

Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo

Savignone, C.A.^{1,2}; Tittarelli, C.M.²; Stornelli, M.C.²; Gimenez, F.²; de la Sota, R.L.²; Stornelli, M.A.²

RESUMEN

La criopreservación de semen y su posterior utilización mediante inseminación artificial en caninos es una biotecnología reproductiva que se encuentra en pleno desarrollo. Los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular de los espermatozoides. El estudio de la acción de diferentes sustancias adicionadas a los diluyentes, su efecto sobre la criopreservación del eyaculado y el desarrollo de nuevos protocolos de congelación, con el fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado, posibilitará en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología. En este trabajo se analiza y discute la acción de los diferentes componentes incluidos en los diluyentes utilizados para la criopreservación de semen canino.

Palabras clave: semen – canino - criopreservación

SUMMARY

Semen cryopreservation and their later use by artificial insemination in canine are a reproductive biotechnology in development. Cryopreservation process induces sperms membranes and cellular metabolism alterations. The study of action of different substances added to extenders, their effect on the cryopreservation processes and the development of new freezing protocols, with obtaining better results during the freeze-thaw process, it will facilitate in the future the frequent application of this biotechnology. The action of different extender components used for cryopreservation of canine semen is analyzed in this work.

Keywords: semen – canine - cryopreservation

INTRODUCCIÓN

El uso de distintas biotecnologías reproductivas en la especie canina se encuentra en pleno desarrollo y su uso es aún poco habitual. La preservación del semen, luego de su recolección, por medio de la adición al mismo de un diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación), permite detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (82) para su posterior utilización mediante técnicas de inseminación artificial (IA). 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 la implementación de bancos de semen criopreservado e IA con semen congelado.

La IA no es un método nuevo en caninos, ya en 1787 fue descrita por Lazaro Spalanzani quien usó semen fresco

(49). Sin embargo debieron pasar casi dos siglos hasta que, en 1956, Harrop obtuvo la primera preñez con semen refrigerado (30). Una década más tarde, en 1969, Seager comunica la primera IA con semen congelado (60).

En los países desarrollados la IA con semen congelado en caninos es aplicada cada vez más frecuentemente debido a las posibilidades que ofrece. A partir del año 1969, cuando se registra el primer nacimiento de una camada obtenida a partir de IA con semen congelado (60), ha aumentado el interés de los especialistas en reproducción y criadores de perros por esta biotecnología estimulando el estudio de este tema y facilitando su desarrollo (63). Como consecuencia de estos avances se han creado bancos de semen en universidades y entidades privadas en diferentes lugares del mundo (16, 45). Estos bancos de semen proveen un reservorio de material genético de suma importancia en la preservación

de caracteres fenotípicos de diversas razas, previniendo cualquier posibilidad de desaparición futura, tanto por motivos ecológicos, sanitarios o catástrofes naturales.

La IA con semen criopreservado permite trabajar con dos reproductores en localizaciones geográficas distantes sin necesidad de transportarlos, lo cual brinda grandes ventajas para los criadores. Así mismo, la congelación de semen en caninos hace posible la conservación del material genético del macho y el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental, así como aumenta las posibilidades de preservación de cánidos silvestres en vías de extinción (18, 19, 21).

Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, permite la selección objetiva del material genético, posibilitando el mejoramiento de patrones

¹ Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Calle 60 y 118. B1900AVW La Plata. Buenos Aires. Argentina.
E-mail: csavign@fcv.unlp.edu.ar (Savignone, CA)

² Instituto de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP

Este trabajo está incluido en un plan de investigación subsidiado económicamente por UNLP; V11/134 a RLS

Recibido: 3/10/06 Aprobado: 20/1/07

fenotípicos caninos gracias a su utilización mediante IA en la práctica reproductiva diaria.

A pesar del desarrollo creciente de estas técnicas, las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado en caninos son aún poco satisfactorias (20, 25, 37, 39).

