmente casual y afortunado, debieron posteriormente investigar qué era lo que sucedía en la célula cuando se la congelaba.

Como es de conocimiento, el Profesor Polge estudiaba métodos de congelación, sin resultado práctico alguno, cuando recibe órdenes de cambiar de laboratorio, para proseguir sus investigaciones en Cambridge. Parece que, en esa confusión, que determina toda mudanza, hubo también pérdida de etiquetas y confusión de envases, habiéndose congelado semen sin proponerse expresamente, con el diluyente habitual, agregado a glicerina o glicerol, que fue finalmente el elemento crioprotector que permitió congelar sin matar células vivas.

Nace allí, la Cryogenesis, o Cryobiología, que es precisamente la ciencia que estudia la relación de acontecimientos que se suceden entre las células y los fluidos en momentos de la congelación.

Y es precisamente el aspecto físico-químico de esa relación, mucho más que la metodología empleada, la que queremos destacar hoy.

1) ASPECTOS FISICO-QUIMICOS DE LA CONGELACION EN SI.

La congelación de semen no es en síntesis más que, el traslado mediante enfriamiento, del material seminal y el diluyente, de un estado líquido a un estado sólido. La sustancia a congelar - en este caso el semen - está integrada por distintos elementos con diferentes temperaturas de congelación y a medida que aquella va descendiendo y alcanzando dichos puntos, esas sustancias van congelando una a una, hasta la congelación total del fluido. Los espermatozoides son células con un elevado porcentaje de agua y elementos químicos diversos y quedarán también sometidos a la regla de congelación que mencionábamos previamente.

Veremos ahora más detenidamente, qué sucede en la célula y en el medio diluyente, cuando la temperatura desciende al punto de congelación; a esos efectos haremos una revisión de ello según se trate de:

- Una solución salina sin células.
- Una solución salina con células.
- Una solución con el agregado de un elemento cryoprotector, pero sin células.
- Una solución con el agregado de un elemento cryoprotector, pero con células, o sea una solución glicerada de semen.

A) CONGELACION DE UNA SOLUCION SIN CELULAS.

El investigador americano Rapatz que ha fotografiado el proceso, sostiene, que el cambio físico más importante en la congelación de una solución salina, resulta la extracción de agua - en forma de hielo - fuera de dicha solución o sistema, lo cual se acompaña por otros importantes acontecimientos. Así por ejemplo, ni bien se inicia la congelación, también comienza el desprendimiento de calor - unas 80 calorías por cada gramo de agua convertida en hielo.- A medida que la congelación progresa y más agua se convierte en hielo, más aumenta la concentración de la sal y más desciende su punto de congelación. Llega un momento en el que, la sal y el agua comienzan a cristalizar simultáneamente, conociéndose dicha temperatura - distinta según cada solución - con el nombre de temperatura ecléctica.

En la Fig. 1 puede verse un ejemplo de congelación de una solución de Na Cl al 15^o/o; al comienzo el agua se va congelando y disponiendo en barras paralelas - b de la figura - permaneciendo separadas por canales -c- de la solución salina aún no congelada. En el cuadro 1 de esta misma figura puede apreciarse una cristalización primaria a 21^oC, conteniendo el canal C - entre las columnas de hielo b - la solución concentrada no congelada.

En el cuadro 2 de la misma figura, se aprecia el efecto de la cristalización cuando la misma solución ha alcanzado los 35^oC bajo 0. Al llegar a este temperatura - temperatura ecléctica de esta solución - agua y sal congelan simultáneamente formando otro diagrama distinto.

Veremos ahora, porque ello interesa en el proceso de congelación de semen, como las características físicas - tipo y tamaño de esos cristales de hielo - varían según la velocidad con que el agua es extraída del sistema, lo cual dependerá a su vez, de la temperatura de congelación, la velocidad de enfriamiento y la concentración y naturaleza de la solución.

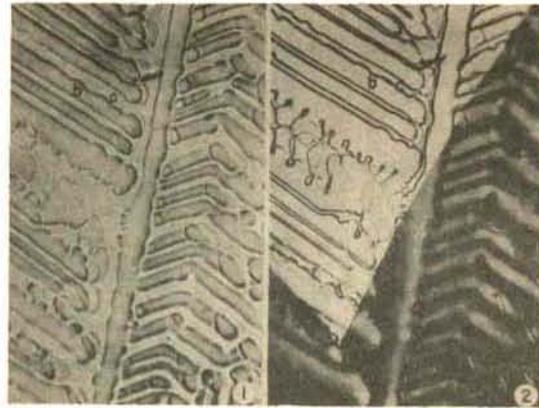


Fig. 1 - Congelación de una sol. de Na Cl al 15^o/o. Cuadro 1= b= agua congelada c=sol. salina no congelada. Cuadro 2: La sol. ya ha congelado formando otro diagrama distinto.

En la figura 2 de Rapatz, pueden observarse las distintas formaciones de cristales según sea la velocidad y naturaleza de la solución congelada: arriba izquierda vemos una formación hexagonal lograda con una solución de glicerol congelada lentamente a - 35^oC; a su derecha, una irregular, lograda mediante congelación rápida de una solución de sacarosa a - 65^oC. Abajo izquierda, se observa una formación esporulada obtenida congelando a - 60^oC y a velocidad intermedia, una solución de glicerol y a su derecha, rosetas irregulares provocadas por la congelación de una solución de gelatina a - 25^oC.

