

INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre CURSO DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS

Código BID-FP-V-2003-1-P-026

Entidad Responsable Postulante Individual LLAMAS DEL SUR S.A.

Coordinador

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad) REPUBLICA FEDERAL DE ARGENTINA, PROVINCIA DE BUENOS AIRES, CIUDAD DE BUENOS AIRES

Tipo o modalidad de Formación CURSO CORTO

Fecha de realización 6 AL 14 DE SEPTIEMBRE 2003

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor (si corresponde)
Pamela Poblete Krumbach	Llamas del Sur S.A.	Médico Veterinario	

Problema a Resolver: la necesidad permanente de los profesionales que desarrollan biotecnologías reproductivas de mantenerse al día en cuanto a nuevos conocimientos teóricos en estas materias, así como sus aplicaciones prácticas. Esto es de suma importancia en el campo de los camélidos sudamericanos, ya que en este rubro no se ha podido lograr el desarrollo de técnicas confiables y repetibles de criopreservación de gametos y de embriones.

Objetivos de la Propuesta:

General: Complementar y perfeccionar las actuales técnicas y conocimientos en cuanto a la criopreservación de gametos y embriones de camélidos sudamericanos.

Específicos:

- a) Complementar los conocimientos y técnicas actualmente en uso en el criadero para la evaluación de gametos.
- b) Actualizar el manejo de equipos para la evaluación, procesamiento y estandarización de gametos.
- c) Actualizar los conocimientos sobre vitrificación y criopreservación de embriones.
- d) Actualizar la información sobre importación y exportación de semen.
- e) Establecer contactos con profesionales del área para intercambiar conocimientos y experiencias.

2. Antecedentes Generales

La cantidad de información entregada durante los días que se desarrolló el curso es tanta y de tan variada índole que fue necesario un tiempo adicional de estudio una vez que éste había terminado, ya que muchas de las materias presentadas eran nuevas. Además de las materias vistas en clase se entregó gran cantidad de información escrita, la cual va incluida en los anexos de este informe, y que ha ayudado para comprender mucho mejor técnicas vistas en teoría y en la práctica durante el curso.

Los prácticos estaban bien enfocados a lo que el curso ofrecía, siendo relativamente sencillos, pensando en que la mayoría de los participantes se desarrollan a nivel de campo, por lo que no se pueden esperar equipos muy sofisticados. A cada alumno se le dio el tiempo y el material necesarios para poder compenetrarse completamente con la técnica, haciéndole ver sus ventajas y desventajas.

Una parte muy importante del curso, y en la que la participante tenía muy pocos conocimientos, era el aspecto biofísico de la criopreservación de gametos y embriones, es decir, los cambios que experimentan las células al ser sometidas a enfriamiento y congelamiento para su posterior conservación. Hubo clases muy completas y claras en esta materia, así como también aplicaciones prácticas. Una de ellas y que resulta muy interesante es un programa computacional desarrollado por la INRA (Francia) el cual calcula y demuestra que los diversos sucesos físicos y biológicos que se presentan en semen de cerdo o de carnero bajo distintas condiciones de enfriado y congelamiento, utilizando un sinnúmero de diluyentes, crioprotectores, envases, etc.

Resumiendo, los conocimientos adquiridos en el transcurso de esta actividad fueron más allá de las expectativas planteadas al momento de postular a este proyecto.

3. Itinerario Realizado: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
06/09/03	Traslado Temuco-Santiago-Buenos Aires	Traslado en avión desde Temuco hasta Buenos Aires para poder participar del curso "Criopreservación de gametos" en la UBA.	Temuco – Santiago – Buenos Aires
07/09/03	Recorrer camino a la Facultad de Veterinaria de la UBA y sus instalaciones.	Conocer de antemano el camino a la Facultad de Veterinaria de la UBA y poder llegar sin problemas al día siguiente, día del inicio del curso.	Buenos Aires
08/09/03	Clases teóricas	Preparar una base sólida de conocimientos para las actividades prácticas	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
09/09/03	Clases teóricas	Preparar una base sólida de conocimientos para las actividades prácticas	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
10/09/03	Clases teóricas y prácticas	Aplicación de los conocimientos adquiridos	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
11/09/03	Clases teóricas	Preparar una base sólida de conocimientos para las actividades prácticas	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
12/09/03	Clases prácticas y teóricas	Aplicación de los conocimientos adquiridos, y luego seguir la preparación para las actividades prácticas que faltaban	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
13/09/03	Clases prácticas	Aplicación de conocimientos adquiridos durante toda la semana, y perfeccionamiento de técnicas en uso actual	Facultad de Veterinaria, UBA, Buenos Aires
14/09/03	Traslado Buenos Aires-Santiago-Temuco	Traslado en avión desde Buenos Aires hasta Temuco una vez finalizada la participación en el curso "Criopreservación de gametos" en la UBA.	Buenos Aires – Santiago – Temuco

No hubo modificaciones en el programa del curso, el cronograma presentado con este proyecto se mantuvo. El detalle del cronograma del curso se entrega en los anexos.

4. Resultados Obtenidos

4.1. Morfología y comportamiento del espermatozoide

Espermioogénesis y causas de anomalías de la misma, ya sea afectando la morfología de los espermatozoides o de su contenido genético. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.2. Nociones de criopreservación

Características biofísicas de espermatozoides, ovocitos y embriones de las cuales depende el método de criopreservación a utilizar. En este punto cabe recalcar el uso de un gran número de fórmulas matemáticas que pueden indicar los cambios físicos que ocurren durante el proceso. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos b y c.

4.3. Criopreservación biológica

En este tema se hizo hincapié en los distintos procesos térmicos y sus consecuencias dependiendo de un gran número de factores (especie animal, solución de dilución, formulación de la solución, método de congelación y descongelación, etc.) Con esto se dio cumplimiento a los objetivos b y c.

4.4. Aplicación práctica de simuladores de congelamiento de semen de cerdo y ovino

Se trata de un programa computacional desarrollado por el INRA (www.inra.fr) que permite anticipar el comportamiento de los espermatozoides durante el proceso de congelamiento e identificar los puntos críticos del mismo dependiendo de la información que se le entregue en cuanto a volumen de semen, concentración final de espermatozoides vivos esperados, composición de solución de dilución (osmolaridad), tipo de envase (material y tamaño). Este programa entrega un informe final en el cual se identifican los sucesos en cada momento de la simulación y posibles causas de los problemas que se presenten. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos b, c y d.

4.5. Métodos de extracción de semen e inseminación artificial

Hay varios métodos, pero se privilegian aquellos que representan el menor peligro de lesiones para el animal y también para el operador, es por ello que en especies domésticas se usa generalmente la vagina artificial, la cual es adaptada para cada especie en particular. En el caso de especies silvestres y de difícil dominio se prefiere la aplicación de electroeyaculación generalmente con sedación o anestesia total del macho. Con esto se dio cumplimiento al objetivo b.

4.6. Núcleo espermático y métodos de evaluación de éste

Origen y características del núcleo espermático, basándose principalmente en espermatozoides bovinos y de ratones. Se dieron pautas de algunos métodos de evaluación de la cromatina concentrada en la cabeza del espermatozoide. También se presentó un método de evaluación de ADN espermático post-descongelado. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.7. Evaluación de calidad seminal

Las características a considerar al momento de evaluar una muestra de semen son muchas, algunas de ellas dependen de la experiencia del observador por ser subjetivas (motilidad espermática, viscosidad, olor, color), mientras que otras son indiscutibles (pH). Se destacaron 2 pruebas sencillas de laboratorio que se pueden aplicar a las muestras para determinar su viabilidad (vivos-muertos, integridad de acrosoma). En el práctico desarrollado en este tema se presentaron muestras al microscopio de espermatozoides de bovino, porcino, equino, camélido sudamericano y ovino sometidos a los distintos test de evaluación de cromatina, con el fin que los alumnos pudieran identificar y diferenciar in situ las normalidades y anormalidades en esas especies. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.8. Mejoramiento de calidad seminal

Se hizo un resumen de protocolos usados en investigación y en el comercio para lograr la mejor calidad de semen y así favorecer la capacidad de fecundar del mismo. Es importante recalcar que se recomienda el uso de estos métodos sólo cuando haya algún problema como orquitis o senectud del macho, ya que en estos casos hay mayor probabilidad de obtener semen con anormalidades o teratozoospermia. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.9. Sexaje de semen

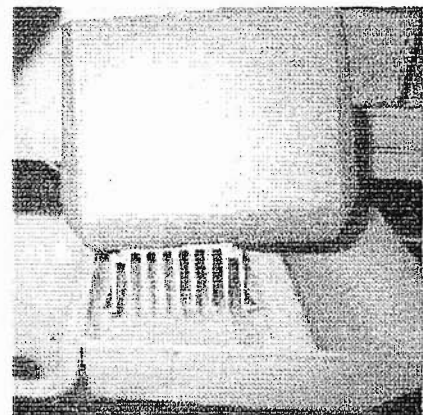
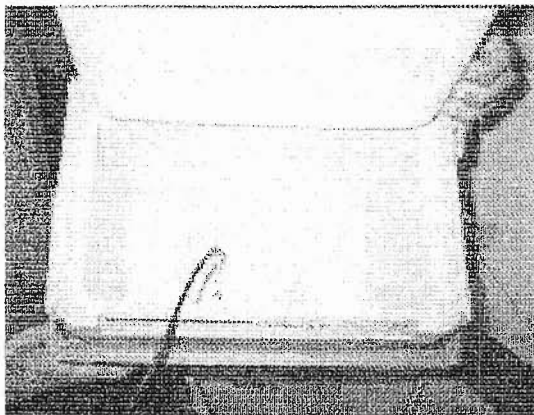
El sexaje de semen se usa principalmente en la producción de vacunos de carne ya que el objetivo que se persigue con este método es lograr el mayor número de crías macho. Este método se basa en el peso específico del contenido de ADN de los espermatozoides, asumiendo que aquellos con el cromosoma Y son 3-4% más livianos que los que contienen la información del cromosoma X. Hasta el momento la citometría de flujo ha demostrado ser la técnica más confiable para lograr este objetivo ya que identifica una mayor concentración de ADN en los espermatozoides con el cromosoma X. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.10. Ovario y ovocitos

Repaso del comportamiento hormonal del aparato reproductor femenino y desarrollo ovárico. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y b.

4.11. Criopreservación de semen (Foto)

Se desarrolló una actividad práctica que incluyó la fabricación de heladeras de semen basadas en una caja Coleman[®], placas Peltier y disipadores (fotos 2, 3 y 4). Luego se ofreció una charla guiada mediante un video en el cual se mostraba el funcionamiento del Sephadex[®] como método de mejoramiento seminal en el laboratorio. Finalmente se procedió a congelar varias muestras de semen de bovino con un protocolo sencillo aplicable en terreno, destacando las debilidades del mismo y haciendo sugerencias para prevenirlas. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a, b, c y e.



Fotos 2, 3 y 4: Heladera de fabricación casera con placas Peltier

4.12. Criopreservación de embriones in vivo e in vitro

Se explicaron los protocolos clásicos de criopreservación para embriones obtenidos in vivo e in vitro y porcentajes de preñez esperados en algunas especies domésticas. Con esto se dio cumplimiento al objetivo c.

4.13. Criopreservación de ovocito

Se identificaron los puntos críticos de los diversos protocolos de obtención, manipulación y criopreservación de ovocitos. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a, b y c.

4.14. Criopreservación de tejido ovárico

Razones de criopreservación de tejido ovárico y protocolos de conservación según la especie. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a y c.

4.15. Vitrificación de ovocitos

Se desarrolló un práctico con la finalidad que los alumnos adquiriesen las habilidades necesarias para esta tarea. En el práctico se abordó el protocolo desarrollado por el Dr. Masashigue Kuayama para ovocitos de porcino. En los anexos se incluye el detalle de este práctico junto con el protocolo de vitrificación.



Foto 1: trabajo con lupas para la selección y lavado de ovocitos previo a la vitrificación. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a, b y c.

4.16. Importación y exportación de semen

Este punto estuvo enfocado específicamente a la realidad en esta materia en Argentina, por lo que sirvió para conocer sobre la legislación del vecino país y los problemas que enfrentan actualmente al competir con el mercado europeo, de Canadá y de Estados Unidos. Con esto se dio cumplimiento a los objetivos a, b, c y e.

4.17. Biología de la conservación

Se destacó la importancia de poder conservar material genético de especies en peligro de extinción (ciervos Padre David, felinos salvajes, pudú, etc.) o de animales en cautiverio que no se reproducen naturalmente. Con esto se dio cumplimiento al objetivo a.

5. Aplicabilidad

El desarrollo de técnicas de criopreservación de gametos y de embriones, sea de la especie que fuere, ha sido una inquietud que ha estado presente desde hace muchos años en la mente de científicos chilenos, especialmente enfocado a la producción (Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile).

Hay también algunos laboratorios del país que han puesto énfasis en el desarrollo de biotecnologías aplicables a las especies propias de la zona, ya sean éstas silvestres, como el pudú, el puma, la vicuña y el guanaco o domésticas, entre las que se cuentan las llamas y alpacas. Uno de estos laboratorios es el que está situado en el predio del Criadero Llamas del Sur S.A., entidad que mediante proyectos se ha dedicado al perfeccionamiento de técnicas de criopreservación de semen y de embriones llamas y alpacas. Los avances alcanzados en esta materia son enormes, pero aun no se ha logrado desarrollar una o más técnicas de confiabilidad y repitibilidad demostrables en este ámbito. Lo mismo sucede con trabajos presentados por investigadores de otros países de Sudamérica, Perú y Argentina especialmente en lo que a los camélidos sudamericanos se refiere, falta la posibilidad de repetir exitosamente dichas experiencias en otros laboratorios. Aprovechando la ocasión se conversó con profesionales dedicados a la reproducción de los camélidos que trabajan en la UBA y ellos confirmaron la dificultad que significa trabajar con estas especies debido al vacío de conocimientos en cuanto a las características físicas, bioquímicas y biológicas de los gametos y embriones de camélidos. Lo mismo sucede en cuanto al nivel de conocimientos sobre los cambios físicos y biológicos que gametos y embriones sufren al ser sometidos a tratamientos tan brutales como la congelación y descongelación. Se sabe lo que sucede en otras especies, pero aun falta mucho por descubrir en los camélidos sudamericanos.

En cuanto a la incorporación de los conocimientos adquiridos en este curso se debe tener muy en claro que el tema de la criopreservación de semen, ovocitos y embriones de camélidos es un tema a desarrollar a largo plazo, para el que es necesario contar con

fondos seguros por un largo período de tiempo, ya que son animales que difieren enormemente de las especies domésticas con las que normalmente se trabaja en inseminación artificial y transferencia in vitro (bovino, equino, suino, ovino, etc) y de quienes tenemos un nivel de conocimiento biológico mucho mayor ya que han sido mucho más investigados en el transcurso de los años.

Con los conocimientos adquiridos gracias a este curso es posible continuar la investigación detallada de las características de los gametos de camélidos sudamericanos, pero por terminar la ejecución del proyecto SAG de mejoramiento genético de estas especies en el cual se desempeñó la profesional es necesario buscar otras fuentes de financiamiento para lograr dicho objetivo, ya que se hace necesaria la existencia de un laboratorio con implementación costosa, además de los insumos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono /Fax	Dirección	E-mail
Universidad de Buenos Aires	Dra. Susana Giuliano	Docente e investigadora		Chorroarin 280, Capital Federal, Buenos Aires	smgiulia@fvet.uba.ar
Universidad de Buenos Aires	Dr. Humberto Cisale	Docente e Investigador		Chorroarin 280, Capital Federal, Buenos Aires	cisale@fvet.uba.ar
Universidad de Buenos Aires	Dra. M ^a Laura Fischmann	Docente e Investigadora		Chorroarin 280, Capital Federal, Buenos Aires	fischmann@fvet.uba.ar
INTA Tucumán	Srta. Silvana Apichela	Investigadora			sapichela@hotmail.com
	Dr. Juan Manuel Coley	Veterinario de terreno		Barranquilla, Colombia	juanmacoley@msn.com
	Dr. M. Rivolta	Investigador		Buenos Aires	mrivolta@cie-rp.com.ar
INTA Abra Pampa	Dra. Karina Cancino	Investigadora			akancino@hotmail.com
	Dra. Denise Mondino	Investigadora			denomondino@yahoo.com.ar

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar

- Convenios con Institutos de Reproducción de Argentina y Chile que cuenten con los medios, conocimientos, experiencia e instrumentos para realizar investigaciones bioquímicas, de biología molecular y comportamiento de gametos.
- Desarrollar proyectos de investigación serios en el altiplano chileno aprovechando los conocimientos hasta ahora adquiridos.
- Establecer convenios con industrias farmacéuticas para la investigación de gametos de camélidos sudamericanos.
- Participar de cursos y congresos que ofrezcan este tema para ir complementando los conocimientos adquiridos en este curso, aprovechando la experiencia de otros profesionales del rubro y discutir las posibles líneas de investigación a abordar en el futuro.

8. Resultados adicionales: capacidades adquiridas por el grupo o entidad responsable, como por ejemplo, formación de una organización, incorporación (compra) de alguna maquinaria, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, etc.

9. Material Recopilado: junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Material	Caracterización (título)
Foto 1	Vitrificación de ovocitos
Foto 2	Heladera casera
Foto 3	Heladera casera
Foto 4	Heladera casera
Artículo 1	Bovine Reproduction IMV Manual
Artículo 2	Nociones de Termodinámica
Artículo 3	Nociones de las Propiedades Coligativas
Artículo 4	The effect of chromatin condensation and morphology of human spermatzoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmatic sperm injection programme.
Artículo 5	Aneuploidy in pig sperm
Artículo 6	ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis.
Artículo 7	Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining
Artículo 8	Comparison of the effects of 2 methods of criopreservation on testicular sperm DNA.

Artículo 9	Complete selective absence of protamine P2 in humans.
Artículo 10	Cryopreservation of spermetazoa: a 1996 review.
Artículo 11	Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever.
Artículo 12	Chroamtin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa.
Artículo 13	Deoxyribonucleic acid loop and domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.
Artículo 14	Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry.
Artículo 15	Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells.
Artículo 16	Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays.
Artículo 17	Reliability of the Comet assay in cryopreserved human sperm.
Artículo 18	Sperm morphology and chromatin condensation before and after semen processing.
Artículo 19	Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development.
Artículo 20	A comparison of baseline and induced DNA damagein human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay.
Artículo 21	X-ray microanalysis of toluidine blue stained chromosomes: a quatitative study of the metachromatic reaction of chromatine.
Artículo 22	Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unripaired DNA breaks not allowed.
Artículo 23	Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with Non Return Rates: a preliminary study in France.
Artículo 24	Proper steps for bull semen dilution and freezing.
Artículo 25	Enrichment of high quality sperm in bovine semen. Relative effectiveness of three filtration matrixes.
Artículo 26	Crioconservación de gametas.
Artículo 27	Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing.
Artículo 28	Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa.
Artículo 29	Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the asssestment of their post-thawing function.
Artículo 30	Solidifation processes of solutions.
Artículo 31	Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions.
Artículo 32	Freezing of living cells: mechanisms and implications.
Artículo 33	Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation.
Artículo 34	Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation.
Artículo 35	Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human

	spermatozoa.
Artículo 36	Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol.
Artículo 37	Correction for solute/solvent interaction extends accurate freezing point depression theory to high concentration range.
Artículo 38	Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions.
Artículo 39	Embedding resin space, water contents and chromatin compaction in rabbit sperm nuclei: electron microscopic X-ray spectromorphometry of a brominated probe.
Artículo 40	The presence of water channel proteins in ram and human sperm membranes.
Artículo 41	Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations.
Artículo 42	Nucleus of the boar spermatozoon: structure and modifications in frozen, frozen-thawed, or sodium dodecyl sulfate-treated cells.
Artículo 43	Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing.
Artículo 44	Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen.
Artículo 45	Cryopreservation of boar semen. III: Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing.
Artículo 46	Cryopreservation of boar semen in mini and maxi-straws.
Artículo 47	Comparison with the theory of kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions.
Artículo 48	Morphology and biochemistry of in-vitro produced embryos: implications for their cryopreservation.
Artículo 49	Cryopreservation of embryos of farm animals.
Artículo 50	The earliest stages of folliculogenesis in vitro.
CD 1	Artículos en (pdf) y Criosimulación
Cronograma 1	Cronograma Curso de Criopreservación de Gametas
Guía 1	Técnicas de tinción nuclear
Guía 2	Evaluación de semen fresco

10. Aspectos Administrativos

10.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

_____ muy dificultosa _____ sin problemas _____ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

__X__ bueno _____ regular _____ malo

Siempre dio todo el apoyo necesario para que pudiera cumplir con lo propuesto (teléfono, internet, tiempo), no hubo problemas de calendario, siempre y cuando todo se organizara con antelación. Tal vez el único problema que se presentó fue disponer de todo el tiempo necesario, esto no por culpa de la entidad responsable, sino que yo cumplía una obligación laboral con ellos y no quería dedicar demasiado tiempo a esto, pues podía entorpecer mi labor en el criadero.

c. Información recibida durante la actividad de formación

__X__ amplia y detallada _____ aceptable _____ deficiente

d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

__X__ bueno _____ regular _____ malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

Siendo el único problema la distribución de tiempo por parte de la persona que ejecutó este proyecto, sería bueno asegurarse de antemano las fechas de estas actividades, ojalá antes de partir, así hay una obligación inmediata y programada. Las fechas presentadas en el proyecto fueron tentativas y finalmente costó un poco más de lo pensado la organización de las distintas actividades de difusión.

10.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	X		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa			
Reserva en hoteles			
Cumplimiento del programa y horarios	X		

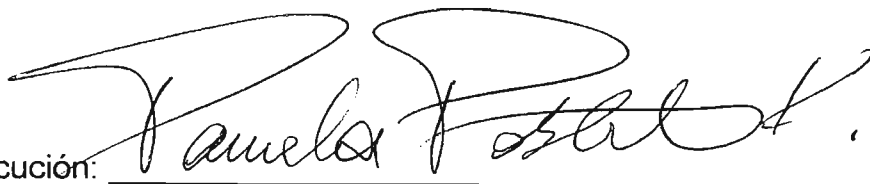
11. Conclusiones Finales

El curso llenó completamente las expectativas de la profesional participante, ya que se logró la inclusión de gran cantidad de información nueva y novedosa, de nuevas experiencias prácticas nunca antes realizadas como por ejemplo la criopreservación de oocitos, y de buenos contactos con investigadores y profesionales que trabajan tratando de descubrir nuevos caminos que conduzcan al esclarecimiento de este tema, ya que éste sigue siendo un misterio y que trabajan en distintas organizaciones, tanto privadas como estatales de Argentina y de Colombia.

Además de lo completo del curso cabe destacar la apertura de los docentes que dictar las distintas clases, tanto teóricas como prácticas, para que los alumnos se acerquen para efectuar cualquier consulta, comentario o simplemente para compartir alguna experiencia previa en las distintas materias.

Fecha: Mayo 2004

Nombre y Firma coordinador de la ejecución:



AÑO 2004

BOVINE REPRODUCTION IMV MANUAL

Dr MSc Decuadro-Hansen
Technical Director IMV Technologies
France

THE IMPORTANCE OF HEAT DETECTION IN COWS: PRACTICAL APPLICATIONS

INTRODUCTION

The sexual activity of the adult bovine female, in good health and non-pregnant is cyclic. The cycle lasts for 20 to 21 days (17 to 24 days) for heifers as well as for cows.

The return in to heat and the ovarian activity after calving comes after a period of 2 or 3 weeks up to 2 or 3 months. In bovine many factors influence the return into heat: the body condition, the dairy status, the breed, the number and date of calving, the eventual post-calving pathology (1,2,7,9,10,11,12,16). Thus on dairy cows, the average interval between calving and the first following ovulation is 20 days (8), and more than 80% of the animals observed in anoestrus (or not in heat) are in fact already cycled (8). For beef cows, the return of the regular sexual activity is usually longer because the environmental conditions usually are not very favourable (8).

Nowadays you need a herd management, which ensure an economic viability. Heat detection is a must and is prior to any attempt to improve global reproduction of your herd.

Apart from the oestrus's physiological signs (organic or hormonal), 24 hours before heat, one can already remark a few common signs: appetite decrease, resting period decrease, movements, mooing, decrease in milk production. When the heat period approaches behaviour signs appear: mutual vulva sniffing, licking, false fights, mounting attempts, pressure of the chin on the back of an other cow, vaginal mucus. But the only positive sign of a cow being in heat is the acceptance of mounting. This reaction lasts, in average, for 18 to 24 hours and 9 to 12 hours for heifers (11,12).



HEAT DETECTION

Heat detection affects the herd fecundity and fertility and it is the first criteria involved in reproduction management (5). Therefore it is an essential condition of any successful breeding program.

In a herd where heat detection is well done, 75% of the cows must be seen in heat at least once in 60 days following calving. The non-observation of heat during the 2 months following calving reveals 2 types of problems: the cow was not in heat (true anoestrus) or the detection was poor (14). Consequently, in both cases, the cow will be reproduced later.

Heat detection

Numerous technical and scientific articles were written on heat detection. **One time out of two the breeder does not detect the heat and once every six times the inseminator is called when the cow is not in heat.** (1,2,3,8)

The first infecondity reason in a herd is often the difficulty to detect the heat when it appears. This is due to biological problems (short oestrus, cow in high milk production, heat appearing most of the time between 18H00 and 06H00 (11)) or due to breeding practises (not enough time for detection, criteria used by the breeder, size increase of the herd).

Heat detection depends of two factors, one being the animal and its capacity to show heat signs and the other one being the breeder with his surveillance capacity and experience.

Various studies show that it is almost impossible even for an experienced breeder, to detect more than 80% of the heat eventhough he observes the herd 3 times a day for a period of at least 30 minutes each. Further more these observations are usually not applied by the breeders (4,5,11).

Heat detection is even harder when you know that 20 % of the cows have either short, silent or night heats (6,8,12).

The visual observation of heat behaviour is in these cases so difficult that the breeders usually use other less obvious signs than mounting and that explains why 5 to 20 % of the inseminated females have a high progesterone level (8).

Table 1: Herd spread according to the proportion of female inseminated in luteal phase: progesterone concentration at the time of AI > 1 ng/ml – Reimers and Coll 1985.

Percentage of cow in luteal phase at AI(*)	Herd numbers	Herd percentage
0	283	60,6%
<10	40	8,8%
10-20	102	21,8%
>20	42	9,0%
Total	467	100%

(*) Intra-herd

To obtain a calf per year for each cow, we have two possibilities:

- *improve the cow's capacity to fecundate (fertility);
- *inseminate each cow for the first time two months after calving.

Heat detection is the best mean to improve the reproduction performance.

WHAT ARE THE METHODS USED FOR COW HEAT DETECTION?

I - Non visual methods:

- A) Clinical genital tract evaluation;
- B) Intra vaginal pH measurement or vaginal mucus conductivity;
- C) Progesterone dosage;
- D) Pedometer;
- E) Vaginal or milk temperature recording

II - Visual Methods:

Immobilisation reflex observation 3 times a day (Ex.: 6-7a.m, 12-13p.m. and 18-19p.m.) or video surveillance round the clock.

Note that a late evening surveillance by the breeder tend to improve drastically the reproduction performances (15).

a) Detection help:

- * Blowing animal: castrated bull, androgenised cow;
- * Marking system: tightrope marking (Chin-bail).

b) Mounting markers:

- * Positioning of difference articles around the sacrum area: *Kamar;
- *Ink Tel Tail; *DEC.

MOUNTING ELECTRONIC DETECTORS USED AS A TOOL FOR BOVINE REPRODUCTION SURVEILLANCE:

The main sexual behaviour sign in cows is the acceptance of mounting. Therefore the time devoted to this observation by the breeder is directly linked with the period between calving and the first heat.

The improvement of electronic devise efficiency concerning heat detection in cows would allow:

- 1) A percentage increase of heat detection especially for short, silent and night heats.
- 2) A decrease of mistakes due to the breeder's consideration of others factors which generally are linked to oestrus but are not specific to oestrus
- 3) An improvement of cattle fertility and a reduction of the calving-fecundating AI period if the system informs about the beginning of heat which is better than the usual 2 controls per day.

IMV Technologies developed a heat detection devise based on electronic recording. It is the first visual alarm electronic heat detector, which takes into account the elements mentioned above.



CONCLUSION

Fecundity mastering is the key element in herd management and profitability. The fertility improvement is directly linked to the breeder's working conditions, which allows him to improve heat detection and the right time insemination. The techniques for heat detection available on the market today must optimise the surveillance of the herd in order to improve the reproductive performances.

Bibliography:

- 1) BORSBERRY S., DOBSON H. « Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds ». In *Veterinary record* 1989 124,217-219 ;
- 2) BRONGNIART et coll. *Journées 3R* 2-3 Dec. 1998 page 84 ;
- 3) BRONGNIART I., GYONVARCH A., KERSALE P., BOUTES J.L. « Facteurs influençant les paramètres de reproduction chez la vache laitière ». In *3R* 1998 ;
- 1) COLEMAN D.A., THAYN.E., DAILEYR.A.-Factors affecting reproductive performance of dairy herds. *J.Dairy Sci.*, 1985 ,68 ,1793-1803 ;
- 5) DE KRUIF(A.), BRAND(A.)-Factors influencing the reproductive capacity of a dairy herd.*N.Z. Vet.J.* 1978 ,26, 178-189 ;
- 6) HANZEN(C.), HOUTAIN(J.-Y.), LAURENT(Y.) et coll.- Influence des facteurs individuels et de troupeau sur les performances de reproduction bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1996,140,195-210 ;
- 7) HUMBLLOT P. « Les paramètres de l'anoestrus post-partum ». In « *Journées d'information UNCEIA-ITEB* ; Mars :p.5-17. ITEB Ed, Paris 1982 ;
- 8) HUMBLLOT P. , THIBIER M. « Apports des dosages hormonaux dans le diagnostic et la traitement des problèmes de reproduction chez la vache ». In *Elevage Insémination N°259 Février 1994* ;
- 9) REIMERS T.J ; SMITH R.D ; and NEWMAN J.K-1985 Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the north eastern United States-*J.Dairy Sci.* 68 :963-972.
- 10) SEEGER S.H « Performances de reproduction du troupeau bovin laitier : variations dues aux facteurs zootechniques autres que liées à l'alimentation ». In *Journées Nationales des GTV 1998*
- 11) SIGNORET page 79-83 « *l'élevage bovin* » N°115 1982 ;
- 12) SMITH R. D. , Ph.D. Cornell University, Ithaca, New York. In *Morrow - Current therapy in theriogenology* p.153-158 1986 ;
- 13) SMOLDERS EA, THESINGH MS, VOS PL, WILLEMSE AH « The onset of the ovarian cycle following calving ». In *Tijdschr Diergeneeskd* 1996 Nov 1 ;121(21) ;
- 14) VALLET A. Interprétation des paramètres du bilan de reproduction. In *AERA Alfort Janvier 1999*, pag 31-41 ;
- 15) VAN EERDENBURG(F.C.J.M.), LOEFFLER(H.S.H.), VAN VLIET(J.H.). »Detection of oestrus in dairy cows :A new approach to an old problem ». *Vet.Quarter*, 1996,18,181-192 ;
- 16) VARNER(M.), BRAND(A.).-Monitoring reproductive performance :execution In Brand A., Noordhuizen J.P.T.M., Schukenn Y.H., 1996. *Herd health and production management in dairy practice*. Wageningen Pers, Wageningen(Pays-Bas)1997, 333-343 ;

NOCIONES DE TERMODINÁMICA

Introducción

Termodinámica es la parte de la Física que estudia los fenómenos que dependen de la **temperatura**, magnitud que solo puede ser definida para sistemas macroscópicos.

La teoría de la Termodinámica, cuyos axiomas o postulados están fundados en 150 años de experiencia, es una teoría fenomenológica, lo que implica que puede desarrollarse sin necesidad de hacer o usar modelos sobre la materia, requiriendo además que las magnitudes físicas involucradas sean establecidas experimentalmente. Al respecto, cabe mencionar que la teoría cinética de los gases, tema que se incluye en los tratados clásicos de Termodinámica, es una formulación que utiliza *modelos* de la materia, y se fundamenta en la Mecánica Clásica. Su inclusión, aunque no es necesaria, permite profundizar el concepto de temperatura. Hoy se sabe que todos los fenómenos térmicos se vinculan al movimiento desordenado de átomos y moléculas. Esto último se desarrolla dentro de la Mecánica Estadística.

La Termodinámica nació con la revolución industrial y muchos fueron los científicos que la desarrollaron. Entre ellos están :

1. El conde Rumford (1753-1814). Norteamericano. En 1798 propuso que el calor era una forma de energía.
2. Robert Mayer. Alemán. En 1841 calculó el equivalente mecánico del calor y enunció el primer Principio de la Termodinámica.
3. James P. Joule (1818-1889). Inglés. Midió el equivalente mecánico del calor. Realizó una experiencia que mostró que la energía interna de un gas solo depende de la temperatura.
4. Sadi Carnot (1796-1832). Francés. En 1824 estudió el rendimiento de las máquinas térmicas. Dio el enunciado del segundo Principio de la Termodinámica y desarrolló la teoría del calórico (luego desechada).
5. Lord Kelvin (William Thomson - 1824-1907). Irlandés. Sentó las bases del primer y segundo Principio de la Termodinámica. Dio la escala absoluta de temperatura.
6. Rudolf Clausius (1822-1888). Alemán. Enunció el segundo Principio de la Termodinámica.
7. W. Nernst. Alemán. En 1906 desarrolló el teorema que se conoce como tercer Principio de la Termodinámica.

Temperatura

El concepto de temperatura admite varios tratamientos distintos. Una definición básica cualitativa, fundada en el sentido del tacto, puede obtenerse de la capacidad (subjetiva) de reconocer si un sistema dado está más frío o caliente que otro. Se dice entonces que todo sistema macroscópico posee una propiedad denominada temperatura que indica el estado térmico del mismo. Para que esta definición sea operativa es necesario además establecer una escala térmica arbitraria que permita asignarle un valor numérico a cada estado térmico. Como curiosidad se menciona que en los primeros termómetros (siglo XVII) se designaba con la cifra 100 a la temperatura de fusión del hielo, y con 0 a la de ebullición.

La posibilidad de medir la temperatura surge del importante hecho experimental de que cualquiera sea el sistema macroscópico, si se espera un tiempo suficiente, finalmente estará en **equilibrio térmico**, indicando con esto que todas sus partes tendrán la misma temperatura.

La Termometría es el estudio de las diferentes escalas de temperatura y su forma de medición. Para nuestros fines solo haremos referencia a dos escalas: la escala Celsius o

centigrada y la Kelvin o absoluta, pues son las aceptadas internacionalmente como adecuadas para la medición de la temperatura.

- Escala Celsius o Centigrada - Fija arbitrariamente dos valores: 0°C para la temperatura del agua y hielo en equilibrio, y 100°C para la temperatura del agua en ebullición, ambos a la presión de una atmósfera.
- Escala Kelvin o Absoluta - Es idéntica a la Celsius pero desplazada en 273.15°C , es decir que se cumple: $T_K = T_C + 273.15 \text{ K}$

A pesar de que ambas escalas son aparentemente equivalentes, estudios posteriores han permitido una interpretación más profunda de la temperatura que privilegia el uso de la escala absoluta. Por ello haremos un análisis detallado de un diseño experimental que permite dar una descripción más sustancial.

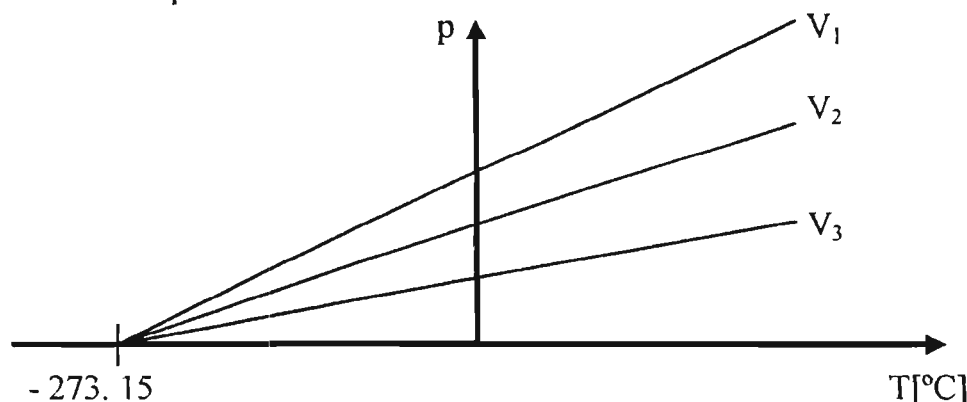
T



Sea un recipiente como muestra la figura, en cuyo interior se encuentra un gas. Posee una manguera flexible que forma una U con un líquido que hace de tapón. Moviéndolo adecuadamente la manguera puede lograrse que los bordes del líquido se igualen. En estas condiciones la presión interna es igual a la atmosférica, siendo T la temperatura (centigrada) inicial del gas, medida por el termómetro. Se marca la posición del borde izquierdo del líquido.

Si ahora calentamos el sistema cuidando que el volumen permanezca constante, lo cual se logra desplazando la manguera hasta que el borde izquierdo del líquido coincida con la marca inicial, observaremos que el borde derecho del líquido está más arriba que el otro, generando sobre el gas una sobrepresión que puede calcularse fácilmente. En estas condiciones tendremos un nuevo par de valores (p_1, T_1) . Repitiendo lo anterior varias veces podremos obtener un conjunto de pares (p, T) que pueden ser graficados. Estos puntos resultan alineados indicando que p es una función lineal de T .

Finalmente, cambiando el recipiente (Volumen), repetimos la experiencia. El gráfico obtenido muestra una familia de rectas de distinta pendiente, que se cortan en un punto sobre el eje de las temperaturas.



Se encuentra una relación lineal entre presión y temperatura, con distinta pendiente y ordenada al origen para cada volumen. Se observa claramente que si se define una

nueva escala (absoluta) de temperatura, desplazada en -273.15°C , las rectas pasarían por el origen, es decir donde presión y temperatura absoluta son nulas.

La Mecánica Estadística interpreta la presión como una consecuencia del choque de moléculas contra las paredes del recipiente, haciendo notar que presión cero para un gas implicaría que las moléculas que lo forman deberían estar en reposo respecto del recipiente. Dado que la condición de reposo absoluto de un gas no es posible, pues ello contradice leyes de la Física Moderna perfectamente comprobadas, se concluye que el cero absoluto no puede ser alcanzado y, más importante aún, que existe un límite en bajas temperaturas que no puede ser superado.

Sistema termodinámico

Se denomina así a cualquier sistema macroscópico. Para que un sistema quede unívocamente definido deberán darse los medios que lo forman (gas, líquido, sólido, mezclas, etc.), y los vínculos que lo restringen (sistema aislado, abierto, presencia de un campo eléctrico, volumen constante, recipiente adiabático, etc.).

Una vez definido un sistema termodinámico existen *ciertas* magnitudes físicas, tales como temperatura, volumen y presión, denominadas *variables de estado*, que pueden ser medidas permitiendo caracterizar su estado termodinámico. Si las magnitudes físicas que caracterizan el estado de un sistema permanecen constante, se dirá que está en estado de equilibrio (*equilibrio termodinámico*).

TRABAJO Y CALOR

Existen dos mecanismos principales, no excluyentes mutuamente, por los cuales los sistemas macroscópicos pueden modificar su estado de equilibrio, dando lugar a *transformaciones termodinámicas*. Uno de ellos (llamado mecánico), resulta de cualquier cambio directo del volumen del sistema, pudiendo dar lugar a cambios de la temperatura sin que ello implique intercambio de calor; el otro (térmico) ocurre cuando el sistema termodinámico interactúa con otro a distinta temperatura, en cuyo caso hay intercambio de calor, pudiendo incluso cambiar la presión sin que ello signifique trabajo mecánico. Por esta razón se dice que los sistemas termodinámicos simples homogéneos poseen dos grados de libertad: uno mecánico y otro térmico. Resulta evidente que estos procesos podrán producir intercambio de energía (mecánica y/o térmica) entre los sistemas que interactúan, dependiendo del tipo de transformación.

Corresponde ahora hacer una aclaración muy importante: los sistemas termodinámicos modifican su estado de acuerdo a sus propiedades y vínculos particulares, más allá del tipo de perturbación aplicada. Por ejemplo: la compresión de un gas en un recipiente adiabático, que significa que no puede intercambiar calor con el exterior, provoca un incremento de presión y también de temperatura. Es decir que se ha calentado a pesar de que **no hubo intercambio de calor** con otro sistema. Este mismo aumento de la temperatura puede lograrse mediante un intercambio de calor con otro sistema a mayor temperatura, lo que provocará un aumento de la presión sin necesidad de que haya habido trabajo mecánico (V constante). Es decir, el mismo estado final puede lograrse mediante dos tipos de perturbación distintas, una mecánica y la otra térmica.

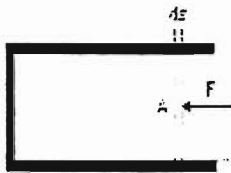
En consecuencia, carece de sentido asignarle a un sistema un tipo particular de energía (mecánica o térmica), dado que ello lo determinará el tipo de interacción a que sea sometido. Por esta razón al contenido de energía de un sistema termodinámico se lo define **Energía Interna**. Debe aclararse que la energía interna de un sistema no incluye la energía de traslación y rotación del sistema como un todo.

El *trabajo* es una magnitud física que permite calcular el intercambio de energía (mecánica) en las interacciones. Recordemos, a modo de ejemplo, el trabajo que realiza la atracción gravitatoria sobre un punto material en caída libre, resultando en una variación de su energía cinética (Teorema de las fuerzas vivas).

Este cálculo, $W = P \cdot h = E_{cf} - E_{ci}$, permite determinar el incremento de energía cinética del punto material. Análogamente, el trabajo para comprimir un resorte dará el incremento de energía elástica del mismo, que es otra forma de energía mecánica.

En forma general, se define como trabajo elemental (diferencial) de una fuerza a la expresión $dW = F_{tg} \cdot ds$, siendo F_{tg} la componente de la fuerza en la dirección del movimiento y ds el desplazamiento elemental (diferencial). Las unidades de esta magnitud son las mismas que las de energía (Joule, ergio, electrón-volt, etc.). Nótese que para que haya un trabajo mecánico es necesario que exista interacción (fuerzas aplicadas).