Los resultados obtenidos utilizando diversas técnicas de IA (intravaginal, intrauterina transervical o intrauterina quirúrgica) (17, 43, 83, 84) son dispares, variando entre un 40% y un 70% (38, 46, 55, 61, 62, 64, 66). Estas variaciones pueden deberse a factores relacionados directamente con la calidad del semen utilizado, con el momento de la inseminación (momento de mayor fertilidad de la hembra), o con la técnica de IA empleada (30, 32, 37, 40). Debido a la corta sobrevida 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 del cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica (40). Stornelli y col. (65, 66) evaluaron la fertilidad obtenida utilizando, mediante inseminación intrauterina con catéter noruego, semen canino congelado-descongelado con un diluyente TRIS base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM Paste. Los resultados mostraron que las perras inseminadas con un diluyente TRIS base con el agregado de 1,5% de Equex STM Paste, presentaron un porcentaje de preñez (71,4% vs. 42,8%) y un número de embriones gestados (2,14 vs. 1,14) numéricamente superiores a las perras inseminadas con el diluyente sin el agregado de Equex STM Paste.

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular así como pérdida de la motilidad espermática, provocando disminución de la fertilidad al descongelado (29, 82). Este hecho se encuentra relacionado con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y a los pocos estudios realizados en esta especie si la comparamos con las especies de producción. Constantemente se

modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la criopreservación de semen canino con el fin de obtener una alta sobrevida de espermatozoides al descongelado y una prolongada vida fértil del material depositado en el útero de la perra, obteniendo de esta manera tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. Estos hechos se encuentran íntimamente relacionados con la conservación de la integridad estructural y fisiológica del espermatozoide al descongelado (32).

El continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de congelado y descongelado, así como la aplicación de metodologías para la congelación de semen canino que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología, mejorar la práctica reproductiva diaria y aumentar las posibilidades de preservación de cánidos en peligro de extinción.

FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Para obtener una criopreservación satisfactoria, garantizando la conservación de la integridad estructural y fisiológica de los espermatozoides al descongelado y una mayor sobrevida de los mismos en el tracto genital femenino, se deben considerar una serie de factores, relacionados con la utilización de procedimientos apropiados de dilución, congelación y descongelación (31).

Los cambios ocurridos durante la congelación-descongelación en las membranas del espermatozoide son similares a los producidos durante los procesos de capacitación y reducen la longevidad espermática (45, 48). Las modificaciones térmicas que se producen durante los procesos de congelación-descongelación, provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los espermatozoides (82). Los cambios más evidentes son

la pérdida de la motilidad espermática y la pérdida de la integridad acrosómica (51, 54, 77). Otros factores que modifican la integridad de las membranas de los espermatozoides son los relacionados con las características físico-químicas de los diluyentes utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en la célula espermática (13, 14, 36). Entre los factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, se encuentran los cambios de volumen, asociados a cambios en la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular, el estrés térmico, relacionado con los cambios de temperatura (shock de frío), los efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el medio extra e intra celular (23, 24, 78, 79, 81).

Estrés térmico: Shock de frío

El enfriamiento rápido del semen entre 30° C y 0° C induce un estrés letal en algunas células, proporcional a la tasa de enfriamiento, por lo que este proceso debe ser realizado cuidadosamente (80, 82). Un lento enfriamiento también induce estrés sobre la membrana del espermatozoide, relacionado con un cambio de fase lipídica y alteración del estado funcional de la membrana. El shock de frío es visto entonces como la consecuencia de un estrés continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia (33).

El hecho de que el shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins y col. en 1993 (12). Asimismo Holt y North (33) obtuvieron evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación.

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0° C sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5° C y 15° C (12). Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes. Savignone y col. (57) y Stornelli

y col. (69, 70) lograron preservar semen canino a 4°C y 15°C, diluido en un medio comercial (MR-A®) con el agregado de yema de huevo, obteniendo buenos parámetros de contrastación seminal a los 2 y a los 3 días posteriores a la extracción (motilidad progresiva individual: 2d 77,2%, 3d 60,4%; Vigor: 2d 4,2, 3d 3,4; espermatozoides vivos: 2d 67,5%, 3d 52,8%; acrosomas intactos: 2d 71,3%, 3d 55,5%; HOS: 2d 69,6%, 3d 54,8%).