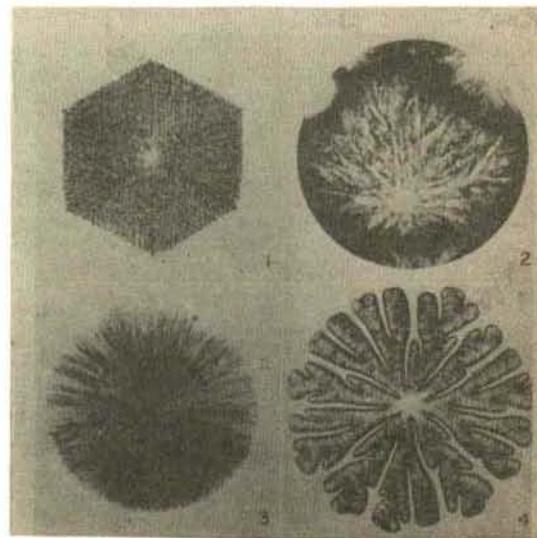


Fig. 2 - Influencia de la velocidad y naturaleza de la solución congelada, en la forma y disposición de los cristales.

Como puede verse, según sea la solución, la temperatura utilizada y su velocidad de descenso, también será la forma, característica y cantidad de cristales formados. Esto se da como dijimos, para una solución salina sin células; veremos ahora qué pasa cuando introducimos células en dicha solución.

B) CONGELACION DE UNA SOLUCION SALINA CONTENIENDO CELULAS.

Según el investigador americano Mazur, al descender bajo 0° - la temperatura, el agua de la solución comienza a congelar. A medida que aquella sigue bajando, más agua de la solución prosigue congelando, determinando un considerable aumento de la concentración salina. En esa circunstancia se establece una notoria diferencia de potencial químico entre la solución acuosa dentro de la célula y aquella fuera de la misma y en la que, para producirse el equilibrio correspondiente, deberá suceder una de éstas dos prerrogativas: el agua fluye fuera de la célula congelando exteriormente y determinando el aumento de la concentración salina dentro de la célula, o, b) el agua intracelular congela dentro de la célula, aumentando por idéntica razón la hipertonidad salina intracelular.

Cualquiera de esos dos acontecimientos son críticos para la célula y el que suceda, uno u otro, dependerá de la velocidad de congelación. Si ésta se realiza lentamente,

el equilibrio del sistema se obtendrá a través de la salida del agua fuera de la célula y si aquella es muy rápida, el agua congelará dentro. Conviene recordar - según Mazur - que el riesgo de congelación para la célula, no es tanto la temperatura excepcionalmente baja, sino su pasaje en dos oportunidades - congelación y descongelación - a través de la temperatura crítica situada entre los menos 15 y 150°C bajo 0 , riesgo que precisamente se limita con una velocidad óptima de congelación y descongelación.

El efecto de esa velocidad de enfriamiento lo expresa Mazur gráficamente en la fig. 3; puede notarse en la misma, que si aquella es lenta - parte superior derecha - el agua intracelular sale para congelar fuera; si la velocidad aumenta - centro - el agua no tiene tiempo de salir y congela dentro de la célula y finalmente, si la velocidad de enfriamiento es muy intensa - inferior derecha - la cristalización se hace también dentro de la célula, disminuyendo el volumen de los cristales pero aumentando su cantidad.

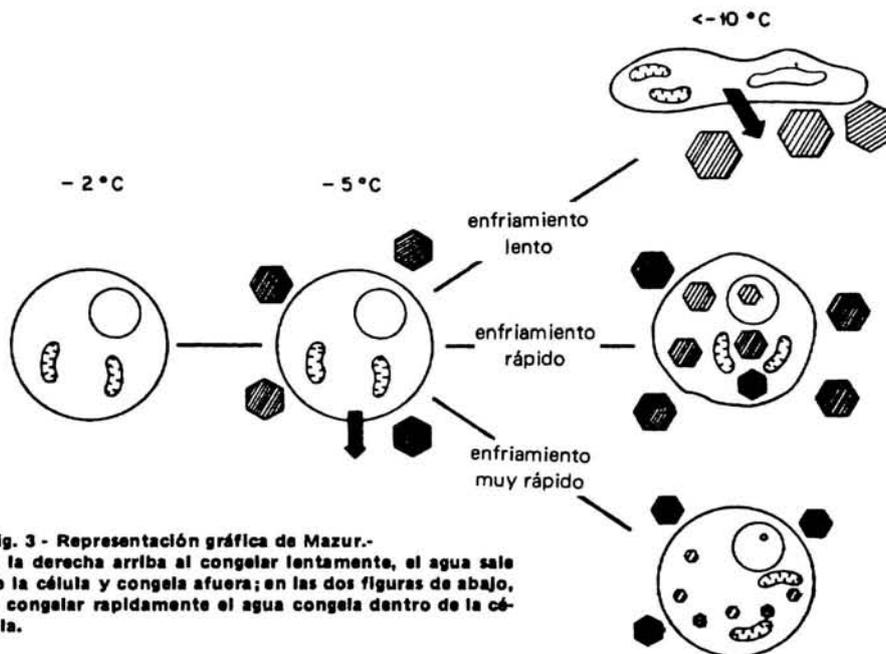


Fig. 3 - Representación gráfica de Mazur.-
A la derecha arriba al congelar lentamente, el agua sale de la célula y congela afuera; en las dos figuras de abajo, al congelar rápidamente el agua congela dentro de la célula.