Un caso de mucho interés en Termodinámica es el cálculo del trabajo de compresión de un sistema macroscópico (gas, líquido o sólido). Veamos un ejemplo:



Sea un dispositivo como muestra la figura, con un gas en equilibrio en su interior, sobre el cual se realiza una compresión suficientemente pequeña para que la presión no se modifique.

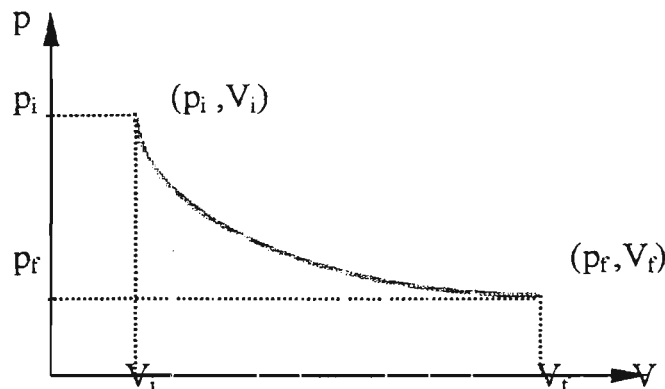
En este caso la Fuerza aplicada, distribuida sobre la superficie A , vale $F = p \cdot A$, siendo p la presión interna.

En consecuencia, el trabajo elemental realizado vale $dW = p \cdot A \cdot ds = p \cdot dV$.

Sumando los trabajos elementales desde el volumen inicial al final obtendremos el trabajo realizado para la compresión. En general podemos establecer que cualquier cambio de volumen en un sistema termodinámico implica un trabajo mecánico.

Cabe aclarar que la modificación de volumen no es requisito indispensable para que haya trabajo mecánico. De hecho, todos los procesos con fricción realizan trabajo mecánico.

Resulta sumamente práctico obtener una interpretación geométrica del trabajo realizado durante una transformación. Supongamos que al estado inicial del sistema corresponden los valores p_i y V_i , y que conocemos los valores de p , V durante toda la transformación hasta adquirir los valores p_f y V_f , como muestra el gráfico.



La curva corresponde a la transformación, siendo el área encerrada el valor numérico del trabajo realizado, que resulta de sumar los rectángulos elementales $p.dV$ para cada valor de presión.

El valor será positivo si la transformación va de izquierda a derecha (volumen creciente), y negativo en sentido opuesto. Ello quiere decir que si hay expansión el sistema realiza trabajo, perdiendo energía, y si hay compresión lo recibe, aumentando su energía interna.

La *cantidad de calor* intercambiada entre **dos sistemas a distinta temperatura** es la magnitud física que permite calcular el intercambio de energía (*térmica*) entre ambos, **debido a la diferencia de temperaturas**. Debe tenerse claro que para que haya calor intercambiado es necesario que por lo menos dos cuerpos o partes de un sistema estén a distinta temperatura simultáneamente. La simple modificación de la temperatura de un único sistema, por si sola, no implica que haya habido intercambio de calor, pues ello puede ocurrir debido a un trabajo mecánico. Por ejemplo: el aumento de temperatura debido a una compresión rápida, tal como sucede en un inflador, sucede sin intercambio de calor. Análogamente, el calentamiento de un resorte que es comprimido, también es adiabático, es decir, sin intercambio de calor.

Por otro lado, también podemos tener intercambio de calor sin que se modifique la temperatura final. Veamos un ejemplo: si un gas ideal, en un recipiente no adiabático a temperatura ambiente, es comprimido muy lentamente, la temperatura aumentará levemente durante la compresión. Sin embargo, este incremento de temperatura será tanto menor cuanto más lenta sea la compresión, pues el sistema estará intercambiando calor con el medio. La temperatura final del gas será igual a la inicial. Ello se debe a que toda la energía mecánica entregada durante la compresión es disipada mediante intercambio de calor con el medio. Su energía interna, que en un gas sólo depende de la temperatura, no cambió a pesar de que el par de variables conjugadas mecánicas (p , V) se modificaron. Es decir, cambió el estado pero no su energía interna.

Las unidades de esta magnitud son las mismas que las de energía (Joule, ergio, electrón-volt, etc.). Sin embargo, debido a que inicialmente se supuso que el calor era un fluido que poseían los cuerpos y no se conocía su relación con la energía, también es utilizada la *caloría*. Se define como caloría a la cantidad de calor necesaria para elevar en 1°C la temperatura de un gramo de agua a presión atmosférica. Esta definición no es bastante exacta, ya que la cantidad de calor necesaria para aumentar 1°C depende levemente de la temperatura inicial del agua. Por supuesto que existe equivalencia entre caloría y las otras unidades de energía, tema este que será tratado más adelante.

CALORIMETRIA

La cantidad de calor necesaria para aumentar un ΔT dado es diferente para distintas sustancias, por lo cual se puede definir como capacidad calorífica C de un cuerpo a la relación $C = \Delta Q / \Delta T$, siendo ΔT el cambio de temperatura que produce ΔQ .

Asimismo, se encuentra que cuanto menor es la masa de un cuerpo menor será la cantidad de calor necesaria para provocar un dado ΔT . Podemos entonces definir una magnitud, *calor específico* c , que depende solamente del tipo de sustancia, como la cantidad de calor necesaria para aumentar en 1°C a 1 gramo de esa sustancia. Las unidades de esta magnitud son $\text{cal} / ^{\circ}\text{C} \cdot \text{g}$.

Debe agregarse que es necesario establecer el proceso usado durante el calentamiento, pues el calor específico de una sustancia dará valores distintos si el proceso se realiza a presión constante o a volumen constante. Si el calentamiento se realiza a presión

constante, permitiendo que se modifique el volumen del cuerpo, parte del calor intercambiado se gastará en trabajo mecánico ($p \cdot \Delta V$), cosa que no sucede si se mantiene constante el volumen. En consecuencia, para una dada sustancia, el calor específico a presión constante (c_p) será mayor que el correspondiente a volumen constante (c_v).

Por razones prácticas e históricas, los cálculos calorimétricos utilizan generalmente el calor específico a presión constante, razón por la cual se acepta que si no se especifica expresamente corresponderá c_p .

La expresión matemática $\Delta Q = c \cdot m \cdot \Delta T$, que fue establecida empíricamente, resume todo lo expresado y es la relación fundamental de la calorimetría, siendo m la masa del sistema, y ΔT la temperatura final menos la inicial.

Cuando ΔQ es positivo, cosa que sucede cuando la temperatura final es mayor que la inicial, se dice que el sistema recibió calor (proveniente de una fuente más caliente); cuando es negativo se dice que el sistema entregó calor. Esta manera de expresar los intercambios de calor pueden llevar a un error conceptual, que es la de suponer que los cuerpos *poseen* calor. Al respecto recordemos que el calor es la magnitud que permite calcular los cambios de energía entre dos cuerpos o sistemas a distinta temperatura, y está caracterizando un proceso (térmico) particular. De igual manera, sería erróneo asumir que los sistemas poseen *trabajo*.

En todo caso los sistemas termodinámicos poseen Energía interna, la cual puede ser modificada por procesos térmicos (intercambio de calor) o procesos mecánicos (trabajo mecánico).

Debe aclararse que la expresión $\Delta Q = c \cdot m \cdot \Delta T$ es válida para gases, líquidos y sólidos, siempre y cuando no haya cambio de estado (evaporación, fusión, sublimación, etc.) durante el intercambio de calor. En los cambios de estado la temperatura permanece constante a pesar de que haya intercambio de calor.

Por ejemplo: si se calienta hielo en un recipiente abierto, a presión atmosférica normal, inicialmente a -5°C , la temperatura aumentará hasta 0°C , comenzando a fundirse el hielo. Esta temperatura permanecerá constante mientras coexistan agua y hielo. Una vez fundido todo el hielo (por intercambio de calor), el sistema ahora líquido aumentará su temperatura hasta 100°C si no cesa antes el intercambio de calor. Si la temperatura del agua alcanza los 100°C habrá otro cambio de estado (vaporización), permaneciendo constante la temperatura hasta que todo el líquido se haya evaporado. Esta es una explicación simplificada de lo que se conoce como cambios de fase.

Se define como *calor latente* a la cantidad de calor que hay que entregar para cambiar de estado a 1 g de la sustancia.

En consecuencia, en el ejemplo anterior y suponiendo que la temperatura final es menor que 100°C , el calor total intercambiado desde el estado inicial al final será:

$$\Delta Q = c_{\text{hielo}} \cdot m \cdot (0^\circ\text{C} + 5^\circ\text{C}) + m \cdot c_{\text{fusión}} + c_{\text{agua}} \cdot m \cdot (T_f - 0^\circ\text{C})$$

siendo c_{hielo} el calor específico del hielo a presión constante, $c_{\text{fusión}}$ el calor latente de fusión del hielo, y c_{agua} el calor específico del agua a presión constante.

Parámetros termodinámicos y variables de estado

Parámetro termodinámico es cualquier magnitud medible, tal como presión, volumen, temperatura, campo eléctrico, etc. Esta definición, en el sentido más amplio, hace suponer que toda magnitud física que pueda ser medida en un sistema sería necesaria para la descripción completa del estado del mismo, lo cual no es cierto. En cada sistema

termodinámico sólo existen algunos parámetros que permiten determinar su estado, denominados *variables de estado*, que son **propiedades** del sistema. Cuáles y cuántas variables de estado se requieren para determinar completamente el estado de un sistema, depende del sistema y sus vínculos. Por otro lado, la experiencia muestra que siempre que se modifica una variable de estado, por lo menos otra también cambia, lo que permite establecer que en todo sistema termodinámico **siempre** existe relación funcional entre las variables de estado. Este hecho es muy importante por dos razones:

- 1) permite establecer empíricamente cuáles parámetros termodinámicos son variables de estado, es decir adecuados para caracterizar el estado del sistema termodinámico considerado, y
- 2) conocida la relación funcional (*ecuación de estado*) se disminuye en uno el número de variables de estado necesarias para describir su estado termodinámico.

Ejemplo: un gas ideal encerrado en un recipiente de volumen constante (vínculo) posee sólo dos variables de estado (presión y temperatura).

La ecuación de estado es $p=(nR/V)T$ (Gay-Lussac), y basta el valor de una variable de estado para determinar el estado termodinámico del sistema.

En cuanto a los otros parámetros termodinámicos que no son variables de estado del sistema, cabría preguntarse qué utilidad pueden brindar. Al respecto digamos que si un sistema termodinámico permanece en equilibrio termodinámico, sólo se necesita conocer el valor (constante) que tienen sus variables de estado. En cambio, si el sistema modifica su estado (transformación termodinámica), su evolución dependerá del mecanismo utilizado. En este caso, otros parámetros termodinámicos que no son propiedades del sistema, tales como trabajo mecánico o intercambio de calor, que serán tratados más adelante, pueden ser necesarios para determinar los cambios de estado correspondientes.

Variables de estado - Los sistemas que interesan en la Física son aquellos que tienen la capacidad de interactuar con otros, es decir que pueden absorber y/o entregar energía, bajo determinadas condiciones. En consecuencia, dada una magnitud física cualquiera, resulta útil considerar aquella otra magnitud tal que el producto de ambas tenga unidades de energía. Estas se denominan *variables conjugadas*, y juegan un papel importante en las transformaciones energéticas.

Las variables de estado pueden ser intensivas o extensivas. Intensivas son aquellas cuyo valor es independiente de la cantidad de sistema que se tome, mientras que extensivas son aquellas cuyo valor depende de la cantidad de sistema considerado. En las variables conjugadas siempre una es intensiva y la otra extensiva.

Son intensivas: presión, temperatura, energía media, campo eléctrico E , y otras.

Son extensivas: volumen, energía interna, entropía, masa, y otras.

En general, el producto entre una variable intensiva y un incremento infinitesimal de la variable extensiva conjugada, representa la fracción elemental de energía involucrada en el proceso correspondiente.

Desde un punto de vista formal existen infinitos pares de variables conjugadas, pues una vez definida una magnitud arbitraria cualquiera, su conjugada queda determinada. No obstante, la naturaleza nos muestra que los procesos básicos de las interacciones entre sistemas *termodinámicos* son dos, uno mecánico y otro térmico, indicando con esto que el intercambio energético entre sistemas se reduce, en última instancia, a interacciones mecánicas mediante fuerzas aplicadas, choque, etc., y/o térmicas debido a la presencia de diferentes temperaturas simultáneas.

Esta interpretación de las interacciones posibles entre sistemas conduce a que se diga que los sistemas termodinámicos no aislados tienen al menos dos grados de libertad, uno mecánico y otro térmico.

Por lo expuesto haremos una breve referencia a dos casos que son muy significativos:

1 - Variables conjugadas (mecánicas). presión y volumen

Una vez definida la presión se encuentra que su variable conjugada es el volumen, dado que el producto de ambas tiene unidades de energía. Siendo el volumen la variable extensiva, pues su valor depende de la cantidad de sistema que se considere, se cumple que $p dV$ representará la variación de energía correspondiente. Dado que dV significa una compresión o una expansión elemental, es obvio que debe existir movimiento, lo que conduce a interpretarlo como un proceso mecánico. Como ya hemos demostrado este proceso corresponde al trabajo mecánico que realiza un sistema.

$$p dV = dW$$

La presión p por un incremento de volumen dV es el trabajo realizado por el sistema para dicho incremento de volumen.

2 - Variables conjugadas (térmicas) temperatura y entropía

En los fenómenos térmicos la magnitud más representativa es la temperatura, que es una variable intensiva pues no depende de la cantidad de sistema que se considere.

Si hallamos su variable conjugada en base a la definición, nos encontramos con una magnitud, que denominaremos entropía S , cuya interpretación física no es evidente.

No obstante, el producto $T dS$ representará la variación de energía correspondiente a los procesos térmicos, que como ya hemos visto se denomina intercambio de calor.

Podemos expresar entonces: $T dS = dQ$.

O sea que la temperatura T por un incremento de entropía dS representará la cantidad de calor intercambiada por el sistema, necesaria para dicho incremento de entropía.

La interpretación profunda de la entropía excede los objetivos de este curso, por lo cual solo haremos mención de algunos aspectos.

Supongamos tener dos sistemas termodinámicos no aislados distintos, inicialmente en equilibrio térmico, a mayor temperatura que la ambiente. Al cabo de un tiempo ambos estarán a temperatura ambiente pues así se comporta la naturaleza, es decir que los cuerpos más calientes se enfrían y viceversa. Sin embargo el proceso de enfriamiento que sufrieron no fue idéntico pues son distintos sistemas (por ejemplo, uno tardó más que el otro en enfriarse). La entropía es la propiedad que tienen los sistemas que indica como responderá dicho sistema ante intercambios de calor. Asimismo, la Mecánica Estadística permite vincular el concepto de entropía con el nivel de orden del sistema.

Función de estado o ecuación general de estado - Se denomina así a la ecuación de estado de un sistema termodinámico libre de vínculos. En este caso el sistema posee el mayor número posible de variables de estado, que para los sistemas homogéneos simples es tres (3), de los cuales solo dos son independientes, pues poseen solo dos grados de libertad: uno mecánico y uno térmico.

Corresponde aclarar que no siempre es posible establecer la función de estado de un sistema dado, en particular aquellos en que intervienen más de tres variables de estado. Analicemos un caso importante. En un gas ideal libre de vínculos restrictivos, la función de estado es: $pV=nRT$, siendo R la constante universal de los gases.

En consecuencia, el estado termodinámico de un gas ideal puede ser determinado midiendo dos de sus tres variables (p , V , T), dado que el valor de la tercera se calcula. Como se verá mas adelante, la Energía interna de un gas ideal es sólo función de la temperatura: $U(T) = nc_v T + U_0$, siendo U_0 una constante que, por convención, se toma como la energía interna del sistema cuando su temperatura absoluta es cero. Esta función de estado parece contradecir lo dicho anteriormente, pues sólo dos variables se relacionan funcionalmente. Sin embargo ello no es así, debido a que la energía interna es una “variable de estado” muy singular dado que su valor absoluto no puede ser medido en forma alguna. En consecuencia, su valor numérico carece de significado físico. Lo que si es medible es la diferencia de energía interna entre dos estados termodinámicos distintos, y representa el incremento o disminución de la energía total del sistema.

TRANSFORMACIONES TERMODINÁMICAS

Se denomina así a cualquier modificación de los valores de las variables de estado. Si el estado inicial de un sistema es de equilibrio, sólo podrá modificarse cambiando las condiciones externas. Cualquier modificación provocará, inevitablemente, la pérdida del estado de equilibrio, debido a que ninguna perturbación puede hacerse extensiva a todo el sistema en forma simultánea. En consecuencia, algunas variables de estado perderán su significado pues toman valores “locales” diferentes dentro del mismo sistema. Si cesa la perturbación el sistema buscará nuevamente el equilibrio, que alcanzará luego de un tiempo, pero al menos dos variables de estado tendrán ahora valores distintos.

Cuando determinadas transformaciones son suficientemente lentas y cumplen con ciertas condiciones, el sistema prácticamente evoluciona pasando por sucesivos estados de equilibrio. Si la transformación inversa puede ser realizada hasta volver al estado inicial por el mismo camino se dirá que es una **transformación reversible**.

Este tipo ideal de transformación es muy importante y requiere establecer claramente algunos aspectos. En primer lugar debe ser lo suficientemente lenta para que la pérdida del equilibrio termodinámico en cada instante sea despreciable, es decir que las variables de estado puedan ser medidas en cualquier momento durante la transformación. Como ejemplo digamos que si se trata de la compresión o expansión de un gas en un inflador, se puede demostrar que podrá ser considerada reversible si la velocidad del pistón es menor a la velocidad del sonido en dicho gas, que es de cientos de metro por segundo.

Evidentemente, para el ejemplo dado, no es tan lento como podría suponerse. A pesar de ello se las suele llamar cuasiestáticas.

En segundo lugar, si la transformación termodinámica pasa por sucesivos estados de equilibrio, su presión, volumen y temperatura pueden ser medidos en cualquier instante, lo que permite diferentes tratamientos gráficos y matemáticos. Si además consideramos que la ecuación de estado solo vale en equilibrio termodinámico, entonces es factible el estudio cuantitativo del sistema durante la transformación, siendo esta la principal razón de la importancia de estas transformaciones ideales.

Durante las transformaciones reales, que sin exclusión son irreversibles, no es posible determinar su estado termodinámico ni es válida la función de estado.

Cabe aclarar que existen transformaciones que no pueden ser consideradas reversibles bajo ninguna condición. Tal es el caso de la difusión y también aquellos procesos en que la transformación involucra elementos friccionales no despreciables.

Para los sistemas simples y homogéneos la función de estado comprende 3 variables, usualmente p , V y T . Por ser una función de 3 variables (2 de ellas independientes), la función de estado puede ser representada en un gráfico tridimensional, dando lugar a

una superficie de equilibrio termodinámico. Toda transformación reversible estará representada por una curva perteneciente a dicha superficie.

Estos cambios reversibles pueden realizarse de infinitas maneras distintas, dando lugar a distintas transformaciones termodinámicas. En particular interesan los siguientes casos:

Transformación isotérmica	T cte.
Transformación isocórica	V cte.
Transformación isobárica	p cte.
Transformación adiabática	$Q = 0$

DIFUSION

El fenómeno de difusión fue estudiado profundamente por Fourier para explicar la transmisión de calor en medios materiales. El modelo matemático que se ajusta al proceso es válido tanto para partículas materiales, tal es el caso de difusión de gases en gases, como para radiaciones, como sucede en la difusión de calor en medios materiales. Se concluye entonces que el fenómeno puede manifestarse con o sin transporte de materia. La característica principal de este proceso es que solo puede ocurrir en aquellos sistemas que permitan un inmenso número de interacciones simultáneas, tomando un carácter netamente estadístico.

Analicemos con un ejemplo como es la difusión de gases en gases. Supongamos un cuarto a temperatura ambiente y presión atmosférica. Si se abre una llave de gas, una persona ubicada a unos metros de la salida de gas recién lo detectará un cierto tiempo después, a pesar de que la velocidad individual de las moléculas del gas es de decenas o incluso centenas de metros por segundo. Ello puede justificarse admitiendo que las moléculas del gas chocan infinidad de veces con las de aire modificando su trayectoria en cada choque.

Estadísticamente puede mostrarse que el avance medio de las moléculas es radial (tiene simetría esférica) si la fuente es puntual, pero a una velocidad media mucho menor que las velocidades individuales, debido al camino azaroso que cada una realizará. Esta velocidad media de avance (*velocidad de difusión*) depende del libre camino medio entre moléculas y la velocidad de las moléculas. Como el libre camino medio depende de la presión y la velocidad depende de la temperatura, se concluye que temperatura y presión son variables fundamentales para calcular las características de la difusión de gases en gases.

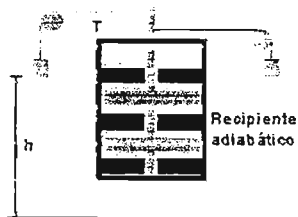
Veamos ahora otro aspecto más complejo de este fenómeno, que es como se comporta la distribución de la sustancia que difunde. Tomaremos otro ejemplo (bidimensional) más simple que puede ser realizado fácilmente. Si sobre un recipiente abierto y de sección circular, con agua en equilibrio en condiciones normales de presión y temperatura, depositamos en el centro de su superficie partículas insolubles, en una zona lo más pequeña posible, observaremos que las partículas irán ocupando una superficie cada vez mayor hasta terminar uniformemente distribuidas (movimiento browniano). Durante todo este proceso puede medirse por métodos ópticos la concentración de partículas sobre la superficie del agua, hallándose una de las principales características del fenómeno de difusión: la distribución de las partículas que difunden puede ajustarse en cada instante con una curva de Gauss, es decir que sigue un comportamiento gaussiano, típico de los procesos estadísticos.

Por último analicemos otra característica de este fenómeno, que se manifiesta cuando el fenómeno ocurre entre dos planos paralelos, cada uno con una distinta concentración constante de partículas libres, separados por un medio difusivo para dichas partículas, tal como una pared porosa para vapor de agua.

Se comprueba que se establece un flujo desde el plano de mayor concentración hacia el otro, que es directamente proporcional a la diferencia de concentraciones. Esto hace suponer (erróneamente) que las partículas están sometidas a una acción (fuerza) debida a la diferencia de concentraciones, lo que varios autores lamentablemente denominan *fuerzas difusivas*, sin considerar que el fenómeno es descrito asumiendo que no hay interacción entre los elementos que difunden y que simplemente hay mayor número de partículas que difunden desde la cara de mayor concentración.

EQUIVALENTE MECANICO DEL CALOR

La experiencia de Joule sobre el equivalente mecánico del calor reviste una gran significación, dado que demuestra que un sistema puede llegar a un mismo estado final mediante trabajo mecánico o por intercambio de calor.



Sea un dispositivo como muestra la figura, con agua en su interior, que posee un eje con paletas móviles y otro grupo de paletas fijas al recipiente, las cuales evitarán la rotación del agua cuando el eje esté girando. De esta forma el trabajo mecánico que se entregue al sistema no se convertirá en energía cinética de rotación del agua. Se encuentra que cuando las pesas caen una altura h , realizando un trabajo mecánico $W = 2 P \cdot h$, la temperatura del sistema aumenta ΔT . Este incremento se debió al trabajo mecánico y no hubo intercambio de calor.

Joule calculó la cantidad de calor que hubiera provocado el mismo cambio de estado, encontrando una equivalencia entre trabajo mecánico y cantidad de calor. Este valor es:

$$J = 4.1858 \text{ Joules/cal}$$

Nota: muchos autores hacen referencia a la experiencia de Joule con una interpretación inadecuada, asumiendo erróneamente que *el trabajo mecánico se transformó en calor*. Recuérdese que para que haya intercambio de calor es necesario dos sistemas a distinta temperatura simultáneamente. En todo caso una interpretación aceptable sería indicar que *el trabajo mecánico se transformó en energía interna*.

Lamentablemente este error conceptual se repite en otros casos. En particular, cuando los sistemas modifican su temperatura, cualquiera sea la transformación, suele asumirse equivocadamente que *se entregó o quitó calor*, cuando debería decirse que el sistema aumentó o disminuyó su energía interna, ya sea por intercambio de calor y/o por trabajo mecánico, de acuerdo con la transformación correspondiente.

PRIMER PRINCIPIO DE LA TERMODINAMICA

Este Principio establece la conservación de la energía y puede enunciarse de la siguiente manera: *"La variación de energía interna de un sistema es igual a la cantidad de calor intercambiado menos el trabajo realizado por el mismo"*.

Por consiguiente podemos escribir

$$dU = dQ - dW$$

siendo dU la variación de energía interna del sistema, dQ el calor recibido (>0) o entregado (<0) por el sistema, y dW el trabajo realizado por el mismo.

Es interesante destacar algunas consideraciones:

1. La termodinámica postula que los cambios energéticos solamente se producen mediante dos mecanismos básicos posibles, el mecánico y el térmico.
2. La energía interna es una propiedad de todos los sistemas termodinámicos, y en consecuencia es una variable de estado. Aún así, el valor absoluto de la energía

interna está indeterminado, pudiendo calcularse sólo las variaciones, siendo éstas las que poseen sentido físico.

3. Tanto el calor como el trabajo no son propiedades del sistema, por lo cual no pueden caracterizar su estado. Desde un estado inicial a un estado final se puede llegar por infinitas transformaciones distintas, con valores distintos de calor y trabajo, pero una misma variación de energía interna. Es decir, **la variación de energía interna sólo depende del estado inicial y final, cualquiera sea el camino utilizado.**

GAS PERFECTO O IDEAL

Se define como gas perfecto a aquel cuya función de estado, establecida empíricamente (leyes de Boyle y Mariotte, Gay-Lussac y Avogadro), es:

$$pV = nRT$$

siendo R la constante universal de los gases (8.314 Joule/°C mol), n el número de moles y T la temperatura absoluta.

Ningún gas real cumple con dicha ecuación rigurosamente.

También experimentalmente se determinó que la energía interna de un gas ideal es solo función de la temperatura. El experimento, realizado por Joule, consiste en determinar el estado termodinámico (p, V, T), inicial y final, de un gas encerrado en un recipiente adiabático que está conectado a otro (con vacío inicial) a través de una válvula. Cuando se abre la válvula el gas sufre una expansión disminuyendo su presión y aumentando su volumen. Sin embargo, se encuentra que la temperatura final no cambia. La variación de energía interna es cero, dado que el trabajo mecánico es nulo, a pesar del cambio de volumen, pues el gas en expansión libre no realiza presión sobre otro sistema, y no hay intercambio de calor pues no existen diferentes temperaturas. Considerando que p y V se modificaron, y que la única variable de estado que no cambió fue la Temperatura, se concluye que la energía interna no puede depender ni de la presión ni del Volumen, siendo solo función de la Temperatura para permanecer constante.

Calores específicos molares c_v y c_p para un gas ideal. Para los gases resulta más adecuado definir su calor específico molar, que es la cantidad de calor necesaria para elevar en 1°C a un mol de dicho gas. De esta definición se obtienen las siguientes relaciones:

$$dQ = c_v \cdot n \cdot dT \quad \text{y} \quad dQ = c_p \cdot n \cdot dT$$

ya sea que el intercambio de calor sea a volumen constante o a presión constante.

Si aplicamos el primer Principio para ambas relaciones será:

- 1 - A volumen constante

$$dU + dW = c_v \cdot n \cdot dT$$

pero dado que V es constante $dW = p \cdot dV = 0$, quedando

$$dU = c_v \cdot n \cdot dT$$

- 2 - A presión constante

$$dU + dW = c_p \cdot n \cdot dT, \text{ siendo } dW = p \cdot dV = n \cdot R \cdot dT, \text{ quedando}$$

$$dU = c_p \cdot n \cdot dT - n \cdot R \cdot dT = n \cdot (c_p - R) \cdot dT$$

Comparando esta expresión con la obtenida para volumen constante se obtiene, para gases ideales, la igualdad $c_p - c_v = R$

Todo esto conduce a una relación lineal entre energía interna y temperatura.

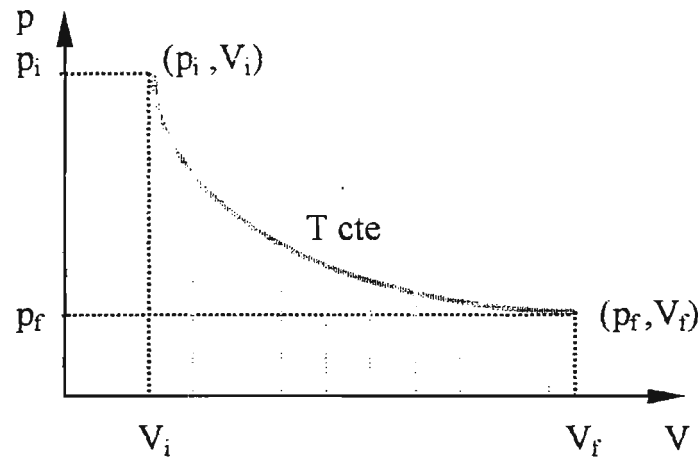
$$U(T) = n \cdot c_v \cdot T + U(0)$$

Veamos ahora algunas transformaciones termodinámicas aplicadas a un gas ideal.

1 - Expansión isotérmica reversible

La ecuación de estado en este caso es : $p = \frac{n \times R \times T}{V}$, con $T = \text{constante}$

que representado en un gráfico pV da una hipérbola



Para que una expansión sea isotérmica y reversible debe estar acompañada de intercambio de calor con una fuente más caliente, pues al aumentar el volumen el sistema realiza trabajo a expensas de su energía interna. Como la energía interna no debe variar si pretendemos que la temperatura permanezca constante, habrá que entregarle una cantidad de calor idéntica al trabajo realizado.

En la práctica una expansión isotérmica puede lograrse aproximadamente si se tiene el gas en un recipiente no adiabático en equilibrio térmico con el medio ambiente externo y se aumenta el volumen muy lentamente, de tal manera que la temperatura se estabilice continuamente con la del medio ambiente.

El trabajo realizado por el gas está representado por la zona rayada, y vale :

$$W = n R T \ln (V_f / V_i) = n R T \ln (p_i / p_f)$$

El calor intercambiado es exactamente igual al trabajo realizado : $Q = W$

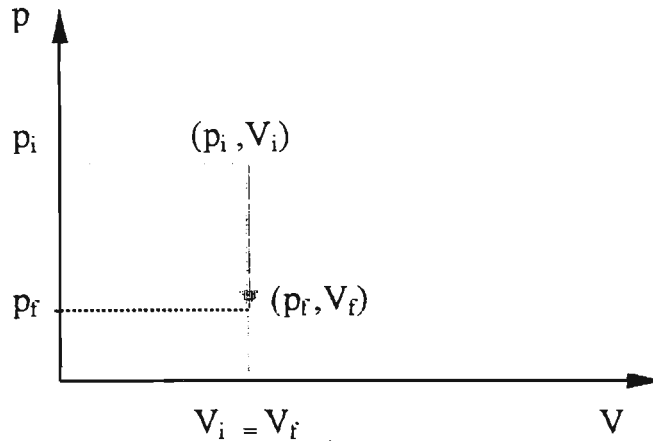
La variación de energía interna vale cero pues no hubo cambio de la temperatura.

2 - Transformación isocórica reversible.

Esta transformación ocurre aproximadamente cuando un recipiente cerrado, conteniendo un gas, es enfriado.

La ecuación de estado es : $p = \frac{n \times R}{V} \times T$, con $V = \text{constante}$

Esta es una relación lineal entre p y T , cuyo gráfico pV será:



El trabajo realizado por el gas vale 0 pues no hubo cambio de Volumen

El calor intercambiado (hay que enfriar el sistema para lograr una presión final menor que la inicial) vale $Q = c_v n (T_f - T_i)$

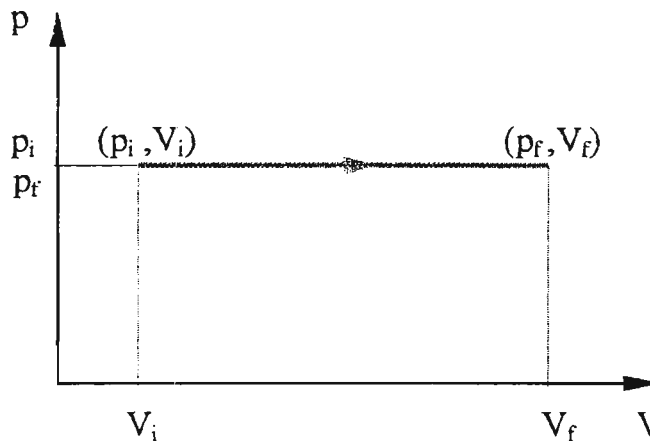
La variación de energía interna da: $\Delta U = Q = c_v n (T_f - T_i)$

3 - Expansión isobárica reversible

La ecuación de estado para este caso es : $V = \frac{n \times R}{p} \times T$, con $p = \text{constante}$

lo que nos permite calcular la diferencia de Volumen conocida la temperatura final e inicial, para la expansión determinada.

$$V_f - V_i = \frac{n \times R}{p} \times (T_f - T_i)$$



El trabajo realizado por el gas está dado por el área encerrada por el rectángulo marcado, y vale :

$$W = p (V_f - V_i) = n R (T_f - T_i)$$

El calor intercambiado (hay que calentar el sistema para lograr una expansión a presión constante) vale:

$$Q = c_p n (T_f - T_i)$$

La variación de energía interna da: $\Delta U = c_v n (T_f - T_i)$

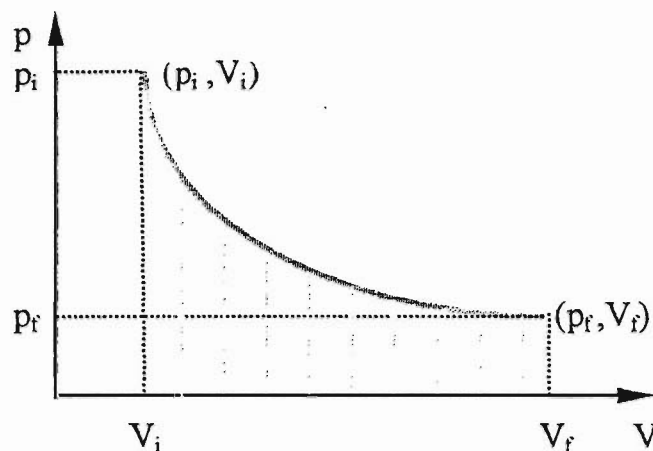
Obsérvese que el calor entregado al sistema es mayor que la variación de energía interna pues $c_p > c_v$.

4 - Expansión adiabática reversible

La ecuación de estado para este caso es: $p \times V = n \times R \times T$

El sistema no intercambia calor, es decir $Q = 0$, por lo cual la variación de energía interna es $\Delta U = -W$. Como se trata de una expansión este trabajo será positivo (el sistema debe realizar trabajo para producir la expansión), lo que indica que la energía interna final será menor y, en consecuencia, disminuye la temperatura.

Realizando los cálculos adecuados se obtiene: $p V^{(\gamma)} = \text{cte}$ que representado en un gráfico pV da



El trabajo realizado por el gas está representado por la zona rayada, y su cálculo es : $W = -n c_v (T_f - T_i) = -\Delta U$

Potenciales termodinámicos

El primer Principio, cuya expresión general puede ser escrita

$$dU = dQ - dW = TdS - pdV$$

muestra que la energía interna puede ser considerada función de S y V , pues aunque intervienen p , V (variables mecánicas) y T , S (variables térmicas), las variaciones solo ocurren sobre la entropía y el volumen.

Mediante transformaciones matemáticas simples el primer Principio puede ser escrito en función de las otras variables, dando lugar a otras tres expresiones que, junto a la Energía Interna, se conocen como *Potenciales Termodinámicos*.

A modo de ejemplo veamos como se obtiene el Potencial denominado **Entalpía**.

Primero indiquemos que si se realizan operaciones algebraicas donde solo intervienen variables de estado (propiedades) el resultado también será una variable de estado.

Definamos entonces la función $H = U + pV$ (Entalpía), la cual también será una propiedad del sistema pues U , p , V lo son. Si ahora calculamos la variación de H , se obtiene la expresión buscada:

$$dH = dU + p dV + V dp = T dS + V dp$$

Los 4 potenciales termodinámicos son:

1. $U(S, V)$ Energía interna $dU = T dS - p dV$
2. $H(S, p) = U + pV$ Entalpía $dH = T dS + V dp$
3. $F(V, T) = U - ST$ Helmholtz $dF = -p dV - S dT$
4. $G(T, p) = U + pV - ST$ Energía libre (Gibbs) $dG = -S dT + V dp$

Nociones de Propiedades Coligativas

Las soluciones presentan ciertas propiedades físicas que no dependen del tipo de moléculas o partículas que las componen, sino del número de ellas. A dichas propiedades se las denomina *propiedades coligativas*.

Veamos ahora algunos conceptos básicos sobre las soluciones:

□ **Solución:** Es una mezcla homogénea, de dos o más componentes, que pueden fraccionarse o separarse por los métodos comunes de fraccionamiento.

□ **Homogénea:** que está constituida por una sola fase (no tiene límites físicos y las propiedades intensivas son las mismas en todo el sistema).

□ **Soluciones diluidas:** Son aquellas que contienen una pequeña cantidad de soluto en un volumen dado de solvente.

□□□□ **Solvente:** es el componente que se encuentra en mayor proporción en la solución diluida.

□ **Soluto:** se denomina así al componente que se halla en menor proporción. De las soluciones diluidas las que nos interesan son las compuestas por un sólido no volátil en un solvente líquido.

Debemos ahora conocer, una vez definida el área de interés en nuestro estudio, algunas propiedades del solvente líquido; como ser presión de vapor, temperatura de ebullición y temperatura de fusión.

Presión de Vapor

Las moléculas de un líquido al igual que las de un gas o un sólido se encuentran en movimiento constante. La estructura de un líquido hasta cierto punto es ordenada y las moléculas en el estado líquido pueden tener movimiento de: traslación, pero no con tanta libertad como en los gases.

Supongamos un determinado volumen de líquido en un recipiente abierto (Figura 1); algunas de las moléculas del líquido escapan y superan las fuerzas de atracción. De esta manera veremos que el volumen del líquido disminuye. Decimos entonces que el líquido se ha evaporado.

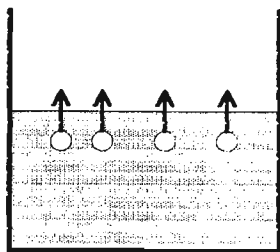


Figura 1

Ahora bien, si cerramos el recipiente, veremos que las moléculas que escapan de la fase líquida se acumulan en el espacio superior y algunas vuelven al líquido (Figura 2).

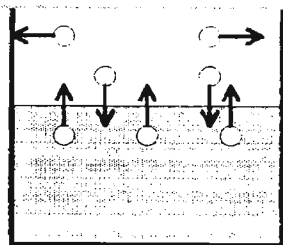


Figura 2

A medida que aumenta el número de moléculas en el espacio libre, también aumenta el número de las que vuelven al líquido. De esta manera se llega a un estado de “equilibrio dinámico”, para cada temperatura, cuando el número de moléculas que pasan de la fase líquida al espacio superior libre es igual al número de moléculas que vuelven al líquido en un tiempo dado (Figura 3).

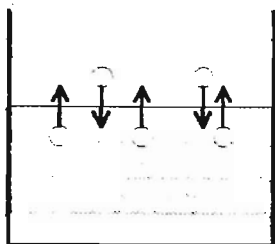


Figura 3

Podemos decir que el espacio superior libre se halla saturado con vapor y la presión que éste ejerce sobre la interfase gas - líquido es la presión de vapor del líquido a la temperatura dada. Este equilibrio depende exclusivamente de la temperatura y se establece para cada temperatura. La presión de vapor aumenta con la temperatura, ya que al aumentar la temperatura, aumenta la energía cinética de las moléculas, por lo tanto el número de moléculas por unidad de volumen de vapor es mayor, y éste ejerce mayor presión de vapor cuando llega al estado de equilibrio.

Para que las moléculas se separen de la fase líquida y pasen a la fase vapor deberán vencer las fuerzas de atracción de las moléculas del líquido. Estas fuerzas son relativamente grandes debido a que las moléculas en la fase líquida se hallan más próximas que en la fase vapor. Para vencer estas fuerzas de atracción se debe suministrar al líquido energía térmica. Este es el *calor de vaporización del líquido*. Podemos definirlo como el calor absorbido cuando se vaporiza una cantidad definida, 1 gramo o 1 mol de sustancia. En la siguiente tabla se dan las presiones de vapor para una serie de líquidos.

Temperatura	Agua	Etanol	Ácido acético	Acetona
0°C	4,58	12,2	-	67,3
10°C	9,21	23,6	-	115,6
20°C	17,53	43,9	-	184,8
30°C	31,82	78,8	-	282,7
40°C	55,32	135,3	-	421,5
50°C	92,51	222,2	56,6	621,6
60°C	149,4	352,7	88,9	860,6
70°C	233,7	542,5	136,0	-
80°C	355,1	812,6	202,3	-
90°C	525,8	-	293,7	-
100°C	760,0	-	417,1	-

Tabla 1: Presiones de Vapor en mm de Mercurio

Como vimos anteriormente, las presiones de vapor de todas las sustancias aumentan con el aumento de temperatura, y su variación se representa por una curva como la del siguiente gráfico (Figura 4).

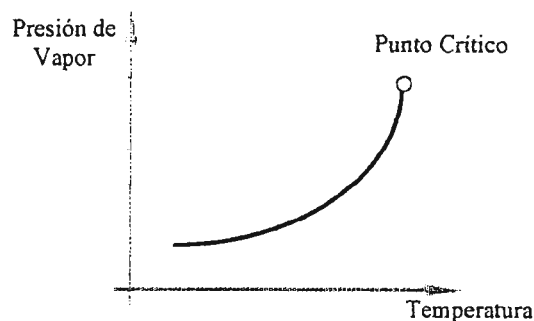


Figura 4: Curva de Presión de Vapor - Temperatura

Ya veremos más adelante que la temperatura más elevada a la cual se puede medir la presión de vapor se denomina "*punto crítico*"; y el límite inferior se denomina "*punto triple*".

Punto de Ebullición

Si la presión que se ejerce sobre un líquido se ajusta a un valor definido, por ejemplo 1 atmósfera, es posible elevar la temperatura del líquido hasta que su presión de vapor sea igual a la presión externa arbitraria. En tal situación se observa la formación de burbujas en el interior del líquido y su escape a través de la superficie.

Se define como *punto de ebullición* a la temperatura para la cual la presión de vapor del líquido iguala a la presión externa. Si ésta es de 1 atmósfera, la temperatura se define como "*punto de ebullición normal*".

