

FERTILIDAD Y SUPERVIVENCIA DEL SEMEN CANINO CRIOPRESERVADO

MA Stornelli, RL de la Sota

Instituto de Teriogenología
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: *En la presente revisión se tratan los procedimientos de evaluación seminal, los aspectos más importantes de la criopreservación de semen en el perro y el alcance de la valoración in vitro de la calidad de semen al descongelado. Se realiza también la evaluación de los alcances de la inseminación artificial con semen criopreservado en esta especie.*

PALABRAS CLAVES: Semen congelado-criopreservación-evaluación de semen- caninos

FERTILITY AND SURVIVAL OF CANINE SEMEN CRIOPRESERVATION

ABSTRACT: *Semen evaluation, criopreservation, and artificial insemination with frozen semen in canines are reviewed. Factors influencing the fertility of stored semen and methods used for improvement are discussed.*

KEY WORDS: Frozen semen-criopreservation- semen evaluation-canine

Fecha de recepción: 16/11/05

Fecha de aprobación: 12/03/07

Dirección para correspondencia: M. Alejandra Stornelli, Instituto de Teriogenología. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA. Tel: +54-221-4236663/4, ext. 457. Fax: +54-4257980.

E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie.

La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (1). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (2).

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (3, 4, 5). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (6) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954, Rowson (7) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (8) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación de semen han aumentado en forma creciente. Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas. En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la descongelación, a la técnica de IA implementada y a la detección del momento de mayor fertilidad están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (9, 10, 11, 12, 13). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en este área. (12, 14). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen

congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios.

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (15, 16).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL Y PREDICCIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE

Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática. Sin embargo, es imposible reemplazar las pruebas de campo, pues las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente que ocurrirá cuando se encuentren óvulo y espermatozoide *in vivo* (15, 17). Los métodos más precisos para evaluar la capacidad de fecundante del semen luego de ocurrido un proceso de criopreservación son las pruebas de campo, es decir la inseminación de un gran número de hembras (18). Este hecho fue posible en los animales de granja (19, 20, 21). Sin embargo, en pequeños animales las pruebas de fertilidad a campo son difíciles de implementar ya que usualmente solo un pequeño número de hembras está disponible para el estudio, razón por la cual poseen baja sensibilidad.

PRUEBAS DE CONTRASTACIÓN SEMINAL

Las pruebas *in vitro* de evaluación seminal pueden relacionarse con la morfología o viabilidad espermática (22). Las pruebas que se relacionan con el estudio morfológico del espermatozoide se considera que reflejan la producción espermática y el almacenamiento extragonadal. Las pruebas que evalúan la viabilidad espermática proveen información no solo de la calidad espermática del semen producido sino también del efecto causado por el estrés de la recolección y la criopreservación (23, 24). Los procesos de congelación y descongelación someten a los espermatozoides a diferentes tipos de estrés provocando daños de membrana, alteración del metabolismo espermático y pérdida de la motilidad, factores que afectan la capacidad fecundante del semen (25, 26, 27, 28).

EVALUACIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (27, 28). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (25, 27, 33). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Existen variadas metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Una de estas metodologías está representada por tinciones que permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos en base a la permeabilidad de membrana a los colorantes vitales. Las células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Watson 1990). Algunos ejemplos de coloraciones vitales son eosina-nigrosina, eosina azul de anilina, azul tripán (34). Existen también tinciones que permiten evaluar simultáneamente viabilidad espermática e integridad acrosomal. La triple tinción utilizando azul tripán, marrón bismark y rosa de bengala permite observar si la membrana plasmática de la célula conserva la permeabilidad selectiva no permitiendo el paso del azul tripán así como también la integridad del acrosoma el cual si está presente en la célula se teñirá con rosa de bengala pudiendo observarse si está íntegro o si está dañado (3, 5). También pueden emplearse sustancias fluorescentes permeables como marcadores de integridad de membrana, por ejemplo yoduro de propidio o bisbencimida (propidium iodide o bis-benzimide) combinado con Isotiocianato de fluoresceína usando microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides que han perdido la permeabilidad selectiva de membrana dejan pasar al yoduro de propidio y se observan rojos (35). La aplicación del citómetro de flujo permite realizar una evaluación exacta y objetiva de la célula espermática mediante la aplicación de pruebas fluorescentes (36). Sin embargo el costo de los equipos impide el uso de esta técnica en muchos laboratorios de investigación y centros comerciales. Una prueba sencilla, poco costosa y que posee buena correlación con la capacidad fecundante del semen es la prueba de endósmosis positiva (EP). En esta prueba los espermatozoides son expuestos a una solución hipotónica la cual produce el hinchamiento celular por entrada de