La velocidad óptima de enfriamiento sería pues, aquella suficientemente lenta como para evitar la formación intracelular de hielo y suficientemente rápida, como para evitar la hipertonidad de la solución.

La muerte celular puede producirse en ambos casos: por formación de hielo intracelular y consiguiente hipertonidad celular, o por hipertonidad de la solución.

Hay alguna teoría así mismo, que entiende que la causa de muerte podría deberse a un encogimiento o disminución del volumen celular derivado de la pérdida de agua, lo cual sería incompatible con la vida. Veremos ahora que sucede cuando introducimos un factor cryoprotector a la solución.

C) CONGELACION DE UNA SOLUCION GLICERADA SIN CELULA.

Hasta ahora hemos tratado la congelación de soluciones sin el agregado de aditivos cryoprotectores como el glicerol. Aparentemente, el agregado de glicerol modificaría el efecto hipertonizante a través de su propiedad coligativa, reduciendo a una temperatura dada, la fracción congelada y la concentración salina en la fracción aun no congelada.

En la fig. 4 - de Mazur - puede apreciarse - arriba - el comportamiento de una solución salina sin glicerol y abajo, con el agregado de éste.

Puede notarse que a idéntica temperatura, la superficie no congelada (no rayada) es mucho mayor en la solución glicerada que en la sin glicerol. El glicerol, según alguna otra teoría, actuaría penetrando dentro de la célula, disminuyendo la fracción congelada y disminuyendo la hipertonicidad salina. Es probable también que el glicerol actúe disminuyendo la salida de agua desde la célula misma, impidiendo así el encogimiento celular que habíamos visto era letal para la célula.

Finalmente, hay quienes afirman que el efecto protector del glicerol no se realiza a partir de su penetración dentro de la célula, sino protegiendo a ésta desde el medio exterior. Como puede verse, no se ha definido totalmente el modus operandi del glicerol como elemento cryoprotector.

Finalmente, introduciremos ahora espermatozoides en la solución glicerada.

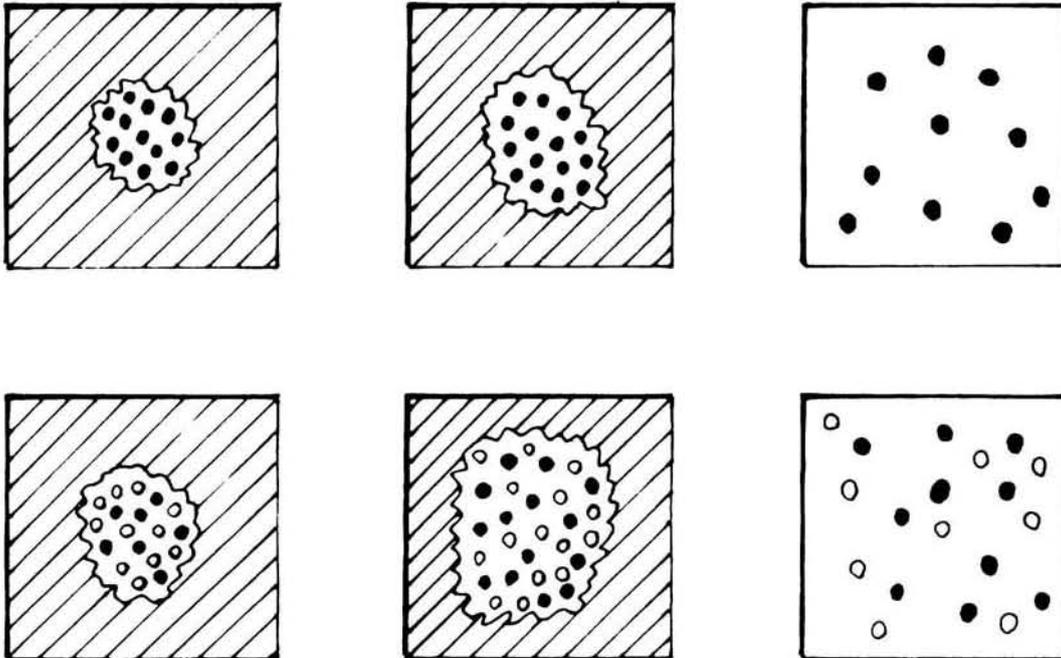


Fig. 4 - Expresión gráfica de Mazur.- Arriba, a igual temperatura que abajo, la solución no glicerolada presenta una superficie más pequeña que la figura de abajo - sol. glicerolada.

D) CONGELACION DE UNA SOLUCION GLICERADA CON CELULAS - SOLUCION GLICERADA DE SEMEN.

Estudiado el mecanismo de congelación y la acción protectora del glicerol, ubiquemos ahora el espermatozoide en el medio a congelar. Iniciado el proceso de enfriamiento, el agua comienza a salir de la solución, transformándose en hielo dispuesto en forma de barras.