Un descenso de la presión exterior significará un descenso del punto de ebullición como ocurre con la destilación a presión reducida. Por el contrario un aumento de la presión significará una elevación del punto de ebullición del líquido. Este es el principio del funcionamiento de autoclaves y ollas a presión.

En un recipiente cerrado podemos aumentar la presión hasta que el agua se pueda calentar en presencia de su vapor hasta 120°C aproximadamente. De esta forma podemos esterilizar una gran variedad de material quirúrgico, ya que a esa temperatura se destruyen todos los microorganismos. Es evidente, por estas consideraciones, que un gráfico de la variación de la presión de vapor en función de la temperatura dará también la variación del punto de ebullición con la presión externa.

Punto de Fusión

Cuando se calienta un sólido cristalino puro pasa a líquido en forma definida a una cierta temperatura. Se define como punto de fusión a la temperatura para la cual coexisten los estados líquido y sólido en equilibrio. Si se enfría el líquido se obtendrá la solidificación o congelación para la presión dada. Por lo tanto los puntos de fusión y congelación son idénticos para una sustancia pura. Los puntos de fusión o congelación que se dan usualmente en las tablas han sido determinados a la presión de una atmósfera, es decir, 760 mm de mercurio.

Presión de Vapor de los Sólidos (Sublimación)

Un sólido, así como un líquido, tiene una presión de vapor definida para cada temperatura; al aumentar la temperatura aumenta la presión de vapor, y la variación se puede representar por una curva análoga a la que se obtienen para un líquido. Esta curva se denomina "*curva de sublimación*".

El término sublimación se emplea para indicar el pasaje directo del estado vapor al de sólido sin pasar por el estado líquido.

Análogamente, en condiciones adecuadas, se puede condensar un vapor directamente a sólido; esto ocurre en general por enfriamiento del vapor, siempre que su presión sea menor que la presión de vapor del sólido en su punto de fusión. Por ejemplo, la presión de vapor del hielo a 0°C es aproximadamente 4,6 mm de mercurio, y si la presión parcial de vapor de agua es menor que este valor, se obtendrá por enfriamiento brusco la precipitación directa de un sólido a partir de un vapor. De esta manera se forma la escarcha en la naturaleza.

Si la presión parcial del vapor de agua es superior a 4,6 mm de Hg. se formará primero líquido en cuanto la temperatura descienda. Un caso muy interesante de sublimación es el del dióxido de carbono. En el punto de fusión (-56°C) la presión de vapor de equilibrio del sólido es de 5 atmósferas; esto indica que el dióxido de carbono no puede ser convertido en líquido salvo que la presión sea superior a este valor. A presiones atmosféricas ordinarias, por lo tanto, el dióxido de carbono pasa directamente a gas a cualquier temperatura, sin la formación intermedia del líquido. Este hecho es una de las ventajas del “hielo seco” como refrigerante, y explica el empleo del adjetivo “seco”.

El cambio de sólido a vapor, como el de líquido a vapor o el de sólido a líquido, es acompañado por una absorción de calor, éste es el *calor de sublimación*, Q_s . Está relacionado con los calores de vaporización (Q_v) y de fusión (Q_f) por la expresión:

$$Q_s = Q_f + Q_v$$

donde los tres valores deben referirse a las mismas temperaturas. Dicho de otra manera la cantidad de calor (Q_s) que se debe suministrar para convertir un mol de sólido directamente a vapor es la misma que la que se requerirá para fundir primero el sólido (Q_f) y vaporizar luego el líquido (Q_v) a la temperatura y presión dadas. Este resultado concuerda con la ley de la conservación de la energía.

Diagrama de Fases

Se puede ilustrar las condiciones de equilibrio entre las diferentes formas o fases de una sustancia, a través del denominado “diagrama de fases” o diagrama de equilibrio.

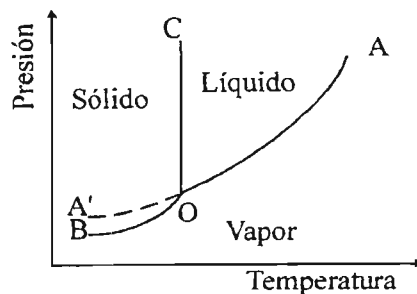


Figura 5

En este diagrama el segmento OA indica la variación de la presión de vapor del líquido en función de la temperatura, mientras que el segmento OB (curva de sublimación) muestra la variación de la presión de vapor de la forma sólida.

Como se vio en dicha figura, OA se extiende solamente hasta el punto crítico. Este punto está determinado por una presión y una temperatura crítica.

☐ Temperatura crítica: es la temperatura por encima de la cual no se puede licuar un gas, esto es, la temperatura máxima a la cual la sustancia puede existir en forma líquida.

☐ Presión crítica: es la presión necesaria para provocar la licuación a temperatura crítica. Es la presión de vapor más elevada posible de un líquido.

Las condiciones de equilibrio de sólido y líquido están representadas por la curva OC. La dirección de la pendiente de la línea OC depende de si el aumento de presión provoca un aumento o un descenso del punto de fusión; en la Figura 5 la curva se inclina hacia la izquierda, lo que significa que el punto de fusión desciende con el aumento de la presión.

Este es el caso del agua; para otras sustancias la curva se inclina hacia la derecha. En cualquier caso, debido a la pequeña variación del punto de fusión con la presión, la línea OC es siempre casi vertical; su pendiente se ha exagerado en este gráfico para mayor claridad. Como vemos en el diagrama las tres curvas se encuentran en O, y por lo tanto, en este punto, que se conoce como “*punto triple*”, deben coexistir los tres estados físicos de la sustancia.

El término punto triple se emplea en general para designar la temperatura y la presión a las cuales los tres estados (fases) de una sustancia dada se hallan en equilibrio.

Puesto que el sólido y el líquido están en equilibrio en el punto triple, es claro que este es un punto de fusión. Sin embargo, este no es el punto de fusión normal del sólido a la presión de 1 atmósfera, sino el punto de fusión a la presión del vapor que está en equilibrio con el sólido y el líquido. Por ejemplo, el punto de fusión del agua a 1 atmósfera de presión es de 0°C y por lo tanto el punto triple debe hallarse próximo; la presión de vapor del agua o del hielo es de 4,6 mm de Hg.

El punto triple del agua es entonces el punto de fusión del hielo, o sea el punto de congelación del agua, a una presión de 4,6 mm de Hg. (0,006 atm.) en lugar de 760 mm de Hg., es decir, 1 atm. La temperatura del punto triple es de 0,01°C.

Resumiendo lo visto hasta aquí, puede decirse que a las temperaturas y presiones representadas por cada línea de las curvas del diagrama, están en equilibrio dos fases, a saber líquido y vapor a lo largo de OA, sólido y vapor a lo largo de OB y sólido y líquido sobre OC. En las áreas que se encuentran entre las curvas las condiciones son tales que puede existir una sola fase; ya sea sólido, líquido o vapor. En la región entre las curvas OA y OC, por ejemplo, solo puede existir líquido; se ve que las temperaturas están por encima del punto de fusión (curva OC) para cualquier presión, y que las presiones son superiores a la presión de vapor de equilibrio (curva OA) para cualquier temperatura.

En forma análoga, la región que se halla a la izquierda de las curvas OB y OC representa las temperaturas y presiones que permiten sólo la existencia de sólido, mientras que en el área debajo de OB y OA las condiciones son tales que la única fase posible es el vapor. El diagrama de fases para una sola sustancia, como el agua, consta de tres regiones en cada una de las cuales puede existir sólo una fase; estas regiones se delimitan por tres líneas, a lo largo de las cuales pueden existir dos fases en equilibrio, y las tres líneas se cruzan en un punto donde pueden coexistir las tres fases.

Equilibrio Metaestable

Si un líquido, libre de partículas de polvo, se enfría en un recipiente limpio y de superficies lisas, con frecuencia la temperatura puede ser llevada debajo del punto de congelación normal sin que aparezca sólido, entonces, se dice que el líquido está sobreenfriado. A cada temperatura, el líquido sobreenfriado tendrá una presión de vapor definida, y la curva de presión de vapor será en este caso una continuación ininterrumpida de la curva del líquido. La curva OA' en la Figura 5, representa la variación de presión de vapor del líquido sobreenfriado en función de la temperatura. Se dice que el sistema líquido - vapor según OA' se encuentra en una condición de *equilibrio metaestable*. Se emplea el término metaestable para describir un “estado de equilibrio definido que no es el más estable a la temperatura dada”; el pasaje del equilibrio metaestable al estable se realiza con frecuencia ya en forma espontánea o por el agregado de la fase estable. Así, si se introduce una pequeña cantidad de sólido, en el líquido sobreenfriado según OA', se producirá generalmente dentro del líquido sobreenfriado una separación inmediata de la fase sólida; la temperatura y la presión pasarán a un punto que se encuentra sobre la curva estable OB.

Propiedades Coligativas

Hemos estudiado las propiedades físicas de un solvente líquido. Veamos ahora como son afectadas estas propiedades físicas cuando se prepara una solución de dos sustancias puras, solvente líquido y un soluto sólido no volátil.

Habíamos visto que las propiedades coligativas son aquellas que dependen del número de moléculas o partículas y no de su naturaleza. Las propiedades coligativas que estudiaremos a continuación son:

- Descenso de la presión de vapor
- Ascenso ebulloscópico
- Descenso crioscópico

Presión osmótica

Descenso de la Presión de Vapor

Cuando disolvemos un soluto no volátil, como la glucosa, en un solvente líquido obtenemos una solución. Ahora bien, si medimos la presión de vapor de la solución para todas las temperaturas, veremos que dicha presión de vapor es inferior a la del solvente puro. Si graficamos los valores de presión de vapor de la solución, comparándolos con los del solvente puro obtendremos el siguiente gráfico.

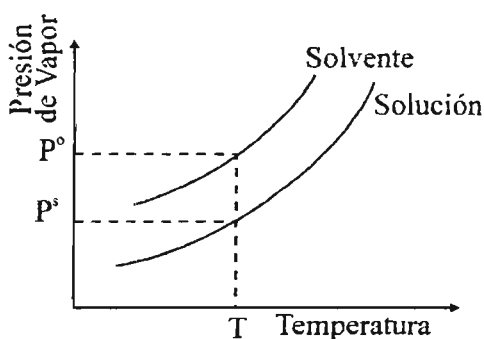


Figura 6

En el gráfico observamos que para una determinada temperatura T, tenemos el valor p^0 (presión de vapor del solvente) y un valor p^s (presión de vapor de la solución), menor al anterior $p^s < p^0$. Podemos decir entonces que cuando se disuelve un soluto no volátil en un determinado solvente se observa un descenso de la presión de vapor para todos los valores de temperatura.

El descenso de la presión de vapor es: $\Delta p_v = p^0 - p^s$

Siendo p^0 la presión de vapor del solvente y p^s la presión de vapor de la solución. Aunque durante mucho tiempo se supo que al disolver un soluto en un líquido, la presión de vapor de este último desciende, la relación cuantitativa entre el descenso y la composición de la solución fue descubierta por F. M. Raoult (1887).

Si a la diferencia $p^0 - p^s$ se la divide por p^0 , el resultado, expresa el *descenso relativo de la presión de vapor* para la solución dada.

$$\Delta p = \frac{p^o - p^s}{p^o}$$

Según una de las formas de la “Ley de Raoult”, el descenso relativo de la presión de vapor es igual a la fracción molar del soluto en la solución. Si n_1 y n_2 representan el número de moles de solvente y soluto, respectivamente la fracción molar del soluto es:

$$X_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

La ley de Raoult se expresa entonces como:

$$\frac{p^o - p^s}{p^o} = X_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Las soluciones que cumplen la ley de Raoult a cualquier concentración y a todas las temperaturas, se llaman “soluciones ideales”. Son muy pocas las soluciones que se comportan como ideales, y siempre se puede esperar alguna desviación de la ley de Raoult; sin embargo, para las soluciones diluidas, estas desviaciones son pequeñas y pueden despreciarse.

Se puede expresar la ley de Raoult de otra forma si restamos ambos miembros de la ecuación anterior:

$$\frac{p^o - p^s}{p^o} = X_2 \Rightarrow \frac{p^o}{p^o} - \frac{p^s}{p^o} = X_2 \Rightarrow 1 - \frac{p^s}{p^o} = X_2 \Rightarrow \frac{p^s}{p^o} = 1 - X_2$$

La suma de las fracciones molares de soluto y solvente siempre debe ser igual a la unidad; por lo tanto si X_1 es la fracción molar del solvente y X_2 la del soluto, resulta que:

$$X_1 + X_2 = 1$$

Luego

$$\frac{p^s}{p^o} = X_1 \quad ; \quad p^s = X_1 \cdot p^o$$

Esto significa, pues, que la “presión de vapor del solvente en una solución es directamente proporcional a la fracción molar del solvente”, si se cumple la ley de Raoult.

Por medio de la ley de Raoult se puede determinar el peso molecular de una sustancia disuelta. Si la solución está formada por m_1 gramos de solvente de masa molecular relativa Mr_1 y m_2 gramos de soluto de masa molecular relativa Mr_2 ; los números de moles de cada uno estarán dados por:

$$n_1 = \frac{m_1}{Mr_1} \quad y \quad n_2 = \frac{m_2}{Mr_2}$$

y en consecuencia la ley de Raoult queda expresada así:

$$\frac{P^{\circ} - P^s}{P^{\circ}} = \frac{\frac{m_2}{Mr_2}}{\frac{m_1}{Mr_1} + \frac{m_2}{Mr_2}}$$

Por lo general, las masas moleculares relativas obtenidas concuerdan bien con los valores previstos, no obstante, en algunos casos se han observado desviaciones; pronunciadas; estas desviaciones se pueden atribuir, en general, a que las soluciones no se comportan en forma ideal. Como habíamos definido anteriormente, una solución ideal es aquella que cumple la ley de Raoult a todas las concentraciones; pero se observa con frecuencia que la ley se aplica al solvente con aproximación satisfactoria en soluciones diluidas, pero a concentraciones mayores aparecen las desviaciones.

Estas soluciones no son completamente ideales, pero las podemos considerar como tales, para los fines presentes, cuando están comprendidas en el intervalo de dilución en el que se cumple, aproximadamente, la ley de Raoult para el solvente. Por consideraciones teóricas, se ha demostrado que la condición para que se cumpla la ley de Raoult es que el soluto no debe afectar las fuerzas que actúan entre las moléculas del solvente. Este será el caso si el solvente y el soluto tienen las mismas características, es decir, si ambos son no polares o si ambos son sustancias polares afines. Podemos establecer, a grandes rasgos, que si estas condiciones se cumplen, la ley de Raoult será moderadamente válida para soluciones de concentración de hasta "0,1 molal". La presencia de un soluto polar en un solvente no polar, o viceversa, afectará las fuerzas entre las moléculas del solvente, de tal manera que no se puede esperar que la ley de Raoult se cumpla.

Se ha observado una desviación del comportamiento ideal en soluciones de ácidos y bases fuertes, de sales y en general en soluciones capaces de conducir la corriente eléctrica (soluciones electrolíticas). En el caso de estos solutos, especialmente cuando el solvente es agua, se encuentra para las masas moleculares relativas; valores considerablemente menores que los esperados; estos valores disminuyen, aproximadamente a un valor límite, a medida que decrece la concentración de la solución, es decir con el aumento de la dilución. Lo mismo se observa cuando calculamos los valores de descenso de la presión de vapor o cualquiera de las otras propiedades coligativas. A fin de conseguir acuerdo entre los valores calculados y experimentales debemos obtener un factor de corrección, el cual se conoce como "factor de van't Hoff". El mismo se define como la relación entre el valor experimental o real y el teórico o esperado.

De este modo, si ΔP_v representa el valor experimental y ΔP_{v0} es el valor esperado del descenso de la presión de vapor para una solución de comportamiento ideal, por definición se tiene que:

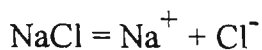
$$i = \frac{\Delta P_v}{\Delta P_{v0}}$$

Siendo i el factor de van't Hoff.

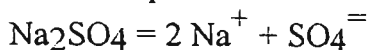
En el caso de sales como NaCl, KNO₃, MgSO₄, etc. formadas por dos radicales, el valor i de van't Hoff tiende hacia un valor límite de 2 en soluciones diluidas; para sales constituidas por tres radicales como K₂SO₄, CaCl₂, Na₂SO₄, etc. el valor i se aproxima a 3 a medida que la concentración decrece.

El significado fundamental de los valores que se acaban de describir fue comprendido por S. Arrhenius (1887) quien pudo correlacionar las propiedades anormales con el hecho de que las soluciones correspondientes eran buenos conductores de la electricidad.

Según Arrhenius, "cuando un ácido, una base o una sal se disuelven en agua, se separan o se disocian espontáneamente en iones con cargas positivas y negativas", siendo éste el fundamento de la teoría de la disociación electrolítica. Veamos el caso del cloruro de sodio, el cual se disociaría en dos iones,



mientras que el sulfato de sodio dará tres iones por disociación:



Se podría explicar la propiedad de las soluciones de conducir la corriente eléctrica por la presencia de iones libres, ya que el transporte de la corriente se efectúa siempre por partículas cargadas, sean electrones o iones. La formación de iones libres explicaría además, las propiedades anormales de estas soluciones. Como definimos anteriormente, las propiedades coligativas dependen del número de partículas disueltas en la solución; si a este respecto cada ión se comporta como una partícula, y no hay razón de que así no sea, el valor del descenso de la presión de vapor producida por una molécula de cloruro de sodio, sería el doble del que se espera para la molécula entera. Esto explicaría el valor límite 2 del factor de van't Hoff para el cloruro de sodio y sales similares, para una dilución infinita, es decir, muy grande. A concentraciones apreciables es menor que 2. Siendo alrededor de 1,90 para una solución 0,05 molal y 1,87 en una solución 0,1 molal. Este valor límite es igual al número de partículas en que se disocia el electrolito.

Si cada molécula en solución estuviera completamente disociada en iones, el valor del factor de van't Hoff para la solución sería el valor límite. Por lo tanto la disociación incompleta sería una manera de explicar la existencia de valores de i menores al valor límite. Cuando las soluciones no tienen una disolución infinita se producen interacciones entre las partículas debido a que al aumentar la concentración, las partículas de carga diferente están más cercanas.

Al valor límite se lo representa con la letra v .

El valor límite de i para el NaCl, KCl, es 2; para el CaCl_2 , K_2SO_4 , es 3; FeCl_3 es 4.

El grado de disociación electrolítica de una solución está dado por el "coeficiente osmótico" (g), el cual se define como

$$g = \frac{i}{v}$$

El valor del coeficiente osmótico (g) se encuentra tabulado. Depende del electrolito en cuestión y de la concentración de la solución. Veamos un ejemplo, para una solución de cloruro de sodio 0,3 molal, el valor de g obtenido de la tabla es 0,86; por lo tanto

$$i = g \cdot v, \text{ o sea } i = 0,86 \cdot 2 = 1,72$$

A dilución infinita i tiende a v , por lo tanto g vale 1. Si recordamos que el coeficiente de van't Hoff había quedado definido como

$$i = \frac{\Delta P_v}{\Delta P_{vo}}$$

podemos decir también que

$$\frac{\Delta P_v}{\Delta P_{vo}} = g \cdot v$$

Ascenso Ebulloscópico

Una consecuencia directa del descenso de la presión de vapor por un soluto no volátil es que el punto de ebullición normal de la solución es decir, la temperatura a la cual su presión de vapor se hace igual a 1 atm., debe ser superior al del solvente puro. Esto se puede observar en las siguientes curvas, que representan la variación de presión del solvente puro y de una solución en función de la temperatura. La curva de la solución está siempre debajo de la que corresponde al solvente:

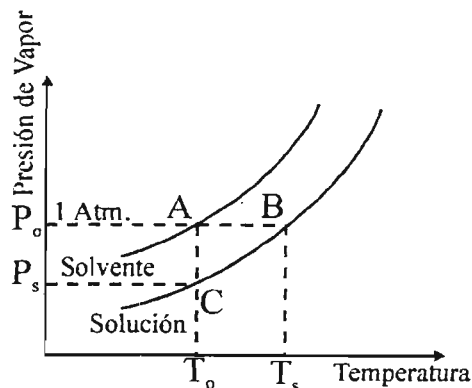


Figura 7

Si tomamos a T_0 como el punto de ebullición del solvente y a T_s como el de la solución, la diferencia $T_s - T_0 = \Delta T$ será el ascenso del punto de ebullición. Este incremento en el punto de ebullición está representado en el gráfico por el segmento AB. El punto A da la presión de vapor del solvente, es decir, 1 atm., mientras que el punto C representa la presión correspondiente a la solución, ambas a la temperatura T_0 ; por lo tanto, la distancia AC es el descenso de la presión de vapor $P_0 - P_s$. Siendo P_0 una magnitud constante, igual a 1 atm., resulta que AC es proporcional al descenso relativo de la presión de vapor $(P_0 - P_s)/P_0$.

Si las curvas de las presiones de vapor de una serie de soluciones son casi paralelas en la región del punto de ebullición, como es probable que suceda para soluciones diluidas, la relación entre las distancias AB y AC será constante para estas soluciones.

En otras palabras, la elevación del punto de ebullición AB será proporcional al descenso relativo de la presión de vapor AC. Si el descenso relativo es igual a la fracción molar del soluto X_{st} , por la ley de Raoult, resulta que

$$\Delta T = Cte. \cdot X_{st}$$

donde *Cte.* es la constante de proporcionalidad, igual a AB/AC , y ΔT es el ascenso ebulloscópico.

Para las soluciones diluidas es conveniente expresar la concentración de la solución en función de la molalidad; siendo el número de moles de soluto disueltos en 1000 g. de solvente. Se puede sustituir la fracción molar del soluto por la molalidad del soluto resultando que la ecuación

$$\Delta T = Cte. \cdot X_{st} \quad \text{se hace} \quad \Delta T = Ke. \cdot m$$

donde *Ke* es una constante para cada solvente. Por lo tanto, la elevación del punto de ebullición de una solución es proporcional a su molalidad, siempre que la solución sea diluida (que cumpla la ley de Raoult).

Vimos antes que había una diferencia entre el descenso de la presión de vapor experimental y el esperado; lo mismo ocurre con el ascenso ebulloscópico cuando se estudian soluciones electrolíticas. En este caso el factor i será el coeficiente entre el ascenso ebulloscópico y el esperado, por lo tanto

$$\frac{\Delta T}{\Delta T_o} = i$$

Surge ahora la necesidad de definir otra forma de expresar la concentración, la cual representa el número de partículas presentes en la solución. Esta nueva forma de expresar la concentración es la “*osmolaridad*”, la cual podemos definir como el número de osmoles por litro de solución.

Osmol: es la cantidad de sustancia que contiene el número de Avogadro de partículas coligativamente activas. En fisiología es más usado como unidad de miliosmol (mosm), siendo $1 \text{ osmol} = 10^3 \text{ mosm}$.

Otra forma de expresar la osmolaridad es:

$$\text{osm} = m \cdot i$$

Vemos entonces que la ecuación inicial para el ascenso ebulloscópico

$$\Delta T = K_e \cdot m$$

pasa a ser

$$\Delta T = K_e \cdot \text{os}$$

Tomemos como ejemplo una solución de NaCl 0,3 molal, para la cual su coeficiente osmótico (g) tabulado es de 0,86; la ecuación es :

$$\text{osm} = m \cdot g \cdot v$$

$$\text{osm} = 0,3 \cdot 0,86 \cdot 2 = 0,516 \text{ osmolal}$$

En el caso de soluciones de no electrolitos, como la glucosa, 1 osmolal equivale a 1 mol ya que no hay disociación , por lo tanto

$$\Delta T_e = K_e \cdot m$$

Dentro del área biológica es más usado el término osmolaridad (número de osmoles/litro solución), que el de osmolalidad. En soluciones diluidas la diferencia es lo suficientemente pequeña, que puede ser despreciada.

Descenso Crioscópico

Otra consecuencia del descenso de la presión de vapor del solvente en una solución, es que el punto de congelación de la solución es más bajo que el del solvente puro. Sabemos que una sustancia disuelta desciende el punto de congelación del agua: es conocido el uso de la sal común para fundir nieve. La relación entre el punto de congelación del solvente puro y el de una solución se puede ver en el siguiente gráfico:

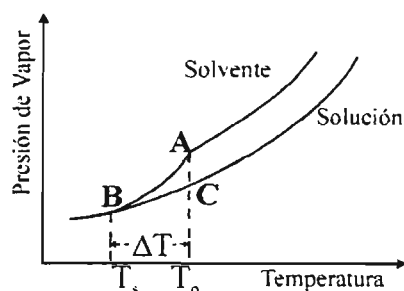


Figura 8

Estas curvas muestran la variación, en función de la temperatura, de la presión de vapor del solvente sobre el solvente puro (agua), sobre la solución y sobre el solvente sólido (hielo) respectivamente.

En el gráfico se ve que A es el punto de congelación del solvente, es decir T_0 ; en forma similar, B, que corresponde a T_s , es el punto de congelación de la solución, donde ésta se encuentra en equilibrio con el hielo.

El punto de congelación de la solución es, por supuesto, más bajo que el solvente, y el “descenso del punto de congelación” ΔT_c es igual a $T_0 - T_s$. La distancia $\underline{AC}$ equivale a $p_0 - p^s$ en el punto de congelación del solvente, y como p_0 a esa temperatura es constante, resulta que $\underline{AC}$ es proporcional al descenso relativo de la presión de vapor.

Para estas soluciones el descenso crioscópico ΔT_c será proporcional al descenso relativo de la presión de vapor, y por lo tanto, a la fracción molar del soluto X_2 . De aquí resulta que

$$\Delta T_c = Cte \cdot X_{st}$$

Como para el caso del ascenso ebulloscópico se puede sustituir la fracción molar del soluto por la molalidad quedando $\Delta T_c = K_c \cdot mol$. El descenso del punto de congelación es así proporcional a la molalidad de la solución; la condición esencial es que la solución sea diluida.

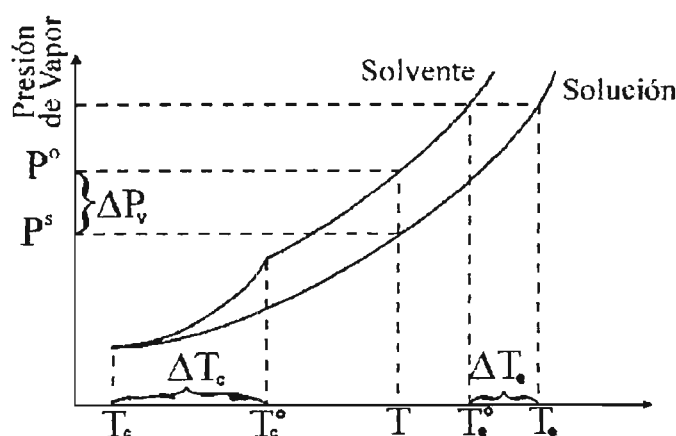


Figura 9

Cuando se trate de soluciones electrolíticas la molalidad es sustituida por la osmolalidad; siendo $osm = m \cdot g$, quedando $\Delta T_c = K_c \cdot osm$, en la que K_c se denomina “constante crioscópica” y depende del solvente.

Ósmosis y Presión Ósmótica

Ósmosis (del griego: empujar) es el “pasaje espontáneo de solvente a una solución, o el pasaje

espontáneo de solvente de una solución diluida a una más concentrada; cuando ambos líquidos se hallan separados por una membrana semipermeable pura”.

Una membrana semipermeable pura es aquella que permite pasar libremente al solvente, pero no al soluto.

Un simple ejemplo de ósmosis se obtiene si se fija una membrana semipermeable pura, en el extremo de un tubo delgado que termina en forma de campana, se llena en parte con una solución acuosa de sacarosa y se introduce en un recipiente con agua. El nivel del líquido debe coincidir con el 0 de la escala del tubo. Dicho nivel se elevará en el tubo hasta que la presión hidrostática así producida alcance a detener el flujo de agua.

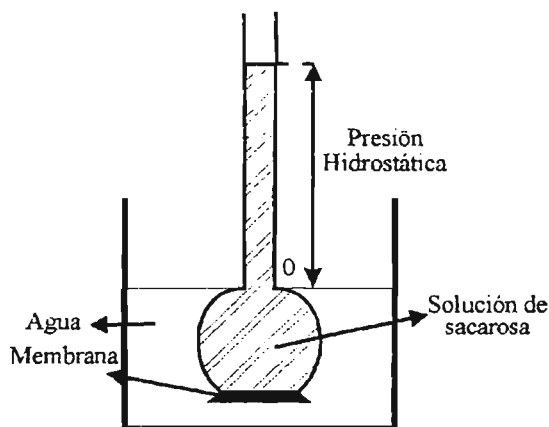


Figura 10

El fenómeno de ósmosis ocurre debido a la existencia de una diferencia de presión (presión osmótica) entre las caras de la membrana semipermeable, que provoca el pasaje de solvente. La presión osmótica puede medirse a través de “la sobrepresión que debe aplicarse a una solución para impedir el pasaje de solvente hacia ella, cuando los dos líquidos se hallan separados, por una membrana semipermeable pura”.

Para las medidas de presión osmótica es necesario disponer de una membrana que se aproxime en lo posible a la semipermeabilidad perfecta. Las membranas artificiales preparadas con ferrocianuro de cobre, $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$, son consideradas hasta hoy como el mejor material para este fin.

Cuando en el recipiente exterior se coloca un solvente puro se puede impedir el pasaje de solvente a través de la membrana semipermeable, colocando un émbolo sobre la superficie de la solución y ejerciendo una presión adecuada. Esta presión puede obtenerse agregando pesas sobre el émbolo hasta que el mismo se mantenga quieto.

Debido a que presión es la fuerza que actúa por unidad de superficie:

$$P = \frac{F}{s}$$

el valor está dado, en este caso, por la fuerza que ejercen las pesas más el émbolo dividida por la superficie del émbolo.

Cuando el émbolo no sube ni baja existe una presión tal; para la cual no hay pasaje de solvente. Si la presión que se ejerce es menor que este valor, el solvente pasa hacia la solución, el volumen de ésta aumenta y su concentración disminuye; si es mayor la solución pierde solvente que pasa al exterior y su concentración aumenta. La presión recibe el nombre de “presión osmótica”.

Medición de la presión osmótica

Antes debemos recordar el teorema general de la hidrostática que dice: la diferencia de presión entre dos puntos de una masa líquida en reposo es igual al producto del peso específico del líquido por la diferencia de nivel entre los mismos.

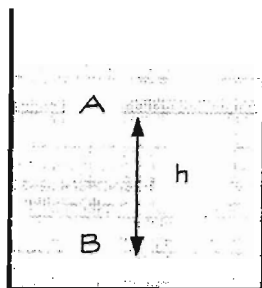


Figura 11

$$\Delta P = p_B - p_A = h \cdot \zeta = \delta \cdot g \cdot h$$

$$\text{Presión Hidrostática} = \frac{g}{\text{cm}^3} \cdot \frac{\text{cm}}{\text{seg}^2} \cdot \text{cm} = \frac{\text{dinas}}{\text{cm}^2} = \text{barias}$$

Recordemos que el tubo del osmómetro lleva una escala y que el nivel del líquido en el tubo se eleva progresivamente a medida que el solvente penetra por la membrana semipermeable, hasta que la presión hidrostática alcanza una magnitud suficiente para equilibrar la presión osmótica.

Será entonces, la diferencia de presión $\Delta P = (\text{presión osmótica})$

$\Delta P = \delta \cdot g \cdot h = \pi$ siendo h el nivel alcanzado por el líquido en el osmómetro.

El esquema de osmómetro indicado en la figura 10 no es satisfactorio para la determinación cuantitativa de la presión ósmotica.

En la Tabla 2 se dan algunos datos acerca de la influencia de la concentración sobre la presión osmótica, los valores fueron obtenidos a una temperatura de unos 15°C, la constancia aproximada de la relación de la presión osmótica con la concentración, es decir, π/C , como se ve en las cifras de la última columna, indica que a temperatura constante, la presión osmótica de una solución es casi directamente proporcional a su concentración.

Concentración % (c)	P. osmótica mmHg (π)	Relación (π/c)
1	535	535
2	1016	508
4	2082	521
6	3075	613

Tabla 2

Los resultados de la tabla 3 muestran el efecto de la temperatura; estos resultados fueron obtenidos por Pfeffer empleando una solución de sacarosa al 1 por ciento. Es evidente que la presión osmótica aumenta con la temperatura y la constancia aproximada de la relación entre la presión osmótica y la temperatura absoluta, o sea π/T , muestra la estrecha proporcionalidad que existe entre estas cantidades.

Temperatura (T) °K	Presión osmótica mmHg (π)	Relación (π/c)
--------------------	---------------------------------	----------------------

280,0	505	1,80
286,9	525	1,83
295,2	548	1,85
305,2	544	1,79
309,2	567	1,83

Tabla 3

J. H. van't Hoff demostró que las medidas de Pfeffer de la presión osmótica indicaban que existía un paralelismo entre las propiedades de las soluciones y de los gases. Si c es la concentración de una solución expresada en moles por unidad de volumen de solución, y V es el volumen de solución que contiene un mol, en las mismas unidades, c es igual a $1/V$. Como se acaba de ver, la presión osmótica dividida por la concentración es constante a una temperatura dada; y si bien las unidades de concentración usadas en la tabla no son iguales a las definidas aquí, los valores son aproximadamente proporcionales, de modo que se puede escribir:

$$\frac{\pi}{C} = \text{constante}$$

donde π es la presión osmótica; reemplazando C por $1/V$ resulta que:

$$\pi \cdot V = \text{constante a temperatura constante}$$

Se ve que este resultado es análogo al de la ley de Boyle, cuando la presión osmótica de la solución sustituye a la presión del gas. Por otra parte, la proporcionalidad entre la presión osmótica y la temperatura absoluta, a una concentración dada, indica que se puede aplicar a las soluciones una ley equivalente a la ley de Gay Lussac para los gases, así:

$$\frac{\pi}{T} = \text{constante para una solución de concentración definida.}$$

Combinando las ecuaciones anteriores, como en el caso de los gases, se llega al resultado:

$$\pi \cdot V = R \cdot T$$

donde R es una constante. Introduciendo valores experimentales de la presión osmótica de una solución de concentración conocida a temperatura definida surge el hecho interesante de que la constante R es casi idéntica a la constante de los gases. Se ve que la ecuación, denominada "ecuación de van't Hoff" para las soluciones diluidas, es exactamente análoga a la ecuación de un gas ideal.

Para el cálculo de R a partir de datos de presión osmótica, conviene escribir la ecuación en la forma siguiente:

$$\pi = R \cdot T \cdot C$$

puesto que la concentración c es igual a $1/V$.

Mecanismo de la membrana semipermeable y de la presión osmótica

Se puede demostrar teóricamente, que la magnitud de la presión osmótica que se desarrolla cuando una solución y su solvente se encuentran separados por una membrana semipermeable debe ser independiente de la naturaleza de la membrana.

Se han realizado numerosas tentativas para explicar la propiedad que tienen muchas sustancias de ser semipermeables, pero el problema no puede considerarse todavía resuelto.

En base a algunos experimentos se podría explicar la semipermeabilidad en relación con la ósmosis, suponiendo que el solvente es soluble en la membrana, mientras el soluto es insoluble. Una interpretación ampliamente aceptada, es que las moléculas del solvente, por ejemplo, agua, son atraídas por la superficie de la membrana, es decir, son “adsorbidas”. Resulta así un contacto íntimo entre las moléculas del solvente que se encuentran a ambos lados de la membrana; estas moléculas pasan sin dificultad. En cambio las moléculas del soluto no pueden penetrar la compleja red de poros que constituye la membrana semipermeable, porque no existe comunicación directa entre ambas caras de la membrana.

Otra sugestión que ha recibido algún apoyo es que las membranas de material semipermeable están formadas por gran número de capilares finos que no son humedecidos por el agua; el pasaje directo del líquido a través de los capilares no es posible. En cambio, las moléculas de vapor pueden difundir a través de los poros, de modo que cuando se coloca de un lado de la membrana el solvente puro y del otro la solución, se produce la destilación, a través de los capilares del lado donde la presión de vapor es elevada, es decir, el disolvente, hacia donde la presión de vapor es menor, o sea la solución; de este modo se produciría la ósmosis.

Este mecanismo no explica tan bien como el anterior el comportamiento de las membranas en presencia de diferentes solventes. Por ejemplo, el ferrocianuro de cobre actúa como membrana semipermeable cuando el solvente es agua pero cuando se trata de algunos solventes no acuosos, como la piridina y la acetona se deben emplear otras membranas, tales como corcho vulcanizado, etc. La teoría de la adsorción concuerda mejor con los hechos, pues el corcho adsorbería las moléculas del solvente orgánico, mientras que el ferrocianuro las moléculas de agua.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la presión osmótica; teniendo en cuenta la aparente analogía entre las soluciones y los gases, se han intentado explicar la presión osmótica, como resultado del bombardeo por las moléculas del soluto como se dijo anteriormente, la analogía citada puede ser errónea; en todo caso, la teoría del bombardeo encuentra muchas dificultades.

Otro punto de vista considera la presión osmótica como resultado del bombardeo de la membrana semipermeable por las moléculas del solvente, más bien que por las del soluto. Puesto que en el solvente puro existe un número relativamente mayor de moléculas que en la solución, habría una presión resultante que tendería a impulsar a las moléculas del solvente hacia la solución, como sucede en la realidad. Otra interpretación de la ósmosis, está dada por la teoría que supone a la membrana semipermeable constituida por capilares secos, a través de los cuales las moléculas de vapor destilarían del solvente a la solución, como se dijo en el párrafo anterior. A medida que la presión externa sobre la solución (presión osmótica) aumenta, lo hace sin presión de vapor; cuando, esta última llegó a ser igual a la del solvente, la destilación, es decir, el flujo del solvente, cesa. La presión externa a la cual se produce este hecho sería la presión osmótica de la solución.

En años recientes se ha desarrollado la idea, emitida primeramente por el mismo van't Hoff en 1892, de que el mecanismo real de la presión osmótica carece de importancia; indudablemente, tanto las moléculas del disolvente como las del soluto bombardean la membrana semipermeable, y al mismo tiempo puede producirse la destilación a través de los poros. Sin embargo, en el estudio de la presión osmótica el punto esencial es que, por alguna razón relacionada en la presencia de las moléculas del soluto, la “tendencia de escape” o “actividad” de las moléculas del soluto es menor en la solución que en el solvente puro. Esta disminución de la tendencia de escape o actividad se evidencia directamente en el hecho de que la presión de vapor de la solución es menor que la del solvente. Un resultado de esta diferencia en la tendencia de escape es que las moléculas del solvente tenderán siempre a pasar de éste a la solución.

Comportamiento Osmótico de los Eritrocitos

Para estudiar el comportamiento osmótico de las células animales con relación al medio en el cual están dispuestas (*medio interno*), se utilizan los eritrocitos (glóbulos rojos). En los mamíferos, estas

células se caracterizan por ser anucleadas. Su forma es generalmente bicóncava, mientras que su tamaño varía en las diferentes especies.

Las soluciones se pueden clasificar en:

Isoosmolares son aquellas que presentan la misma osmolaridad.

Hipoosmolar es aquella que presenta menor osmolaridad.

Hiperosmolar es aquella que presenta mayor osmolaridad.

Isoosmóticas son aquellas que presentan la misma presión osmótica.

Hipoosmótica es aquella que presenta menor presión osmótica.

Hiperosmótica es aquella que presenta mayor presión osmótica.

Si sumergimos eritrocitos lavados en una solución isoosmótica, no observaremos morfológicamente ninguna variación en las células, a pesar de que se produce un intercambio bidireccional de solvente, hacia y desde el eritrocito.

En el caso de que sumerjamos a los eritrocitos en una solución **hiperosmótica** se producirá un eflujo de solvente, observando que los eritrocitos se “arrugan”, dando lugar a células conocidas como “**crenocitos**”.

Si la solución que utilizamos es una solución **hipoosmótica** podremos observar en un primer momento que la entrada de solvente al eritrocito produce una modificación de la forma del mismo, dando lugar a un “**esferocito**”. Si la diferencia de osmolaridad es suficientemente grande, la presión ejercida por el agua intracelular será mayor que la resistencia de la membrana celular, produciéndose la ruptura de la misma. Este proceso se conoce como “**hemólisis**”, y será estudiado con más detalle en los trabajos prácticos.

Si los solutos que forman las soluciones de trabajo atraviesan la membrana a una velocidad suficientemente baja con respecto al solvente, ésta se comportará como una membrana semipermeable pura. Por ejemplo, si consideramos la velocidad de pasaje de los iones Cl^- y Na^+ como 1, el agua atravesará la membrana cincuenta millones de veces más rápido, lo que permite despreciar el paso de los iones al considerar el fenómeno osmótico. No obstante, ciertos solutos atraviesan la membrana a mucho mayor velocidad que estos iones. Estos solutos, como la urea y el CO_2 , se llaman solutos “**penetrantes**”. En este caso, si sumergimos eritrocitos en una solución isoosmótica de urea, al cabo de poco tiempo observaremos hemólisis.

Esto se debe a que el soluto ingresa a la célula, arrastrando al mismo tiempo solvente. El aumento de presión en el interior, dado por el aumento del solvente, acabará por romper la membrana.

En fisiología suelen emplearse los vocablos **isotónico**, **hipertónico** e **hipotónico** como sinónimos de iso, hiper e hipoosmótico respectivamente. Estos términos se refieren a las modificaciones del volumen celular (del griego: *tonos* = volumen). No obstante, podemos observar que son equivalentes solamente en el caso de solutos no penetrantes, ya que en el ejemplo de la urea, una solución isoosmótica se comporta como hipotónica.

BIBLIOGRAFIA

“Elementos de Fisicoquímica”

Samuel Glasstone

Editorial Médico Quirúrgica

Hum Reprod. 1996 Nov;11(11):2468-71.

The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme.

Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W.

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany.