agua a la célula, induciendo de esta manera el enrollamiento de la cola de los espermatozoides que poseen membrana plasmática intacta (37, 38).

Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica. El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización. La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lectinas marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (39,40). Dentro de las lectinas marcadas con fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (39). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC (41).

MOTILIDAD

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la criopreservación. Los espermatozoides necesitan ser motiles y capaces de sufrir hiperactivación para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito cuando ambas células se encuentran en el oviducto. La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. Sin embargo debe tenerse en cuenta que es el parámetro más influenciado por el operador (22). El sistema de análisis computarizado de semen (CASA, Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática (29, 30) y permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (e.g. espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (31). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración (32). Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática.

Proceso de criopreservación espermática

El semen puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (26). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (42, 43). En 1956, Harrop (6) comunica la primera preñez en caninos con semen refrigerado a 4° C durante 4 días usando un diluyente a base de leche. Desde entonces varios diluyentes han sido probados para su uso con semen canino (44, 45, 46). Uno de los diluyentes más comúnmente usados es el Tris-citrato conteniendo 20% de yema de huevo (TYH) (45, 78), el cual permite el uso de semen refrigerado con buena capacidad fecundante durante 24-48 horas pos-refrigeración, obteniéndose porcentajes de preñez aceptables (62,5%; Fosberg 91, 46). Este diluyente se ha comparado *in vitro* con diluyentes preparados en base a leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en cuanto a la conservación de motilidad espermática e integridad de membrana (46). El MRA® (glucosa, EDTA, citrato de sodio, acetato de potasio, aminoglucósidos, excipiente tampón), es un diluyente que posibilita buena conservación del semen porcino tanto en relación a la viabilidad espermática como a la preservación de la capacidad fecundante (27, 48). Este diluyente con el agregado de 20% de yema de huevo permitió obtener en caninos, parámetros seminales (porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto) significativamente mayores que el TYH cuando el semen fue refrigerado durante 24, 48 o 72 hs tanto a 4° C como 15° C (78). Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C (47). Sin embargo no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (78).

Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenamiento son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración (50). El semen refrigerado, no requiere el uso de equipos sofisticados para su preparación y puede utilizarse mediante la aplicación de IA vaginal (2, 12). Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen canino y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a

la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C o 15°C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (12).

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos (40).

Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen refrigerado es una práctica rutinaria, sin embargo no ocurre lo mismo en Sudamérica.

Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, factores que pueden determinar, en el futuro, su uso rutinario en Sudamérica, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos.

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco. Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (28).

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática (51). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundantes en la población de espermatozoides sobrevivientes luego del proceso de criopreservación (27, 28). Existen variados tipos de daños asociados tanto al enfriamiento propiamente

dicho como a los componentes de un diluyente. Estos daños están relacionados con los cambios de temperatura (shock de frío), la toxicidad de los crioprotectores y la formación y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular (26,52, 53, 54, 55). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de la membrana así como el metabolismo y la función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (56).

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (8, 57,). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (3, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen, habiendo sido utilizado también el dimetilsulfoxido (DMSO) (61, 65). Existen otros compuestos como el dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (64,66, 67, 68,).