El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (6, 27, 47). La composición lipídica del medio donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, se relaciona con la prevención de los mecanismos de injuria celular (50, 80), debido a que los fosfolípidos (53) y las lipoproteínas de baja densidad (22) poseen un efecto protector contra el shock de frío, actuando sobre la superficie celular estabilizándola (78).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (23). El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (4). Gao y col. (23) han demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas del glicerol durante el proceso de criopreservación. Este procedimiento permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado. Otros compuestos con propiedades crioprotectoras serán analizados más adelante.

FORMACIÓN DE HIELO EN EL MEDIO EXTRA E INTRA CELULAR

El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (81). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevida, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, lo cual es letal para la célula. Es importante considerar aquí que la población espermática, tanto en diferentes especies como en un individuo en particular es muy heterogénea. Un eyaculado posee una diversa población de células con diferentes estados de maduración. Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (28).

DILUYENTES UTILIZADOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

Un diluyente que permita obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación, consiguiendo altas tasas de fertilidad *in vivo* precisa contener azúcares como fuente de ener-

gía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH, antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación (9).

En la última década, se han estudiado muchos diluyentes para la criopreservación de semen canino. Los más utilizados son los que contienen TRIS base, con el agregado de distintas sustancias como por ejemplo crioprotectores (glicerol, propanodiol, etilenglicol, dimetil formamida), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), azúcares no permeables que crean un medio hipertónico (lactosa, sacarosa, trealosa, rafinosa), o azúcares energéticos permeables, capaces de atravesar la membrana plasmática (fructosa, glucosa).

Los crioprotectores utilizados como constituyentes de diferentes diluyentes para la criopreservación de semen pueden ser clasificados como permeables o intracelulares, constituidos por moléculas pequeñas que requieren una mayor concentración para proteger a las células de las crioinjurias, y no permeables o extracelulares (moléculas de mayor tamaño) que ejercen su acción en concentraciones menores (34, 42).

Los azúcares no permeables (trehalosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (1, 10, 11). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (3). La trehalosa posee además una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación (5, 8, 10, 11) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación. Este disacárido ha sido utilizado con éxito en el semen ovino (2, 44). Se han logrado buenos resultados con el agregado de 7,6% de trehalosa al diluyente base, obteniéndose un 64% de motilidad progresiva al descongelado, superando al porcentaje obtenido utilizando el mismo diluyente base

sin el agregado del azúcar (54,3%) (2). El efecto de la adición de este azúcar a un diluyente TRIS base sobre el semen canino al descongelado ha sido poco estudiado (37, 85). Yildiz y col. (85) comunicaron que si bien la adición de trealosa a un diluyente TRIS base ejercía un efecto negativo sobre la motilidad, se observaba cierta acción protectora sobre la integridad acrosómica. Stornelli (65) evaluó el efecto crioprotector de la trealosa sobre el semen canino pero no ha encontrado efectos benéficos al incluir trealosa al diluyente para criopreservar semen canino, obteniendo índices de congelabilidad inferiores con el agregado de trealosa en comparación con el diluyente TRIS base sin el agregado de este azúcar (motilidad progresiva individual: 62,3% vs 73,3%, $P<0.01$; espermatozoides vivos: 74,3% vs 76,9%, $P<0.05$; acrosomas intactos: 71,1% vs 72,8%, $P<0.05$; HOS: 72,9% vs 78,0, $P<0.01$). Sin embargo, con el agregado de 2,5% de trealosa se obtuvieron mayores índices de motilidad progresiva individual (65,0% vs 61,4%), vigor (3,9 vs 3,7) y HOS (74,0% vs 72,5%) en relación a los obtenidos al adicionar mayores concentraciones de trealosa (5%, 7% y 9%) al diluyente TRIS base (72, 73), lo cual se correlacionaría con la concentración del azúcar en el diluyente y la hipertonía del medio. Esto podría explicarse por la sensibilidad del espermatozoide canino al estrés osmótico (15). La utilización de menores cantidades adicionadas al diluyente podría permitir que este azúcar estabilizara las membranas espermáticas evitando el estrés osmótico causado por concentraciones mayores (72). Savignone y col. (58, 59) estudiaron el efecto del agregado de trealosa en concentraciones que no modifican la osmolaridad del TRIS base sobre la viabilidad espermática al descongelado ($<16,5$ mOsm). El semen diluido en TRIS base con la adición de trealosa presentó índices pos-descongelación para motilidad (45,35 vs. 31,7%, $P<0.001$) e integridad de membrana (48,8% vs. 42,3%, $P<0.05$) significativamente superiores al semen diluido con TRIS base sin el agregado del azúcar. Este hecho podría relacionarse con el efecto estabilizador de la membrana producido por este azúcar.