The main purpose of this study was to determine the possible relationship between chromatin condensation (Aniline Blue staining), the morphology of spermatozoa according to strict criteria, and the fertilization, cleavage and pregnancy rate in an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) programme. A total of 60 patients were divided into two groups (27 versus 34) according to sperm stainability by Aniline Blue. The first group involved patients having a positive Aniline Blue staining test with 0-29% stained. The fertilization rate in this group was 60.8%, cleavage rate 54.4% and pregnancy rate 18.5%. In the second group in which > 29% spermatozoa were positively stained, the fertilization rate was 62.1%, cleavage rate 62.0% and pregnancy rate 35.3%. There was no statistically significant difference between the two groups. Furthermore, the influence of morphology according to strict criteria after Papanicolaou staining on successful fertilization, cleavage and pregnancy was studied in 85 patients who were divided into two groups according to the percentage of morphologically normal sperm. The fertilization, cleavage and pregnancy rates were 44.21, 63.37, and 39.47% respectively in the first group (< 4%), the corresponding values for the second group (> 4%) were 56.50, 46.04 and 21.21%. There was no significant correlation between the fertilization ($P = 0.722$), cleavage ($P = 0.519$) and pregnancy ($P = 0.096$) rates in either group. This study demonstrates that neither chromatin condensation (Aniline Blue staining) nor morphology could assess the fertilization potential, cleavage and pregnancy rate in an ICSI programme.

1: Cytogenet Cell Genet. 1999;85(3-4):200-4.

Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y.

Rubes J, Vozdova M, Kubickova S.

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic. rubes@vri.cz

The objective of this research was to develop chromosome-specific probes for use in evaluating aneuploidy in boar spermatozoa through the application of fluorescence in situ hybridization (FISH) technology. A multicolor FISH method was developed to detect aneuploidy in the sperm of boars using DNA probes specific for small regions of chromosomes 1, 10, and Y. The average frequencies of sperm with disomy for chromosomes 1, 10, and Y were 0.075%, 0.067%, and 0.094%, respectively. The incidence of disomy did not differ significantly by chromosome. The average frequencies of diploidy were 0.177% for 1-1-10-10 and 0.022% for Y-Y-10-10. Thus, the incidence of overall diploidy (1-1-10-10) was significantly higher than that of disomy for the chromosomes examined ($P < 0.01$ for disomy of the autosomes and $P < 0.05$ for disomy of the Y chromosome). No significant age or breed effects on disomy and diploidy rates and no significant interindividual variations in disomy or diploidy were found. The observed level of numerical chromosome aberrations in pig sperm appear to be within the range of the baseline frequencies reported so far in men.

J Cell Sci. 2000 Mar;113 (Pt 5):877-86.

ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis.

Fouquet J, Kann M, Soues S, Melki R.

Laboratoire de Biologie Cellulaire, Centre Universitaire des Saints-Peres, Universite Rene Descartes, Paris V, France. jean-pierre.fouquet@biomedicale.univ-paris5.fr

Actin related protein of vertebrate, Arp1, is a major component of the dynactin complex. To characterise and localise Arp1 during mammalian spermatogenesis, polyclonal antibodies were raised against a human recombinant Arp1. Anti-Arp1 antibodies were used for western-immunoblotting, indirect immunofluorescence and immunoelectron microscopy. In round spermatids, Arp1 was detected at the centrosome and at the Golgi apparatus. In elongated spermatids, Arp1 was predominantly found along microtubules of the manchette and at their site of attachment to the nuclear envelope. In maturing spermatids, Arp1 was still present in the pericentriolar material, but in testicular spermatozoa it was not detectable. These various localisations of Arp1 and their changes during spermatid differentiation suggest that the dynactin complex in association with dynein might contribute to several activities: the functional organisation of the centrosome and of the Golgi apparatus and the shaping of the nucleus by manchette microtubules.

: Andrologia. 1999 Dec;31(6):361-6.

Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining.

Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A.

Department of Obstetrics & Gynaecology, University of Stellenbosch, Tygerberg Hospital, South Africa.

The successful implementation of ICSI has provided a unique means of allowing couples suffering from severe male infertility to achieve their reproductive goals. However, despite the great therapeutic advantages of the technique, ICSI often provides solutions to clinicians in the absence of an aetiological or pathophysiological diagnosis. The development of a sequential diagnostic schedule for patients consulting for fertility disturbances would be an ideal method of approach. Since sperm morphology recorded by strict criteria has often been correlated with fertilization failure, the present study aimed to evaluate the relationship between normal morphology and chromatin staining among fertile and subfertile men. Both chromomycin A3 (CMA3) and acidic aniline blue (AAB) were employed to record chromatin packaging quality among 58 men visiting the andrology laboratory. Intra- and interassay variations were initially recorded for fertile sperm donors. The coefficients of variation (CV) for all intra- and inter-assay assessments were < 12%. Chromatin packaging was significantly and negatively correlated with normal sperm morphology, namely $r = 0.40$ ($P = 0.001$) and $r = 0.33$ ($P = 0.001$) for CMA3 and AAB, respectively. Receiver operator characteristics illustrated sensitivity and specificity values of 75% and 82% for CMA3 and 60% and 91% for AAB, respectively. Significantly different CMA3 and AAB staining was recorded among men with severe teratozoospermia (< 4% normal forms) when compared with normozoospermic men (> 14% normal forms), namely 49% vs. 29% for CMA3 and 51% vs. 26% for AAB staining, respectively. Chromatin packaging assessments should be a valuable addition to the sequential diagnostic programme in an assisted reproduction arena.

: Fertil Steril. 2000 Sep;74(3):450-3.

Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA.

Steele EK, McClure N, Lewis SE.

Department of Obstetrics and Gynecology, The Queen's University of Belfast, Institute of Clinical Science, Northern, Belfast, Ireland.

OBJECTIVE: To assess the effects of two methods of freezing on testicular sperm DNA from subjects with obstructive azoospermia and to compare these with samples of fresh and freeze-thawed testicular sperm from fertile men. **DESIGN:** The Comet assay was used to determine the percentage of undamaged DNA in fresh testicular sperm, testicular sperm freeze-thawed in suspension and in a biopsy sample (men with obstructive azoospermia), and in fresh and freeze-thawed testicular sperm (fertile men). **SETTING:** The Regional Fertility Center, Royal Maternity Hospital, Belfast, Northern Ireland, United Kingdom. **PATIENT(S):** Twelve males with obstructive azoospermia (normal testicular volume and hormone profiles) and nine fertile control subjects. **Intervention(s):** Trucut needle testicular biopsy under local anesthetic. **MAIN OUTCOME MEASURE(S):** Measurement of the percentage of undamaged DNA in fresh and freeze-thawed testicular sperm using the Comet assay. **RESULT(S):** No significant difference was found between the percentage of undamaged DNA of fresh testicular sperm and of both types of freeze-thawed testicular sperm. There was also no significant difference between the percentage of undamaged DNA in fresh or freeze-thawed testicular sperm from controls. Control ejaculated sperm DNA was significantly more damaged than testicular sperm DNA from control men. **CONCLUSION(S):** Cryopreservation of testicular sperm does not increase baseline levels of DNA damage.

: J Biol Chem. 1993 May 15;268(14):10553-7.

Complete selective absence of protamine P2 in humans.

de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R.

Molecular Genetics Research Group, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Spain.

Male sterility due to abnormal sperm morphology or motion has been widely reported, although relatively little has been published on the sperm nuclear protein abnormalities. We report the first cases worldwide of infertile patients having a complete selective absence of protamine P2 in the sperm nucleus. This provides a selective phenotype that will aid understanding of the mechanisms of synthesis, processing, or function of the P2 protamines. In addition, it is of marked immediate relevance to medicine as it allows the diagnosis of this type of human male sterility and the opportunity to understand the basis of this defect

: Hum Reprod Update. 1996 Nov-Dec;2(6):553-9.

Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review.

Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J.

Department of Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction, CHU Bretonneau, Faculte de Medecine, Universite F. Rabelais, Tours, France.

Both the ability to freeze human spermatozoa and the possibility of pregnancy following intrauterine insemination have existed for >40 years. There have been a number of improvements during that time concerning the methods of freezing and thawing human spermatozoa. Initially, the use of the cryoprotective properties of glycerol allowed a major improvement; subsequently, changes were mainly empirical. It was a long time before specific cryobiological studies were undertaken. However, the necessity for these became apparent with the partial recovery or sometimes loss of motility after freezing either subfertile semen before chemotherapy or radiotherapy, or spermatozoa collected from non-physiological situations (epididymal or testicular spermatozoa). The main trends in improvement have defined end-points other than the percentage of motility recovery or the assessment of ultrastructural damage. More sensitive criteria of the objective assessment of motility, energy status, damage to the plasma membrane or to subcellular elements, chromatin stability and chromosomal damage have been proposed as complementary end-points to better assess sperm cryopreservation. A different approach was related to the biochemical environment and physical conditions imposed on spermatozoa during the freezing and thawing process. Biochemical changes were assessed following different combinations of various extenders which attempted either to better preserve some parameter or to avoid the tendency towards drastic increase in osmotic pressure. Analysis of physical conditions was linked to the rate of cooling, freezing and warming, and was based on cryobiological studies. Finally, even though such improvements are not negligible, many questions remain unanswered. The extensive use of frozen spermatozoa during assisted reproductive techniques, together with the development of assisted fertilization using surgically collected spermatozoa, creates the need for additional studies to improve the cryopreservation of human spermatozoa.

: J Androl. 2000 Sep-Oct;21(5):739-46.

Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study.

Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R.

Department of Chemistry and Biochemistry, South Dakota State University,
Brookings 57007, USA. donald_evenson@sdstate.edu

Semen samples from a fertile patient presenting with influenza and a 1-day fever of 39.9 degrees C were obtained and analyzed at 18-66 days postfever (dpf) for sperm nuclear proteins, DNA stainability, free thiols (-SH), and susceptibility to DNA denaturation in situ. At 18 dpf, 36% of sperm demonstrated denatured DNA as measured by the sperm chromatin structure assay (SCSA), and decreased to 23% by 39 dpf. Samples at 33 and 39 dpf contained 49% and 30%, respectively, of cells with increased DNA stainability (HIGRN). A unique sperm nuclear protein band migrating between histones and protamines on acid-urea gels appeared at 33 and 39 dpf and nearly disappeared by 52 dpf. Amino acid sequencing of the first 8 N-terminal residues identified this protein as the precursor to protamine 2. The protamine P1 and P2 ratio remained normal, whereas the histone to protamine ratio increased slightly at 33 to 39 dpf. Flow cytometric measurements of nuclear -SH groups revealed the greatest reduction in free nuclear thiols at 33 dpf, and returned to normal by 45 dpf. The time of appearance of the unprocessed protamine 2 precursor and the relative increase in histone suggest a fever-related disruption of the synthesis of mRNA that codes for a P2 processing enzyme or enzymes. Increased DNA staining is likely due to the increased histone/protamine ratio. This case study demonstrates that fever/influenza can have latent effects on sperm chromatin structure and may result in transient release of abnormal sperm.

: Andrologia. 1998 Mar-Apr;30(2):85-9.

Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa.

Ferrari MR, Spirito SE, Giuliano SM, Fernandez HA.

Area Fisica Biologica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Sperm head morphology is basically conditioned by the nuclear structure. The aim of the present work was to study the relation between nuclear morphological features, DNA content and chromatin distribution in morphologically normal vs. abnormal bovine spermatozoa. To this end, individual Feulgen-reacted spermatozoa were cytophotometrically studied. Chromatin compactation was evaluated by means of nuclear area, as well as mean and maximal absorbance of each nucleus. Morphological abnormality analysed included large, small, pear, narrow and round shapes, together with presumably 'diploid' sperms. Both large and small spermatozoa have a DNA content that does not differ significantly from normal values, but their area and mean and maximal absorbance are significantly different. Size variation seems basically due to altered chromatin compactation. The pear shapes have a narrower neck and a significant increase in maximal absorbance alone, which is invariably recorded in the neck zone whose increase would indicate a change in distribution and/or compactation. The narrow and round shapes fail to present significant variations in studied parameters. The possible 'diploids' differ significantly from normal cells in all studied variables, with a little area increase.

Biol Reprod. 1993 Jun;48(6):1193-201.

Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.

Ward WS.

Division of Urology, Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, New Jersey 08903-0019.

In the four decades since the discovery of the basic structure of the DNA double helix, researchers have been investigating the more dynamic tertiary structures that DNA assumes in the various forms of chromatin. The tertiary structure of DNA is important because it is directly related to the function of the genome: for the cell to access the information that is present in the genome accurately and efficiently, the DNA must be in an organized form. This paper reviews the recent work on one particular enigmatic structural form of eukaryotic DNA, that of the highly condensed spermatozoa. Based on the literature and on recently completed experiments in the field, a new model for DNA packaging in sperm nuclei is presented. In this model, each individual DNA loop domain in the sperm chromatin is condensed into a toroid-shaped structure termed the DNA loop doughnut.

: J Androl. 1998 Nov-Dec;19(6):704-9.

Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry.

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ.

Research Centre in Reproductive Medicine, University of Auckland, New Zealand.

Artificial insemination using cryopreserved semen is a common management tool of the contemporary livestock producer. However, cryopreservation is detrimental to sperm function and fertility, killing some 50% of the spermatozoa during the process. Prediction of cryopreservation damage from prefreeze samples remains elusive. Computer-automated sperm head morphometry was used in this study to determine the effects of cryopreservation on bovine sperm head morphometry. Semen was collected from 18 bulls and was divided. One portion was extended to 200×10^6 sperm/ml and a microscope slide was prepared, while the remaining portion was cryopreserved in a Triscitrate-yolk extender. After thawing, the cryopreserved samples were prepared on microscope slides. All slides were air dried and were stained with hematoxylin and rose bengal. The morphometric dimensions for length, width, width/length, area, and perimeter for a minimum of 200 sperm heads were analyzed from each slide by computer-aided sperm head morphometry analysis, and the mean measurements were recorded. Bull sperm heads were significantly ($P < 0.01$) smaller in cryopreserved spermatozoa than in the companion extended samples for length (8.56 ± 0.07 vs. 8.63 ± 0.08 microm), width (4.39 ± 0.05 vs. 4.48 ± 0.05 microm), area (28.42 ± 0.07 vs. 29.14 ± 0.08 microm), and perimeter (23.33 ± 0.21 vs. 23.70 ± 0.23 microm) for all bulls. Width/length was also different (0.513 vs. 0.519). In addition, differences ($P < 0.05$) were found within 14 of 18 bulls for at least four of the morphometric parameters. The percent change in measures after cryopreservation were correlated ($P < \text{or} = 0.05$) to the variability of the extended sample. Variations in sperm head measurements were lower ($P < \text{or} = 0.05$) in extended samples of the four bulls in which no changes occurred than in extended samples of the remaining 14 bulls. These data suggest that the variability in sperm head measurements of individual bulls, or ejaculates, may be an indicator of sperm cryosurvivability.

Andrologia. 1990 May-Jun;22(3):217-24.

Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells.

Bach O, Glander HJ, Scholz G, Schwarz J.

Dept. of Dermatology/Andrology, School of Medicine, Karl-Marx-University, Leipzig, GDR.

During spermatogenesis in mammals the evolutionary early histones are replaced step by step by more species specific nucleoproteins (protamines). The protamines protect the genetic information of the male against mutagenic or other damaging influences and possibly play a role in male fertility. A method was presented to study the nucleoproteins (NP) of single human ejaculates. This procedure was checked concerning its usability and validity by bull spermatozoa. The NP of cryopreserved human spermatozoa of fertile men and of infertility patients were investigated and compared with the electrophoretic patterns of NP of somatic hepatocytes of rat and mouse. A total of 48 semen samples were studied. Ten of these samples were obtained from semen donors of proven fertility and 38 samples were collected from male partners of infertile couples. Photodensitometrically it could be distinguished between percentages of non-protamines (PNP) and percentages of protamines (PP). The PP varied intra-individually with a mean standard deviation of 34%, analogously to the alterations of classical semen parameters. The PP of fertile men did not significantly differ from the infertility patients with normal spermiogram parameters but showed a significantly higher value compared with the semen samples with pathological spermiograms. On average the PP of all infertile patients were significantly lower than the PP of fertile semen donors.

Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays.

Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE.

Department of Obstetrics and Gynaecology, Queens University of Belfast, UK.

DNA integrity in sperm is essential for the accurate transmission of genetic information and therefore the maintenance of good health in future generations. The ELISA and Comet assays, two techniques that detect DNA damage in cells, are compared in this study of DNA integrity in human sperm. Both techniques rely on alkaline unwinding for the release of single strands of DNA from the nucleus. The ELISA detects single strands immunochemically whereas the Comet assay measures single strands drawn out by electrophoresis, stained with ethidium bromide and quantified by image analysis. The two techniques, both modified for use with sperm, detect similar levels of baseline DNA damage along with similar dose-dependent patterns of induced damage by X-ray irradiation at 10 and 30 Gy ($P < 0.05$). The assays are also comparable in the detection of a significant protective effect by ascorbic acid (300 and 600 μM) and alpha-tocopherol (30 and 60 μM) on DNA integrity, both at baseline levels and following X-ray irradiation ($p < 0.01$). The advantages and disadvantages of each technique are discussed.

: Hum Reprod. 2002 May;17(5):1274-80.

Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm.

Duty SM, Singh NP, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Huang T, Hauser R.

Environmental Health Department, Occupational Health Program, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115-9957, USA.

BACKGROUND: Although the comet assay has potential value for measuring DNA damage in large epidemiological human sperm studies, it is impractical to perform the assay daily on fresh semen samples. Therefore, before its use in epidemiological studies, the reliability of the comet assay in measuring DNA damage in cryopreserved sperm should be compared with that in fresh human sperm. **METHODS:** Semen samples from 16 men were cryopreserved in liquid nitrogen (LN) using four methods: flash freezing with and without cryopreservative, and programmable freezing with and without cryopreservative. Neutral microgel electrophoresis was performed and comets were stained with YOYO-1. Comet length was measured using an eyepiece micrometer at x400 magnification.

RESULTS: The highest correlation was between comet assay results obtained from fresh human semen compared with semen flash frozen without cryopreservative ($R = 0.88$). However, the method of cryopreservation, as compared with other sources of variability, accounted for only 6% of the variability. Inter-individual variability accounted for 20%, and individual sperm-to-sperm variability within an ejaculate accounted for 65%. **CONCLUSIONS:** Flash-freezing in LN without cryopreservative most closely reproduced the results obtained using fresh human semen samples, and thereby represents the most appropriate cryopreservation method for human semen in epidemiological studies utilizing the neutral comet assay.

Arch Androl. 2000 May-Jun;44(3):221-6.

Sperm morphology and chromatin condensation before and after semen processing.

Hammadeh ME, Nkemayim DC, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W.

Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Saarland, Homburg Saar, Germany. Frmham@med-rz.uni-sb.de

Semen analysis constitutes the most important investigation of male infertility. However, the true anomalies present in defective sperm cells have been only partially characterized. The integrity of the sperm chromatin may play the most important role, particularly in ICSI, where most of the natural selection mechanisms are bypassed. This study was carried out to characterize sperm morphology (strict criteria), to evaluate chromatin condensation and sperm count in native semen as well as after semen preparation by the swim-up technique, and to eventually evaluate any correlation between these parameters. Semen from 90 men was analyzed for the above parameters in both the fresh and processed semen. Whereas the sperm count decreased after sperm preparation by the swim-up technique in comparison to the value in the fresh semen ($p < .001$), there was an increase in the percentage of morphologically normal ($p < .001$) and chromatin-condensed sperm ($p = .99$). However, there was no correlation between sperm morphology, chromatin condensation, and sperm count either in the fresh or in the processed semen samples. These results suggest that sperm morphology, sperm count, and chromatin condensation are independent parameters that should be evaluated separately in the assessment of male fertility in an assisted reproduction program.

Hum Reprod. 1998 Dec;13 Suppl 4:11-9.

Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development.

Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A.

Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Geneva, Switzerland.

In the first part of this report we investigate whether chromatin anomalies in human spermatozoa can influence fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). We have examined the sperm chromatin packaging quality using the chromomycin A3 (CMA3) fluorochrome and the presence of DNA damage in spermatozoa using in-situ nick translation. When comparing the spermatozoa of patients undergoing in-vitro fertilization (IVF) and ICSI distinct differences are evident in that ICSI males have a higher CMA3 fluorescence, indicating spermatozoa with loosely packed chromatin, and more spermatozoa containing endogenous DNA nicks. When examining the unfertilized oocytes of ICSI patients we found that men who had a high percentage of anomalies in their chromatin, i.e. > 30% CMA3 fluorescence and > 10% nicks, had more than double the number of unfertilized oocytes containing spermatozoa that had remained condensed. The observation that failed fertilized oocytes, injected with spermatozoa from patients with a higher percentage of sperm nuclear anomalies, contain more condensed spermatozoa indicates that a selection process against these spermatozoa may be in place at the time of fertilization. In the second part of the study we show that spare ICSI embryos have significantly lower rates of development to the blastocyst stage compared with those developed after routine IVF. These results show that a greater understanding of the molecular basis of male infertility is therefore needed to broaden our knowledge on the effect that abnormal spermatozoa have on fertilization and embryo development.

: Mol Hum Reprod. 1996 Aug;2(8):613-9.

A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.

Department of Obstetrics and Gynaecology, Queen's University of Belfast, UK.

Baseline DNA damage in spermatozoa from fertile and infertile men was compared using a modified alkali single cell gel electrophoresis (comet) assay. Semen from normozoospermic fertile, normozoospermic infertile and asthenozoospermic infertile (World Health Organization criteria, 1992) samples were studied. No significant difference was observed in levels of baseline damage between the three groups. A median value for baseline damage of approximately 20% (80% head DNA) was obtained in all samples. Irradiation with X-rays (5-30 Gy) produced no additional damage in fertile samples when median values were examined. However, irradiation with 30 Gy X-rays produced significant damage in both infertile groups. Hydrogen peroxide (40 microM) treatment induced significant damage in the asthenozoospermic group, whereas 100 microM H₂O₂ was required to cause significant damage in the normozoospermic fertile and infertile samples. Within the fertile population a subgroup in which percentage head DNA was greater than 80% was observed in both treated and untreated specimens. This subgroup significantly decreased with treatment in both infertile groups. We conclude that the asthenozoospermic infertile group is more susceptible to damage than the normozoospermic infertile group, which in turn is more susceptible than the fertile group. The fertile group contains a resistant subpopulation of spermatozoa with relatively intact DNA.

: Mol Reprod Dev. 2001 Apr;58(4):357-8.

Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed.

Kierszenbaum AL.

Department of Cell Biology and Anatomical Sciences, The City University of New York Medical School, New York, NY 10031, USA. kier@med.cuny.edu

The completion of spermiogenesis requires condensation of the haploid spermatid genome. This task is accomplished in a gradual and relentless manner by first erasing the nucleosomal organization of chromatin while the DNA is protected by transient nuclear proteins TP1 and TP2. Then, the more permanent protamines come into play to stabilize the spermatid genome until fertilization occurs. Mice lacking TP1 manage to produce relatively structurally normal sperm, although fertility is reduced and chromatin condensation is abnormal despite the compensatory expression of TP2. TP1 and TP2 appear to have the house-keeping function of reestablishing continuity when chromatin breaks take place during the remodeling process. DNA single-strand breaks are frequently observed when spermiogenesis is half completed. There is a temporal relationship between TP1 and DNA breaks: TP1 nuclear levels increase and the frequency of DNA breaks become less prominent as spermiogenesis is reaching completion. TP1 seems to hold the broken ends together until an as-yet-unidentified ligase bridges the gap.

Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with Non Return Rates: a preliminary study in France

Decuadro-Hansen , Camus Agnès, Delhomme Guy
 La Sapaie, IMV Technologies 61302 l'Aigle France
 gdh61@hotmail.com
 agnes.camus@imv-technologies.com
 guy.delhomme@imv-technologies.com

Introduction

The overall efficiency of reproduction in cattle herds fertilised by artificial insemination (AI) has suffered a slow but permanent decline over the last decades, both in Europe (including France) and in the United States, Philippot 1994 (6), Chevalier and Humblot 1998 (1), Haferstroh *et al.*, 1999 (5). As a consequence, one major economical parameter inferring with the economical management of cattle breeds, namely fertility has more or less been severely impaired.

In cows fertilised by AI, fertility is itself dependent on a variety of factors including the management, the animal score, the quality of male and female gametes and the timing between sperm deposition and ovulation, etc... Factors related to the female are the most important; nevertheless, those related to the male must be considered. On a large scale, they could be easily modified. From a practical standpoint, male fertility is generally defined as the rate of inseminated cows not having returned to heat over a given period of time e.g., 28, 56, 60-90 or 90 days. As the success or, on the contrary, the failure of AI directly influences non return rates, scientists and farm managers have long been searching for an adequate predictor of fertility directly measurable in semen doses. Indeed, such an approach is justified by the high variability of fertility parameters, not only between individuals, but also between ejaculates issued from a single individual Christensen *et al.*, 2000 (2). Therefore, a simple, precise, accurate and, if possible, reliable method to assess the "quality" of semen in relation with its fertilizing potential has been extensively searched over the past years. Recently, Christensen *et al.*, 2000 (2), observed highly significant correlations between sperm viability and bull fertility, estimated by flow cytometry (FC) (equipment: Becton Dickinson - BD FACSCountTMAF) versus microscopic motility (MM) and computerised analysis of sperm motility (CASA, IVOS Hamilton Thorne Research). Correlations on pre-frozen semen irrespective of the treatment provided to doses were, respectively, 0.28 for CASA, and 0.34 for MM versus 0.71 for FC. Even higher correlations ($r = 0.99$; $P < 0.01$) were observed between viability and fertility determined at the ejaculate level irrespective of the type of treatment (pre-freeze or frozen-thawed). In pre-cited studies, the estimates of sperm viability and sperm concentration in ejaculates were performed using the combination SYBR14/PI modified procedure described by Garner, *et al.* recommended by BD Bioscience (San Jose, CA, USA). Lately, Christensen *et al.* (NAAB, 2002) showed correlation to fertility (NRR 56) for microscopic (MM) assessment of sperm motility and sperm viability (FC) assessed by FACSCount AF, based on 44,946 first inseminations (9).

The aim of the present study was to verify if or not the experimental procedures proposed by Christensen *et al.* (2000) may also be of practical interest in cattle herds inseminated with sub-optimal concentrations of sperm per dose.

Materials and Methods

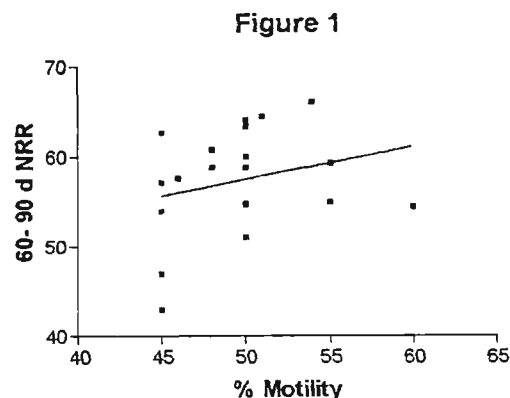
Our experimental approach was at first performed on the basis of the data collected from a previous study dedicated to a comparison of sperm quality and fertility after dilution of semen with two different extenders - Dumont, 2002 (4). It involved a total of 2,154 first AI and 20 batches of semen issued from 7 testing bulls (for a total of 14 fractioned ejaculates) and 6 service bulls (at reason of 2 – 4 ejaculates per bull).

The total number of sperm/straw was 8.28×10^6 (range 6.4 - 12). In both trials, the assessment of frozen/thawed sperm was performed from 3 straws randomly chosen per ejaculate on the basis of semen volume, sperm concentration, % motility, (progressive sperm) assessed by one technician, and finally total number of progressive sperm/straw (total number of sperm/dose x % motility).

Additionally, the concentration, and the percentages of viable sperm were evaluated with a BD FACSCount™ AF flow cytometer on the basis of SYBR 14/PI staining procedure proposed by BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Field observations of achieved fertility (60-90 d non return rates) were performed by the cooperative network involved in this experiment.

Results

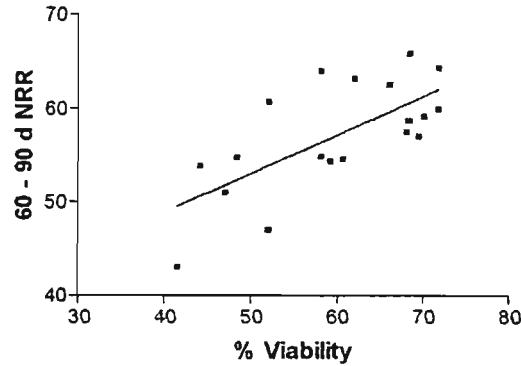
In order to assess the incidence of one or the other parameters analysed on subsequent fertility, we determined the best fit between these variables on the basis of linear and curvilinear models (Source: GraphPad Prism).



% Motility x 60-90 d non return rates

The best fit observed between these two parameters was a linear model (see Figure 1), but the calculated r^2 value was 0.06, revealing the absence of correlation between the two parameters analysed ($P > 0.05$).

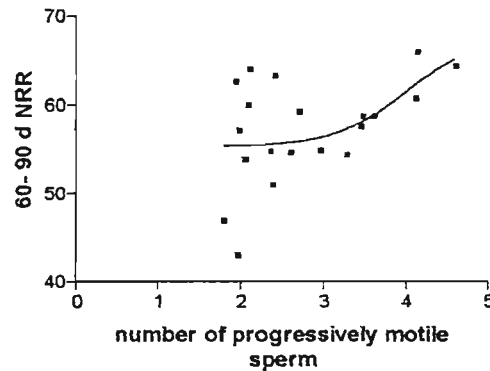
Figure 2



% Viability x 60-90 d non return rates

The graphic distribution between these two parameters has been reported in Figure 2. Its statistical analysis reveals an optimal adjustment on the basis of a linear model, with a highly significant correlation between the two parameters analysed ($r^2=0.48$; $P<0.01$).

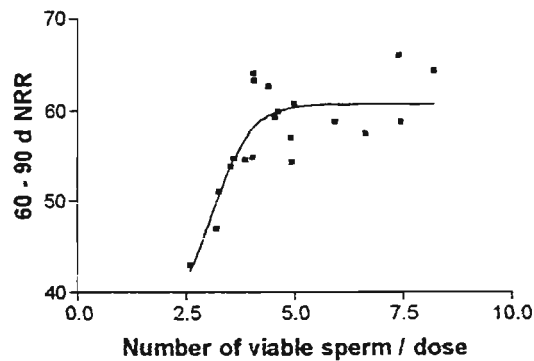
Figure 3



Number of progressively motile sperm/dose x 60-90 d non-return rates

The best fit between these two parameters has been reported in Figure 3. The regression retained as the best fit between the number of progressively motile sperm/dose and 60-90 d non return rates is a curvilinear model with $r^2=0.24$ ($P<0.05$).

Figure 4



Number of viable sperm/dose x 60-90 d non-return rates

Figure 4 depicts the relation between the total number of viable sperm per dose and the 60-90 days non-return rates (NRR). The best fit observed was typically a saturation curve with an $r^2=0.69$ ($P<0.01$).

Conclusion

The aim of this study was to verify if semen quality parameters, objectively estimated, can be used as predictors of fertility (60-90d non return rates) in the case of artificial inseminations performed with sub-optimal quantities of frozen/thawed sperm. From the four parameters tested here, it appears that a positive correlation with the 60-90d non-return rate was observable with percent sperm viability, and, with the number of viable sperm /dose. Meanwhile, the latter parameter had the higher determination coefficient ($r^2=0.69$), indicating that 69% of achieved fertility was explained by this synthetic *in vitro* parameter. Naturally, the relatively low number of cows tested (2,154 first AI) should be taken as a sufficient reason to keep some prudence with regards to the generalisation of our observations. However, these data confirm, at least in part, previous observations by Christensen *et. al.* (2000) that objective tests of sperm quantity and quality performed *in vitro* (here: sperm number and viability) with *ad hoc* materials may be of practical use, not only in order to determine the initial characteristics of semen doses but also to predict the levels of achieved fertility with an acceptable accuracy. This approach is especially interesting in the case of AI performed with sub-optimal doses of semen. In addition, the results reported in Figure 4 suggest that the asymptote of the graph depicting the interrelationships between the number of viable sperm and fertility is reached for doses of viable sperm of approximately $4.5\text{-}5.0 \times 10^6$.

The AI industry must answer to the quality expectations of breeders, who today are very well informed concerning genetics, sanitary topics and fertility results. The use of a quick, reliable and objective evaluation method for semen (concentration and viability), such as the FACSCountTMAF flow cytometer, can contribute to the improvement of quality and optimisation of the production of doses.

If one inputs these results in a database such as SMILE (Roberts 2000) it will be possible to analyse many factors influencing semen and ejaculate quality (dilution parameters, freeze curve, collection frequency, relationship bull - handler - collector, other events). The FACSCountTMAF allows the laboratory manager to follow objectively the quality improvement, and the homogeneity of the doses produced. In order to compute the concentration and viability results with those of the non-return rate, tools like barcode printed on the straws will improve more reliable and faster feedback data of each ejaculate. Through the use of objective means and equipment, semen production centre can thus better monitor, improve, then work towards certifying the doses produced and provide a unique tool to the world wide exchange of semen.

References

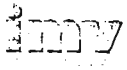
1. Chevalier A. and Humblot P. – 1998 Evolution des taux de non-retour après insémination artificielle : effet du contrôle du délai de mise à la reproduction sur les résultats de fertilité.- Renc. Rech. Ruminants 1998,5 : 75-77
2. Christensen P, Jensen J, Stevang JP, Pedersen KM, Guo Z, Godfrey W, Korsgaard IR, Lehn-Jensen H. In: The relationship between assessment of semen quality by flow

- cytometry and bull fertility. 4th Annual conference of the ESDAR, Prague, 23-25th November 2000; P.10
3. Garner, D.L., L.A. Johnson, S.T. Yue, B.L. Roth and R.P. Haugland 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. J. Androl. 15: 620-629.
 4. Dumont P. 2002 Comparaison des dilueurs Bioxcell-Triladyl pour la congélation de la semence bovine. La lettre de l'Andrologie N°8 26 Avril 2002, 16 p.
 5. Haferstroh R, Seegers H, Gerard O, Beaudeau F, Menjon P. Taux de non retour des taureaux d'insémination artificielle: facteurs de variation liés à l'utilisation des taureaux et aux caractéristiques des femelles-support. Elev. et Insémin. 291, Juin 1999 pages: 3-16
 6. Philippot JM-1994 Vêlage et infécondité des vaches laitières, Villeurbane.-Centre d'Ecopathologie Animale (Ed), in « Réussir Lait Elevage », N°59 (N°Spécial) avril 1994 10 p.
 7. Roberts E. 2000 An integrated system for bull ID and semen processing. P. 16-22 18th
 8. Conf on Art.Ins.and Reprod. NAAB September 29-30 Sept. 2000
 9. Christensen P. 2002 Danish Semen Analysis: Fertility vs. Quality Tests - NAAB 2002.

Acknowledgements

The authors thanks Jean Pierre Brillard, INRA Nouzilly (37) France, for scientific assistance. We would like also to thank:

- Marc Lebreton, Crehen AI center(22) France ,
- Philippe Voinot, Nancy AI center (54) France,
- Pascal Dumont, Laboratoire pour le contrôle des reproducteurs, Maisons Alfort, France UNCEIA



Proper steps for bull semen dilution and freezing
Dr Decuadro-Hansen
IMV Technologies
France

Introduction

Since Polge the first successful cryopreservation of spermatozoa was reported in 1949, spermatozoa from many mammalian species have been successfully frozen. Since then, millions of calves have been produced after artificial insemination (AI) of females with cryopreserved sperm. In fact freezing and thawing of bull semen is necessary for widespread utilisation of genetically superior sires. It allows thousands of cattle producers to access to bulls/genetics they could otherwise not afford to purchase.

AI Bull studs are devoted to assure that maximum numbers of spermatozoa survive the freeze-thawing process, thus providing high numbers of viable sperm for insemination coming from disease-free bulls and in a proper package.

Semen cryopreservation implies storage of spermatozoa at subzero (i.e. frozen) temperatures. The cryogen normally used to accomplish this task is liquid nitrogen (LN -196°C). If spermatozoa withstand the freezing and thawing process, spermatozoa integrity may be maintained indefinitely in liquid nitrogen because metabolic activity of spermatozoa is considered to be negligible at this temperature.

Maintaining the highest fertilizing potential of semen through the freeze/thaw process requires best available conditions for cryopreservation. Many studies over the past 50 years have attempted to optimise the freezing and thawing conditions for sperm from literally hundreds of species. However, sperm from each species possess their own unique characteristics including specific sperm size, shape, membrane lipid and protein composition and metabolic requirements, each of which effects the conditions required to cryopreserve the cells.

Regardless the successful research to improve cryopreservation, some spermatozoa fail to survive freezing and thawing. The reasons for cell death due to freezing and thawing are not fully understood. Two known causes of sperm injury/death are: a) formation of ice crystals within spermatozoa (intracellular ice formation), when fast cooling rates are used resulting in irreparable damage to the sperm membrane and, b) development of regions of high solute concentrations (solution effects) that dehydrate the cell when slow rates of cooling or thawing are employed.

The objective of any freezing procedure is to optimise the cooling rate so that cell death due to formation of intracellular ice and hypertonic solutions is minimized.

The quality of the semen produced by a cryopreservation laboratory is controlled by numerous interactions between individual processing procedures including: cooling rate, equilibration time, equilibration time x thaw rate, thaw rate : freezing rate, freezing rate x glycerol level and glycerol level x thaw rate. Due to these interactions, evaluating the effects of individual components of the cryopreservation process on semen viability can be misleading. Thus, there is no clearly defined "best" semen extender or processing protocol. It is the responsibility of each AI lab to consistently monitor the quality of their processing protocol using acceptable viability criteria and final thawing and handling procedures that are consistent with on-farm recommendations.

One of the main benefits of AI is hygienic safety. Several studies on bacteriological quality of bull semen show however that semen is often far from being sterile and is often contaminated by numerous microbial agents like bacteria and fungi, which can be currently found in cattle environment. The level of microbial contamination depends highly on the conditions of semen collection as well as the microbial quality of the semen extender.

Since the development of cryopreserving techniques for mammalian spermatozoa, glycerol, egg yolk or milk were most commonly used as freezing extenders. Extenders used for cryopreservation of bovine spermatozoa generally contain 20 % of egg yolk. Therefore, the risk of microbiological contamination from egg yolk might occur. IMV Technologies has introduced a new concept in bovine sperm cryopreservation : the Bioxcell™, an egg yolk free sterile extender, which has been widely used in artificial insemination centres.

The aim of this paper is to describe the procedures to dilute and freeze the bovine semen with Bioxcell™.

The ultimate aim of laboratory assessment of semen characteristics is prediction of fertilization and gestation results.

PROTOCOL OF BIOXCELL with frozen semen

Extender preparation

- 1) Place the bottle of 100ml concentrated extender in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes.
- 2) Place an Erlenmeyer of 400ml bi-distilled apyrogen sterile water or equivalent in a water-bath at 32-34°C.
- 3) Put the 100ml concentrated extender into the 400ml bi-distilled apyrogen sterile water or equivalent. Rinse the bottle twice with the final solution.
- 4) Homogenize the solution; the extender is ready to use.
- 5) It is recommended to use the extender for semen dilution within 6 hours since time of preparation.

Once prepared, the BIOXCELL extender can be frozen at -20°C (it is recommended to do that operation just after the extender preparation, should you desire to preserve it for a later use). If so, then split the solution in small 100ml aliquots. Thawing must be done rapidly (plunge the flasks directly into a water-bath at 32-34°C for 15 minutes). Homogenize once the extender is thawed. Do not freeze again.

User's instructions

1) Protocol for a one-step dilution (at 32-34°C)

1a) Semen packaging at room temperature (20°C)

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Incubate the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes
- Do the final dilution by adding the pre-diluted semen into the extender. Do not homogenize.
- Leave the flasks of diluted semen at room temperature (20°C) for 10 to 15 minutes.
- Homogenize and pack semen at 20°C.
- Place the straws horizontally in a plastic container, then place the container in a cold cabinet at +4°C. The straws should be protected from cold so they may go from 20°C down to +4°C in one hour to one and a half hour. The number of straws should be adjusted according to the type of container used. For example : 300 mini straws in a 65mm goblet.
- Equilibrate semen for 3 to 5 hours away from light.
- Place the straws on the freezing racks into the cold cabinet.
- Freeze. Remember that your freezer machine has to be close to the cold cabinet.

1b) Semen packaging at +4°C

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Incubate the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes.
- Do the final dilution by adding the pre-diluted semen into the extender. Do not homogenize.
- Place the flask of diluted semen in a plastic container with a constant level of water from the water bath at 32°C (the level of water should not be above the level of diluted semen). Then place the container in a cold cabinet at +4°C. It is recommended to place a thermometer in the water. When the temperature reaches 12-14°C, you can add ice-cubes to the water. Anyway, the 4°C temperature should be reached within one hour – one and a half hour.
- Equilibrate diluted semen for 3 to 5 hours away from light.
- Pack semen into straws in the cold cabinet.
- Place straws on the racks.
- Freeze.

2) Protocol for a two-step dilution (+32-34°C and +4°C)

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Place the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes, and add it to 20 to 25ml of Bioxcell at 32-34°C.
- Place the flasks of diluted semen in a plastic container filled with water from the water-bath at 32-34°C. It is recommended to place a thermometer in the water.
- Then, place the flasks in a cold cabinet at +4°C for one hour to one and a half hour (You can add ice cubes when the temperature reaches 12-14°C).
- Equilibrate diluted semen for 3 to 5 hours away from light.
- Pack semen into straws at +4°C.
- Place straws on racks.
- Freeze.

PROTOCOL OF BIOXCELL with fresh semen

Extender preparation

- 6) Place the bottle of 100ml concentrated extender in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes.
- 7) Place an Erlenmeyer of 400ml bi-distilled apyrogen sterile water or equivalent in a water-bath at 32-34°C.
- 8) Pour the 100ml concentrated extender into the 400ml bi-distilled apyrogen sterile water or equivalent. Rinse the bottle twice with the final solution.
- 9) Homogenize the solution; the extender is ready to use.
- 10) It is recommended to use the extender for semen dilution within 6 hours from time of preparation.

Once prepared, the BIOXCELL extender can be frozen at -20°C (it is recommended to do that operation just after the extender preparation). Split the solution in small 100ml aliquots. Thawing must be done rapidly (plunge the flasks directly into a water-bath at 32-34°C for 15 minutes). Homogenize once the extender is thawed. Do not freeze again.

User's instructions

2) Protocol for a one-step dilution (at 32-34°C)

1a) Semen packaging at room temperature (20°C)

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Incubate the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes
- Do the final dilution by adding the pre-diluted semen to the extender. Do not homogenize.
- Leave the flasks of diluted semen at room temperature (20°) for 10 to 15 minutes.
- Homogenize and pack semen at 20°C.
- Place the straws horizontally in a plastic container, then place the container in a cold cabinet at +4°C
The straws should be protected from cold so they may go from 20°C down to +4°C in one hour to one and a half hour. The number of straws should be adjusted according to the type of container used
For example : 300 mini straws in a 65mm goblet.
- Equilibrate semen for 3 to 5 hours away from light.
- Store semen at +4°C in our thermostatic cabinet ref. 005485.
Storage (time between semen dilution and A.I.) should not exceed 72 hours.