La yema de huevo es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío y es generalmente incluido en los diluyentes utilizados para criopreservación. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (69, 70). El compuesto activo en la yema de huevo es la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (54). Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejora el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (68, 71, 72, 73). Compuestos detergentes que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) solos o como un componente del Equex STM® paste (detergente comercial) han sido incluidos en diluyentes de semen usados para la congelación de semen canino (12, 43, 74, 75). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia espermática al descongelado (64, 68, 40) así como la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos (76, 77, 78). Peña (68), observó un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al utilizar dos pasos de dilución en el protocolo de congelación cuando incorpora Equex STM paste al diluyente. Sin embargo no se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad espermática al descongelado. Notlthing (79) obtuvo altos porcentajes de preñez mediante IA intravaginal con semen criopreservado utili-

zando un diluyente con el agregado de Equex STM paste. Así mismo Rota (80) obtuvo buenos resultados utilizando inseminación artificial intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste. Sin embargo no existen estudios de fertilidad en relación con las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en la formulación de los diluyentes.

Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino (81, 82). Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (83). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos (83). La suplementación del diluyente con azúcares influencia la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. El tipo y localización del impacto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (83, 84, 85, 86, 87).

La trealosa es usada como una molécula protectora en la estabilización celular durante la congelación. Durante la congelación ocurren fenómenos de deshidratación celular. Este azúcar es acumulado en altas concentraciones (superiores al 20%) en muchos organismos capaces de sobrevivir a la deshidratación completa. Por ejemplo las levaduras utilizadas en panadería, las cuales han sido estudiadas exhaustivamente, no sobreviven a la desecación durante la fase de crecimiento logarítmico (en la cual no poseen cantidades significativas de trealosa), pero durante la fase estacionaria ellas acumulan este azúcar y pueden desecarse satisfactoriamente (88, 89).

Se ha comunicado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado en espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con trealosa (90, 91, 92). Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce y su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (85, 86).

Por debajo de aproximadamente -5°C , las células y el medio que las rodea permanece no congelado gracias al superenfriamiento y al descenso del punto de congelación producido por los solutos protectores presentes frecuentemente en el medio externo. Es así que el contenido de la célula permanece no congelado y superenfriado, presumiblemente pues la membrana plasmática bloquea el desarrollo de cristales de hielo dentro del citoplasma. El agua superenfriada de la célula, tiene por definición un potencial químico

mayor que el agua parcialmente congelada existente en el exterior de la célula. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo (87). Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. Si el enfriamiento es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua y concentrar suficientemente los solutos para eliminar el superenfriado y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior (93).

Los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (85, 88, 94). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular por la cristalización del hielo (91, 95).

El mayor grado de estrés sufrido por los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana resulta en una transición de fase termotrópica, fusión y aumento de la permeabilidad de membrana. Debido a que el agua, ligada al hidrógeno de los grupos polares de las cabezas, es removida por la deshidratación aumenta la temperatura de transición (T_m) de gel a líquido cristalino. Sin embargo la solubilidad fosfolipídica de la fase gel está siempre disminuida relativamente en comparación con lo que se observa en la fase líquida cristalina y podrían existir diferencias de sensibilidad en la T_m en el estado de hidratación lo cual puede resultar en separación fosfolipídica (85). La trealosa posee una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (84, 85, 88, 96) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (14). Este azúcar muestra una interacción directa con los fosfolípidos de las cabezas de los grupos polares durante la desecación y congelación, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que se relacionaría con la disminución de T_m (84, 96). El agregado de trealosa al diluyente utilizado para la congelación de semen canino podría mejorar la viabilidad espermática al descongelado (97).

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fertilización (98).