Las sustancias permeables (glicerol, propilenglicol, etilenglicol) tienen como función la remoción de gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo y previniendo de esta manera la ruptura celular. El glicerol es el crioprotector más utilizado para preservar semen (63). Es una sustancia permeable que reduce los daños celulares durante el proceso de criopreservación, aunque es tóxico para los espermatozoides y altas concentraciones de este crioprotector pueden alterar la viabilidad espermática interfiriendo con la capacidad fecundante del semen criopreservado (7, 9, 41). El etilenglicol ha sido usado eficazmente en la criopreservación de embriones bovinos por su mayor permeabilidad (41, 76). Sin embargo, si lo comparamos con el glicerol, el etilenglicol posee mayores efectos tóxicos sobre la célula espermática. La toxicidad de estos compuestos puede ser considerada como uno de los factores responsables de los fracasos ocurridos en ciertas ocasiones con el uso de esta biotecnología (26). Recientes estudios muestran que la adición al diluyente de amidas (dimetil formamida) en diferentes concentraciones en reemplazo de parte del glicerol dan como resultado mejores parámetros de contrastación seminal *in vitro*, al presentar este compuesto menores efectos tóxicos sobre la célula espermática. Este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (26). Savignone y col. (56) evaluaron la eficacia de la dimetilformamida utilizada en reemplazo de parte del glicerol como componente del diluyente TRIS base para la criopreservación de semen canino. Al analizar los resultados obtenidos utilizando dimetilformamida, se observaron efectos negativos sobre motilidad (30.1 ± 1.7 vs 40.4 ± 2.0 , $P<0.001$), integridad de membrana (40.2 ± 1.0 vs 45.5 ± 3.2 , $P<0.01$), e integridad acrosómica (34.3 ± 1.3 vs 42.2 ± 3.2 , $P<0.001$) en relación al diluyente TRIS base sin esta amida. Al analizar la osmolaridad de los medios utilizados se observó que el diluyente TRIS base con el agregado de dimetilformamida presentó mayor osmolaridad que el diluyente TRIS base sin el agregado de amidas (1088 mOsm vs 906 mOsm). Estos resultados

reflejan la marcada sensibilidad del semen canino a la alta osmolaridad (15).

Los detergentes son capaces de solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. Los del grupo alquiliónico, al cual pertenece el dodecil sulfato de sodio (SDS), desnaturalizan la estructura nativa de las proteínas de membrana y las disocian en sus cadenas polipeptídicas. El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Sin embargo se ha observado que este detergente, si se agrega al diluyente en pequeñas cantidades, posee un efecto benéfico sobre la motilidad espermática y la integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (52), gracias a su acción sobre la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo la cual, como ya mencionamos, ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (78). Si se agregan cantidades mayores el detergente que no es utilizado sobre la yema de huevo altera las membranas espermáticas afectando la viabilidad de las células (52).