Rapatz, a través del microscopio electrónico ha captado ese instante - fig. 5 -; puede verse en ella, a las barras de hielo - I - aprisionando prácticamente la solución diluyente aun no congelada, integrada por citrato de sodio, yema de huevo y glicerol y entre las que pueden verse las cabezas - S - de dos espermatozoides bovinos. Si la temperatura sigue decreciendo, la congelación seguirá su curso en la forma ya estudiada, dependiendo la vida del espermatozoide de que la velocidad impuesta al sistema impida la formación rápida de cristales intracelulares, o que la tonicidad inter o intra celular aumente demasiado.

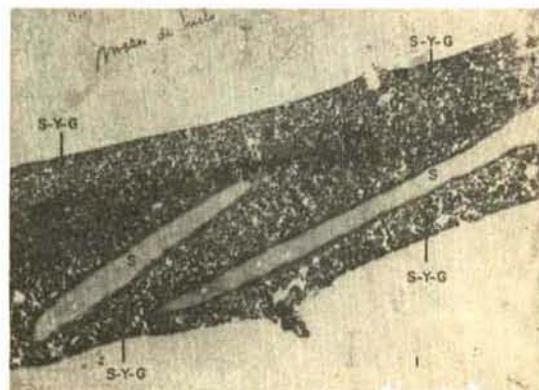


Fig. 5 - Foto tomada a través de microscopio electrónico. La masa de hielo - I - ya ha congelado y aprisiona la sol. diluyente aun no congelada. Puede notarse la cabeza de dos espermatozoides - s -.

El efecto de una congelación bien llevada puede apreciarse en la fig. 6, donde es dable notar la correcta estructura del espermatozoide congelado, en contraposición de las figs. 7 y 8 que muestran una congelación ultrarápida y su efecto sobre la estructura interna de la célula.

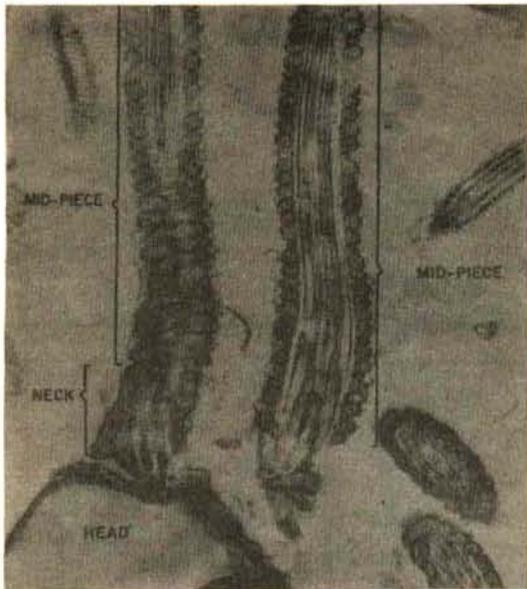


Fig. 6 - Fotografía a través de microscopio electrónico; puede notarse la perfecta organización del espermatozoide luego de descongelado.

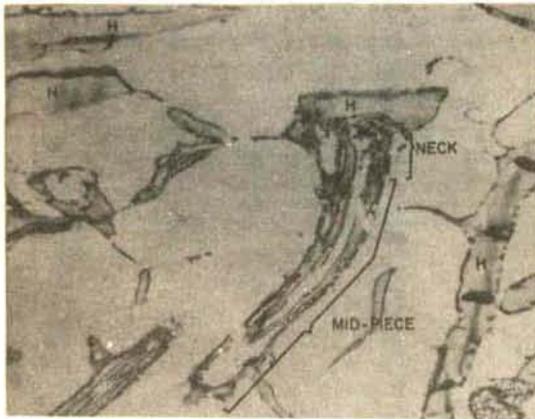
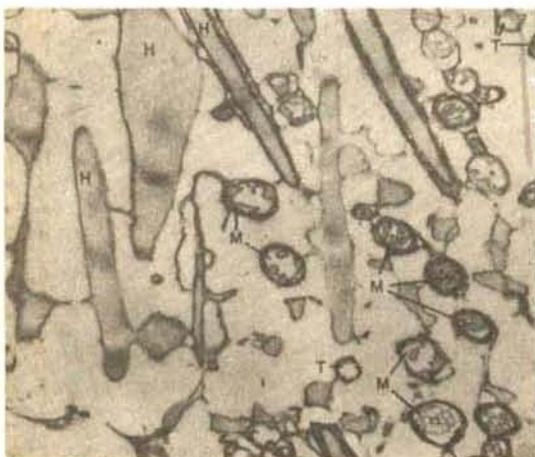


Fig. 7



Figs. 7 y 8 - Fotografía tomada luego de descongelada una muestra de semen congelado en forma ultrarrápida; se notan lesiones de todo tipo tanto en cabeza como en cuello y cola.

Finalmente, queremos agregar algo más sobre la descongelación, que no significa otra cosa que someter al espermatozoide a desandar el peligroso camino entre los menos 50 y menos 150°C, esta vez en sentido inverso al tomado cuando la congelación.

El hecho de que una solución de semen haya congelado, no quiere decir de que dicha solución se haya estabilizado totalmente; en realidad, el tipo de cristales puede cambiar tanto de forma como de tamaño en un proceso conocido con el nombre de RECRISTALIZACIÓN MIGRATORIA.