La membrana plasmática es considerada como el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (99). En humanos, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica fue estudiada mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) y se observó una correlación positiva entre los daños observados y la fertilidad (100). En caninos se han estudiado los cambios ultraestructurales presentes en las cabezas espermáticas usando MET (40). Cuando se compararon los dos métodos de congelación (Congelación en termo de nitrógeno vs congelación sobre vapores de nitrógeno líquido) utilizados para criopreservar semen en caninos (44,80) no se observaron diferencias entre los métodos, y ningún método provocó daño más extenso que el otro, ni mejoró significativamente la calidad espermática al descongelado. Sin embargo en ambos métodos se observaron importantes cambios a nivel de las cabezas en el semen congelado, lo cual puede causar reducida longevidad espermática y explicar las bajas tasas de concepción obtenidas con IA intavaginal en comparación con IA intrauterina cuando se usa semen congelado (40, 101). Estudios dirigidos a caracterizar el tipo y extensión de los cambios ultraestructurales presentes en espermatozoides caninos congelados con diferentes diluyentes podrían ayudar a desarrollar nuevos diluyentes prediciendo en forma más segura la fertilidad de ese semen. El semen congelado puede ser almacenado por largo tiempo en bancos de semen y preservar así material genético, es así que un reproductor puede ser usado mucho tiempo después de su muerte.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO

Tres puntos conforman las llaves del éxito para obtener buenos resultados con la implementación de IA en caninos: 1) Determinación del momento óptimo para la IA, 2) Uso de semen de buena calidad, 3) Uso de una adecuada técnica de IA (12).

El semen congelado luego de la descongelación posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de estrés que pueden producir variados cambios en el espermatozoide (102, 103). Es así que en caninos, si se usa semen congelado, la IA debe realizarse entre el día 4 y 7 del estro, ya que este es el período óptimo para la concepción. En este momento, el espermatozoide posee altas probabilidades de interactuar con ovocitos fértiles en relación al tiempo de vida de los mismos (10).

La IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe

considerarse un protocolo de criopreservación que no solo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (102). En el perro se estima que entre 150 y 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (34).

Debido a la corta sobrevivencia de los espermatozoides congelados en comparación con el semen fresco, el uso de IA intrauterina aumenta las posibilidades de preñez. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

CONCLUSIONES

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Procesos adecuados de criopreservación determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y un mayor tamaño de camada. Con el desarrollo de la criopreservación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes

posibilidades en el futuro.

Por otra parte la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica reproductiva diaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod Nutr Develop.* 2000; 40:505-512.
2. Fastard W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 2000; 53:175-186.
3. Peña Martínez AI. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. 1997.
4. Spallanzani L. *Observatione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell' homo e degli animali.* Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola. II. Modena. 1776; (citado por, Peña, 1997).
5. Stornelli MC, Stornelli MA, Savignone C, Beluzan I, Arauz MS, De La Sota, R.L. Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen. *Braz. J. Anim. Reprod.* 2001; 25:464-466.
6. Harrop AE. Artificial Insemination in a bitch with preserved semen. *Brit. Vet. J.* 1956; 110:424-425.
7. Rowson LEA. infertility of cow, sow and bitch. *Irish Vet. J.* 1954; 8: 216-221.
8. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest;* 1969; 17:6-7.
9. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of the results obtained with an intravaginal and an intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:323-327.
10. Fosberg CL, Fosberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:299-310.
11. Fosberg CL, Fosberg M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:313-323.
12. Fosberg CL. Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 1995; 10:48-58.
13. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, Kirk RW. Artificial insemination of Beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 1970; 31:1807-1813.
14. Johnston DJ, Kuztritz MVR.; Olson, P. Canine