1b) Semen packaging at +4°C

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Incubate the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes.
- Do the final dilution by adding the pre-diluted semen to the extender. Do not homogenize.
- Place the flask of diluted semen in a plastic container with a constant level of water from the water bath at 32°C (the level of water should not be above the level of diluted semen). Then place the container in a cold cabinet at +4°C. It is recommended to place a thermometer in the water. When the temperature reaches 12-14°C, you can add ice-cubes to the water. In any case, the 4°C temperature should be reached within one hour – one and a half hour.
- Equilibrate diluted semen for 3 to 5 hours away from light.
- Pack semen into straws in the cold cabinet.
- Store semen at +4°C in our thermostatic cabinet ref. 005485
Storage (time between semen dilution and A.I.) should not exceed 72 hours.

2) Protocol for a two-step dilution (+32-34°C and +4°C)

- After semen examination, do a pre-dilution 1:1 with Bioxcell at 32-34°C.
- Homogenize the tube once.
- Place the pre-diluted semen in a water-bath at 32-34°C for 10 minutes, and add it to 20 to 25ml of Bioxcell at 32-34°C.
- Place the flasks of diluted semen in a plastic container filled with water from the water-bath at 32-34°C. It is recommended to place a thermometer in the water.

- Then, place the flasks in a cold cabinet at +4°C for one hour to one and a half hour (You can add ice cubes when the temperature reaches 12-14°C).
- Do the final dilution at +4°C.
- Equilibrate diluted semen for 3 to 5 hours away from light.
- Pack semen into straws at +4°C.
- Store semen at +4°C in our thermostatic cabinet ref. 005485
Storage (time between semen dilution and A.I.) should not exceed 72 hours

IMPORTANT!

- Fresh semen should be stored at +4°C in our thermostatic cabinet until A.I.
- Time between semen dilution and A.I. should not exceed 72 hours
- Do not warm semen before A.I.
- Use IMV fresh semen straws

Dr G.D. Hansen
IMV Technologies
decuadro.hansen@imv-technologies.com

ENRICHMENT OF HIGH QUALITY SPERM IN BOVINE SEMEN. RELATIVE EFFECTIVENESS OF THREE FILTRATION MATRICES

H. O. CISALE; M. L. FISCHMAN; C. D. BLASI; H. A. FERNANDEZ;
B. L. GLEDHILL*

*Laboratorio de Espermatología, Area Física Biológica,
Facultad Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires,
Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires, Argentina.*

**Biology & Biotechnology Research Program, L-452, Lawrence Livermore National Laboratory,
University of California, Livermore, &, Bio-Link: National ATE Center for Biotechnology
Education, City College of San Francisco,
San Francisco, California, USA*

IMPROVEMENT OF BULL SEMEN QUALITY

Key words: semen quality – column filtration – bull

Corresponding Author: Dr. Humberto Cisale

Laboratorio de Espermatología

Fac. Cs. Veterinarias – Universidad de Buenos Aires

Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires – Argentina

Phone: 54 11 4524 8432/8486

Fax: 54 11 4524 8480

SUMMARY

To be practical, any method for improving bull semen must yield a large quantity of motile sperm. Some separation methods based on physical properties, e.g., filtration, chromatography, centrifugation, washing and pooling, have been reported as satisfactory, but generally are not repetitive. Nevertheless, filtration methods appear to allow the attainment of an acceptable number of sperms, thereby to introduce such technique in standard bovine semen AI doses production line. The aim of this work was to systematically evaluate the relative efficiency of three filtration matrices (silica oxide, glass beads, or Sephadex™) on improvement of whole ejaculate quality. Analysis of type of matrix, and volume and height of filtration column were performed. The only one characteristic of the columns that appears to influence the improvement behaviour of the filtering is the matrix volume. While that, all matrices produced improvement of the semen quality, the current results show that the behaviour of Sephadex™ was better than the other matrices tested. An explanation for the behaviour of the column filtration is proposed.

CRIOCONSERVACION DE GAMETAS

Capítulo del Libro: **"Reproducción Y Obstetricia Veterinaria"**
a publicarse por la Editorial Interamericana-Mc Graw Hill (España).

HUMBERTO CISALE - HUGO A. FERNANDEZ
Profesores Asociados - Area Física Biológica
Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad de Buenos Aires

Desde el descubrimiento del efecto beneficioso del uso de glicerol en el congelamiento de eyaculados bovinos, a comienzos de la década del '50, se han desarrollado técnicas, generalmente empíricas, para optimizar los resultados de la inseminación.

El espermatozoide de toro, de fácil congelabilidad relativa, fue tomado como modelo celular de comportamiento frente al complejo proceso de congelado y descongelado. Sin embargo, las técnicas exitosas en estos animales no han podido ser trasladadas a otras especies con el mismo resultado.

Los recientes avances en el conocimiento y comprensión de la estructura y función de las membranas de las células nos permiten investigar más coherentemente este problema.

La optimización de las técnicas de congelamiento requiere una cuidadosa consideración de la complejidad de la membrana plasmática del espermatozoide, la interacción de sus componentes y la influencia del enfriamiento, congelamiento y descongelamiento sobre esas interacciones.

El modelo de membrana propuesto por Singer y Nicholson, modelo de mosaico fluído, presenta a la estructura de la membrana como una bicapa lipídica que contiene proteínas integradas y asociadas. Este tipo de ordenamiento, predominante en los sistemas biológicos, es el que provee una barrera selectiva y controlable para el movimiento de moléculas polares.

Este modelo se ha ido complicando a medida que ha aumentado el conocimiento sobre la distribución y asimetría de lípidos, y las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Estas complejas interacciones fueron la base de la propuesta de dominios específicos ordenados en el plano de la membrana, resultando en una organización de compartimentos de la misma. Sorprendentemente, estos dominios se mantienen en una membrana en estado fluído, que permite una libre difusión lateral de sus componentes.

En este modelo, el mantenimiento y estabilidad de los dominios son críticos para todas las funciones del espermatozoide.

Otro ordenamiento de los lípidos es posible, la fase hexagonal. Los fosfolípidos de ácidos grasos altamente insaturados normalmente presentan forma de conos invertidos, y en la presencia de calcio, monosacáridos, altas concentraciones salinas, o frío, se modifican.

Un grupo de estos fosfolípidos puede asumir la estructura circular, con las cabezas hacia el interior y las cadenas de los ácidos grasos hacia afuera. Esta fase hexagonal es menos común y no presenta el efecto barrera de permeabilidad, y probablemente sólo exista en forma transitoria durante la fusión con el oocito.

Una bicapa estable con el radio de curvatura esperado para la membrana celular demanda que la mitad de los fosfolípidos totales estén localizados en cada capa. Sin embargo, cada fosfolípido tiene predilección por una orientación específica.

Por ejemplo, lípidos con una carga neutra o positiva como la fosfatidilcolina, la esfingomielina o los glicoesfingolípidos, residen en la capa externa de la membrana, mientras que los fosfolípidos aniónicos, como la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol prefieren la capa citoplasmática. Cualquier proceso que altere esta disposición puede modificar la estabilidad de la membrana.

Los lípidos permiten la difusión de diferentes solutos hasta alcanzar su temperatura crítica (temperatura de cambio de fase de cada lípido). A esta temperatura los lípidos se estructuran de manera tal que esta movilidad está netamente restringida.

Shock Térmico

El fenómeno conocido como "Shock Térmico", suele ser la explicación elegida cuando se tiene un fracaso en un proceso de congelamiento de semen. En realidad existen muchos otros factores, incluidos los térmicos, que pudieron ser la causa de la mortandad celular, ya que el choque térmico ocurre ocasionalmente en los procesos de criopreservación de células, siendo menos frecuente de lo que se supone. Dentro de las características de este fenómeno, encontramos que si bien se origina en un punto, es un proceso extensivo, es decir que requiere una zona extensa (no puntual) con estructuras rígidas o semirígidas. En un medio isótropo homogéneo fluído este fenómeno no aparece.

La idea básica es la siguiente: cuando se origina un importante gradiente térmico ($\Delta T/\Delta x$) en un punto (entorno) de una zona estructural (por ej.: membrana celular), se provoca una modificación mecánica violenta que, si supera el límite elástico de la misma, produce su ruptura como la fractura en un cristal.

Esto genera una onda mecánica esférica (onda de choque) que se propaga a la velocidad del sonido en el medio líquido, y es capaz de deformar estructuras adyacentes (otras células), dependiendo de la concentración celular. Esta deformación mecánica aumentará localmente la temperatura (reversibilidad del proceso), pudiendo repetirse el fenómeno, propagándose rápidamente a todo el volumen.

Un gradiente térmico grande no implica una gran diferencia de temperatura. Bastan pocos grados de diferencia entre dos puntos muy cercanos para iniciar el proceso de choque térmico.

La posibilidad de ocurrencia del fenómeno aumenta en forma significativa en las interfases, razón por la cual los procesos de migración térmica de iones en cristales se hacen sumergiéndolos totalmente en un líquido puro. Asimismo, la pinza (no punteaguda) que se usa para el manejo también se introduce en el líquido y está revestida en teflon, que es un mal conductor térmico, para que la zona de agarre no desencadene el proceso.

Todo parece indicar que sería conveniente hacer lo mismo en criopreservación celular, evitando introducir pipetas o puntas a distinta temperatura en los tubos con muestras y, de ser posible, evitando grandes concentraciones celulares. Asimismo, la dilución de los eyaculados disminuye la probabilidad de ocurrencia de "Shock Térmico".

El proceso puede ocurrir tanto durante el enfriamiento como en el calentamiento (descongelado). Es probable que muchos problemas de esta índole ocurran en estas etapas, siendo provocados por la general por falta de precauciones en el manejo, como por ejemplo la diferente temperatura entre el tubo colector y el semen.

Congelamiento de Células

Las membranas celulares soportan una serie de modificaciones durante la congelación y descongelación provocadas por la adición de crioprotectores, cambios volumétricos, modificaciones asociadas al encogimiento y estiramiento en respuesta a soluciones hiperosmóticas, deshidratación, transiciones de fase termotróficas y lipotróficas en los fosfolípidos de membrana, efecto "solución", y formación de hielo intracelular. Pueden distinguirse cinco pasos que presentan, cada uno, una acción especial sobre la membrana.

Estos son:

- a) dilución y enfriado, que lleva a la célula a una temperatura que altera las propiedades físicas de sus membranas celulares
- b) adición de crioprotectores y envasado, que demanda grandes cambios en el volumen celular y una rápida recuperación
- c) congelado, que altera aún más la estructura de la membrana y el volumen en un lapso muy breve
- d) almacenamiento, donde se produciría tal vez un adormecimiento de la funcionalidad celular
- e) descongelado e inseminación, que requiere la recuperación y viabilidad de los espermatozoides.

La disminución de la temperatura altera el estado de fase de la membrana ("Phase state"), modificando sus propiedades físicas. La cristalización extracelular resulta en un cambio de fase del solvente externo, con un aumento de la concentración de los solutos remanentes en el líquido, dándole a la célula muy poco tiempo para adaptarse.

Al mismo tiempo, el descongelamiento somete a la célula a un camino inverso con los mismos peligros. Las curvas de congelamiento deben ser estudiadas con cuidado para minimizar los cambios que se producen en la membrana frente al pasaje de solvente y crioprotectores, e impedir la formación prematura de hielo intracelular.

Lípidos de membrana

Algunos lípidos, en general aquellos que adoptan preferentemente el estado de "nonbilayer", están íntimamente relacionados con ciertas proteínas estructurales. Estos lípidos que rodean a las proteínas, influyen en las propiedades funcionales de la unidad agregada lípido-proteína. La evolución de las especies ha resultado en la selección de constituyentes lipídicos con características físicas tales que llevan a una disposición líquido-cristalina, donde las cadenas acílicas están en relativo "desorden".

Este entorno de la membrana permite el movimiento libre por difusión de componentes a través de ella, mientras la temperatura esté por sobre el valor crítico de cambio de fase. Si la temperatura baja por debajo de ese límite, los lípidos se ordenan restringiendo la motilidad más allá de la estimada por efectos de temperatura en procesos difusivos.

El calentamiento de la célula para su descongelado, lleva a que aparezcan complejos lípido-proteína diferentes a los iniciales. La ubicación original puede reestablecerse en un proceso tiempo dependiente o, en su defecto, aparecer modificaciones en el comportamiento funcional de la membrana.

Se ha encontrado que aquellas especies que poseen una alta relación molar de colesterol/fosfolípidos, o un alto grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas unidas a esos fosfolípidos, tienen más resistencia al descongelado.

A pesar de los diferentes tipos de fosfolípidos encontrados en los espermatozoides, existe una relativamente pequeña variación en las temperaturas termotrópicas de la transición de fases. Estos picos ocurren entre los 20 y 25°C sin relación con la sensibilidad al choque térmico.

Modificaciones de Volumen

El primer ajuste de volumen en el ciclo del congelado-descongelado ocurre en respuesta a la adición de crioprotectores a las células, que se encuentran en un medio isotónico. Se produce una contracción rápida asociada con un egreso de agua intracelular.

Si el crioprotector es penetrante, es seguida por un lento retorno a su volumen original a medida que éste entra.

El segundo ajuste de volumen sucede cuando el agua extracelular se congela. Hay un movimiento de agua hacia afuera de la célula en respuesta a las altas concentraciones osmóticas extracelulares resultante del congelamiento del agua extracelular.

La adición de glicerol, crioprotector penetrante mayormente utilizado, resulta en un egreso del agua osmóticamente activa, que puede llevar a la célula hasta un 50% de su volumen original.

Un cambio mayor ocurre cuando el espermatozoide se transfiere del diluyente que tiene glicerol (aprox. 1300 mOsm) al tracto reproductivo femenino (aprox. 300 mOsm). A medida que el agua entra a la célula, mucho más rápidamente de lo que el glicerol puede salir, se expande hasta cuatro veces su volumen.

Como la cromatina está altamente condensada en la cabeza del espermatozoide, una sustancial reducción en el volumen celular total puede acomodarse solamente entre la región media y la cola. Para evitar su ruptura, y dada su finura e imposibilidad de realizar grandes cambios estructurales por la baja capacidad de síntesis espermática, la membrana debe crear invaginaciones o evaginaciones.

La desestabilización de la membrana puede ocurrir en ausencia de formación de hielo intracelular, por ello es probable que la deshidratación de la célula (stress osmótico) juegue un importante rol en el daño de membrana por congelamiento - descongelamiento. No obstante, el período de equilibramiento de los espermatozoides durante el procesamiento de semen antes del congelamiento, es un equilibramiento de la célula con el frío antes que con el glicerol.

La restauración del equilibrio isotónico es causa significativa del daño celular durante la criopreservación e indica que un mejor descongelamiento y mantenimiento posterior pueden mejorar la viabilidad del semen criopreservado.

Formación de hielo

La probabilidad de que se formen núcleos de hielo es inversamente proporcional a la viscosidad y función directa del volumen, por lo que para obtener un buen proceso la viscosidad debe aumentar y el volumen de la dosis a congelar, disminuir.

La primera lesión en ovocitos que se congelan se observa en el oolema y puede suponerse que se produce por pequeños cristales de hielo que se forman en su interior, y que pueden servir de sitios de nucleación. El daño asociado a los efectos de solución es más pronunciado con bajas velocidades de enfriado, mientras que el problema del hielo intracelular es una consecuencia de las altas velocidades de enfriado.

Crioprotectores

El medio usado para suspender las células durante la criopreservación afecta fuertemente la formación de cristales, la temperatura de cristalización y la sobrevivencia celular. La adición de coloides en soluciones acuosas durante la congelación modifica la forma y crecimiento de los cristales. Esta depende de la temperatura, concentración, y compuesto específico usado. La temperatura de recrystalización (al descongelar) depende también del compuesto usado.

Básicamente, los crioprotectores pueden ser clasificados como penetrantes (glicerol y DMSO) y no penetrantes (lactosa y trealosa), de acuerdo a su posibilidad de atravesar la membrana. Ambos tipos pueden causar una deshidratación de la célula por un egreso de agua inducido osmóticamente, pero difieren en la capacidad de entrar al citoplasma y permanecer en él.

Un crioprotector especial es la yema de huevo de gallina. El efecto de sus fosfolípidos en la protección contra la injuria por frío se debería a la disminución de la pérdida de los propios fosfolípidos de la membrana del espermatozoide. Es el único polímero conocido que protege a la célula en ausencia de agentes coligativos.

Otros aditivos, como la sacarosa y la trealosa, estabilizan las membranas de los liposomas durante el congelamiento. La trealosa y la prolina son crioprotectores naturales de muchos organismos acuáticos.

Las proteínas de peces antárticos, que impiden el congelamiento de la sangre a muy bajas temperaturas, inhiben el crecimiento de cristales por modificar la estructura del hielo, adsorbiéndose a los cristales. No obstante, se ha determinado que en el espermatozoide humano podrían actuar como núcleos formadores (*seeding*).

Los crioprotectores penetrantes como el glicerol y dimetilsulfóxido reducen la deshidratación celular previniendo la concentración del medio extracelular y son más efectivos a velocidades bajas de congelamiento.

El exacto mecanismo por el cual el glicerol protege a las células de la injuria por frío no se conoce exactamente. Es claro que entra a la célula y reside tanto en la membrana como en el interior del citoplasma.

Hay alguna evidencia de que se une a las cabezas de los fosfolípidos reduciendo la fluidez de la membrana, e interacciona con las proteínas y glicoproteínas, causando el enclaustramiento de partículas en la estructura. Reduce la capacidad eléctrica, indicando que hay grandes reacomodamientos en la membrana, posiblemente por la aparición de formaciones similares a "gap- junctions", e induce la interdigitación de las dos láminas, alterando la fluidez e incrementando el orden de las cadenas acílicas interiores. También altera la polimerización y despolimerización de los microtúbulos.

Puede producir efectos directos en el balance bioenergético por aumento en la demanda de ATP (estimulado por la actividad de la bomba de iones) o por su propio metabolismo.

Protocolos de congelación

Para realizar un buen protocolo de congelación deben considerarse todas y cada una de las posibilidades de lesión de la gameta a congelar.

Sabemos que cuando el congelado es muy lento, el hielo formado es exclusivamente extracelular, y el agua es extraída de la célula en respuesta a crecientes concentraciones de solutos fuera de la misma. Este agua contribuye a la creciente proporción de hielo extracelular. En consecuencia, la célula es deshidratada mientras el agua se va incorporando al hielo extracelular. Si la velocidad de enfriado es muy rápida, el agua no es capaz de abandonar la célula con una rapidez suficiente como para responder a la demanda osmótica de los solutos extracelulares, que aumentan su concentración.

Esto resulta en un superenfriamiento de los fluidos intracelulares, menos concentrados, con la consiguiente formación de hielo intracelular. Mientras que el proceso del congelado se acerca al fin, las áreas de alta concentración (solución eutéctica) también solidifican, finalizando el efecto "solución". La temperatura a la cual la solución eutéctica se congela es el punto eutéctico, y depende de la composición del diluyente original en que fue disuelta la célula. Normalmente el congelado ocurre por la propagación del hielo desde un centro de nucleación en forma dendrítica. Los cristales grandes parecen crecer a expensas de los cristales pequeños. Este proceso se llama recrystalización, y puede ser la razón fundamental del requerimiento de bajas temperaturas de almacenaje.

En el enfriamiento, a medida que el agua se congela el medio extracelular se va concentrando. Esto puede causar: 1) cambios en el pH por solubilización de las sales tampón; 2) aumento de la deshidratación celular, con modificación de las estructuras intracelulares; 3) modificación de los complejos proteína-lípido de las membranas celulares y aumento de la pérdida de fosfolípidos. El efecto solución es más evidente cuanto menor es la velocidad de enfriamiento, porque las células están sometidas a altas concentraciones por más tiempo. Debe tomarse en cuenta que la lesión osmótica se observa solamente cuando la célula retorna a condiciones isoosmóticas. Las lesiones disminuyen cuando la temperatura es más baja al descongelado, y cuanto menos tiempo esté en condiciones hiperosmóticas, mejor será su sobrevivencia.

Debe establecerse cuál es la tasa de cambio de temperatura que permita el movimiento de agua y crioprotectores sin la formación de hielo intracelular o cambios irreversibles en la membrana.

Un diseño de un protocolo para criopreservación debe:

- Considerar al espermatozoide como un serie de compartimientos unidos por membranas, previendo un ensayo de evaluación de la funcionalidad de cada uno.
- Altas concentraciones de glicerol pueden alterar muchos aspectos del sistema adicionalmente a las propiedades coligativas del solvente del diluyente.

- Cada compartimiento tiene su propia relación con la temperatura e interacción potencial con el diluyente, predisposición al hinchamiento osmótico y daño resultante, y requerimiento de ATP.
- La solución a este problema complejo requiere un desarrollo satisfactorio de una ecuación compleja multifactorial para cada compartimiento.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

Abdelhakeam, A.A.; Graham, E.F; Vázquez, I.A., Chaloner, K.M., 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology* 28: 43 - 49.

Alvarez, JG, Storey, BT, 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerol and other polyols as sole cryoprotectants. *J. of Andrology*, 14 (3): 199 - 209.

Amann, RP; Pickett, BW, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7 (3): 145 - 173.

Coulter, GH, 1992. Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*, 38: 197 - 207.

Drobnis, EZ; Crowe, LM; Berger, T; Anchordoguy, TJ; Overstreet, JW; Crowe, JH, 1993. Cold shock damage is due to lipid transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The J. Experimental Zoology*, 265: 432 - 437.

Friedler, S.; Giúdice, L.C.; Lamb, E. J., 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.* 49: 743 - 764.

Hammerstedt, RH; Graham, JK; Nolan, JP, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11 (1): 73 - 88.

Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and non- equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys*, 17: 53 - 92.

Parks, JE; Lynch, DV, 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29: 255 - 266.

Saacke, RG, 1982. ¿Qué ocurre cuando un espermatozoide es congelado y descongelado? *Procc. 9th Technical conf. on AI, NAAB*, pp 6-11.

Trounson, AO; Shaw, JM, 1992. Embryo cryopreservation. *Reprod. Med. Review*, 1: 179 - 188.

Cryobiology. 1997 Sep;35(2):93-105.

Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing.

Woelders H, Matthijs A, Engel B.

Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), Lelystad, NL-8200 AB, The Netherlands.
h.woelders@id.dlo.nl

The influence of the presence of trehalose or sucrose, the osmolality of the freezing medium, and the cooling rate on success of cryopreservation of bull sperm were investigated. Bull semen was frozen at four different cooling rates varying from 40 to 300 degrees C/min in standard Tris-egg yolk medium and in hypertonic or isotonic media containing 0.2 M trehalose or sucrose. Sperm motility, H33258 exclusion, and acrosome morphology were evaluated. In the hypertonic media the motility was almost completely inhibited, but could partly be restored by returning to isotonic conditions. Medium composition and cooling rate had significant effects, with a strong interaction of medium x cooling rate. The optimal cooling rate was found to be between 76 and 140 degrees C/min. At the highest cooling rate, both the presence of the sugars and the high osmolality of the hypertonic media conferred significant protection against fast-cooling damage, sucrose being significantly better than trehalose. At all other cooling rates the medium differences were less pronounced, but the isotonic sugar media were generally superior to standard medium as to preservation of acrosome intactness and H33258 exclusion. This indicates that the isotonic sugar media could enable some improvement of cryopreservation of bull semen over the currently used Tris-egg yolk medium. Further improvement of sperm survival at the AI station should be possible by implementation of controlled rate freezing, using a cooling rate in the optimal range between 76 and 140 degrees C/min.

Cryobiology. 1988 Apr;25(2):131-42.

Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa.

Watson PF, Duncan AE.

Department of Physiology, Royal Veterinary College, London, United Kingdom.

Ram spermatozoa were subjected to a slow rate of freezing (1 degree C/min) in various glycerol-NaCl-water solutions of known composition such that the molal concentration of NaCl (ms) and the unfrozen fraction of water (U) could be calculated at subzero temperatures from the relevant phase diagram. Sperm motility was reduced as ms increased and U correspondingly decreased with temperature. However, by freezing spermatozoa in solutions of differing initial tonicities, but with a constant weight ratio of glycerol: salt, to various subzero temperatures, the effects of ms could be separated from those of U. Motility was found to decrease dramatically at values of U less than 0.07 regardless of ms but, at higher values of U, maximum motility was dependent on the final salt concentration in that fraction, being reduced as the osmolality increased. Sperm cell concentration had no apparent effect on the influence of ms or U on viability in the range studied ($3-12 \times 10^8$ spermatozoa/ml). In order to account for these observations, the effects of osmotic stress on spermatozoa were investigated. When subjected to sudden changes in osmolality of the suspending medium by increasing NaCl or sucrose concentration at room temperature, spermatozoa showed a decreased motility with increasing osmolality. Since no improvement in motility was found on returning the cells to isosmolar conditions cell damage appeared to be irreversible. Furthermore, when placed in solutions of increasing hypotonicity the number of swollen spermatozoa with looped tails increased with increasing hypotonicity. Since the drop in motility seen at low values of U corresponded to those spermatozoa exposed to a hypotonic starting solution, it is suggested that a hypotonic stress followed by a hypertonic stress during freezing and thawing may account for the profound loss of motility in these samples, while a hypertonic stress may account for the strong effect of ms seen at higher values of U.

Reprod Fertil Dev. 1995;7(4):871-91.

Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.

Watson PF.

Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London, UK.

New research on the cooling and cryopreservation of mammalian spermatozoa is reviewed in the context of the older literature. Cryoinjury to a variety of cell organelles is regarded as being due to the two major stresses of cryopreservation, i.e., the change in temperature, and the formation and dissolution of ice and its consequences. Since the cryopreservation process involves departure of the cells from and return to body temperature, both cold shock and warm shock are included as potential stresses to be considered, as well as the stages involving cooling below the freezing point of the medium. The causes of cryoinjury are reconsidered and new concepts concerning the influence of osmotic stress are presented. Heterogeneity of the sperm population is discussed in the context of the success with which spermatozoa can be cryopreserved between and within ejaculates and individuals. The functional state of frozen and thawed spermatozoa is examined on the basis of published results of structural and functional tests of sperm competence. The hypothesis is advanced that cryopreserved mammalian spermatozoa are in a state resembling capacitation, which accounts for their relatively reduced longevity and their readiness to undergo egg penetration without incubation. The importance of this to the utilization of cryopreserved spermatozoa is examined, and proposals are made for new avenues of research to overcome these problems.

Cryobiology. 1997 Jun;34(4):348-62.

Solidification Processes of Solutions

Viskanta R, Bianchi MVA, Critser JK, Gao D.

School of Mechanical Engineering, Purdue University, W. Lafayette, Indiana, 47907-1288, U.S.A.

Recent progress in modeling pure liquid and dendritic alloy solidification is reviewed to lay the groundwork for freezing of solutions relevant to cryopreservation of biological materials. The classical Stefan problem of freezing/melting a pure substance is discussed first to introduce some of the fundamental concepts, and then the framework for modeling the freezing of solutions is reviewed. The formalism is extended to the freezing of a solution-saturated porous media. As an application of the methodologies developed by engineers, freezing of a sodium chloride solution in a flat bag is simulated, and then using the temperature and salt concentration data calculated the kinetics of water loss from a model cell is predicted.

Pharm Res. 1997 May;14(5):578-90.

Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions.

Miller DP, de Pablo JJ, Corti H.

Department of Chemical Engineering, University of Wisconsin-Madison 53706, USA.

PURPOSE: To address the lack of fundamental thermophysical data for trehalose and its aqueous systems by measuring equilibrium and non-equilibrium properties of such systems. **METHODS/RESULTS:** Differential scanning calorimetry (DSC) and dynamic mechanical analysis were used to measure glass transition temperatures of trehalose and its solutions. X-ray diffractometry was used to verify the structure of amorphous trehalose. Controlled-stress rheometry was used to measure viscosity of several aqueous trehalose systems at ambient and sub-ambient temperatures. Over this temperature range, the density of these solutions was also measured with a vibrating tube densimeter. The equilibrium phase diagram of aqueous trehalose was determined by measuring the solubility and freezing point depression. **CONCLUSIONS:** Our solubility measurements, which have allowed long times for attainment of chemical equilibrium, are substantially different from those reported earlier that used different techniques. Our measurements of the glass transition temperature of trehalose are higher than reported values. A simple model for the glass transition is presented to describe our experimental observations.

Am J Physiol. 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.

Freezing of living cells: mechanisms and implications.

Mazur P.

Cells can endure storage at low temperatures such as -196 degrees C for centuries. The challenge is to determine how they can survive both the cooling to such temperatures and the subsequent return to physiological conditions. A major factor is whether they freeze intracellularly. They do so if cooling is too rapid, because with rapid cooling insufficient cell water is removed osmotically to eliminate supercooling. Equations have been developed that describe the kinetics of this water loss and permit one to predict the likelihood of intracellular freezing as a function of cooling rate. Such predictions agree well with observations. Although the avoidance of intracellular freezing is usually necessary for survival, it is not sufficient. Slow freezing itself can be injurious. As ice forms outside the cell, the residual unfrozen medium forms channels of decreasing size and increasing solute concentration. The cells lie in the channels and shrink in osmotic response to the rising solute concentration. Prior theories have ascribed slow freezing injury to the concentration of solutes or the cell shrinkage. Recent experiments, however, indicate that the damage is due more to the decrease in the size of the unfrozen channels. This new view of the mechanism of slow freezing injury ought to facilitate the development of procedures for the preservation of complex assemblages of cells of biological, medical, and agricultural significance.

Biol Reprod. 1998 Jan;58(1):28-36.

Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation.

Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK.

Cryobiology Research Institute and Department of Veterinary Clinical Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, USA.

The osmotic tolerance limits for boar spermatozoa were determined at 22 degrees C. These cells can swell to within 1.02 times and shrink to within 0.97 times their isosmotic volume and maintain > 70% motility. In the presence of an extender, cells can swell to within 1.1 times and shrink to within 0.97 times their isosmotic volume and maintain > 70% motility. Plasma membrane permeability coefficients were determined in the presence of 1 M dimethyl sulfoxide (DMSO), 1 M glycerol, and 2 M ethylene glycol (EG) at 22 degrees C. Hydraulic conductivity (L_p) was estimated to be 0.120 ± 0.016 (mean $\pm$ SEM), 0.138 ± 0.006 , and 0.204 ± 0.021 microm/min/atm in the presence of DMSO, glycerol, and EG, respectively, at 22 degrees C. Solute permeability ($P[CPA]$) was determined to be 0.930 ± 0.118 , 0.481 ± 0.045 , and $1.98 \pm 0.106 \times 10^{-3}$ cm/min, for DMSO, glycerol, and EG, respectively. Subsequent experiments were performed at 8 degrees C and 0 degrees C. Activation energies were calculated for L_p in the presence of glycerol and EG to be 7.20 and 11.51 Kcal/mol, respectively. The activation energies for $P[CPA]$ were 4.06 and 7.48 Kcal/mol for glycerol and EG permeability, respectively. These membrane characteristics were used to calculate volume flux during addition and removal of cryoprotectant agents as well as during cooling and warming. In addition, the potential for intracellular ice formation during cooling and warming was calculated.

J Reprod Fertil. 1996 May;107(1):87-95.

Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation.

Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK.

Cryobiology Research Institute, Methodist Hospital of Indiana, Inc., Indianapolis 46202, USA.

A series of six experiments was conducted to determine the fundamental cryobiological properties of boar spermatozoa to develop optimal approaches for cryopreserving this important cell type. In the first experiments, boar spermatozoa samples were diluted in various osmolalities of experimental solutions (185-900 mOsmol kg⁻¹) to provide hypo-, iso-, and hyperosmotic conditions. Equilibrium cell volumes (Expts 1 and 2) were measured after exposure for 3 min and the change in cell volume was measured over time using an electronic particle counter (Expt 3). The isosmotic cell volume was found to be 26.3 ± 0.39 microns (mean $\pm$ SEM; $n = 5$). Over this range of osmolalities, boar spermatozoa behaved as linear osmometers (a linear volume versus $1/\text{osm}$ plot, $r^2 = 0.99$) with an osmotically inactive cell fraction of $67.4 \pm 4.5\%$. The rate of water permeability (L_p) was determined to be 1.03 ± 0.05 microns min⁻¹ atm⁻¹, which was consistent within and among donors ($P > 0.130$). A second series of experiments was performed to determine the effect of temperature and osmolality on boar sperm motility (Expt 4), and the effect of osmolality on the integrity of the sperm plasma membrane and its temperature dependence. Plasma membrane integrity was measured before and after boar spermatozoa were returned to an isosmolality (Expt 6). Motility was not affected at 30 degrees C, relative to that at room temperature, but was significantly decreased ($P < 0.05$) at 8 degrees C and 0 degree C (yielding a relative reduction to 85% and 35% of original motility, respectively; $n = 6$). Sperm motility was not significantly decreased ($P > 0.05$) until the osmolality reached 210 mOsmol kg⁻¹, at which time motility began to decrease from 95% to 10% of the original value at 90 mOsmol kg⁻¹. The integrity of the plasma membrane of boar spermatozoa was found to be dependent on temperature, donor and osmolality, decreasing significantly ($P < 0.05$) below room temperature, and below 185 mOsmol kg⁻¹ ($P < 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.10$) in the integrity of the plasma membrane of the samples before and after returning to 290 mOsmol kg⁻¹, indicating that osmotic damage occurs during the initial change from isosmotic to hypotonic media. These osmotic characteristics could be used to determine optimal conditions for cryopreservation of boar spermatozoa.

Biol Reprod. 1995 Nov;53(5):985-95.

Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa.

Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK.

Cryobiology Research Institute, Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis 46206-1367, USA.

Osmotic permeability characteristics and the effects of cryoprotectants are important determinants of recovery and function of spermatozoa after cryopreservation. The primary purpose of this study was to determine the osmotic permeability parameters of human spermatozoa in the presence of cryoprotectants. A series of experiments was done to: 1) validate the use of an electronic particle counter for determining both static and kinetic changes in sperm cell volume; 2) determine the permeability of the cells to various cryoprotectants; and 3) test the hypothesis that human sperm water permeability is affected by the presence of cryoprotectant solutes. The isosmotic volume of human sperm was 28.2 ± 0.2 microns³ (mean $\pm$ SEM), 29.0 ± 0.3 microns³, and 28.2 ± 0.4 microns³ at 22, 11, and 0 degrees C, respectively, measured at 285 mOsm/kg via an electronic particle counter. The osmotically inactive fraction of human sperm was determined from Boyle van't Hoff (BVH) plots of samples exposed to four different osmolalities (900, 600, 285, and 145 mOsm/kg). Over this range, cells behaved as linear osmometers with osmotically inactive cell percentages at 22, 11, and 0 degrees C of $50 \pm 1\%$, $41 \pm 2\%$, and $52 \pm 3\%$, respectively. Permeability of human sperm to water was determined from the kinetics of volume change in a hyposmotic solution (145 mOsm/kg) at the three experimental temperatures. The hydraulic conductivity (L_p) was 1.84 ± 0.06 microns.min⁻¹.atm⁻¹, 1.45 ± 0.04 microns.min⁻¹.atm⁻¹, and 1.14 ± 0.07 microns.min⁻¹.atm⁻¹ at 22, 11, and 0 degrees C, respectively, yielding an Arrhenius activation energy (E_a) of 3.48 kcal/mol. These biophysical characteristics of human spermatozoa are consistent with findings in previous reports, validating the use of an electronic particle counter for determining osmotic permeability parameters of human sperm. This validated system was then used to investigate the permeability of human sperm to four different cryoprotectant solutes, i.e., glycerol (Gly), dimethylsulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), and ethylene glycol (EG), and their effects on water permeability. A preloaded, osmotically equilibrated cell suspension was returned to an isosmotic medium while cell volume was measured over time. A Kedem-Katchalsky model was used to determine the permeability of the cells to each solute and the resulting water permeability. The permeabilities of human sperm at 22 degrees C to Gly, DMSO, PG, and EG were $2.07 \pm 0.13 \times 10^{-3}$ cm/min, $0.80 \pm 0.02 \times 10^{-3}$ cm/min, $2.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$ cm/min, and $7.94 \pm 0.67 \times 10^{-3}$ cm/min, respectively. The resulting L_p values at 22 degrees C were reduced to 0.77 ± 0.08 micron.min⁻¹.atm⁻¹, 0.84 ± 0.07 micron.min⁻¹.atm⁻¹, 1.23 ± 0.09 microns.min⁻¹.atm⁻¹, and 0.74 ± 0.06 micron.min⁻¹.atm⁻¹, respectively. These data support the hypothesis that low-molecular-weight, nonionic cryoprotectant solutes affect (decrease) human sperm water permeability.

Hum Reprod. 1995 May;10(5):1109-22.

Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol.

Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK.

Cryobiology Research Institute, Methodist Hospital of Indiana, Indianapolis 46202, USA.

Use of a cryoprotective agent is indispensable to prevent injury to human spermatozoa during the cryopreservation process. However, addition of cryoprotective agents to spermatozoa before cooling and their removal after warming may create severe osmotic stress for the cells, resulting in injury. The objective of this study was to test the hypothesis that the degree (or magnitude) of human sperm volume excursion can be used as an independent indicator to evaluate and predict possible osmotic injury to spermatozoa during the addition and removal of cryoprotective agents. Glycerol was used as a model cryoprotective agent in the present study. To test this hypothesis, first the tolerance limits of spermatozoa to swelling in hypo-osmotic solutions (iso-osmotic medium diluted with water) and to shrinkage in hyperosmotic solutions (iso-osmotic medium with sucrose) were determined. Sperm plasma membrane integrity was measured by fluorescent staining, and sperm motility was assessed by computer-assisted semen analysis before, during and after the anisosmotic exposure. The result indicate firstly that motility was much more sensitive to anisosmotic conditions than membrane integrity, and secondly that motility was substantially more sensitive to hypotonic than to hypertonic conditions. Based on the experimental data, osmotic injury as a function of sperm volume excursion (swelling or shrinking) was determined. The second step, using these sperm volume excursion limits and previously measured glycerol and water permeability coefficients of human spermatozoa, was to predict, by computer simulation, the cell osmotic injury caused by different procedures for the addition and removal of glycerol. The predicted sperm injury was confirmed by experiment. Based on this study, an analytical methodology has been developed for predicting optimal protocols to reduce osmotic injury associated with the addition and removal of hypertonic concentrations of glycerol in human spermatozoa.

J Biochem Biophys Methods. 1994 Dec;29(3-4):217-35.

Correction for solute/solvent interaction extends accurate freezing point depression theory to high concentration range.

Fullerton GD, Keener CR, Cameron IL.

Department of Radiology, University of Texas HSCSA, San Antonio 78284.

The authors describe empirical corrections to ideally dilute expressions for freezing point depression of aqueous solutions to arrive at new expressions accurate up to three molal concentration. The method assumes non-ideality is due primarily to solute/solvent interactions such that the correct free water mass M_{wc} is the mass of water in solution M_w minus $I \cdot M(s)$ where $M(s)$ is the mass of solute and I an empirical solute/solvent interaction coefficient. The interaction coefficient is easily derived from the constant in the linear regression fit to the experimental plot of $M_w/M(s)$ as a function of $1/\Delta T$ (inverse freezing point depression). The I -value, when substituted into the new thermodynamic expressions derived from the assumption of equivalent activity of water in solution and ice, provides accurate predictions of freezing point depression (± 0.05 degrees C) up to 2.5 molal concentration for all the test molecules evaluated; glucose, sucrose, glycerol and ethylene glycol. The concentration limit is the approximate monolayer water coverage limit for the solutes which suggests that direct solute/solute interactions are negligible below this limit. This is contrary to the view of many authors due to the common practice of including hydration forces (a soft potential added to the hard core atomic potential) in the interaction potential between solute particles. When this is recognized the two viewpoints are in fundamental agreement.

Cryobiology. 1987 Jun;24(3):196-213.

Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions.

Fahy GM, Levy DI, Ali SE.

Vitrification solutions are aqueous cryoprotectant solutions which do not freeze when cooled at moderate rates to very low temperatures. Vitrification solutions have been used with great success for the cryopreservation of some biological systems but have been less successful or unsuccessful with other systems, and more fundamental knowledge about vitrification solutions is required. The purpose of the present survey is to show that a general understanding of the physical behavior and biological effects of vitrification solutions, as well as an understanding of the conditions under which vitrification solutions are required, is gradually emerging. Detailed nonequilibrium phase diagram information in combination with specific information on the tolerance of biological systems to ice and to cryoprotectant at subzero temperatures provides a quantitative theoretical basis for choosing between vitrification and freezing. The vitrification behavior of mixtures of cryoprotective agents during cooling is predictable from the behavior of the individual agents, and the behavior of individual agents is gradually becoming predictable from the details of their molecular structures. Progress is continuing concerning the elucidation of mechanisms and cellular sites of toxicity and mechanisms for the reduction of toxicity. Finally, important new information is rapidly emerging concerning the crystallization of previously vitrified cryoprotectant solutions during warming. It appears that vitrification tendency, toxicity, and devitrification all depend on subtle variations in the organization of water around dissolved substances.

Andrologia. 1995 May-Jun;27(3):175-84.

Embedding resin space, water contents and chromatin compaction in rabbit sperm nuclei: electron microscopic X-ray spectrophotometry of a brominated probe.

Ekwall H, Ploen L, Courtens JL.

Swedish University of Agriculture, Department of Anatomy and Histology, Uppsala.

EPON labelled with bromide was used to embed ejaculated rabbit spermatozoa, with the hypothesis that it replaces cell water. X-Ray spectrophotometric microanalysis of sperm nuclei, of egg yolk (an internal standard containing roughly 50% water) and of surrounding embedding resin, revealed that a part of the bromide was bound to the biological components. These latter were saturated when bromide was added in higher concentrations, and the increase in measured bromide could be used to calculate absolute resin contents in sperm nuclei which gives a mean value of 22.62%. Most nuclei (60.80%) were well condensed and displayed a mean resin space close to 17% of the total nuclear volume. The less condensed nuclei had a mean resin space close to 28%. The use of an internal standard revealed that calculated values were underestimated by 4%.

The presence of water channel proteins in ram and human sperm membranes.

Curry MR, Millar JD, Watson PF.

Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London, UK.