Rapatz nos muestra - fig. 9 - una solución glicerada al 10% en la que pueden apreciarse numerosos globulitos uniformes y como una hora después, aquellos se transforman en numerosos cristales irregulares (cuadros 1 y 2) o como una solución de glucosa al 30% puede congelarse abruptamente a - 35°C permaneciendo transparente - cuadro 3 - y opacarse totalmente cuando la muestra es llevada a - 10°C, cuadro 4.

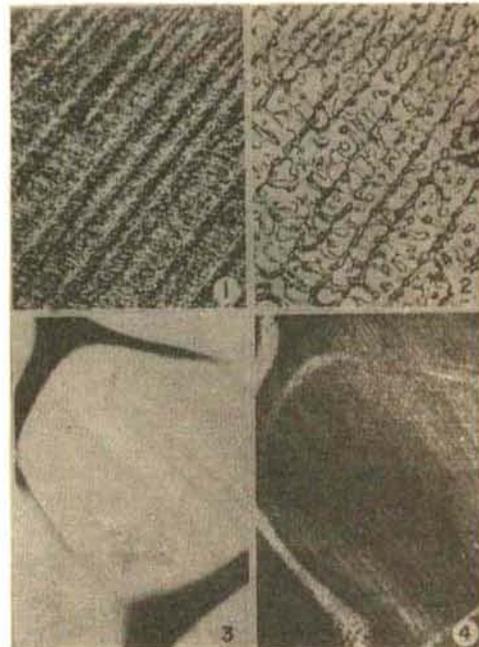


Fig. 9 - Efecto del cambio de temperatura en la forma y disposición de los cristales; puede apreciarse que a cada cambio de aquella, también varía la forma de aquellos.

Este proceso de cristalización se da frecuentemente durante la descongelación (suponemos también durante la conservación) y puede ser sumamente dañino para el espermatozoide. Si la velocidad de descongelación es muy lenta, el proceso de recristalización transforma pequeños cristales en grandes, con riesgo de destrucción celular, siendo ello la razón práctica de la preferencia de la descongelación rápida a 37°C sobre aquella lenta de a 5°C.

2) CONSERVACION DE SEMEN.

A) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACION EN LA MOTILIDAD E INTEGRIDAD CELULAR.

La importancia de una temperatura constante y baja, sobre todo cuando se pretenden largos plazos de conservación, resulta esencial.

De acuerdo a Rapatz, el reordenamiento de la estructura cristalina - recristalización - se produciría a los -80°C , considerando a la solución totalmente estable recién a los -100°C .

Esa es la causa del mejor comportamiento de la conservación en nitrógeno líquido a -193°C sobre aquella en hielo seco en -79°C - fig. 10.

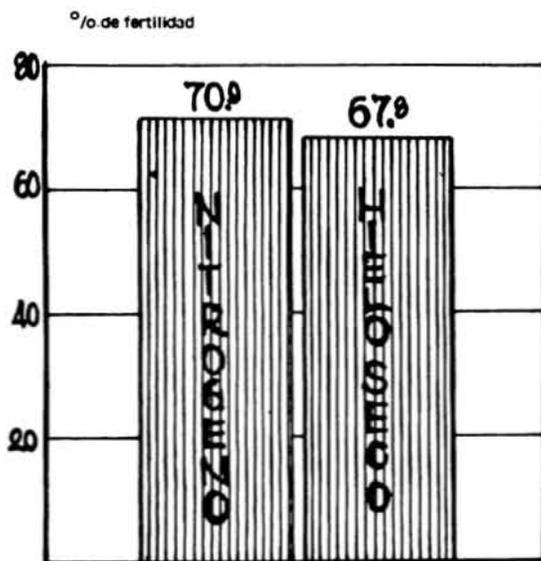


Fig. 10 - Diferencia en fertilidad de semen conservado en hielo seco y nitrógeno líquido.

Para estudiar la influencia de la conservación a temperaturas inferiores a -79°C , Van Demark sometió semen a temperaturas de -79°C , -65°C , -51°C , -37°C y -23°C respectivamente, foto 11., pudiéndose notar que ya a las 24 horas la motilidad del semen mantenido a temperaturas inferiores a los -79°C , había descendido considerablemente y después del cuarto día prácticamente había desaparecido, salvo en el semen conservado a -79°C y -65°C .

Estos riesgos eran antes comunes en la conservación en hielo seco.

Por ello es excepcionalmente importante la constancia de las bajas temperaturas y frecuentes los peligros ocasionados durante el manejo del semen, tanto, durante los trasposos de semen, como en los momentos de la inseminación.

Saacke, por ejemplo estudió las temperaturas logradas en un cuello de termo de 15 centímetros - fig. 12.

Debe tenerse en cuenta incluso, que estas temperaturas subirán aun más, en proporción inversa a la altura del nitrógeno en el termo, de donde entonces la importancia de trabajar con buena reserva de nitrógeno.