- and feline Theriogenology. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 2001; p.287-306.
15. Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality. An opinion. *J. Androl.* 1993; 14:397-406.
 16. Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris, G.J.; Clarke, A. (ed). *Effects of low temperatures on biological membranes.* Academic Press. Orlando. Fla. 1981; 189-417.
 17. Larson B, Rodriguez-Martinez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 61:327-336.
 18. Amann RP. Can be the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 1989; 10: 89-98.
 19. Chupin D, Schuh H. Survey of a present status of artificial insemination in developing countries. *Wild Anim. Rev.* 1993; 74:26-35.
 20. Chupin D, Thibier M. Survey of the present status of artificial insemination in developed countries. *Wild Anim. Rev.* 1995; 82:58-68.
 21. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (Review). *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 37:185-249.
 22. Saacke RG. Components of semen quality. *J. Anim. Sci.* 1982; 55:1-13.
 23. Saacke RG. Semen quality in relation to semen preservation. *J. Dairy Sci.*, 1983; 66:2635-2644.
 24. Xia-Zou C, Ming-Yang Z. Evaluation of sperm quality freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology.* 2000; 53:1477-1488.
 25. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 1970; 168:939-949.
 26. Strom Holst B, Larson B, Fosberg L, Rodriguez Martinez H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 2000a; 119:77-83.
 27. Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing. *J. Thermal Biol.* 1976; 1:137-141.
 28. Watson PF. The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* Oxford University Press. 1979; 1:283-350.
 29. Irvine S. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod.* 1995; 10 (1):53-59.
 30. Vestergren J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57:149-179.
 31. Holt C, Holt WV, Moore HDM. Choice of operating condition to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer assisted semen analysis. *J Androl.* 1996; 17:587-595.
 32. Stornelli, M A.; Arauz, M.S.; Baschard,; De LA Sota, R.L.;(2003). Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency. *Reproduction in Domestic Animals.* 38 (1): 1-4.
 33. Mazur P, Leivo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exper. Cell Res.* 1972; 71:345-355.
 34. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 1991; 21:545-551.
 35. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol. Reprod.* 1986; 34:127-138.
 36. Harrison RPA, Miller NGA. Applying flow cytometry to the investigation of live and sperm suspensions. *Proc. BAS Advances topics in andrology. Sperm Biology, New techniques, New Insights.* 1998; 1-3.
 37. Hideki F, Masashi I, Takasashi K. Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 1993; 38:311-315.
 38. Rodrigez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology.* 1994; 44:885-900.
 39. Kawakami E, Vandevootrt CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW. Comparison of fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm. *J. Exp. Zool.* 1993; 265:599-603
 40. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, de la Sota RL Inseminación con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria.* 2001, 21(1): 58-66.
 41. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:755-763.
 42. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1977; 49:277-284.
 43. Quinn PJ, Chow PJW, White IG. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fert.* 1980; 60:403-407.
 44. Andersen K. Artificial insemination and storage of canine semen. En: Morrow, D.A. (ed.): *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals.* W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 1980; 661-665.
 45. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. En: Kirk RW. (ed). *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice.* W.B. Saunders, Philadelphia (United States). 1989; p.1247-1259.
 46. Rota A, Strom B, Fosberg CL. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995; 44:885-900.

47. Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. 1990; 34:147-157.
48. Paquignon, M.; Bariteau, J.; Boussiere, M.; Courrot, M. (1979). Conservation prolongée du sperm frais du verrant. *Journées Rech. Porcine en France*. 1: 323-328.
49. Roca J, Martinez,S, Vazquez JM, Lucas X, Parilla I, Martinez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 64:103-112.
50. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:481-492.
51. Rota A, Peña AI, Fosberg LC, Rodríguez Martínez H. In vitro capacitation fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 1999; 57:199-215.
52. Rota A, Strom B, Fosberg CL, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 1997; 47:1093-1101.
53. Gao GY, Liu J, Liu C, Mcgann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 1995; 10:1109-1122.
54. Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Linde Fosberg C, Rodriguez Martinez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of select elements. *Reprod. Dom. Anim.* 1998;33:77-82.
55. Strom Holst B, Larson B, Fosberg L, Rodriguez Martinez H. Evaluation of chilled and frozen -thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 2000b; 119:201-206.
56. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
57. Andersen K. Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet. Scand.* 1972; 13:128-134.
58. Battista M, Parks J, Concanon P. Canine sperm post thaw survival following freezing in straws or pellet using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. (ICAR)* 1998; 3:229.
59. Davies PR. A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs. (Doctoral Thesis). University of Sidney. 1982.
60. England GCW. The cryopreservation of dog semen. (Doctoral Thesis). Royal College of Veterinary. University of London. 1992.
61. England GCW. Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:243-255.
62. Fastard W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 1984; 25:561-565.
63. Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 2001; 56:801-815.
64. Rota A, Strom B, Fosberg CL, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 1997; 47:1093-1101.
65. Fastard W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42:251-260.
66. Koutsarova N, Todorov P, Koutsarov G. effect of pentoxifyline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1997; 51:117-121.
67. Peña Martínez AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG, Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1998; 35:5-9.
68. Peña A; Forsberg, LC. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54:859-875.
69. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and termotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1991; 91:451-461.
70. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 1998; 246:305-314.
71. Arriola J, Foote RH, Glycerolation, and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 1987; 70:1664-1670.
72. Graham EF, Rajamannan AHJ, Schemehl MKL, Maki-Laurila M, Bower RE. Fertility studies with frozen board spermatozoa. *A.I. Digest.* 1971; 19:6-7.
73. Pendfold LM, Moore HDM. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99:131-134.
74. Fosberg CL, Strom B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*. 1999; 52:11-23.
75. Nothling JO, Volkman DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 51:109-116.
76. Stornelli MC, Stornelli MA, Savignone C, Beluzan I, Arauz MS, de la Sota RL. (2001). Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*. 25 (3): 464-466.
77. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*. 25 (3): 468-470.
78. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL. (2002). Effects of two different temperatures and three different extenders

- on survival and longevity of chilled canine semen. *Theriogenology* 57: 483 abstr.
79. Nothling JO, Gerstenberg C, Volkman DH. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 1995; 66:49-55.
80. Rota A. Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences; 1998.
81. Norton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:311-316.
82. Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 1979; 1:283-350.
83. Strom Holst B. In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post thaw survival time and pellucida capacity. (Doctoral Thesis); 1999.
84. Bakas LS, Disalvo. E.A. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*. 1991; 28:347-353.
85. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. California. 1989; 219-229.
86. Stornelli. MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MA, Tittarelli C, and R.L. de la Sota. (2003). Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Bras. J. Anim. Reprod.* 27 (3): 359-361.
87. Watson PF, Duncan. Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988; 25:131-142.
88. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The threalosa myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 2001; 43:89-105.
89. Argüelles JC. Physiological roles in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 2000; 174:217-224.
90. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 2000; 53:1053-1061.
91. Aisen EG, Medina VH, Venturino, A. Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 2002; 57:1801-1808.
92. Juliani GC, Snoeck PPN, Henry M. The effect of threalose ou rafinose associated to acetamide/methylulose on post thaw equine sperm viability. *Braz. J. Anim. Reprod.* 2003; 27:355-356.
93. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984; 247:125-142.
94. Aisen,E.; Cisale, H.; Fernández, H. Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. *Vet. Arg.* 1990, 63:1
95. Chen T, Fowler A, Torner M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*. 2000, 40:277-282.
96. Yildiz C, Kaya A, Askoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 2000; 54:579-585.
97. Yanagimachi R. The physiology of reproduction. En: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. 1994; 189-317.
98. Morris GJ. Liposomes as a model system for investigating freezing injury. En Morris, GJ, Clarke A. (eds). *Effects of low temperature on biological membranes*. Academic press, London. 1981; 241-262.
99. Mahadevan MN, Trouson A O. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fert. Ster.* 1984; 41:287-293.
100. Oettlé EE. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Med. Ve. Rev.* 1998; 59:28-70.
101. Tsutsui T, Shimizu O, Ohara N. Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *J. Vet. Med. Sci.* 1989; 51:257-263.
102. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Laming, G.E. (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 2. Reproduction in the male. Churchill Livingstone. Edinburgo. 1990; 747-869.
103. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7:781-791.