Se ha utilizado la incorporación de SDS en diluyentes para criopreservación de semen canino (49), observándose un efecto benéfico sobre la supervivencia al descongelado y la integridad acrosómica. Stornelli (65) incorporó Equex STM Paste (compuesto que contiene SDS) a un diluyente TRIS base para la criopreservación de semen canino, obteniendo buenos resultados con la adición de 1,5% de detergente en comparación con la incorporación de concentraciones menores (0,5%, 1%), (motilidad progresiva individual: 77,6% vs 68,5%, $P<0.01$; espermatozoides vivos: 80,2% vs 76,8%, $P<0.05$; acrosomas intactos: 77,4% vs 73,6%, $P<0.05$; HOS: 84,1% vs. 78,5, $P<0.05$). El agregado de Equex STM Paste en mayores cantidades (2%, 2,5%) no mejoró ni afectó en forma negativa los índices de congelabilidad (71), sin embargo se observó mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales en el semen congelado con estas concentraciones. Jurado y col. (35) y Stornelli y col. (67, 68, 74, 75) observaron, mediante microscopía electrónica de transmisión, un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides con alteraciones ultraes-

tructurales en el semen diluido con TRIS base solo en comparación con el semen diluido con TRIS base con el agregado de Equex STM Paste (69,5% vs 53,0%, $P<0,01$). Entre las alteraciones encontradas en el estudio ultramicroscópico del semen descongelado se pueden mencionar hinchazón y formación de pliegues en la membrana plasmática, hinchazón de la membrana acrosomal, contenido acrosomal distribuido en forma no uniforme, formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y plasmática. La microscopía electrónica de transmisión permitió observar la localización de los daños en los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación, y relacionarlos con la disminución que se observa en los parámetros de contracción seminal. Ejemplos de esta relación serían los menores índices de motilidad progresiva individual y porcentaje de acrosomas intactos observados en el semen diluido con TRIS base en comparación con el semen diluido con TRIS base con el agregado de Equex STM Paste, y la observación mediante microscopía electrónica de transmisión de alteraciones en las colas de los espermatozoides y mayores porcentajes de daño acrosomal respectivamente. En relación al porcentaje de Equex STM Paste adicionado al diluyente, las alteraciones ultraestructurales presentaron un porcentaje signifi-

cativamente mayor en el semen diluido con TRIS base y el agregado de 2,5% de Equex STM Paste en comparación con el semen diluido con TRIS base y 1,5 % de Equex STM Paste (79,2% vs 60,0%, $P<0,02$). Por lo expuesto, si bien las observaciones obtenidas a partir de microscopía óptica indicarían que no existen diferencias con el agregado de distintas concentraciones de Equex STM Paste al diluyente, el estudio ultramicroscópico demuestra claramente que los daños aumentan al aumentar el porcentaje de detergente agregado. Esto podría relacionarse con la acción del detergente sobre los lípidos de la yema de huevo, acción que permite proteger al espermatozoide contra el shock de frío (52). Mayores concentraciones de SDS no mejorarán la protección ya que una vez que el detergente actuó sobre la totalidad de los lípidos de la yema presente en el diluyente el efecto protector no variará, pero si aumentarán los daños ultraestructurales. Es así que el efecto benéfico del detergente se observará hasta que la cantidad adicionada sea tal que comience a actuar sobre las membranas de la célula espermática (52).

CONCLUSIONES

La evaluación *in vitro* de la calidad del semen al descongelado, permite estimar

la eficacia de un diluyente para proteger a los espermatozoides de la agresiones a las que son sometidos durante los procesos de congelación. Sin embargo, sólo una prueba de fertilidad a campo permitirá evaluar si los cambios realizados en la constitución de un diluyente mejorarán la criopreservación del eyaculado, permitiendo conservar un alto porcentaje de espermatozoides con capacidad fecundante y lograr así altas tasas de preñez y buen tamaño de camada.

Durante los últimos 50 años los avances obtenidos en la criopreservación de semen han tenido un profundo impacto sobre la biotecnología reproductiva humana y animal. Sin embargo muchos tópicos sobre la criopreservación de semen permanecen oscuros. Futuras investigaciones sobre este tema permitirán obtener nuevos avances en el área. La adición de nuevas sustancias al diluyente podría proporcionar nuevas posibilidades de uso de semen congelado en la especie canina. La combinación de distintas sustancias, adicionadas al diluyente TRIS base, podrían demostrar que la acción protectora conjunta de estas sustancias, cada una de manera diferente y con diferente impacto sobre la célula, podría resultar benéfica para la protección de los espermatozoides caninos en el proceso de congelación-descongelación.