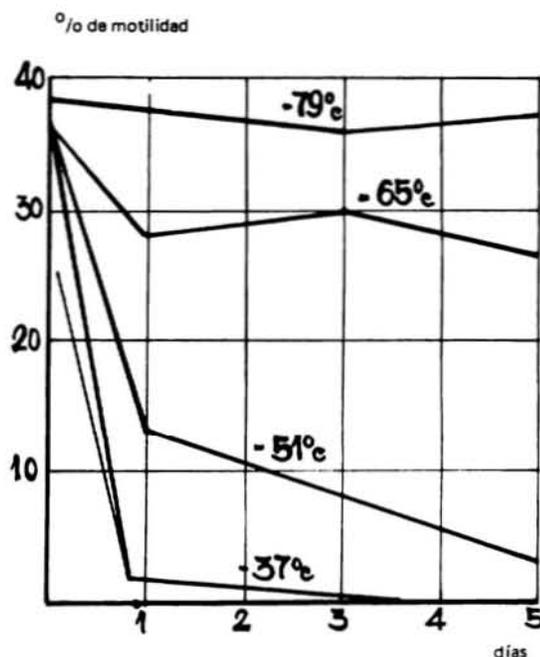


Fig. 11 - Influencia de distintas temperaturas inferiores a -79°C . en la conservación de semen. Nótese que ya a las 24 horas, todo el semen, excepto el conservado a -79° ha bajado considerablemente la motilidad.

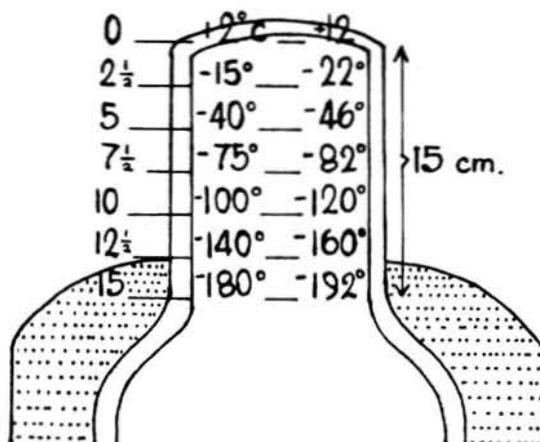


Fig. 12 - Temperaturas en el cuello de un termo tipo.

La influencia del tiempo de exposición de paillets en la parte superior o inferior respectivamente del cuello del termo en su temperatura interna; fue estudiado por el mismo Saacke, fig. 13.

Puede notarse que en la parte superior del mismo - a 5°C - la temperatura de la paillet ya a los 30" asciende a más de lo deseado, -60°C , mientras que en la parte inferior del mismo, -22°C puede permanecer mucho más tiempo sin deterioro.

Así mismo cabe notar que, la temperatura de conservación y el tiempo de exposición influye en forma totalmente distinta en la temperatura interna del semen, según el mismo se halle congelado en ampollas, paillets o pellets, fig. 14.

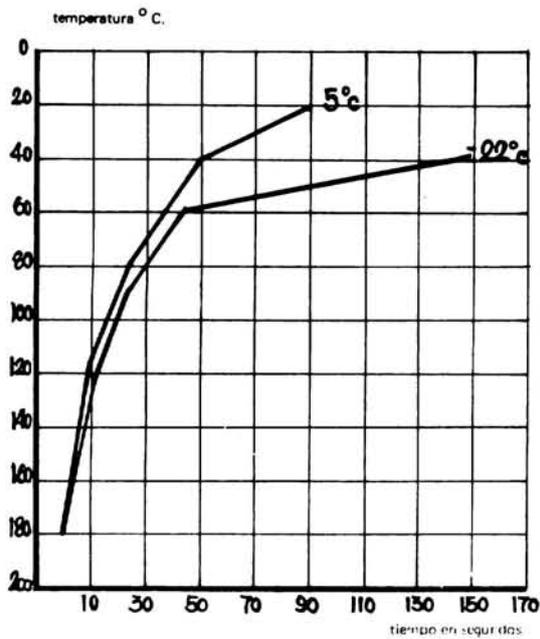


Fig. 13 - Influencia del tiempo de exposición en la parte superior e inferior del cuello del termo - temperaturas de 5° y - 22° C. respectivamente - en la temperatura interna de paillets de 0,5 ml.

Puede notarse que ya al 1/2 minuto de exposición a 20°C, la temperatura en los paillets es inferior al mínimo recomendado, - 75°C, mientras la ampolla recién logra esa temperatura a los 2' de exposición. Eso es debido lógicamente a la distinta relación superficie/volumen, existente entre aquellas y los paillets.

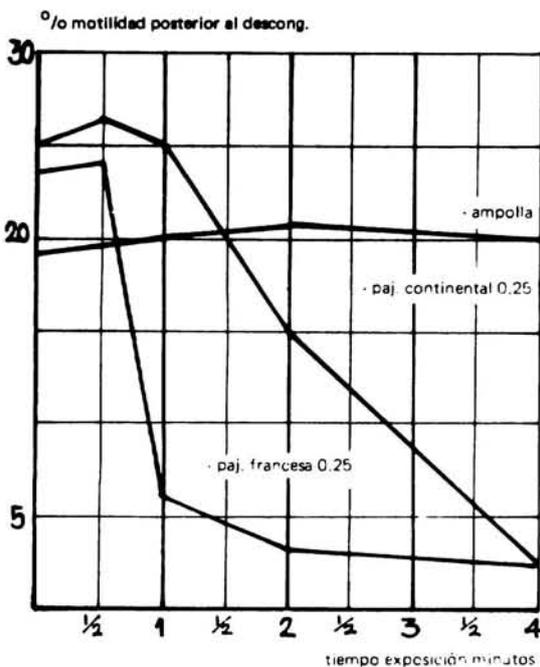


Fig. 15 - Influencia exposición a 20° C., durante distintos períodos de tiempo, en la motilidad del semen, ampolla, pajuela cont. o francesa introducido subitamente en nitrógeno y descongelado luego.