Ram and human spermatozoa have a high coefficient of osmotic water permeability (Pf) with a low activation energy (Ea), suggesting the presence of water channels within their plasma membranes. Sperm membranes were examined for the presence of two known water channel proteins, CHIP28 and glucose transporters belonging to the GLUT family of proteins. The water permeability of ram spermatozoa was not inhibited by mercuric chloride to which the CHIP28 channel is sensitive. The CHIP28 protein was not located in western blots of ram sperm membrane preparations that used an anti-CHIP28 antibody. The water permeability of ram and human spermatozoa was inhibited in the presence of phloretin, an inhibitor of glucose transport. Rabbit spermatozoa, which have a low Pf and a high Ea value, suggesting a non-porous membrane, were unaffected by phloretin. These results indicate that the erythrocyte and proximal tubule water channel, CHIP28, is not present in sperm membranes but that sperm membrane glucose transporters may have a secondary water channel function.

Biol Reprod. 1994 Nov;51(5):1014-21.

Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations.

Curry MR, Millar JD, Watson PF.

Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, London, United Kingdom.

The permeability coefficient to water (L_p) and its associated activation energy (E_a) were measured for ram (8.47 microns/min/atm at 25 degrees C, 1.06 kcal/mol) and human (2.89 microns/min/atm at 30 degrees C, 1.93 kcal/mol) spermatozoa. By use of these figures, predictive water loss curves were calculated, from published equations, for different cooling rates from 100 degrees C/min to 100,000 degrees C/min. The calculated curves show that ram spermatozoa cooled at even the fastest rate would be in osmotic equilibrium by -20 degrees C, and human spermatozoa cooled at rates up to 10,000 degrees C/min would be in equilibrium by -15 degrees C. If the nucleation temperature for spermatozoa is taken to be between -20 degrees C and -30 degrees C, then ram and human spermatozoa cooled at these rates would apparently not exhibit any intracellular freezing. There is a significant discrepancy between these calculated optimal cooling rates and the published empirically derived optimal rates of 50 degrees C/min for ram and 10 degrees C/min for human. The failure of ram and human spermatozoa to conform with the established and previously successful model for prediction of optimal cooling rates suggests that damage sustained at high cooling rates may be unrelated to intracellular ice formation.

Mol Reprod Dev. 1989;1(4):264-77.

Nucleus of the boar spermatozoon: structure and modifications in frozen, frozen-thawed, or sodium dodecyl sulfate-treated cells.

Courtens JL, Paquignon M, Blaise F, Ekwall H, Ploen L.

I.N.R.A., Monnaie, France.

After cryosubstitution and Epon embedding, or after Nanoplast embedding and very thin sectioning, the chromatin of ejaculated or diluted boar spermatozoa appears to be formed of DNA fibers embedded in a quite homogeneous matrix. After sodium dodecyl sulfate (SDS) treatment, and to a lesser extent after freeze-thawing, the DNA fibers are present mostly between cords, probably proteinaceous in nature. The quantity of free sulfhydryl (SH) groups, as calculated from staining by DACM and flow fluorometry, is increased in thawed or SDS-treated cells. The quantity of NH₂ groups, calculated from electron microscopy image analysis of alcoholic phosphotungstic acid-stained cells, is decreased in thawed nuclei. The DNA is more accessible to the fluorochrome ethidium bromide after freeze-thawing, and its sensitivity to HCl hydrolysis is modified, during the Feulgen-like staining procedure using acriflavine. The X-ray energy dispersive analysis of cryosections of nuclei indicates that the slight separation of DNA and nucleoproteins in freeze-thawed spermatozoa could result from a dramatic modification of the nuclear ionic environment during thawing.

J Reprod Fertil. 1989 Nov;87(2):613-26.

Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing.

Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Ploen L.

I.N.R.A., Nouzilly, Monnaie, France.

Boar semen was analysed by electron microscopy coupled to image analysis and X-ray energy dispersive spectroscopy, during the usual process for freezing and thawing in field conditions. Freeze-substitution and freeze-quenching permitted recording of real or potential intracellular ice before, during, and after freezing. Heads and flagella displayed two different osmotic properties before freezing. Heads were dehydrated progressively before and during freezing, while flagella were hydrated before freezing and were only dehydrated during freezing. All parts of the thawed cells were rehydrated. Ice crystal damage was mostly present in frozen mitochondria and axonemes and the acrosomes were strongly affected by thawing. The total amounts of Na, Cl, Ca, K, Mg, and Zn per cell were only elevated in frozen and thawed midpieces while the heads were permeable both to water and elements at that time.

J Reprod Fertil. 1975 Feb;42(2):277-85.

Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen.

Colas G.

The influence of temperature, addition of glycerol, initial freezing temperature, method of dilution, level of glycerol in the diluted semen, equilibration time and type of diluent on the survival and fertilizing capacity of deep-frozen according to the best conditions was compared with that of "fresh" semen. The addition of glycerol at plus 30 degrees C resulted in a highly significant decrease in the mean proportion of motile spermatozoa immediately after thawing compared with the effect of addition at plus 4 degrees C. The immersion of the straws at minus 55 degrees C significantly reduced the revival of the spermatozoa compared with initial freezing at lower temperatures. The exposure time to glycerol had no significant effect on the survival of spermatozoa after thawing and incubation, but fertility was significantly higher with 4% than with 2% glycerol. The I. N. R. A. diluent provided better sperm survival and a significantly higher conception rate than did lactose-egg yolk extender. The semen frozen according to the best conditions (about 50% of the samples) had a fertilizing ability similar to that of "fresh" semen when the proportion of motile spermatozoa before, and after 1 or 3 hr of incubation was equal to or above 45, 40 and 30% respectively.

Acta Vet Scand. 1991;32(4):463-71.

Cryopreservation of boar semen. III: Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing.

Bwanga CO, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H.

Department of Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Ejaculated boar spermatozoa subjected to a conventional freezing and thawing process, were ultra-rapidly fixed, freeze-substituted and examined by electron microscopy to monitor the presence of real or potential intracellular ice and the degree of cell protection attained with the different extenders used during the process. Numerous ice crystal marks representing the degree of hydration of the cells were located in the perinuclear space of those spermatozoa not in proper contact with the extender containing glycerol (i.e. prior to freezing). The spermatozoa which were in proper contact with the extenders presented a high degree of preservation of the acrosomes, plasma membranes as well as the nuclear envelopes. No ice marks were detected in acrosomes before thawing, indicating that the conventional assayed cryopreservation method provided a good protection against cryoinjury. The presence of acrosomal changes (internal vesiculization, hydration and swelling) in thawed samples however, raises serious questions about the thawing procedure employed.

Zentralbl Veterinarmed A. 1990 Oct;37(9):651-8.

Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws.

Bwanga CO, de Braganca MM, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H.

Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Split ejaculates from four boars were frozen with a programmable freezing machine, in mini- (0.25 ml) and maxi- (5 ml) plastic straws with an extender at either acidic (6.3) or alkaline (7.4) pH. Glycerol (3%) was used as cryoprotectant. The freezing of the semen was monitored by way of thermocouples placed in the straws. Post-thaw motility and acrosome integrity were evaluated; the latter using phase contrast microscopy, eosin-nigrosin stain and electron microscopy. Post-thaw sperm motility was significantly higher when semen was frozen in mini-straws than in maxi-straws. For the mini-straws, the motility was better when semen was exposed to an acidic environment during freezing, but this beneficial effect of the low extracellular pH was not evident when maxi-straws were thawed. The motility of the spermatozoa diminished significantly during the thermoresistance test (0 h and 2 h time) at 37 degrees C in a similar way for both straws and extracellular pH's. The freezing procedure, no matter the extracellular pH, did not cause major acrosomal damages, but significantly more normal apical ridges were present in the mini-straws than in the maxi-straws. This in vitro evaluation indicated that the freezing method employed was better for mini- than for maxi-straws since the freezing of the 5 ml volumes was not homogeneous, due to the large section area between the surface and the core of the straw.

Cryobiology. 1986 Feb;23(1):88-102.

Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions.

Boutron P.

The glass-forming tendency and stability of the wholly amorphous state of various cryoprotective solutions has been studied in recent years (5-10, 20). A lot of experimental data including heats of ice crystallization at various cooling rates and devitrification temperatures have been given. In this article these data have been compared with analytical expressions using a semiempirical model. The theoretical variation of the total quantity of ice crystallized with the cooling rate fits very well with the experimental data, adjusting only one parameter. Using the same model, theoretical differential scanning calorimeter (DSC) crystallization peaks have been obtained for cooling or rewarming. The general shape, height, and width of the theoretical peaks are very similar to those of the experimental peaks. The differences are comparable to the random variations of the experimental peaks from one experiment to another. The analytical expressions obtained here could be used to study the relationship between the kinetics of ice crystallization and cell damage when ice crystallizes incompletely inside or outside the cells. These expressions have been applied to ice crystallization for applications in cryobiology. But they could also probably be used in other fields of research such as crystallization from silicates or other mineral or organic glasses.

Hum Reprod. 1995 Nov;10(11):3004-11.

Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation.

Massip A, Mermillod P, Dinnyes A.

Universite Catholique de Louvain. Unite des Sciences Veterinaires, Louvain-la-Neuve, Belgium.

Examination of some ultrastructural and physiological characteristics of in-vitro produced bovine embryos may help to explain why such embryos are more sensitive to freezing than their in-vivo derived counterparts. Improvement of embryo survival after freezing can be achieved by changing the conditions of their culture, selection of embryos based on the kinetics of their development, and changing "standard" freezing procedures. Cryopreservation of embryos by vitrification, in particular, seems to yield higher survival than conventional slow freezing. Further development of protocols requires additional embryo transfer studies to ensure that the ability of thawed embryos to develop normally in vivo correlates strongly with in-vitro survival assays.

Reprod Domest Anim. 2001 Apr;36(2):49-55.

Cryopreservation of embryos of farm animals.

Massip A.

Universite catholique de Louvain, Unite des Sciences veterinaires, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium. massipavete.ucl.ac.be

This review contains two parts. The first part is devoted to the significant steps in cryopreservation of mammalian embryos with emphasis on cattle and sheep that serve as models of reference. These steps are: (1) shortening of cooling and warming processes; (2) addition and dilution of cryoprotectant in one step; (3) introduction of plastic straw as a freezing and dilution container; (4) the choice of ethylene glycol as the quite universal cryoprotectant because of its low toxicity and high permeability; (5) vitrification, a cryopreservation method which enable passage from the liquid to the solid state by extreme elevation of viscosity due to high concentration of cryoprotectants and very rapid cooling. There are several vitrification solutions which contain dimethyl sulphoxide, glycerol, ethylene glycol, or a mixture of them, as basic cryoprotectants. The second part considers some factors affecting the efficiency of cryopreservation concerning (i) the origin of embryos and (ii) the stage of development and species. The origin of embryos (in vivo versus in vitro): in vitro embryos show a chilling and freezing sensitivity associated with their lipid content which can be modified by the culture conditions. Both conventional freezing and vitrification have been used and it seems that vitrification is more adapted to in vitro embryos when some modifications of initial protocols are carried out, particularly the rate of cooling. Thus considerable progress has been achieved by using the open pulled straw method of Vajta which enables the use of a minimum volume of freezing medium (0.5 microl) and a very high cooling rate that permits rapid traversal of the damaging temperature zone, corresponding to chilling sensitivity. The stage of development and species: not only are there differences between species at the same stage of development but in the same species all stages of development do not survive equally under the same freezing protocol. In cattle for example, oocytes and early stages of development in vivo or in vitro do not survive whereas compacted morulae and blastocysts survive very well. In the pig hatched blastocysts survive better than the other stages. Horse embryos have special characteristics that pose problems for successful freezing. In conclusion, a lot of work remains to be done to define fundamental characteristics of embryos of certain species (pig, horse) and of embryos of some stages or of oocytes.

Reproduction. 2002 Feb;123(2):185-202.

The earliest stages of folliculogenesis in vitro.

Smitz JE, Cortvrindt RG.

Follicle Biology Laboratory, Vrije Universiteit Brussel, Laarbeeklaan 101, B-1090 Brussels, Belgium. Johan.Smitz@az.vub.ac.be

In recent years several follicle culture systems have been pioneered in different mammalian species for studying ovarian folliculogenesis and culturing immature oocytes. Applications of these in vitro techniques include fertility preservation for humans, conservation of rare animals and development of oocyte banks for research purposes. Immature female gametes in the ovarian cortex can be cryopreserved for later use if culture techniques are available afterwards to promote growth and maturation. This review focuses on biochemical and biophysical factors related to oocyte culture in mice, the only animal in which live offspring have been produced after folliculogenesis in vitro. The advantage of using mice for these studies is that, in parallel to development of follicle culture systems, essential knowledge on folliculogenesis can be obtained from knockout mouse models. Recent experiments in mice stressed the principal role of the oocyte in follicle development and the strict timing of the biological processes underlying oogenesis in vitro. In large domestic animals and humans, study of oocyte culture is confounded by the constitutively prolonged nature of ovarian follicle development. In humans, only some aspects of follicle development have been studied because of the limited availability of suitable material for experimentation, technical difficulties related to manipulation of very small structures and lack of knowledge on physiological regulation of the early stages of follicle growth. Only a few reports describe ovarian follicular growth in vitro. In this review, relevant information on hormonal and growth factor regulation of the earliest stages of follicle growth in mammals is reviewed. Techniques are becoming available for the precise isolation of distinct classes of follicle and powerful molecular biology techniques can be used in studies of ovarian tissue culture.

CRONOGRAMA CURSO CRIOPRESERVACION DE GAMETAS

Día 8/9/03:

10 a 11.45 hrs.: Dr. Cisale	Introducción. Nociones básicas de criopreservación de gametas. El espermatozoide y sus membranas. Lípidos de membrana.
11.45 a 12 hrs.:	Intervalo - Café.
12 a 14 hrs.: Dr. Cisale	Efecto de la crioprotección sobre las membranas espermáticas. Formas de conservación del semen
14 a 16 hrs.:	Almuerzo libre
16 a 17.45 hrs.: Lic. Fernández	Propiedades coligativas aplicadas a la criopreservación. Formación de hielo. Equilibrio de fases. Punto eutéctico. Tipos de cristalización dependiente de la velocidad de enfriamiento.
17.45 a 18 hrs.:	Intervalo - Café.
18 a 20 hrs.: Lic. Fernández	Curvas de enfriamiento. Curvas de enfriamiento controladas por computadora. Requerimientos experimentales.

Día 9/9/03:

10 a 11.45 hrs.: Lic. Fernández	Nociones de Termodinámica aplicada a la criopreservación. Conducción del calor. Choque térmico. Dilatación térmica.
11.45 a 12 hrs.:	Intervalo - Café.
12 a 14 hrs.: Dra. Fischman	Manipulación de ovocitos y embriones. Congelamiento de embriones producidos in vivo, in vitro y micromanipulados.
14 a 16 hrs.:	Almuerzo libre
16 a 17.45 hrs.: Dra. Fischman	Métodos de criopreservación de embriones, ventajas y desventajas de cada uno. Criopreservación de ovocitos y material ovárico.
17.45 a 18 hrs.:	Intervalo - Café.
18 a 20 hrs.: Dr. Cisale	Extracción de semen. Evaluación de la calidad seminal. Diferentes criterios. Valoración de un eyaculado. Selección de los tests de laboratorio. Métodos subjetivos y objetivos. Características físicas, concentración, morfología, vitalidad e integridad acrosómica.

Día 10/9/03:

10 a 12 hrs.: Dr. Cisale	Motilidad espermática. Tests funcionales. Su utilidad. Termoresistencia, "Swim-up", Moco Cervical, Endósmosis, etc. Pruebas de fertilización homólogas y heterólogas. Pruebas bioquímicas. Su utilidad.
12 a 13 hrs.:	Almuerzo libre
13 a 20 hrs.: Dra. Fischman	Práctico Vitricación de ovocitos.

Día 11/9/03:

10 a 11.45 hrs.: Dr. Cisale	Diseño teórico de diluyentes para semen refrigerado y congelado. Características fundamentales. Tipos de crioprotectores. Congelamiento de semen de especies de abasto. Aditivos seminales
11.45 a 12 hrs.:	Intervalo - Café.
12 a 14 hrs.: Lic. Ferrari	Organización del ADN en espermatozoides de mamíferos. Evaluación de la calidad de la cromatina espermática.
14 a 16 hrs.:	Almuerzo libre
16 a 17.45 hrs.: Lic. Ferrari	Efectos del congelamiento y descongelamiento sobre la cromatina del núcleo espermático.
17.45 a 18 hrs.:	Intervalo - Café.
18 a 20 hrs.: Lic. Spirito	Proteínas del ADN de la cabeza espermática.

Día 12/9/03:

8.30 a 13 hrs.: Lic. Ferrari – Lic Spirito	Práctico ADN espermático. Evaluación de la cromatina espermática a través de la coloración de Feulgen y la prueba de decondensación (NDC) -
13 a 15 hrs.:	almuerzo libre
15 a 16 hrs.: Dr. Cisale	Mejoramiento de la calidad seminal pre y post congelado. Mejoramiento de la calidad seminal por métodos hidrodinámicos. Su aplicación en producción y en la conservación de las especies. Resultados de su aplicación en diferentes especies.
16 a 17.45 hrs.: Ing. Mariano Etcheverry	Importación y Exportación de semen.
17.45 a 18 hrs.:	Intervalo - Café.
18 a 20 hrs.: Méd. Vet. Rivolta	Criopreservación de gametas de especies no tradicionales y/o en peligro de extinción. Su importancia. Características fundamentales. Criopreservación de gametos en muflones, jabalíes, camélidos sudamericanos y cérvidos. Conservación de gametos en animales de zoológico. Conservación de gametos en peces de interés comercial

Día 13/9/03:

9 a 17 hrs.: Dr. Cisale Dra. Fischman	Práctico: Congelamiento de semen en pajuelas. Valoración estándar de un eyaculado
---	---

PROTOCOLOS ADN

• Técnica de coloración con Azul de Anilina Ácida

Se realiza sobre extendidos de acuerdo con la técnica descripta por **Dadoune et al. 1988**.

- ♦ Fijar los extendidos de semen con glutaldehído al 3 % diluido en buffer fosfato salino, durante 30 minutos.
- ♦ Lavar tres veces con agua destilada por 10 minutos cada uno.
- ♦ Colorear con azul de anilina ácida al 5 % *in toto* durante 5 minutos.
- ♦ Lavar tres veces con agua destilada por 10 minutos cada uno. Secar al aire.

El resultado de coloración se expresó como:

$$\frac{\text{Número de espermatozoides con coloración intensa}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100 = \% \text{ esp. positivos}$$

♦ Preparación del colorante Azul de Anilina:

Azul de anilina 5% diluido en ácido acético al 4 % en agua destilada pH 3,5. Se ajusta con ácido clorhídrico o con hidróxido de sodio según el caso.

Buffer salino fosfato (PBS)

CaCl₂ · 2H₂O 0,132 g.

KCl 0,2 g.

KH₂PO₄ 0,2 g.

MgCl₂ · 6H₂O 0,1 g.

NaCl 8,0 g.

Na₂HPO₄ 1,15 g.

Agua destilada cantidad necesaria para un litro

• Reacción de Feulgen.

De acuerdo con la técnica descripta en **Ferrari et al. 1996**.

- ♦ Fijar los extendidos de semen en 3 partes de etanol absoluto y una parte de ácido acético glacial (3:1) durante 30 minutos.
- ♦ Lavar tres veces con agua destilada por diez minutos cada vez.
- ♦ Hidrólisis con ácido clorhídrico 5 Normal a temperatura ambiente (20~22°C) durante 40 minutos. Para cada tipo de material se debe realizar una curva de hidrólisis previa para obtener una hidrólisis óptima.
- ♦ Lavar tres veces con agua destilada por diez minutos cada uno.
- ♦ Coloración con reactivo de Schiff (pH = 2.2) durante una hora en frío (4°C) y en oscuridad.
- ♦ Lavar tres veces por 10 minutos cada uno con agua Sulfurosa en frío (4°C) y en oscuridad.

♦ Preparación del Colorante de Feulgen

0,7 gr. de Fucsina Básica

3,8 gr. de Metasulfito de sodio

200 ml de Acido Clorhídrico 0,15 Normal

1 gr. de Carbón activado (o más).

Se disuelve el Metabisulfito de sodio en ácido clorhídrico y luego se le agrega la Fucsina básica. Luego de 2 horas en agitador magnético y en oscuridad se le agrega carbón activado y se filtra. Si no está claro se agrega más carbón activado y se vuelve a filtrar. Guardar en heladera, en oscuridad, y en frasco color caramelo.

♦ Preparación del Agua Sulfurosa

180 ml de agua destilada

10 ml de Bisulfito de sodio (4°C)

10 ml Clorhídrico 1 Normal

El agua Sulfurosa se prepara inmediatamente antes de ser usada.

- **Coloración con Azul de Toluidina**

Se realiza sobre extendidos de semen de acuerdo con la técnica descrita en **Barrera et al, (1993)**.

- ♦ Fijar los extendidos de semen con metanol puro 1.5 minutos
- ♦ Coloración con Azul de Toluidina al 10 %, durante 15 minutos.
- ♦ Lavar con agua destilada sobre los portas con una piceta hasta que el agua resulta transparente.
- ♦ Secar al aire.

- ♦ **Preparación del colorante Azul de Toluidina**

Solución Stock:

0,4 gr. Azul de Toluidina (Mr 305,83) disueltos en 200 ml de agua destilada. Agregar 200 ml de Tolueno a la mezcla anterior y extraer en una ampolla de vidrio. La fase inferior se colecta descartándose la fase superior que contiene el tolueno y posibles contaminantes hidrofóbicos (tiazonas, rojos y violetas).

La extracción con Tolueno se repite tres veces. Se hace una cuarta extracción con Cloroformo.

El colorante preparado se guarda en un frasco color caramelo rotulado.

Solución de trabajo:

Una parte de solución stock se diluye en 9 partes de agua destilada.

La evaluación se hace en microscopio de inmersión (1000 aumentos), valorando un número de espermatozoides superior a 1000 en cada muestra. Los resultados se expresan con la siguiente fórmula:

Número de espermatozoides coloreados x 100 = % esp. positivos

Nº total de espermatozoides observados

- **Prueba de decondensación nuclear (NCD).**

Con algunas modificaciones a la técnica descrita por **Barrera et al, (1993)**.

- 100 µl de semen de concentración estandarizada se incuban en 100 µl de DTT al 1% (en agua destilada) a temperatura ambiente.
- Los tiempos de incubación dependen del material (en bovinos y cerdos se usan 2 y 11 minutos).
- La reacción se corta con glutaraldehído 2%.
- Los extendidos se hacen con 0,4 µl de la mezcla anterior en cada portaobjeto y se secan rápidamente con una corriente de aire a temperatura ambiente.
- Los extendidos se colorean con Azul de Toluidina y con la Reacción de Feulgen.
- Como control de la reacción se hace en un extremo del preparado un extendido con material no tratado con DTT.

Bibliografia

- Barrera C, Mazzolli AB, Pelling C, Stockert JC. *Metachromatic staining of human nuclei after reduction of disulfide bonds*. Acta Histochem Jena (1993) 94: 141-149.
- Ferrari MR, Spirito SE, Giuliano SM. *Feulgen reaction: its microspectrophotometric analysis in bovine spermatozoa*. Com Biol (1996) 14: 19-32
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato MI. *Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by Aniline blue and semen characteristics*. Andrologia (1988) 20(3): 211-217.

EVALUACION DE SEMEN FRESCO

- 1 - Usar portaobjetos entibiados y baño térmico a 35°C.
- 2 - Medir volumen del eyaculado, pH y observar color.
- 3 - Medir porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva:
 - a) Colocar una gota de diluyente y una mínima cantidad de semen.
 - b) Observar al microscopio con 100X (mínimo) y platina térmica.
 - c) Contar los espermatozoides con motilidad progresiva.
- 4 - Calcular la concentración espermática.
- 5 - Medir porcentaje de vivos y muertos: Tinción vital con Eosina - Nigrosina
- 6 - Observar integridad acrosómica: Contraste de fase
- 7 - Observar morfología normal y anomalías
- 8 - Realizar test hipoosmótico: HOS test

EVALUACION DE SEMEN DESCONGELADO

Pajuelas:

Enfriar la pinza

Sacar la pajuela del termo

Sumergirla en un baño térmico a 35°C durante 30 segundos.

Sacar y secar. Cortar las puntas y depositar en un tubo de hemólisis en el baño.

Pellets (pastillas):

Enfriar la cucharilla

Sacar la pastilla y sumergirla en un tubo con 0,2 ml de solución fisiológica o solución de citrato de sodio 2,92% en el baño térmico a 35°C hasta el descongelado

TINCION EOSINA - NIGROSINA

- Calentar portaobjeto a 37°C sobre placa.
- Colocar una gota de Eosina Y y una gota de Nigrosina.
- Colocar una gota de semen y mezclar.
- Aguardar 7-10 segundos y extender.
- Secar al aire.

Colorantes

- Solución 1% de Eosina Y en solución acuosa 2,92% de citrato de sodio.
 - Solución 10% de Nigrosina en solución acuosa 2,92% de citrato de sodio.
- Filtrar la solución por papel de filtro.

Los espermatozoides sin teñir presentan integridad de membrana.

Los espermatozoides teñidos de rojo no presentan integridad de membrana.

Solución de glutaraldehído para fijar las muestras

Cacodilato de Na 1,07 g en 50 cm³ de agua destilada. Se agrega 3,65 cm³ de HCl 1N y se completa a 200 cm³ con agua destilada. Se toman 194 cm³ de esta solución y se agregan 6 cm³ de glutaraldehído al 25%.

TINCIÓN EOSINA NIGROSINA (otra)

Sirve para distinguir espermatozoides vivos y muertos. Se puede montar y guardar.

Solución de Eosina - Nigrosina

10 g de Nigrosina hidrosoluble, 0,7 g de Eosina Y hidrosoluble, en buffer tartrato / fosfato / glucosa.

Buffer TPB (tartrate phosphate buffer). Almacenar a 5°C.

Para 100 ml

Na ₂ HPO ₄ anhidro	50 mM	0,71 g
KH ₂ PO ₄	25 mM	0,34 g
K, Na tartrate	77 mM	2,173 g

Stock de glucosa: 50 mM glucosa (0,9 g/100 ml)

Preparación de la solución Eosina - Nigrosina

- En un vaso de precipitado, disolver 10 g de Nigrosina en 60 ml de agua mediante ebullición.
- Filtrar a través de papel de filtro dentro de una probeta de 100 ml donde previamente se ha colocado 0,7 g de Eosina Y hidrosoluble.
- Poner 7,5 ml de solución 50 mM de glucosa en el vaso de precipitado, pasando a través del papel de filtro.
- Poner 7,5 ml de buffer TPB en el vaso de precipitado, pasando también a través del filtro (ambas soluciones pueden usarse así para "limpiar" el vaso donde originariamente teníamos la Nigrosina).
- Enjuagar el vaso con agua destilada y llevar a 100 ml.
- Conservar a 5°C.

Método de tinción

- Mezclar 5 μ l de semen y 10 μ l de colorante sobre porta a 37°C.
- Realizar frotis y secar rápidamente en platina a 37°C.

RECuento ESPERMÁTICO

Se usa pipeta para recuento de glóbulos rojos. Se carga el semen hasta la marca 1, luego se completa con la solución espermicida hasta la marca 101. Si la muestra seminal fuera muy concentrada se carga la pipeta hasta la marca 0,5. Para el recuento se usa la cámara de Neubauer. Se cuentan los espermatozoides de 80 cuadrados chicos.

El cálculo se realiza como:

Nº de esp. contados en 80 cuadrados x factor (*)
De esta forma se obtiene el Nº de espermatozoides/mm³

- (*) 10.000 si se carga la pipeta hasta la marca 1
20.000 si se carga la pipeta hasta la marca 0,5

HOS TEST

- Colocar 1 ml de solución hipoosmótica en un tubo y llevar a baño térmico a 37°C. Luego poner una gota del semen fresco.
- Esperar 10 minutos (cerdo) o 30 minutos (bovino - ovino). Contar 200 espermatozoides y obtener la relación espermatozoides "HOS positivos" sobre el total.

SOLUCION HIPOSMOTICA

Citrato de Sodio..... 490 mg
Fructosa..... 900 mg
H₂O destilada.....csp 100 ml

LAVADO DE BOLILLAS DE VIDRIO (en caso de querer usar en lugar de Sephadex)

- Utilizar Glass Beads (250-300 micras) Sigma NG 150 (tipo 4).
- Lavarlas en 6 volúmenes de HCl 0,1 N agitando durante 5 minutos
- Enjuagar con 6 volúmenes de agua destilada, agitando enérgicamente.
- Repetir el enjuague 8 veces.
- Secarlas en placa de Petri a 120-140°C durante 10 a 16 horas.

FORMOL SALINO

Na Cl 9 g
Formol 3 ml
Agua 1000 ml

SOLUCIÓN DE GLUTARALDEHIDO 8% (OTRA)

Glucosa Monohidratada 2,9 g
Citrato sódico 1 g
Bicarbonato sódico 0,2 g
Agua 100 ml

Quitar 8 ml y agregar 8 ml de glutaraldehido

DILUYENTE BASE TRIS (CERDO)

TRIS 2,422 g
Acido Cítrico 1,399 g
Fructosa 1 g
Glicina 1 g
Agua destilada 100 ml
Yema 10%

INFORME DE DIFUSIÓN PROGRAMA FORMACION PARA LA PARTICIPACION

1 Nombre de la propuesta :
CURSO DE CRIOPRESERVACION DE GAMETOS

1.1 Modalidad
CURSO CORTO

1.2 Lugar donde se llevo a cabo la formación
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNIVERSIDAD DE BUENOS
AIRES, CIUDAD DE BUENOS AIRES, REPUBLICA FEDERAL DE ARGENTINA

1.3 Rubro / Area temática de la actividad de formación
BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS/ CRIOPRESERVACION DE GAMETOS

1.4 Fecha en la que se efectuó la actividad de formación:
6 AL 14 DE SEPTIEMBRE 2003

1.5 Postulante
PAMELA POBLETE KRUMBACH

1.6 Entidad Responsable
CRIADERO LLAMAS DEL SUR S.A.

1.7 Coordinador

1.8 Identificación de los participantes de la propuesta

NOMBRE	RUT	TELEFONO FAX E-MAIL	DIRECCION POSTAL	ACTIVIDAD PRINCIPAL	FIRMA
PAMELA POBLETE KRUMBACH	13.659.018-9	245007	San Francisco 0989 TEMUCO	Desarrollo y perfeccionamiento de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos	
		pobletepamela @hotmail.com			

2. ACTIVIDADES DE TRASFERENCIA

2.1. Resumen actividades de transferencia PROPUESTAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
24 de Septiembre 2003	Charla en curso de inseminación artificial	Ayudar a los futuros inseminadores a comprender el proceso de manipulación y criopreservación de gametos	Sociedad de Fomento Agrícola y Ganadero (SOFO), Temuco	15 técnicos agrícolas y ordeñadores
Octubre 2003	Charla a alumnos de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco	Ampliar los conocimientos de los futuros profesionales en lo referido a técnicas de criopreservación de gametos	Universidad Católica de Temuco	15 alumnos de 4º año de Medicina Veterinaria
Noviembre 2003	Charla a criadores de camélidos sudamericanos	Complementar los conocimientos sobre reproducción de camélidos sudamericanos que tienen productores y médicos veterinarios que trabajan con estas especies	Sociedad de Fomento Agrícola y Ganadero (SOFO), Temuco	15-20 pequeños y medianos agricultores
Noviembre 2003	Publicación de artículo en revista SOFO	Difundir a los agricultores de la zona un resumen de conocimientos adquiridos en el curso para ayudarles a mantenerse al día en cuanto a las biotecnologías reproductivas usadas en la actualidad	Sociedad de fomento agrícola y ganadero de Temuco (SOFO)	

Noviembre 2003	Charla a alumnos de postgrado en reproducción de la Universidad Austral de Chile	Ampliar los conocimientos de médicos veterinarios que se especializan en reproducción animal, en el tema de la criopreservación de gametos sudamericanos	Universidad Austral de Chile	Nº por confirmar. Médicos veterinarios realizando su magister en reproducción animal.
----------------	--	--	------------------------------	---

2.1. Resumen actividades de transferencia REALIZADAS

FECHA	ACTIVIDAD	OBJETIVO	LUGAR	Nº y TIPO BENEFICIARIOS
24 de Septiembre 2003	Charla en curso de inseminación artificial	Ayudar a los futuros inseminadores a comprender el proceso de manipulación y criopreservación de gametos	Sociedad de Fomento Agrícola y Ganadero (SOFO), Temuco	15 técnicos agrícolas y ordeñadores
03 de Noviembre 2003	Charla a alumnos de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco	Ampliar los conocimientos de los futuros profesionales en lo referido a técnicas de criopreservación de gametos	Universidad Católica de Temuco	15 alumnos de 4º año de Medicina Veterinaria
21 de Noviembre 2003	Charla a criadores de camélidos sudamericanos	Complementar los conocimientos sobre reproducción de camélidos sudamericanos que tienen productores y médicos veterinarios que trabajan con estas especies	Arica	60 pequeños y medianos agricultores de los sectores de Putre y Visviri.

Diciembre 2003	Publicación de artículo en revista "Inter Campo" N° 60	Difundir a los agricultores de la zona un resumen de conocimientos adquiridos en el curso para ayudarles a mantenerse al día en cuanto a las biotecnologías reproductivas usadas en la actualidad	Sociedad de fomento agrícola y ganadero de Temuco (SOFO)	
10Diciembre 2003	Charla a alumnos de postgrado en reproducción de la Universidad Austral de Chile	Ampliar los conocimientos de médicos veterinarios que se especializan en reproducción animal, en el tema de la criopreservación de gametos sudamericanos	Universidad Austral de Chile	10 Médicos veterinarios realizando su magister en reproducción animal.

2.2. Detalle por actividad de transferencia **REALIZADAS**

Fecha 24 de Septiembre 2003

Lugar (Ciudad e Institución) Sociedad de Fomento Agrícola y Ganadero de Temuco (SOFO),
TEMUCO

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) **Charla en curso de inseminación artificial** La charla ofrecida se dividió en 2 partes, la primera para entregar nociones básicas sobre el ciclo estral de la vaca, desarrollo folicular, ovulación, detección de celo y sincronización de celo en un rebaño, mientras que en la segunda parte se detalló todo el proceso de inseminación artificial en bovinos, partiendo desde la colección del semen, su procesamiento en los centros de inseminación, hasta la inseminación propiamente tal, poniendo énfasis en los cuidados que el inseminador debe tener al momento de manipular un producto tan delicado.

Fecha 3 de Noviembre 2003

Lugar (Ciudad e Institución) Instituto de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias y Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, TEMUCO

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) **Charla a alumnos de Medicina Veterinaria** La actividad realizada fue de carácter teórico-práctico, ya que inicialmente a los alumnos se le dio a conocer los rudimentos de la Inseminación Artificial y los últimos conocimientos en materia de criopreservación de semen, incluyendo un programa computacional desarrollado en Francia por el INRA y que permite inferir el resultado de la congelación de semen de cerdo en diversas condiciones. Luego se procedió a demostrar en el laboratorio los pasos básicos de congelación de semen de bovino, pidiéndole a cada uno que procesara una muestra de semen bovino hasta el punto de almacenamiento.

Fecha 21 de Noviembre 2003

Lugar (Ciudad e Institución) Agrupación de Criaderos de Camélidos Sudamericanos de la Provincia de Arica, ARICA

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada)

Charla criadores y ganaderos de Camélidos Sudamericanos de los sectores de Putre y Visviri Se presentó a los ganaderos los últimos avances en cuanto a la inseminación artificial y la criopreservación de embriones de camélidos sudamericanos, poniéndolos al tanto de la realidad actual de este rubro, que aun se está en etapa de investigación, que falta mucho para hacerlo comercial, pero que de funcionar y hacer el sistema repetible podría significar un ingreso extra para ellos si tienen animales de muy buena calidad de los cuales se pudieran criopreservar semen y embriones. Es por esto que se aprovechó la oportunidad de explicar además mediante transparencias que es lo que ellos deben considerar al momento de seleccionar un reproductor, ya sea este macho o hembra.

Fecha Diciembre 2003

Lugar (Ciudad e Institución) Revista Inter Campo N°60 de la Sociedad de Fomento Agrícola y Ganadero de Temuco, TEMUCO

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada) **Publicación de artículo** Se presentó un artículo titulado "Sexaje de espermatozoides y su utilidad" el cual se anexa a este informe. Dentro de este artículo hay un error en el título de la Tabla presentada, pero que ya fue aclarado en la Oficina de Capacitación de la SOFO y que será publicado en el próximo número de la revista.

Fecha 10 de Diciembre 2003

Lugar (Ciudad e Institución) Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, VALDIVIA.

Actividad (en este punto explicar con detalle la actividad realizada y mencionar la información entregada)

Charla a Médicos Veterinarios realizando su Magister en Reproducción Animal Durante esta actividad se presentó a los alumnos las últimas novedades en materia de criopreservación de semen, ovocitos y embriones, lo cual incluyó avances en cuanto al desarrollo del ADN y el programa computacional desarrollado en Francia por el INRA y que permite inferir el resultado de la congelación de semen de cerdo y caprinos (2 programas) en diversas condiciones.

2.2. Especificar el grado de éxito de las actividades propuestas, dando razones de los problemas presentados y sugerencias para mejorar.

Durante la clase ofrecida a los alumnos del Curso de Inseminación Artificial ofrecido por la SOFO, las actividades que se desarrollaron resultaron muy bien ya que todos los participantes demostraron real interés en los temas que les fueron presentados, formulando muchas preguntas prácticas, lo que permitía que la exposición fluyera sin mayores contratiempos. El profesor a cargo del curso, Dr. Raul Silva W. se mostró siempre dispuesto a ayudar y abierto a sugerencias sobre novedades en el tema.

La charla ofrecida a los alumnos de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, fue muy abierta, probablemente por ser esta una asignatura optativa y mostraron un gran interés en la materia, fue casi una conversación, la cual se extendió por 2 horas. Lamentablemente no fue posible contar con un proyector de Power Point casi hasta el final de la charla aunque éste había sido solicitado con una semana de antelación, a cambio se presentaron transparencias que sirvieron como material de apoyo. Como sólo se dispuso de 20 minutos para mostrar el programa computacional de criopreservación de semen de cerdo desarrollado por el INRA, por la falta del proyector, éste no pudo ser explicado en detalle.

Para hacer posible la publicación de un artículo en la Revista "Inter Campo" de la SOFO se conversó con el director, Sr. René Araneda y la oficina de Capacitación de esa entidad, la cual se mostró muy abierta a dar un espacio dentro de la revista, incluso preguntando que tipo de artículo se iba a publicar. Lamentablemente al transcribir el documento enviado en la imprenta cometieron el error de cambiar una letra en el título de la Tabla presentada, el cual originalmente era "Nº y % de preñez con semen sexado v/s semen control", pero que se publicó como "Nº y % de preñez con semen secado v/s semen control". Ya que la revista fue publicada en los últimos días de Diciembre, recién ahora se pudo hacer ver el error y hubo un compromiso por parte de la SOFO de publicar la corrección en el próximo número.

La charla que se dictó en la I Región, aprovechando un seminario-taller en el que participaron muchos ganaderos de la zona de Putre y Visviri, no fue incluida dentro de la planificación de este proyecto, ya que recién en Noviembre se supo del viaje que debía realizarse al Norte del país. En realidad se aprovechó la oportunidad de la coincidencia del viaje y este seminario. Al consultar en terreno con los organizadores la posibilidad de ofrecer esta charla ellos no mostraron ningún inconveniente. Aunque para los ganaderos este era un tema totalmente nuevo se mostraron muy interesados considerando las repercusiones que el tema tendría en sus objetivos y líneas de crianza. Al comparar la preparación de los ganaderos con las de los alumnos de medicina veterinaria obviamente hubo que considerar que el lenguaje a utilizar debía ser otro, por lo que se le pidió a ellos que si no entendían algo, o no quedaba claro, lo hicieran ver para tratar de explicarlo mejor.

La clase ofrecida a los Médicos Veterinarios participantes del curso de magíster que ofrece el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, tal vez fue el más exitoso en cuanto a la profundización de las materias presentadas, ya que todos los alumnos están interiorizados en los temas que se presentaron, aunque obviamente se trató de mostrar algo nuevo, por lo que se le dio el enfoque desde el punto de vista de la crianza de camélidos sudamericanos. Se conversó sobre experiencias previas de ellos en este campo y las novedades que han surgido en estas. La verdad es que fue una clase de retroalimentación en cuanto a conocimientos.

En conclusión, se trató de respetar las fechas propuestas para el desarrollo de las diversas actividades planificadas. Lamentablemente por razones de coordinación de tiempo con las personas a cargo de las diferentes entidades dispuestas a colaborar con este proyecto, ya que tanto ellos como la participante del proyecto tenían también otra obligaciones en sus respectivos trabajos, fue muy difícil de mantener el calendario de actividades. Por ejemplo casi todas las actividades se retrasaron en un mes e incluso se reemplazó la charla a los pequeños y medianos productores dueños de llamas y/o alpacas por una charla que se ofreció aprovechando la oportunidad de un viaje a la I Región.

2.3. Listado de documentos o materiales mostrados en las actividades y entregados a los asistentes (escrito y/o visual). (Se debe adjuntar una copia del material)

Tipo de material	Nombre o identificación	Idioma	Cantidad
Transparencias	"Registros"	Español	11 fotocopias
Power Point	"Métodos de extracción de semen"	Español	38 diapositivas impresas (7pág)
Transparencias	"Línea semen"	Español	22 fotocopias
Artículo	"Sexaje de semen bovino y su utilidad"	Español	2 páginas

En los documentos anexados a este informe y que contienen el material presentado en las distintas actividades de difusión realizadas se incluye la carta de constancia del organismo o universidad que participó de ésta.

3. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

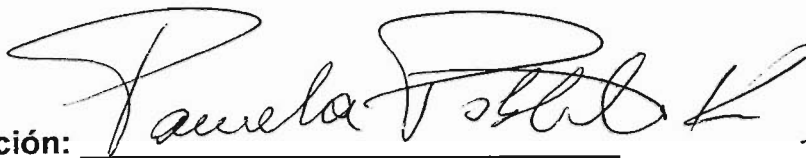
Indicar los problemas administrativos que surgieron en la preparación y realización de las actividades de difusión.

El mayor problema fue mantener el calendario de actividades de difusión propuesto, esto debido a que la profesional participante de este proyecto debía desarrollar su trabajo habitual en el criadero y a pesar de tener todas las facilidades para efectuar las distintas actividades no quiso que estas afectaran su desempeño en las investigaciones que llevaba a cabo en el Criadero Llamas del Sur.