Referencias bibliográficas

1. Aisen, E.; Cisale, H.; Fernández, H. (1990). Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. Vet. Arg. 63:177-182.
2. Aisen, EG.; Alvarez, HL.; Venturino, A.; Garde, J. (2000). Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 53:1053-1061.
3. Aisen, EG.; Medina, VH.; Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. Theriogenology 57:1801-1808.
4. Aitken, RJ.; Wang, YF.; Liu, J.; Best, F.; Richardson, DW. (1983). The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. Int J Androl. 6:180-193.
5. Bakas, LS.; Disalvo, EA. (1991). Effect of Ca^{2+} on the cryoprotective action of trehalose. Cryobiology 28:347-353.
6. Butler, WJ.; Roberts, TK. (1975). Effects of some phosphatidyl compounds on board spermatozoa following cold shock or slow cooling. J Reprod Fertil. 43:183-187.
7. Cardoso, RCS.; Silva, AR; Uchoa, DC. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. Theriogenology 59:743-751.
8. Chen, T.; Fowler, A.; Torner, M. (2000). Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. Cryobiology 40:277-282.
9. Concannon, PW.; Battista, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW editor. Current Veterinary Therapy X: Small Animal practice. Philadelphia PA: WB Saunders p. 1247-1259.

10. Crowe, JH.; Carpenter, JR.; Crowe, LM.; Anchordoguy, TJ. (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Proceedings of the 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. California, USA; p. 219-229.
11. Crowe, JH.; Crowe, LM.; Oliver, AE.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. (2001). The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology* 43:89-105.
12. Dobrins, EZ.; Crowe, LM.; Berger, T.; Anchordoguy, T.; Oversteet, JW.; Crowe, JH. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp Zool.* 265:432-437.
13. Dobrinski, I.; Lulai, C.; Barth, AD.; Post, K. (1993). Effects of four extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:291-296.
14. England, GCW. (1993). Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 47:243-255.
15. England, GCW., Plummer, JM. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47:261-270.
16. Farstad, W.; Andersen-Berg, K. (1989). Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 39:289-292.
17. Farstad, W.; Fougner, JA.; Torre, CG. (1992). The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen. *Theriogenology* 37:699-711.
18. Fastard, W. (1984). Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 25:561-565.
19. Fontbonne, A.; Badinand, F. (1993). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of the results obtained with an intravaginal and an intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fertil.* 47:323-327.
20. Fontbonne, A.; Badinand, F. (1996). Prelevement et examen de la semence chez le chien. In: Dumond, C.; Fontbonne, A. editores. *Les indispensables de l'animal de compagnie*. Paris: PMCAC p. 153-159.
21. Fougner, JA. (1989). Artificial insemination in fox breeding. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:317-323.
22. Foulkes, JA. (1977). The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 49:277-284.
23. Gao, GY.; Ashworth, E.; Watson, PF.; Kleinhans, FW.; Mazur, P.; Critser, JK. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 49:112-123.
24. Gao, GY.; Liu, J.; Liu, C.; McGann, LE.; Watson, PF.; Kleinhans, FW. *et al.* (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 10:1109-1122.
25. Gill, HP.; Kaufman, CF.; Foote, RH.; Kirk, RW. (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31:1807-1813.
26. Gomes, GM.; Jacob, JCF.; Medeiros, ASL.; Papa, FO.; Alvarenga, MA. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 58:277-279.
27. Graham, JK.; Foote, RH. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* 24:42-52.
28. Hammerstedt, RH.; Gahan, JK.; Nolan, JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
29. Hammerstedt, RH.; Parks, JE. (1987). Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J. Reprod. Fert.* 34:133-149.
30. Harrop, AE. (1960). Mating natural service and artificial insemination. In: Bailliére, Tindall & Cox, editores. *Reproduction in the dog*. London, England. p. 87-99.
31. Hay, MA.; King, WA.; Gartley, CJ.; Leibo, SP.; Goodrowe, KL. (1997). Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48:1329-1342.
32. Held, JP. (1997). Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of the Canine Reproduction Symposium. Society for Theriogenology and American College of Theriogenologist; p. 49-59.
33. Holt, WV.; North, RD. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 91:451-461.
34. Jasko, DJ. (1994). Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.* 10 (2):156-165.
35. Jurado, S.; Sarmiento, P.; Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Tittarelli, C.; de la Sota, RL. (2005). Ultrastructural analysis of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa. Proceedings of the 8th Inter American Congress of Electron Microscopy. Sep 25-30 La Habana- Cuba.
36. Lardy, HA.; Philips, PH. (1940). Preservation of spermatozoa. Proceedings of the 32nd. Ann. Meet. Am. Soc. Anim. Prod. p. 219-231.
37. Linde-Forsberg, C. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21:467-485.