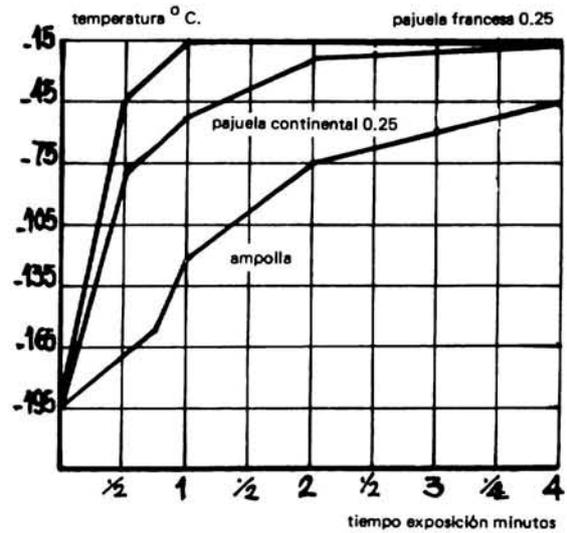


Fig. 14 - Temperatura interna del semen según sea ampolla, pajuela francesa o continental expuesta a temperatura ambiente 20° C. durante distintos períodos de tiempo.

En otra experiencia similar, destinada a notar la influencia de la temperatura y el tiempo de exposición, no ya en la temperatura interna del semen sino en su motilidad, los mismos investigadores americanos, Berndston y Col. expusieron a ampollas y paillets a temperaturas de 20° durante distintas fracciones de tiempo, para luego sumergir las muestras en nitrógeno y evaluar la motilidad, fig. 15. Puede apreciarse como mientras el % de motilidad del semen congelado en ampollas no se vio disminuido en ningún instante, en cambio en los paillets, un minuto de exposición disminuyó la motilidad y a los cuatro minutos ya la misma había desaparecido.

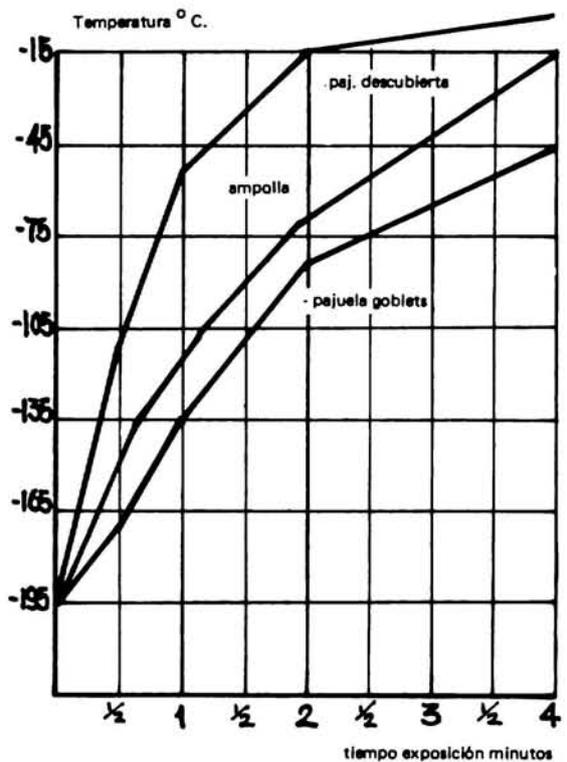


Fig. 16 - Influencia exposición a 20° C. en la temperatura interna de pajuelas protegidas o no en goblets.

A efectos de proteger los paillets del riesgo de la exposición, es imprescindible manejar estos dentro de envases especiales, denominados goblets, según puede verse en la figura 16.

Puede notarse que mientras a los 2 minutos de exposición la temperatura en los paillets dentro de los goblets alcanza -80°C , - casi igual a la de las ampollas - el paillet aislado alcanza a -15°C , o sea una temperatura absolutamente insuficiente.

Igual experiencia considerando no ya la temperatura interna del semen, sino su motilidad, puede verse en la figura 17.

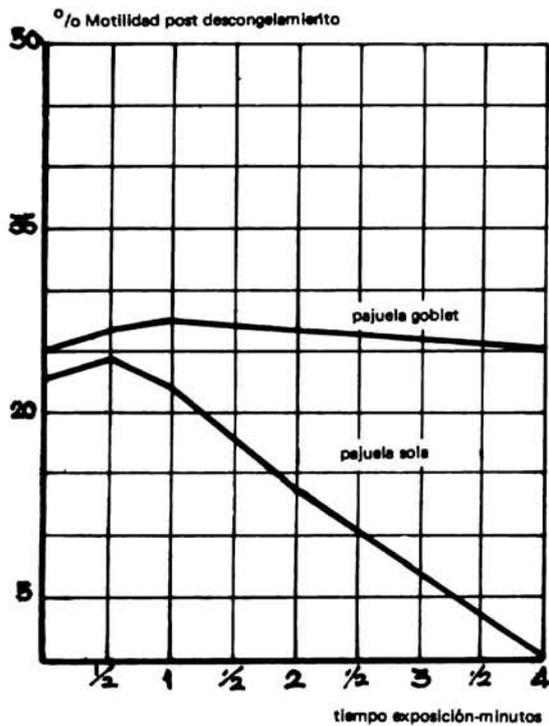


Fig. 17 - Influencia exposición a 20°C . durante distintos períodos de tiempo en la motilidad post descongelamiento de pajuelas protegidas o no en goblets.