El segundo problema fue la demora en la publicación del artículo "Sexaje de semen bovino y su Utilidad", ya que la revista es de tiraje mensual y además hubo un error de título al momento de la publicación, hecho que se comunicó inmediatamente a los editores en SOFO, pero hubo que esperar casi 2 meses para la aparición de la corrección en otro número de la revista mediante una fe de erratas.

Fecha: Mayo 2004

Firma responsable de la ejecución:





Sociedad de Fomento Agrícola
de Temuco A.G.

Temuco, 26 de Enero del 2004

Señores
Fondo de Innovación Agraria
Presente

De mi consideración:

Por medio de la presente, certifico que la Srta. **Pamela Poblete** participó como charlista en el curso “**INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**”, impartido por la Sociedad de Fomento Agrícola de Temuco A. G, entre los días 22 al 27 de Septiembre del 2003 .

Sin otro particular, saluda atentamente a Uds.

Rene Araneda Amigo
Secretario General
SOFO



Temuco, Enero 14 de 2004

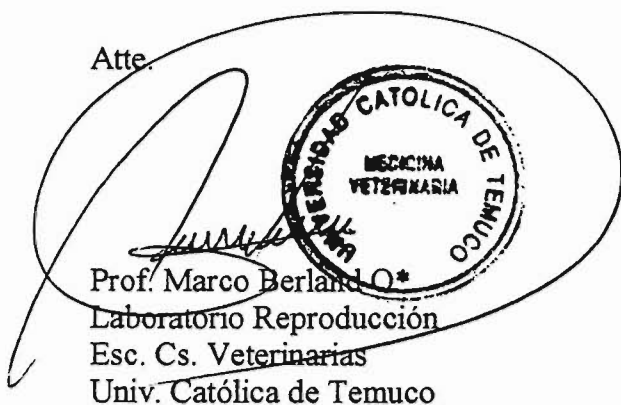
CONSTANCIA

Srs.
Fundación Para La Innovación Agraria
FIA

A través de la presente, quisiera dejar constancia que en mi calidad de profesor de Embriología y Reproducción, de la Escuela de Cs. Veterinarias de la Universidad Católica de Temuco, y en el contexto del curso "Biotecnologías Reproductivas", el cual se imparte a alumnos de cuarto y quinto año de la carrera, solicité a la Srta. Pamela Poblete Krumbach la realización de una clase teórico-práctica sobre avances en biotecnologías de conservación de gametos en especies domésticas. La actividad se realizó según lo acordado durante el día 3 de noviembre de 2003 en dependencias de la Universidad.

Se extiende esta constancia para ser presentada ante FIA

Atte.


Prof. Marco Berland O*
Laboratorio Reproducción
Esc. Cs. Veterinarias
Univ. Católica de Temuco



Universidad Austral de Chile

Instituto Reproducción Animal

Valdivia, enero 09 de 2004.

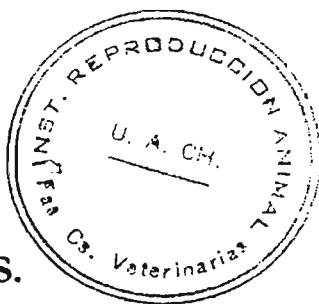
Doctora
Pamela Poblete
San Francisco 0989
TEMUCO

Estimada Dra. Poblete,

Mediante la presente quisiera agradecer su charla "***Avance en Biotecnología de Camelidos***", dictada el 10 de Diciembre/2003 en este instituto.
Reiterando mis más sinceros agradecimientos.

Saluda Atentamente a usted,

Dr. Jorge Correa S.
DIRECTOR



3. REGISTROS

MACHOS ⇒ REGISTRO DE PROGENITORES,
PROCEDENCIA
EDAD
PESO (NACIMIENTO, DESTETE)
LÍBIDO
DESCENDENCIA ⇒ CUÁNTOS,
CÓMO,
COLOR,
DEFECTOS
CARÁCTER, DOCILIDAD
REGISTRO PRODUCTIVO (FIBRA)

HEMBRAS ⇒ REGISTRO DE PROGENITORES,
PROCEDENCIA
EDAD
PESO (NACIMIENTO, DESTETE)
DESCENDENCIA ⇒ CUÁNTOS, CÓMO,
COLOR, DEFECTOS
HABILIDAD MATERNA
APTITUD LECHERA
CARÁCTER
REGISTRO PRODUCTIVO

Hormona:

sustancia que va a la sangre para actuar sobre un órgano distinto al que la produjo.



Órganos productores de hormonas

- Hipotálamo
- Adenohipófisis
- Ovarios y testículos
- Placenta
- Útero



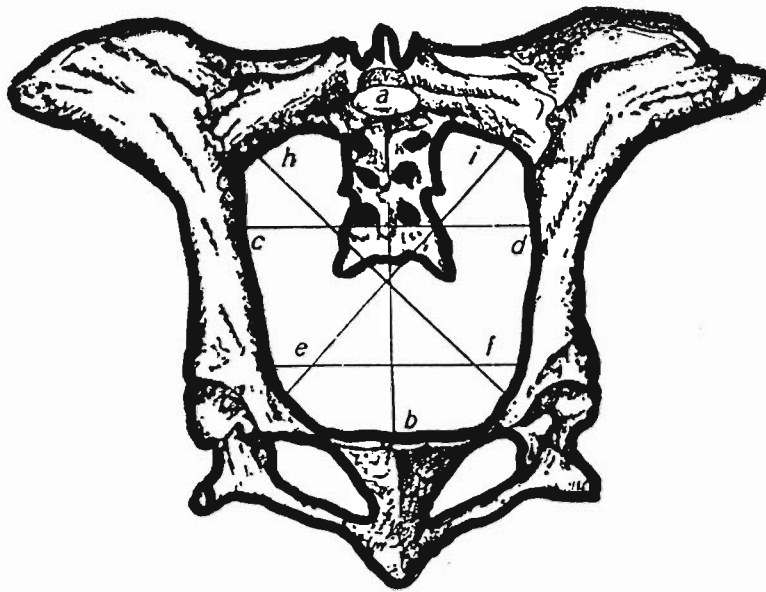


FIG. 2. Diámetros de la cintura pelviana de la vaca. *a-b*, conjugado verdadero; *c-d*, *e-f*, diámetros transversales bisiliacos; *h-f*, diámetro oblicuo derecho; *i-l*, diámetro oblicuo izquierdo.

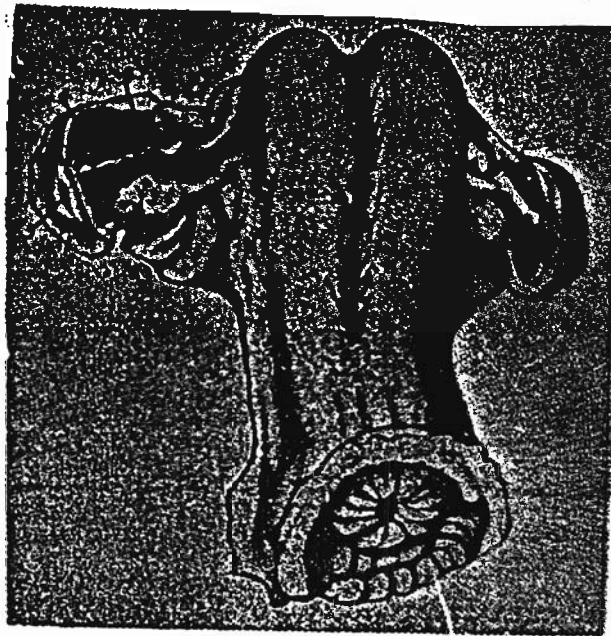
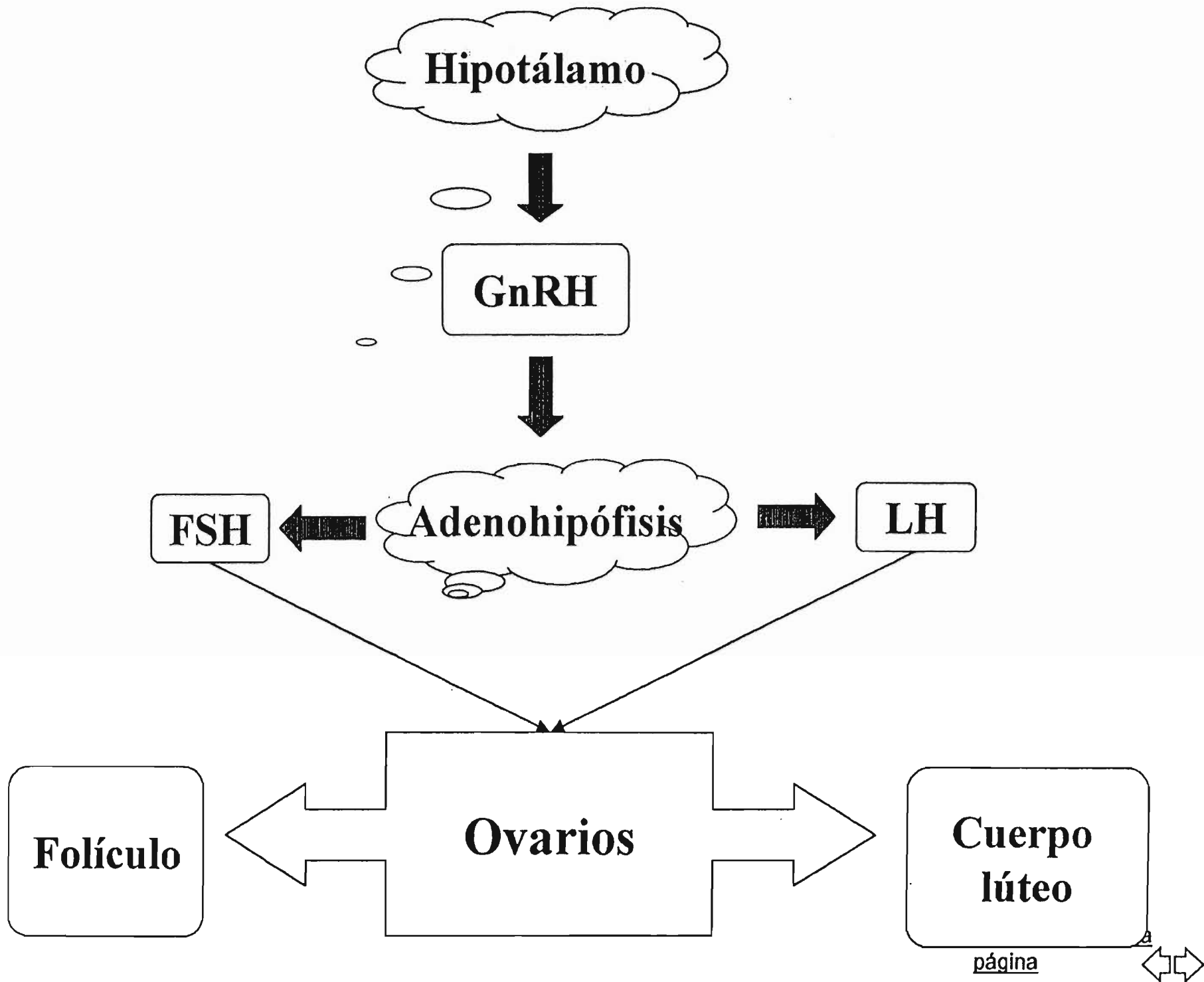
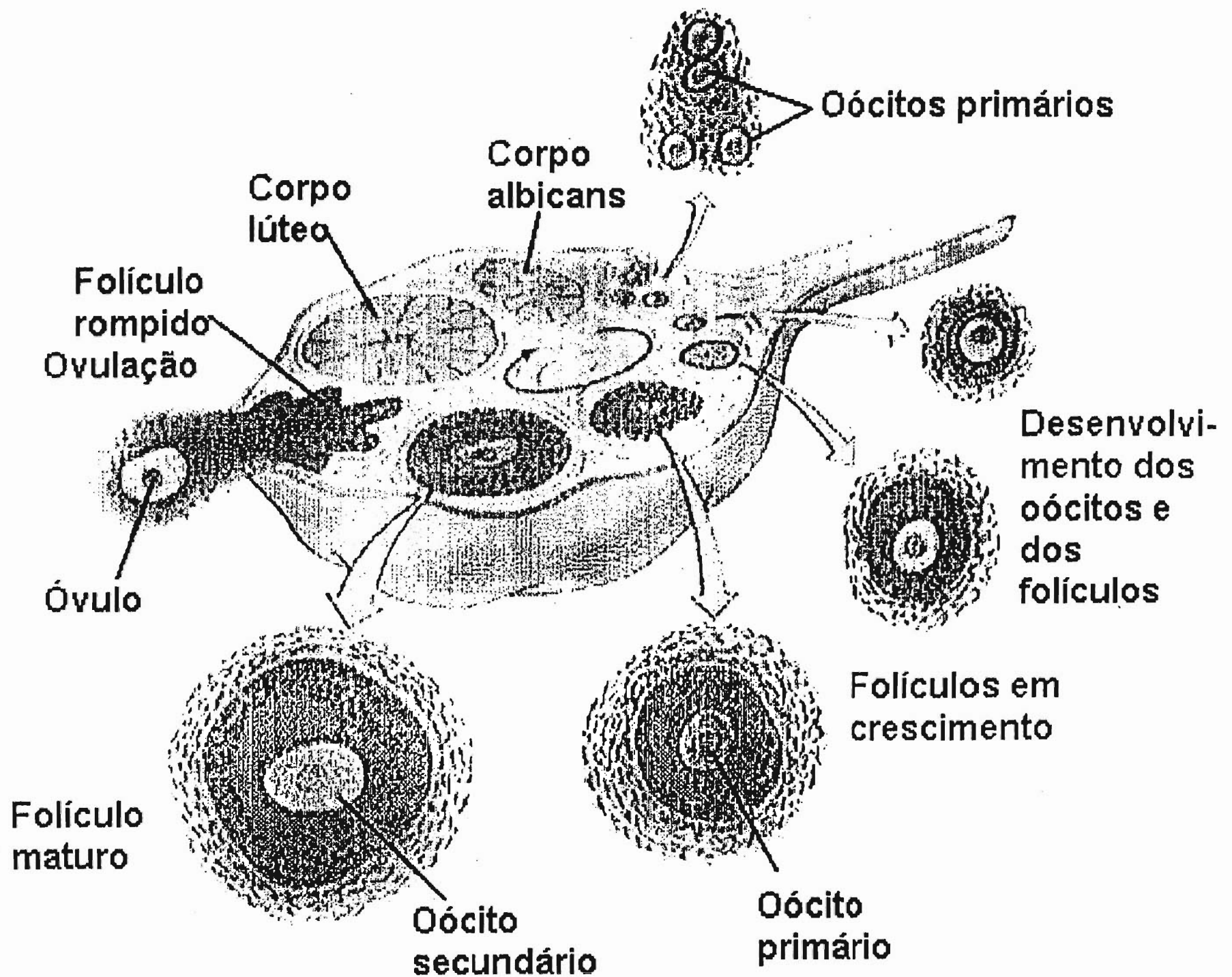


FIG. 6. Organos sexuales internos de la vaca; 1, orificio cervical; 2, cuerno derecho del útero; 3, ovario; 4, bolsa ovárica; 5, orificio abdominal del oviducto; 6, oviducto. (Williams.)



FIG. 8. Ovarios de la vaca. (Nápoles.)





óvulos y hormonas.

Si se examina un ovario al microscopio, se encontrarán cientos de óvulos, cada uno de ellos en el centro de un grupo de células. El óvulo junto con sus células que lo rodean se conoce como folículo.

Cuando se observa un folículo particular, se vería la multiplicación de las células que rodean al óvulo. Como resultado, el folículo se vuelve más grande, lo suficiente para ser apenas visible a simple vista.

Enseguida, aparece una cavidad llena de fluido dentro del grupo de células cercanas al óvulo. Esta cavidad llena de fluido crece, lentamente al principio, pero muy rápido justo antes del periodo de celo.

Las células que rodean al óvulo y que recubren la cavidad llena de fluido del folículo, producen la hormona sexual femenina **estrógeno**. Conforme el folículo se vuelve más y más grande, secreta más y más estrógeno hacia el torrente sanguíneo de la vaca. **Los niveles altos de estrógeno provocan el periodo de celo.**

Hasta este tiempo, el folículo en el ovario puede ser del tamaño de la mitad del ovario y se puede palpar a través del recto. Se siente como una ampolla muy túrgida. Entonces, se rompe, liberando el líquido que hay dentro de él junto con el óvulo. La liberación del óvulo y del líquido se conoce como ovulación, y ocurre cada 25 horas (con un rango de 23 a 27 horas) después del surgimiento del celo.

Cerca del momento de la ovulación, el infundíbulo (embudo) del oviducto se vuelve muy activo. "Agarra" al ovario como si estuviera buscando el óvulo. Si todo marcha bien, el óvulo es dirigido hacia el oviducto. En ocasiones, el infundíbulo no recoge al óvulo. Como resultado se pierde entre los intestinos.

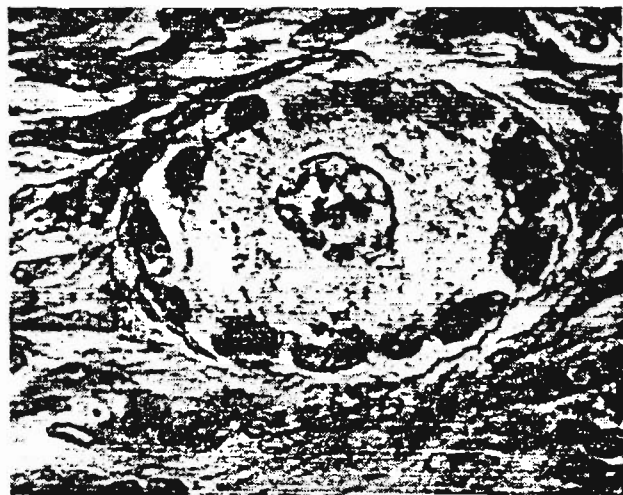
Con un poco de suerte, el óvulo será fertilizado por un espermatozoide que espera dentro o que pasa a través del oviducto. El óvulo fertilizado, entonces, pasa hacia el útero, en donde se puede desarrollar hasta formar una cría.

Después de la ovulación, el folículo viejo y colapsado comienza su "segunda vida". Algunas de las células que recubren la cavidad del folículo repentinamente empiezan a multiplicarse. Estas células secretan la hormona de la preñez, **progesterona**. En un periodo de un día, estas células crecerán hasta el punto en que pueden formar una masa tan grande como 1.3 cm de diámetro.

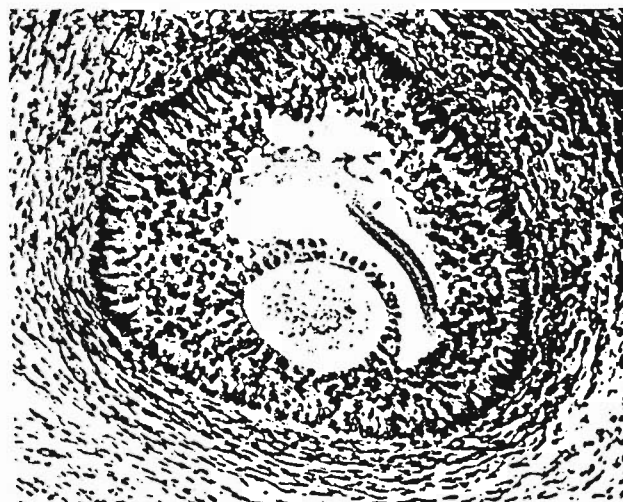
Esta nueva estructura, la cual es de amarilla a roja, es el cuerpo lúteo, algunas veces denominado "cuerpo amarillo".



INTERIOR DEL CERVIX abierto. Note los pliegues del tejido. En la vaca la vagina debe estar en el lado izquierdo y en el útero al lado derecho de este cervix.

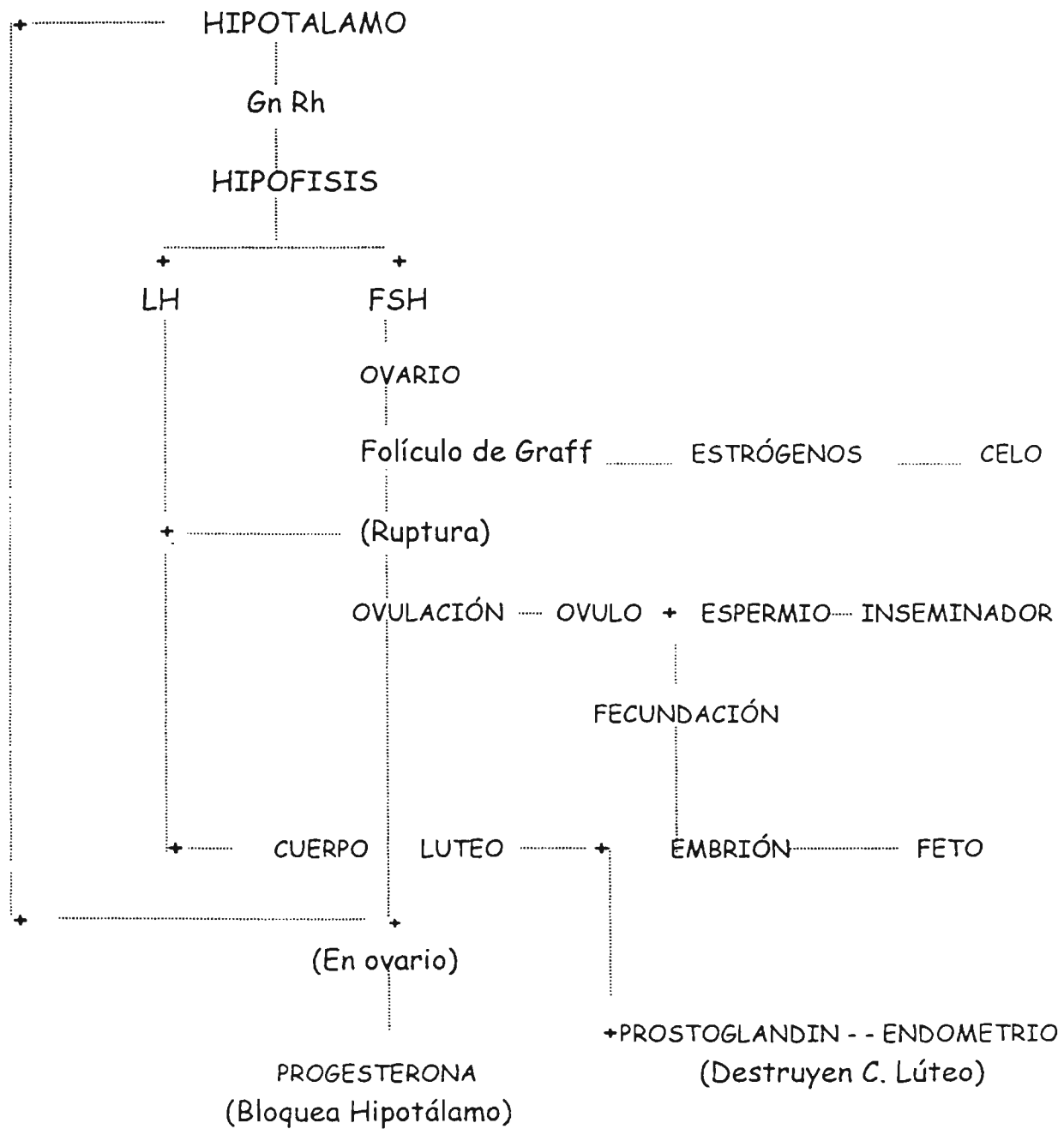


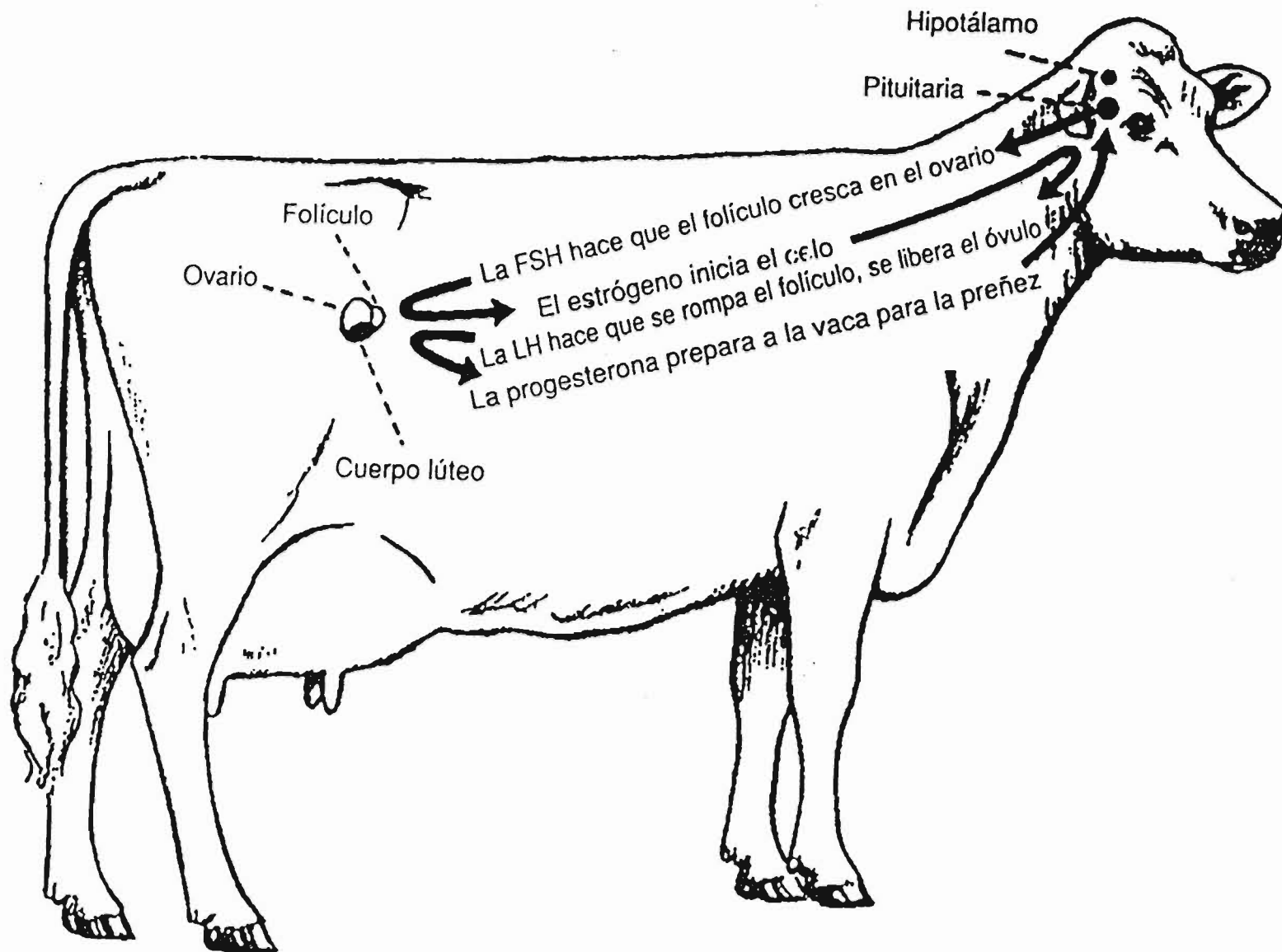
OVULO DE VACA EN EL OVARIO (amplificado 400 veces) el núcleo está en el centro rodeado por el citoplasma y una capa de células que producen hormona femenina.



FOLICULO EN EL OVARIO DE LA VACA (amplificado 200 veces). El óvulo está debajo de la cavidad llena de fluido la cual, a su vez, está alineada con células que producen estrógeno.

2.- CICLO SEXUAL DE LA VACA





etapas del ciclo. Pero la cantidad de estrógeno en la sangre cercana al tiempo del estro es extremadamente pequeña, alcanza solamente diez partes por trillón de partes de sangre.

Se ha sabido de la existencia del estrógeno durante medio siglo debido a que es un agente químico muy potente. Sin embargo, la cantidad de estrógeno en la sangre de las vacas es tan pequeña, que se midió por primera vez en 1971.

El nivel alto de estrógenos en la sangre tiene efectos profundos en todo el cuerpo. El efecto más obvio del estrógeno es que inicia el periodo de celo (estro). El comportamiento de la hembra (que está en celo) es casi el único medio confiable que se tiene para determinar el tiempo óptimo para el apareamiento.

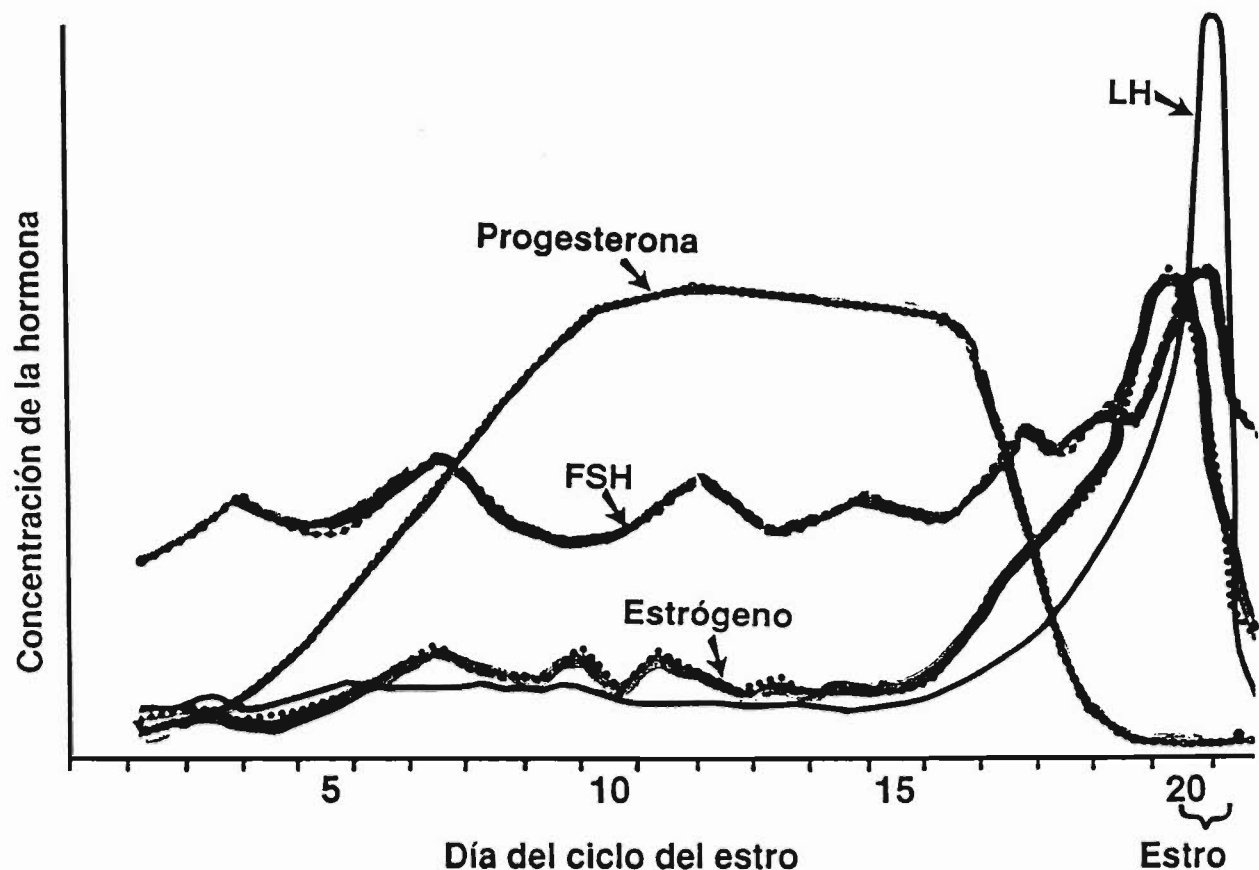
El hecho de que el hombre pueda detectar en las vacas el periodo de celo, es otro factor que hace posible la inseminación artificial. Si sólo el toro pudiera detectar a las vacas en celo, la inseminación artificial (I.A.) no sería práctica.

No obstante, es verdad que algunas vacas no muestran los síntomas típicos durante el periodo de celo y, en consecuencia, pueden volverse infértiles simplemente debido a que son apareadas en el tiempo equivocado. Se sabe poco acerca de la manera en la cual el estrógeno inicia el ci-

clo de celo, pero este efecto estrogénico debe localizarse en el cerebro.

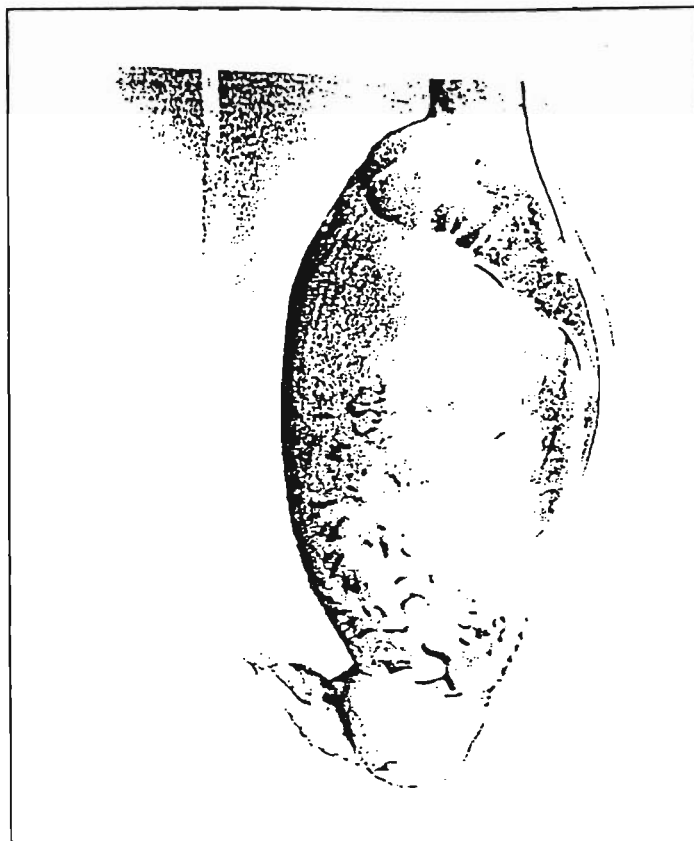
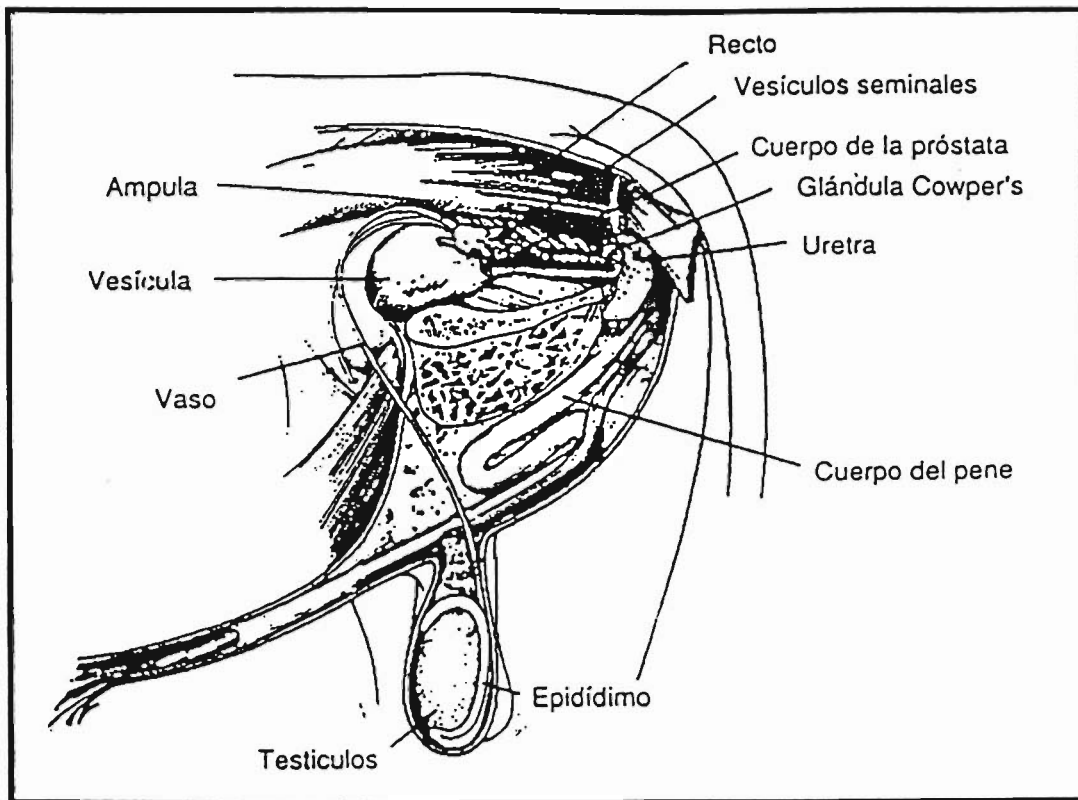
Casi un día antes de surgir el celo, el nivel alto de estrógeno causa que la pituitaria secrete más hormona luteinizante (LH). Esta LH, en combinación con la FSH, la cual está siendo secretada, causa el desarrollo del folículo hasta alcanzar su tamaño máximo. Cerca del establecimiento del celo, la LH se eleva hasta 20 a 30 veces con respecto a su nivel normal, mientras que la secreción de la FSH alcanza aproximadamente el doble de su nivel normal. La sangre transporta ambas hormonas hasta el ovario, en donde estimulan al folículo para que sufra cambios que conduzcan a la liberación del óvulo (ovulación). La ovulación normal ocurre aproximadamente de 23 a 27 horas después del establecimiento del celo.

Si todo sigue bien, el óvulo es recogido por el infundíbulo y es dirigido hacia el oviducto. El folículo viejo, cuyo trabajo ya está hecho, se colapsa con rapidez en el tiempo de la ovulación. Pero la LH no deja descansar a las células de este folículo viejo. En vez de esto, la LH causa que algunas de estas células crezcan rápidamente. En unos pocos días, el folículo ha sido reemplazado por una nueva estructura, el cuerpo lúteo (cuerpo amarillo), el cual puede ser más grande que el folículo.



LINEA SEMEN

- **COLECCIÓN : Aceptación de vagina artificial por machos donantes**
- **EVALUACION : Características Seminales (volumen, color, pH, motilidad, concentración, morfología)**
- **CRIOPRESERVACION**
- **TRANSPORTE Y DISTRIBUCION**
- **INSEMINACION ARTIFICIAL**



TESTICULO DEL TORO disecado para sacarlo del escroto. El epidídimo se encuentra en la parte superior izquierda del testículo. El vaso sale desde la parte inferior hacia la derecha.

FASES DEL PROCESO

1. Colección de semen

2. Evaluación del semen

3. Procesamiento, congelación

4. Inseminación

COLECCIÓN DE SEMEN

MÉTODOS : Alternativos

Fundas vaginales, Esponjas vaginales, Fístula uretral

Electroejaculación : aplicación transrectal de pulsos eléctricos a nivel de pene y glándulas anexas

Ventajas

- cualquier macho
- cualquier época
- no requiere preparación ni entrenamiento del macho

Limitantes

- macho debe ser sedado
- contaminación con orina
- no es agradable

a) **Motilidad** : porcentaje de espermios con motilidad (0-100%)

b) **Intensidad del movimiento** (0 = sin movimiento; 1 = mov.local; 2 = algo progresivo; 3 = progresivo)

La viscosidad natural del semen impide el movimiento progresivo

c) **Concentración** : cantidad de espermios en un mm^3

Se dificulta por la viscosidad del semen

c) Color : subjetivo, relacionado con la concentración

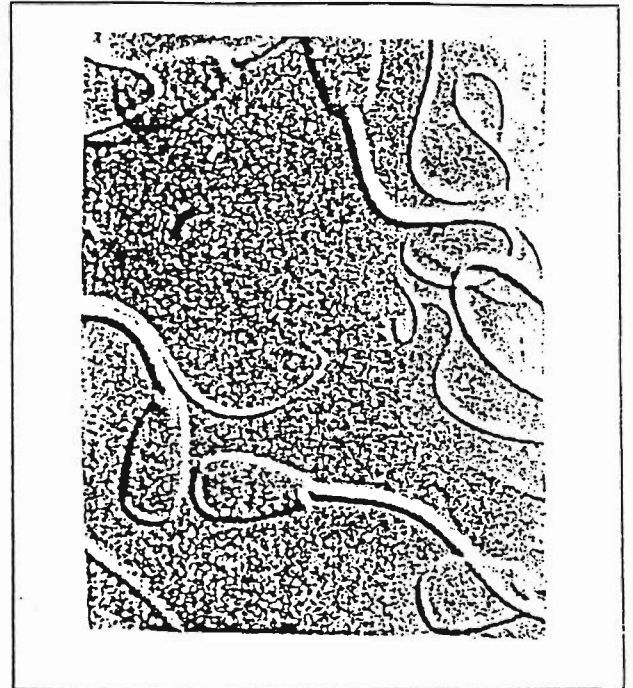
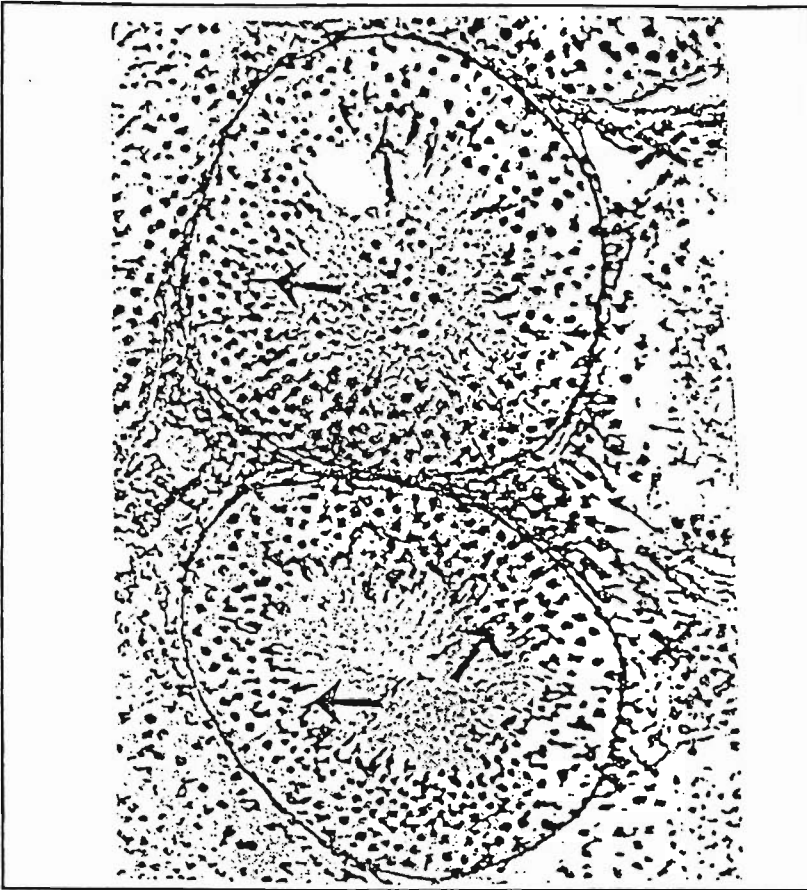
Blanco, marfil : concentración alta

Grisáceo : concentración media

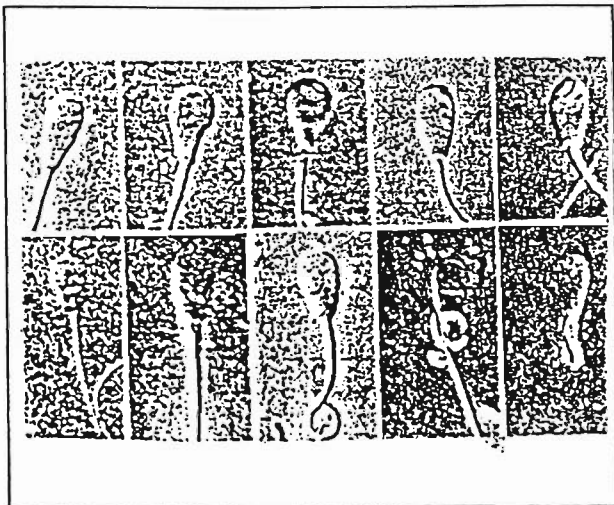
Transparente : concentración baja

Anormal : rojo (sangre), amarillento (orina),
café (polvo)

d) pH : rango 8-9



TESTICULO OBSERVADO A TRAVES DE UN MICROSCOPIO. Se indican dos túbulos centro de los cuales se producen espermatozoides. Los puntos oscuros alargados (flecha) son cabezas de espermatozoides recién formadas. La hormona masculina la producen las células (X) entre los óvulos.