38. Linde-Forsberg, C.; Forsberg, M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 39:299-310.
39. Linde-Forsberg, C.; Forsberg, M. (1993). Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47:313-323.
40. Linde-Forsberg, C.; Strom, B.; Govette, G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52:11-23.
41. Martins-Bessa, A.; Rocha, A.; Mayenco-Aguirre, A. (2006). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology* 66:2047-2055.
42. Meryman, HT. (1971). Crioprotective agents. *Cryobiology* 8:173-183.
43. Meyers-Xallen, VN. (1995). Semen Analysis, Artificial insemination and infertility in the male dog. In: Ettinger, SJ.; Feldman, ER. editores. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders Philadelphia. p. 1664-1672.
44. Molinia, FC.; Evans, G.; Caseres, PI.; Maxwell, WMC. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in TRIS base diluents on motility, acrosome integrity, and fertility of pellets frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36:113-122.
45. Norton, DB.; Bruce, SG. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39:311-316.
46. Nothling, JO.; Volkman, DH. (1993). Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J. Reprod. Fertil.* 47:325-327.
47. Parks, JE.; Meacham, TN.; Saacke, RG. (1981). Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod.* 24:399-404.
48. Paulens, H. (1993). The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock. *Norw. J. Vet. Med.* 105:1135-1142.
49. Peña Martínez, AI. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. [tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela.
50. Pettit, MJ.; Bhur, MM. (1998). Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during criopreservation. *J. Androl.* 19:736-746.
51. Pursel, VG.; Jonshon, LA. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1:63-68.
52. Pursel, VG.; Shulman, LL.; Jonshon, LA. (1978). Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 47:198-202.
53. Quinn, PJ.; Chow, PYW.; White, IG. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60:403-407.
54. Rodríguez-Gil, JE.; Montserrat, A.; Rigau, T. (1994). Effect of hypotonic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 44:885-900.
55. Santos, IW. (2004). Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetilamino metano) para congelação do sêmen canino. [tesis doctoral] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista. Brasil.
56. Savignone, CA.; Gimenez, F.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, CM.; Stornelli, MC.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2007). Comparison of different concentrations of dimethyl formamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Proceedings of the XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Curitiba, Brasil.
57. Savignone, CA.; Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Arauz, MS.; de la Sota, RL. (2001). «Estudio de la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C y 15°C en MRA@-yema de huevo». *Proceedings of the I Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios especializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA)*. Jul 8-9. Buenos Aires, Argentina.
58. Savignone, C.A.; Stornelli, M.C.; Tittarelli, C.M.; Giménez, F.; de la Sota, R.L.; Stornelli, M.A. (2006). Efecto de la adición de concentraciones de trealosa que no modifiquen la osmolalidad del diluyente TRIS base sobre la supervivencia espermática posdescongelación en caninos. *Proceedings of the X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas*; Marzo 15-17; Tandil, Argentina.
59. Savignone, C.; Tittarelli, C.; Stornelli, MC.; Nuñez Favre, R.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006). Cryoprotectant effect of trehalose on canine semen. *Proceedings of the III Congreso de FIAVAC (Federación Ibero Americana de Asociaciones Veterinarias de Animales de compañía) y XXVII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA*. May 31-Jun 3; Vitória, Brasil.
60. Seager, SWJ. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen semen. *A.I. Digest.* 17:6-7.
61. Silva, AR.; Cardoso, RCS.; Uchoa, DC.; Silva, LDM. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59:821-829.
62. Silva, LDM. (2001). Avanços da inseminação artificial na espécie canina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 25:107-111.
63. Silva, LDM.; Onclin, K.; Lejeune, B.; Vestergren, JP. (1996). Comparison of intravaginal and

- intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen; Vet. Rec. 138:154-157.
64. **Smith, FO.** (1986). Update on freezing canine semen. In: Kirk RW editor. Current Veterinary Therapy IX: Small Animal practice. WB Saunders Philadelphia PA p 1243-1248.
 65. **Stornelli, MA.** (2004). Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
 66. **Stornelli, MA.; Leone, FL.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.** (2005). Porcentajes de preñez obtenidos mediante inseminación artificial con semen congelado con un diluyente TRIS base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM paste. Proceedings of the 4^{tas} Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica; Ago 5-6; Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
 67. **Stornelli, MA.; Savignone, C.; Jurado, S.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.** (2004). Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. Proceedings of the IX Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Abr 1-3. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
 68. **Stornelli, MA.; Savignone, C.; Stornelli, MC.; Tittarelli, C.; Jurado, S.; Giménez, F.; de la Sota, RL.** (2006). Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste. Theriogenology 66:664-665.
 69. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Arauz, MS.; Savignone, CA.; García, M.; de la Sota, RL.** (2001). Study of the effect three extender on canine semen stored chilled at 4°C. Revista Brasileira de Reprodução Animal 25:468-470.
 70. **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.
 71. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; de la Sota, RL.** (2002) Comparison of different concentrations of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Proceedings of the Third EVVSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. May. 10-12. Liege, Bélgica.
 72. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; Tittarelli, C.; de la Sota, RL.** (2003). Efecto de diferentes concentraciones de trealosa sobre la supervivencia espermática posdescongelación en caninos. Proceedings of the V Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Jun 27-29; Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
 73. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; Tittarelli, C.; de la Sota, RL.** (2003). Comparison of different concentrations of trehalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Revista Brasileira de Reprodução Animal 27: 359-361.
 74. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Tittarelli, CM.; Jurado, S.; Leone, FL.; de la Sota, RL.** (2005). Efecto del agregado de diferentes concentraciones de Equex STM paste al diluyente TRIS base sobre la viabilidad y ultraestructura del semen canino congelado-descongelado. Proceedings of the 4^{tas} Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Ago. 5-6. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
 75. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; Jurado, S.; de la Sota, RL.** (2004). Viability study and ultraestructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex STM paste concentrations. Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction; Ago 8-12; Porto Seguro, Brasil.
 76. **Voelkel, SA.; Hu, Y.** (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology 37:687-697.
 77. **Wales, RG.; White, IG.** (1963). Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fertil. 5:67-76.
 78. **Watson, PF.** (1976). 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. 1:137-141.
 79. **Watson, PF.** (1981). The effects of cold shock on sperm cell membrane. In: Morris GJ, Clarke A, editores. Effects of low temperatures on biological membranes. Orlando. Fla.: Academic Press; p. 189-417.
 80. **Watson, PF.** (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fert. 62:483-492.
 81. **Watson, PF.** (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev. 7:781-791.
 82. **Watson, PF.; Duncan, G.** (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology 25:131-142.
 83. **Wildt, DE.** (1986). Laparoscopy. In Burke TJ editor. Small Animal Reproduction and infertility. Philadelphia, PA. Lea & Febiger. p. 121-140.
 84. **Wilson, M.** (1993). Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. J. Reprod. Fertil. 47:307-311.
 85. **Yildiz, C.; Kaya, A.; Askoy, M.; Tekeli, T.** (2000). Influence of sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenolog. 54:579-585.