Puede notarse que a los 4 minutos de exposición a 20°C , el paillet aislado ya no registra espermatozoides con motilidad, en cambio en el paillet en goblets, la misma se ha conservado plenamente.

El problema de los aumentos constantes de temperatura, producidos al exponer el semen cada vez que se proceda a inseminar, ha sido estudiado en otra experiencia en la que goblets conteniendo paillets eran expuestos durante un minuto a 2 centímetros de la parte superior del termo, sumergiéndolo luego en nitrógeno y repitiendo idéntica operación cinco veces seguidas.

En la figura 18 puede apreciarse la temperatura interna de esos paillets, según el termo en el que hacía la experiencia tuviera 15 cm. de altura o estuviese lleno; mientras en el primero los paillets en exposición aumentaban de temperatura peligrosamente; en el termo lleno, la misma no sufría casi alteraciones.

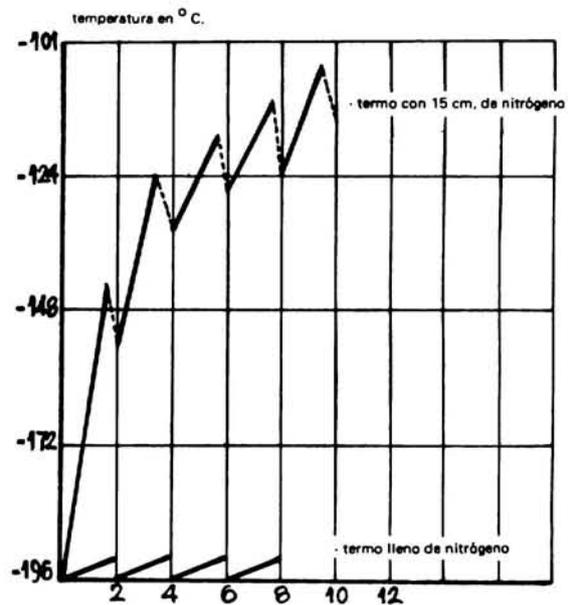


Fig. 18 - Tiempo exposición (minutos) a nivel de cuello.

EXAMEN SEMEN	TERMO BANCO	TERMO CAMPO	DIFERENCIA
MOTILIDAD	23.1	21.0	- 2.1
% ACROSOMAS INTACTOS	40.2	36.7	- 3.5
m. UGOT/ 10^9	269.0	261.0	- 8.0
IU ACROSINA/ 10^9	11.4	11.1	- 0.3

Fig. 19 - Influencia de conservación sobre varias características del Semen en T. Banco y T. Campo durante 6 meses.

Trabajar pues con termos con cantidad suficiente de nitrógeno es altamente recomendable, lo mismo que espaciar las extracciones de semen de modo que este alcance cada vez temperaturas lo más bajas posibles.

En otra experiencia destinada a confirmar estos resultados, Pace y Col, evaluaron el deterioro del semen en cuanto a motilidad, integridad acrosómica, contenido de acrosin y GOT (transaminasa oxalacética glutámica), se-

gún el mismo estuviese durante 6 meses en un termo banco o en un termo de trabajo, fig. 19.

Como puede verse, en todas las características estudiadas, la conservación en banco, superó a aquella en un termo de trabajo. Hacemos notar así mismo nosotros, que en esta experiencia el termo de trabajo se manejó de acuerdo a la técnica aconsejada; si en cambio se hubiera manejado el mismo en forma inadecuada las diferencias hubieran sido notoriamente mayores.

Recibido para su publicación
el 5 de Agosto de 1981.

Vaginas artificiales
Camisas
Embudos
Porta Copas

PARA VACUNOS y LANARES

Guantes con protección
Delantales de goma

Reparaciones



WIC Fabricación

Francisco Reduello 991
casi Gonzalo Ramirez
Tel.: 91 71 32
MONTEVIDEO - URUGUAY

Envíos a cualquier punto de la República

ADEVITEX[®]

Dispert

**UNA VACA
UN TERNERO**

No siempre se puede ver esta imagen en el campo debido a la falta de vitaminas en periodos de parto.

ADEVITEX
una vaca, un ternero, es, la seguridad y resultado de un fuerte shock vitamínico.

Su médico veterinario sabe y confía en la investigación.
DISPERT



DISPERT
LABORATORIOS DISPERT S.A. DIVISION VETERINARIA AV. GAMBALDI 2787
TEL. 80 50 83 MONTEVIDEO

VADEMECUM VETERINARIO

Los profesionales y los estudiantes de veterinaria contarán con un **VADEMECUM** único en su género; obra de los Doctores Juan Pedro Puignau y Juan Dogliotti.

Contendrá todos los específicos autorizados que existen en plaza.

En un meticoloso trabajo de computadora se detalla la composición, la acción, las indicaciones o usos, la administración o dosis, la presentación, las contraindicaciones y precauciones.

Confeccionado en un tamaño práctico y diseñado en forma tal de mantenerlo actualizado permanentemente se convertirá en el auxiliar indispensable del Médico Veterinario.