ESPERMATOZOIDES ANORMALES (amplificados aproximadamente 1500 veces). Las anomalías de la cabeza aparecen en la hilera superior y las de la cola en la hilera inferior.

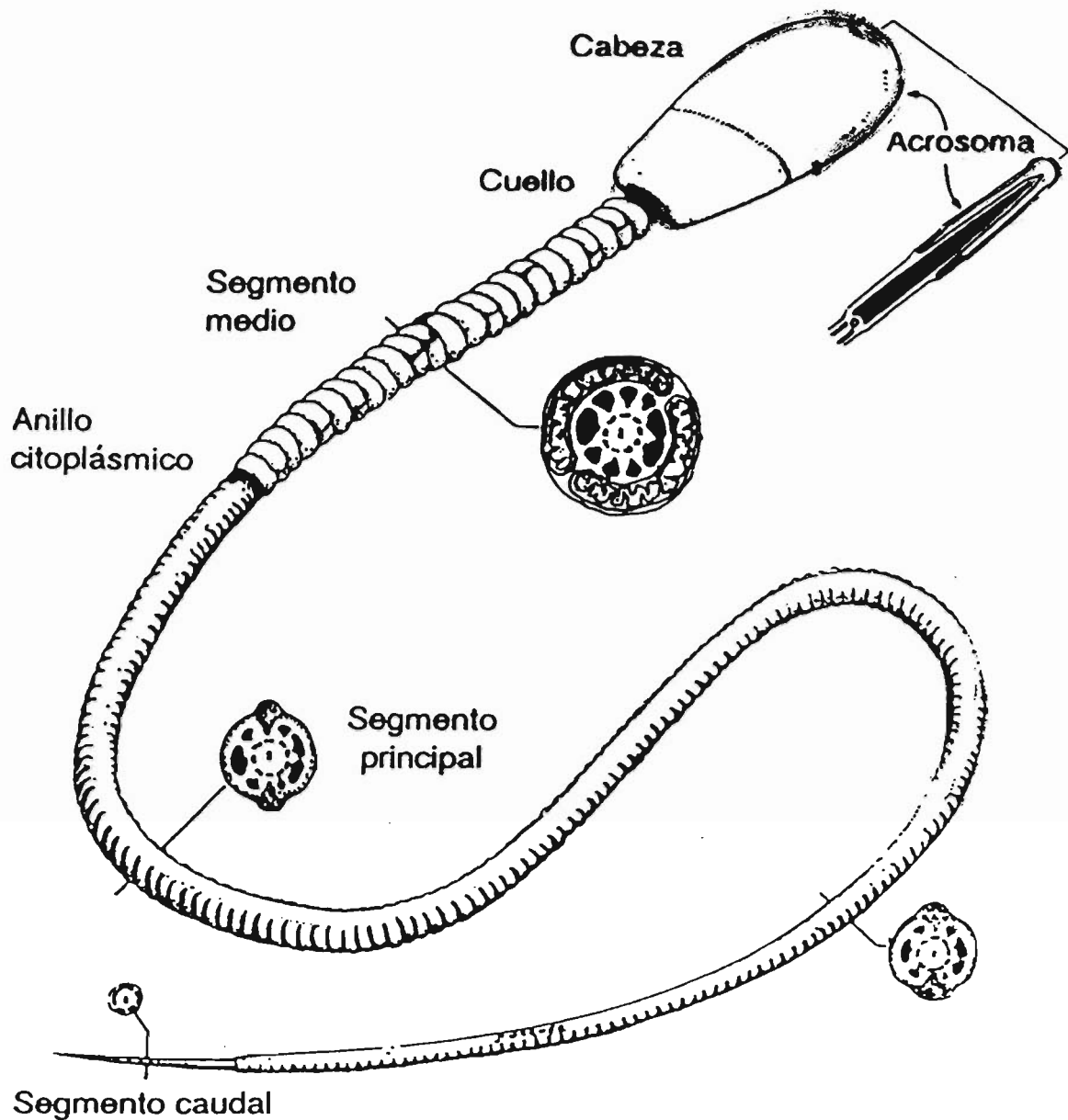
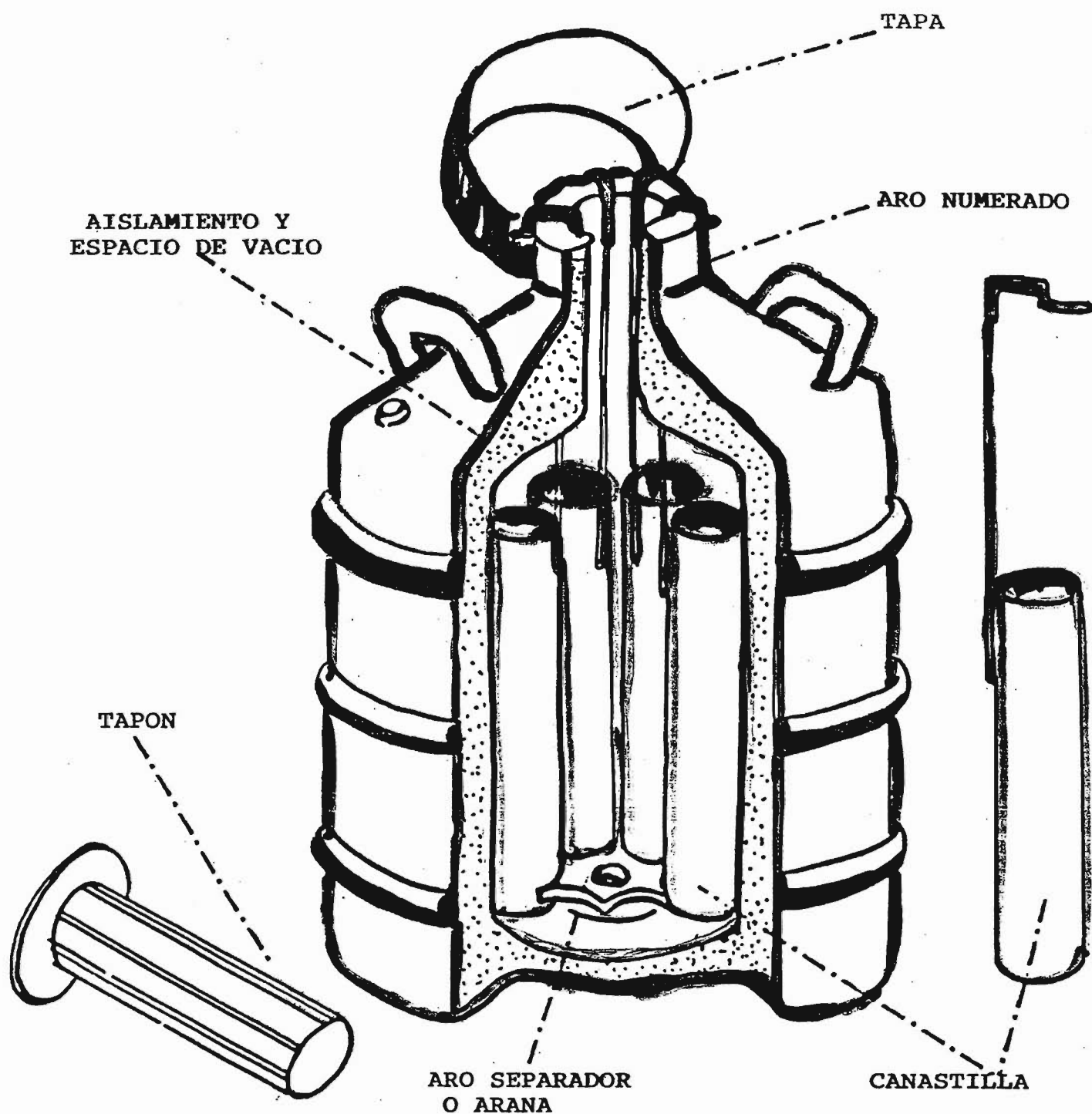


Fig. 7-2. Características de un espermatozoide de bovino. Se observan la cabeza, con su casquete acrosómico y la cola, con sus cuatro divisiones anatómicas. Cortes transversales del segmento medio, el segmento principal (2) y el segmento caudal muestran el núcleo axonémico central con $9 + 2$ microtúbulos; las nueve fibras externas gruesas, la vaina mitocondrial, las columnas longitudinales dorsal y ventral, y las costillas circunferenciales.

Termo de Nitrogeno Liquido



INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

- **Es una de las biotecnologías reproductivas má usadas en otras especies de animales**
- **Básicamente consiste en el depósito artificial de semen dentro de una hembra**



VENTAJAS

- **Mejoramiento genético** mayor aprovechamiento de machos de alto valor genético
(de cada eyaculado se obtienen decenas de dosis)
- **Reduce la transmisión de enfermedades**
- **Costo moderado**
- **Disminuye los problemas de la presencia de macho/s en el rebaño**

LIMITANTES

- **Requiere personal capacitado**
- **Requiere preparación de la hembra receptora**
- **Tasa de fertilidad inferior a la monta natural**
- **Técnica aún en proceso de desarrollo experimental**

CONCLUSIONES

1. Excelente herramienta para el mejoramiento genético de un rebaño
2. Técnica bastante simple y de costo moderado

vértice del cuerno, pero más tarde todavía hacia el cuerpo del útero y hacia abajo (figura 112). La pared se hace más delgada y fluctuante, hasta que, a finales



FIG. 120

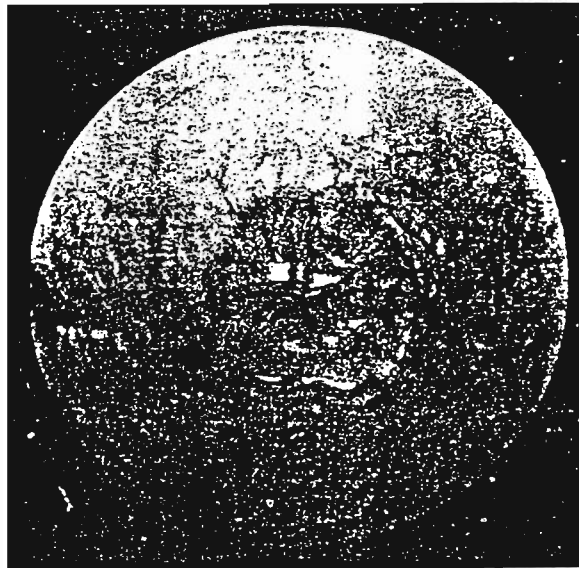


FIG. 121

FIG. 120. Orificio externo del útero de una vaca en el séptimo mes de preñez. Se observa mucosidad teñida de color castaño —también se ven manchas de moco, del mismo color, en la parte dorsal de la bóveda vaginal—. Rebaño de ganado vacuno atacado por el bacilo *abortus de Bang*. (Viena)

FIG. 121. Hocico de tenca de una vaca joven en el séptimo mes de preñez. Sobre el orificio uterino y la parte anterior de la bóveda vaginal se observa una capa mucosa seca en forma de velo. (Viena)

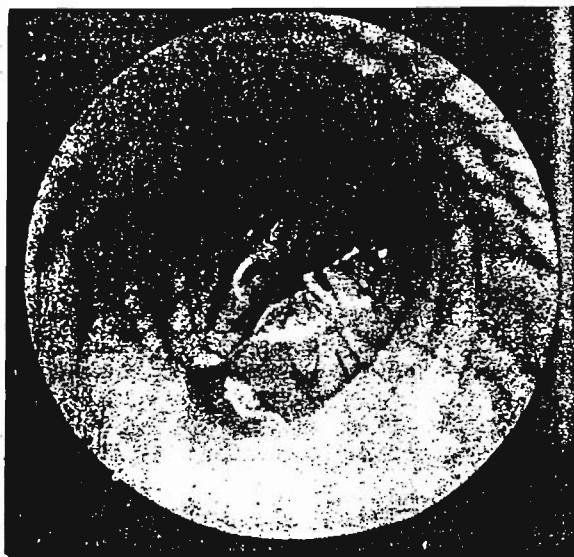


FIG. 122



FIG. 123

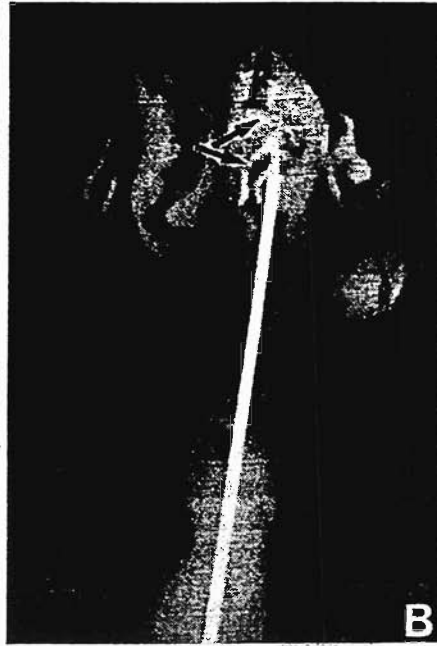
FIG. 122. Hocico de tenca aplanado de una vaca en el octavo mes de preñez, (Viena)

FIG. 123. Hocico de tenca de una vaca unas tres semanas, aproximadamente, antes del fin de la preñez. Se observa ya un estado preparatorio del parto. (Viena)

del cuarto mes y comienzos del quinto, se puede tocar por el recto las partes fetales más pequeñas. La tensión del ligamento ancho —ligamento uterino

A Punta de jeringa ubicada en la abertura interna de la cervix.

B La mitad del semen depositada en la trompa derecha.



C Jeringa retirada del cuerpo uterino.

D El resto del semen se deposita en la trompa izquierda.



BIOTECNOLOGIA :

- Ofrece instrumentos para desarrollo sustentable de agricultura, ganadería, pesca, forestal e industrias alimentarias
- Contribuye a satisfacer las necesidades de una población en crecimiento y cada vez más urbanizada

BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS :

- Tecnologías aplicadas al proceso reproductivo de organismos vivos
- Aceleran el mejoramiento genético convencional
- Producen aumentos en los rendimientos productivos
- Preservan el germoplasma de animales domésticos y silvestres

IMPORTANCIA PRODUCTIVA Y ECONOMICA DE CALIDAD Y DETERIORO GENETICO

a) Calidad Genética :

- Factor estratégico para el desarrollo pleno del potencial productivo de un animal
- Justifica un mayor gasto en alimentación, sanidad, comercialización, etc

VENTAJAS DE APLICACION DE BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS COMO APOYO AL MEJORAMIENTO GENETICO Y PRODUCTIVO

Generales – Comunes :

- Efecto multiplicador de reproductores de alta calidad
- Mayor rapidez en prueba de reproductores : test de progenie
- Eliminación precoz de reproductores que heredan defectos
- Progreso genético mas rápido

VENTAJAS DE APLICACION DE BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS COMO APOYO AL MEJORAMIENTO GENETICO Y PRODUCTIVO

Específicas de Inseminación artificial :

- Reducción de riesgo de transmisión de enfermedades
- Disminución de problemas causados por machos en rebaño

c) Efectos de menor producción e ingresos económicos como consecuencia de :

- DEFECTOS GENÉTICOS :

prognatismo

sindactilia

aplomos defectuosos

- CONSANGUINIDAD :

degeneración de raza

aumenta presencia de animales defectuosos

menor resistencia a enfermedades

d) Capacidad de Selección para Mejoramiento Genético :

CONCLUSIÓN :

Animal - Rebaño de mejor Calidad =

Mayores ingresos económicos para propietario y su grupo familiar.



Ventajas

- Disminuye el riesgo de lesiones del macho y de la hembra
- Permite utilizar un eyaculado en varias hembras
- Progreso genético más rápido

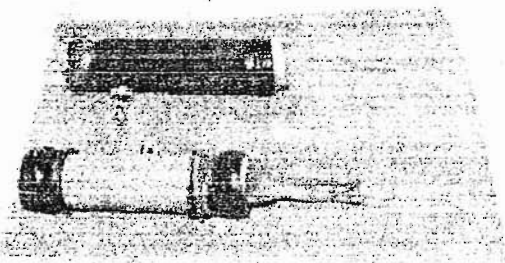
Método ideal de colección de semen

- Aplicable sin riesgos para la salud y el bienestar del animal
- Debe ser repetible en un determinado intervalo de tiempo
- La composición física y química del semen obtenido debe tener similar al obtenido por monta natural
- El personal no debe correr riesgos al aplicar la técnica

Métodos de extracción de semen

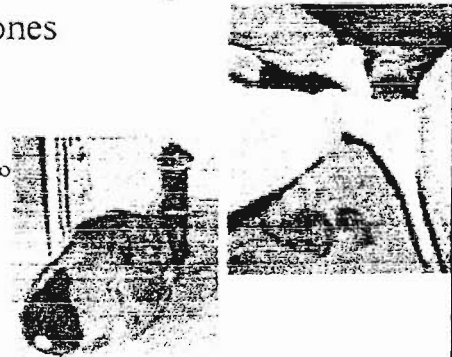
Eyaculatorio	Natural	Post-coito Vagina artificial Masturbación Estimulación manual
	Artificial	Electroeyaculación Inducción farmacológica
Sin eyaculación		Epididimo Masaje transrectal

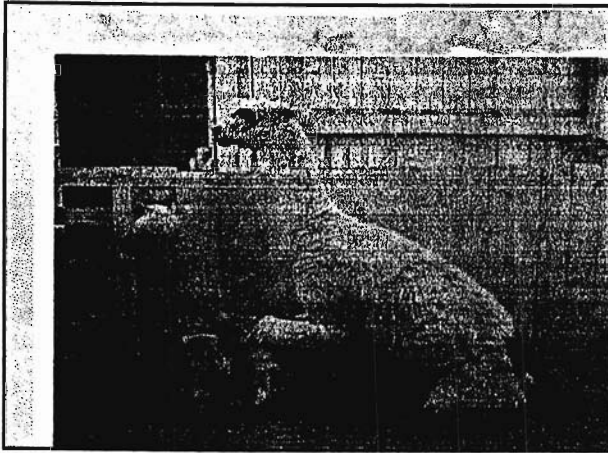
Vaginas artificiales



Condiciones

- Lugar
- Higiene
- Piso
- Semen apto



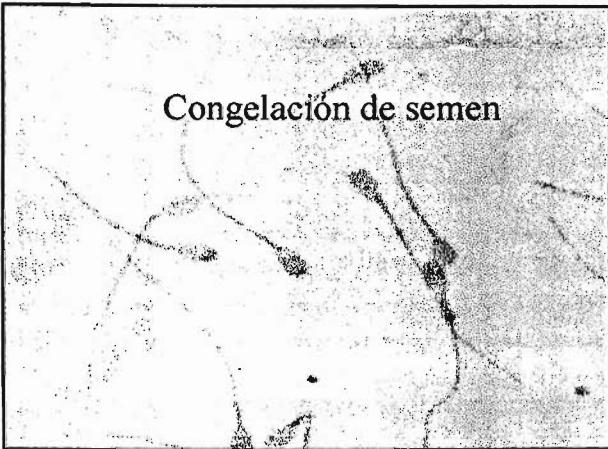


Problemas

- Baja libido
- Impedimentos físicos
- Técnica mal aplicada

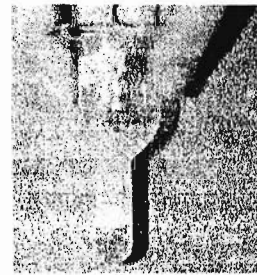


Congelación de semen



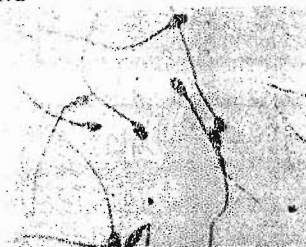
Evaluación macroscópica

- Color
- Volumen
- Olor
- Impurezas



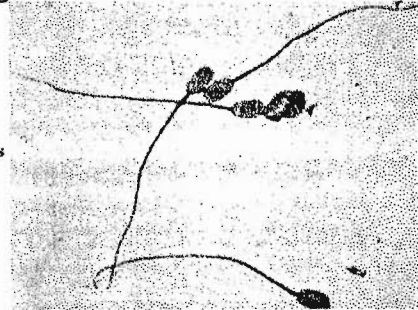
Evaluación microscópica

- Motilidad progresiva
- Motilidad circular
- Concentración
- Morfología



Morfología

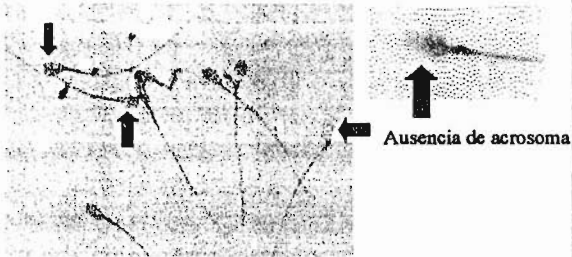
- ⇒ Frotis
- ⇒ Tinción
- ⇒ Cantidad de espermatozoides normales y anormales



Espermatozoides normales

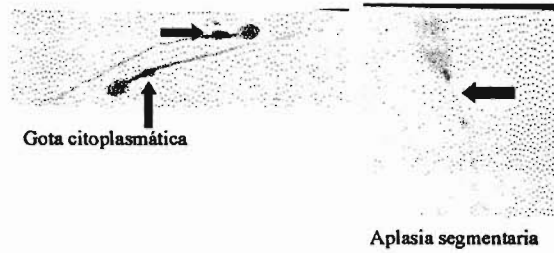
Anormalidades

- Cabeza: piriformes, microcefalias, ausencia de acrosoma, dobles

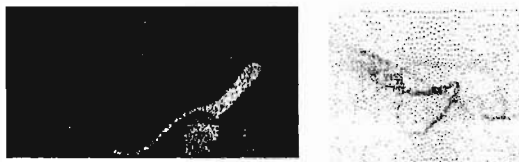


Cabezas piriformes

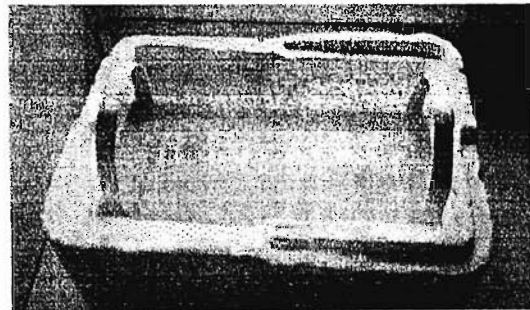
- Pieza intermedia: gota citoplasmática, aplasia segmentaria, engrosamiento.



- Flagelos: enrollados, flectados, dobles



Pasos para la congelación



Dilución

- Concentración inicial
- Concentración final
- Diluyente

Envasado del semen diluido

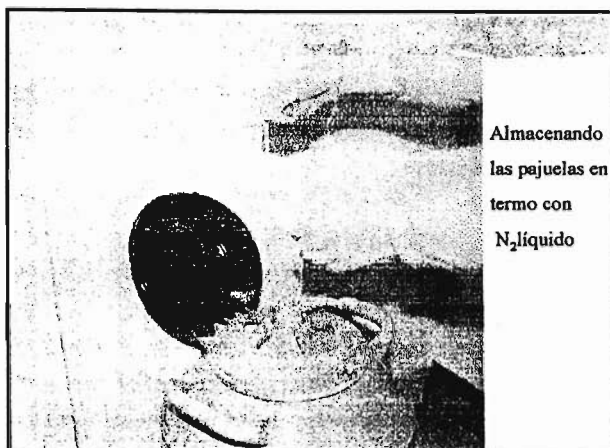
- Pajuelas de 0,25 y 0,5 ml



- Pellets
- Bolsas

Congelación en pajuelas

- Se dejan las pajuelas en vapores de N_2 líquido por 15 minutos
- Se sumergen las pajuelas en N_2 líquido
- Almacenamiento en termo con N_2 líquido
- IMPORTANTE → identificación



Inseminación Artificial

- Es una de las biotecnologías reproductivas más usadas en especies animales de producción.
- Consiste en depositar artificialmente semen dentro del tracto reproductivo de una hembra.

Ventajas

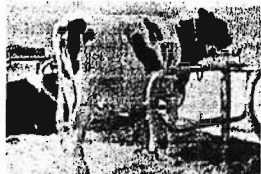
- Mayor aprovechamiento de machos de alto valor genético
- Reduce transmisión de enfermedades
- Costo moderado
- Disminuye los problemas por presencia de macho en el rebaño
- Se pueden obtener crías de reproductores impedidos físicamente o muertos

Limitantes

- Requiere personal capacitado
- Tasa de fertilidad inferior a la monta natural
- En algunas especies requiere una preparación previa de la hembra (ovulación inducida)
- Técnica aún en proceso de desarrollo en algunas especies de interés productivo (porcinos, camélidos)

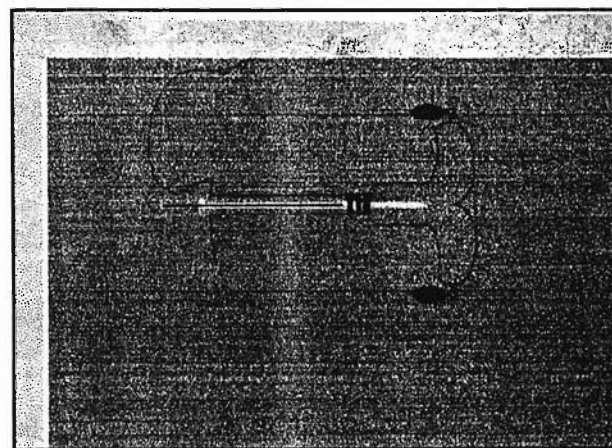
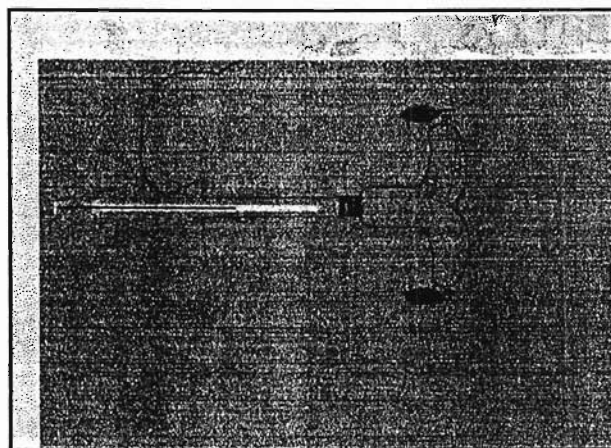
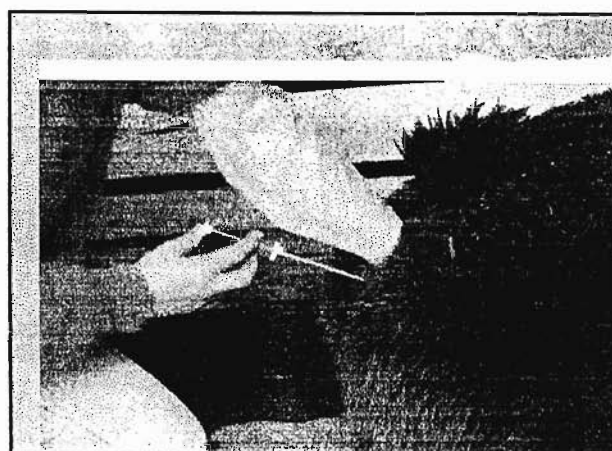
Aspectos a considerar

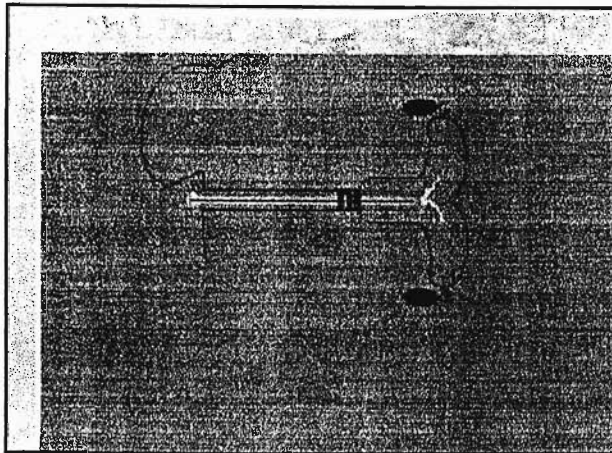
- Hembra
 - ⇒ fértil
 - ⇒ seguimiento del ciclo folicular
- Semen
 - ⇒ alta calidad genética
 - ⇒ descongelado (tº y tiempo)



Aplicación

- Pajuelas en pipeta de inseminación
- "x" horas después de terminado el celo o de inducir la ovulación
- depósito cuidadoso en cervix, cuerpo o cuerno uterino





Soluciones para criopreservación de semen

Propiedades de las soluciones

- Mezcla homogénea de 2 o más componentes.
- Diluida $\Rightarrow$ pequeñas cantidades de soluto en un determinado volumen de solvente.
- Solvente $\Rightarrow$ se encuentra en mayor proporción, es líquido
- Soluta $\Rightarrow$ está en menor proporción, puede ser líquido o sólido

Elaboración de diluyentes

■ CRIOPROTECTORES

- $\Rightarrow$ Glicerol (GLY): es el más usado. (10%)
- $\Rightarrow$ DMSO: el mejor para dilución de semen de llama. En combinación con glucosa para peces.
- $\Rightarrow$ Yema de huevo: al 20% protege los espermatozoides de los daños provocados por el congelamiento.
- $\Rightarrow$ Albúmina
- $\Rightarrow$ Etilen glicol

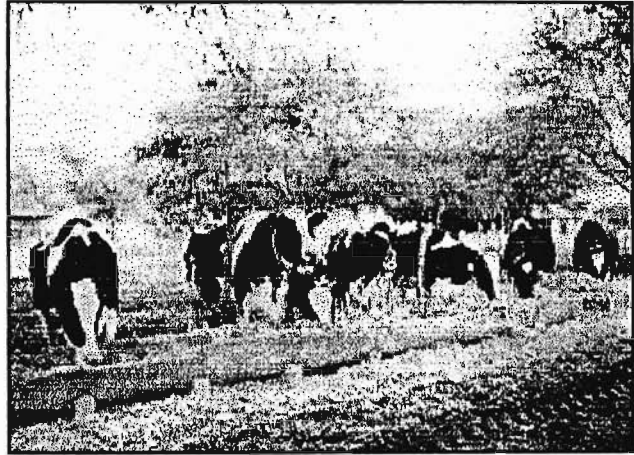
Azúcares

Crioprotección, deshidratación celular y remoción de crioprotectores

- $\Rightarrow$ Sucrosa
- $\Rightarrow$ Lactosa
- $\Rightarrow$ Glucosa
- $\Rightarrow$ Fructosa
- $\Rightarrow$ Trealosa
- $\Rightarrow$ Arabinosa

Buffer

- ⇒ TRIS (mayor capacidad buffer)
- ⇒ Citrato
- ⇒ Ácido cítrico
- ⇒ PBS
- ⇒ Comerciales





Sociedad de Fomento Agrícola
de Temuco A.G.

Temuco, 26 de Enero del 2004

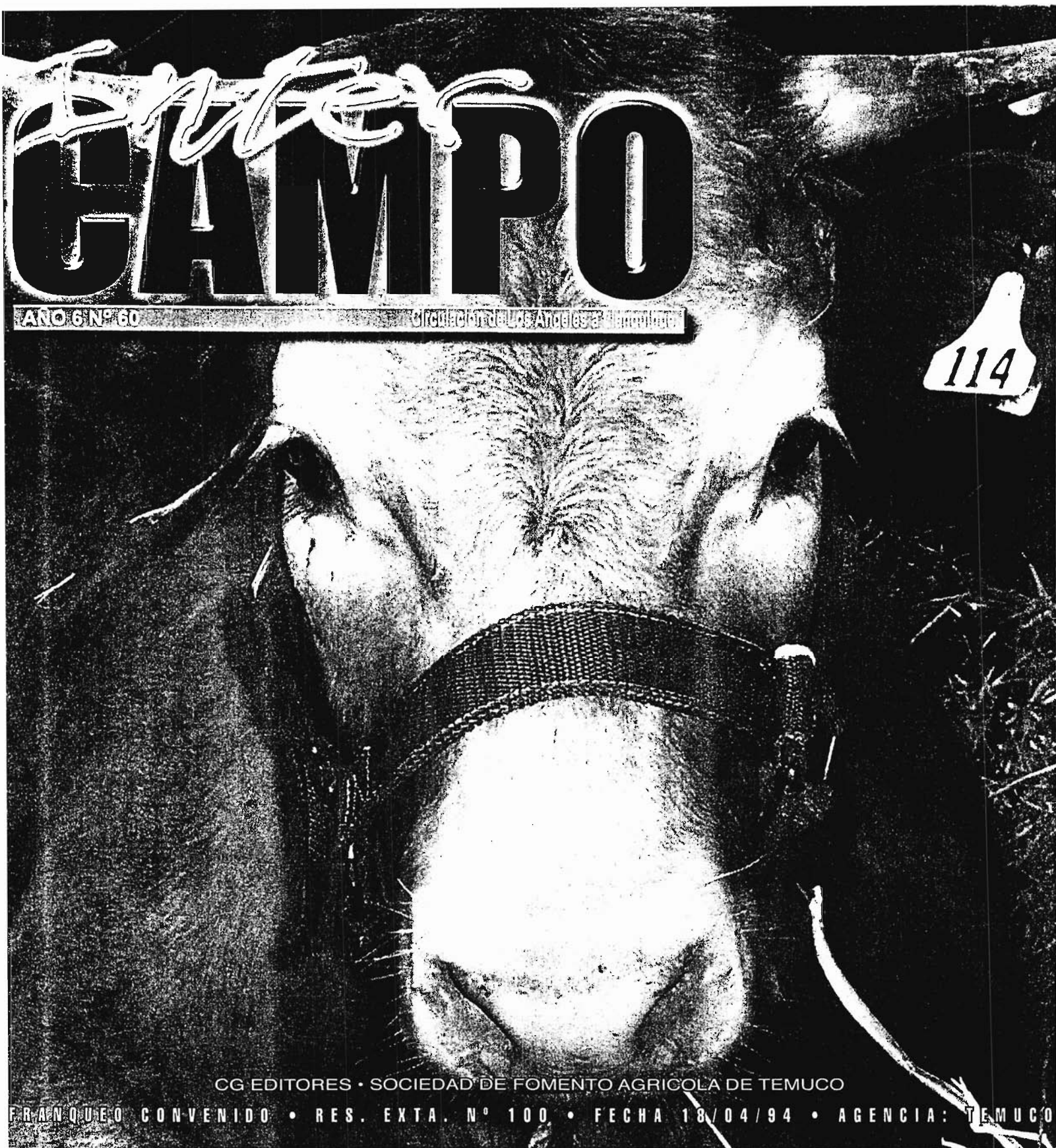
Señores
Fondo de Innovación Agraria
Presente

De mi consideración:

Por medio de la presente, certifico que la Srta. **Pamela Poblete** elaboró el artículo **“SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES DE TORO Y SU UTILIDAD”**, publicado en la Revista InterCampo N° 60 de la Sociedad de Fomento Agrícola de Temuco A.G. en Noviembre del 2003.

Saluda Atte. a Uds.,

Rene Araneda Amigo
Secretario General
SOFO



Entre CAMPO

AÑO 6 N° 60

ORGANO DE LA AGRICOLA DE TEMUCO

CG EDITORES • SOCIEDAD DE FOMENTO AGRICOLA DE TEMUCO

FRANQUEO CONVENIDO • RES. EXTA. N° 100 • FECHA 18/04/94 • AGENCIA: TEMUCO

11|Análisis de los Errores 04|Seminario: Producción y Comercialización de Ovinos
12|Crisis Chilena 15|Informe Económico: Carne, Cultivos y Leche 21|Informe de Coyuntura: Trigo N° 81
24|Artículo: El Mercado del Trigo 27|Actividades: 27|Octubre - Noviembre

SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES de toro y su utilidad

Desde que comenzó la historia de la inseminación artificial en el siglo XVIII se han desarrollado técnicas, generalmente empíricas, para optimizar los resultados obtenidos a través de ésta. El espermatozoide de toro, de fácil congelabilidad relativa, fue tomado como modelo celular de comportamiento frente al complejo proceso de congelado y descongelado.

Los recientes avances en el conocimiento y comprensión de la estructura y función de las membranas de estas células han permitido descubrir que hay diferencias entre los espermatozoides que llevan el cromosoma Y (macho) y los que llevan el cromosoma X (hembra). El espermatozoide X tiene un 3,8% más de ADN que el espermatozoide Y, es decir, la técnica desarrollada por el Dr. Larry Johnson permite predeterminar con un 85 a 95% de seguridad el sexo del ternero obtenido por inseminación artificial, mediante la separación los espermatozoides Y de los X por diferencia de peso.

La compañía que ofrece este servicio ha logrado que este método sea repetible y por ende comercialmente viable.

Otra ventaja de esta técnica es que las dosis usadas contienen sólo 6.000.000 de espermatozoides por pajuela, mientras que la técnica tradicional, en la cual hay sólo un 50% de probabilidades que el ternero sea macho, necesita una dosis mínima de 20.000.000. Es importante considerar que de acuerdo a estudios realizados en Holanda se comprobó que este tipo de semen es recomendable sólo en vaquillas con celo sincronizado, no así en vacas en etapa de lactancia y alcanza alrededor de un 50% de preñez con una dosis. Esto puede ser considerado como una desventaja del sistema ya que para preñar 87 vaquillas de 100 habría que considerar hasta 200 dosis, es decir 2,3 dosis por preñez (87% de preñez). Pero si se toma en cuenta que entre un 85 a 95% de estos terneros serán machos podría considerarse como una inversión válida e interesante en la crianza de animales de carne.

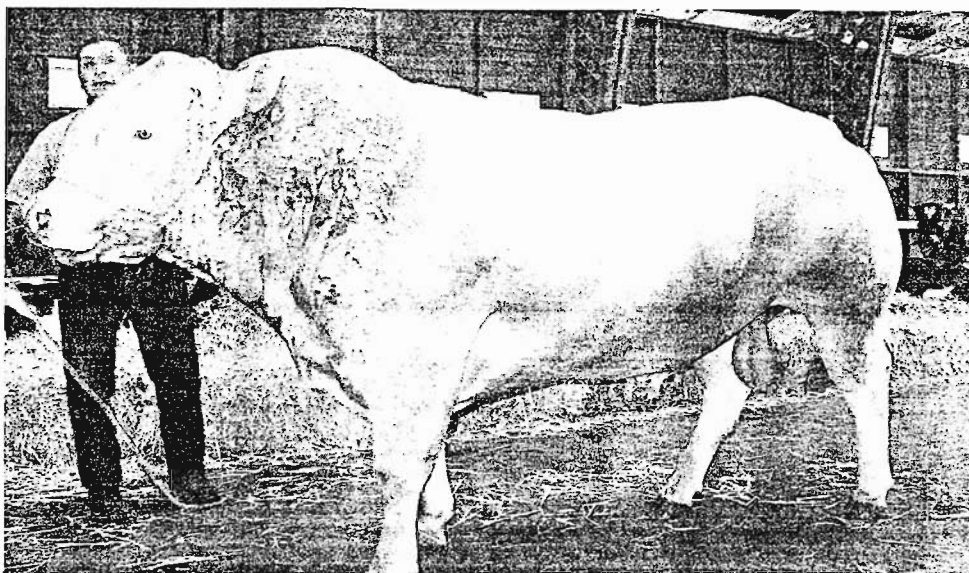


Tabla 1. N° y % de preñez con semen secado v/s semen control

N° espermatozoides / lugar	N° vaquillas inseminadas	N° preñeces
1,0 - 1,5 x 10 ⁶ / cuerpo uterino	176	98 (56%)
3,0 x 10 ⁶ / cuerpo uterino	171	88 (51%)
20 x 10 ⁶ / cuerpo uterino (control)	183	124 (68%)
1,0 - 1,5 x 10 ⁶ / cuerpo uterino	163	70 (43%)
1,0 - 1,5 x 10 ⁶ / cuerpo uterino	158	85 (54%)
20 x 10 ⁶ / cuerpo uterino (control)	128	79 (62%)

Seidel Ge Jr., Herickhoff L.A. y col. (1999)

Pubertad

- Es un terremoto hormonal
- Cambios físicos y de comportamiento
- Edad
- Raza
- Social
- Madurez

