

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE PERRO DOMÉSTICO (*Canis familiaris*) EN UN DILUYENTE A BASE DE TRIS-YEMA DE HUEVO

CRIOPRESERVATION OF DOG SEMEN IN A EXTENDER BASED OF TRIS- EGG YOLK

Olivo-Zepeda I.B.^{1*}, Flores-Padilla J.P.², Conejo-Nava J.J.¹, Núñez-Anita R.E.¹, Toscano-Torres I.A.¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal. *ozib7@hotmail.com.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Keywords: Semen freezing; Progressive motility; Viability; Extensor; Binding assay.

Palabras clave: Congelación de semen; Movilidad progresiva; Viabilidad; Diluyente; Ensayos de unión.

ABSTRACT

Several protocols for dog semen cryopreservation have been evaluated for use in artificial insemination or in vitro fertilization programs. However, there is a low fertility rate with respect to cryopreserved semen. Hence the need to develop cryopreservation techniques and better systematic methodologies for evaluating sperm and its fertilizing capacity. The aim of this work was to evaluate the effect of cryopreservation of dog semen on a tris- egg yolk diluent on seminal quality and its in vitro fertilization capacity of post-freeze spermatozoa. Five Creole males of reproductive age, medium-large size (1.5 years) were used. Ten ejaculates were obtained by digital manipulation. Each ejaculate was evaluated macro and microscopically, and subsequently subjected to the cryopreservation process. The processed semen was thawed at 37° C for one minute and subsequently the progressive mobility and sperm viability were evaluated. The in vitro fertilization capacity of post-frozen dog spermatozoa was evaluated by two spermatozoid-oocyte binding assays: one heterologous, with sow oocytes and another homologous with dog oocytes. The post-freeze results were: progressive mobility of 42.2 % ± 9.3 and viability of 70 % ± 6.15. In the homologous binding assay, it was observed that frozen-thawed spermatozoa have the ability to adhere to granulosa cells but not to the zona pellucida of oocytes of the female canine. In the heterologous binding assay no sperm adhesion was observed. Therefore, it is concluded that diluent based on tris-egg yolk-glycerol is able to preserve the mobility and viability of canine semen after thawing but it is necessary to confirm its fertilizing capacity by in vitro or in vivo fertilization

RESUMEN

Se han evaluado diversos protocolos para la criopreservación de semen canino para ser utilizados en programas de inseminación artificial o fecundación *in vitro*. Sin embargo, existe una tasa de fertilidad baja respecto al semen criopreservado. De ahí la necesidad de desarrollar técnicas de criopreservación y de mejores metodologías sistemáticas para evaluar el espermatozoide y su capacidad fertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la criopreservación del semen de perro doméstico (*Canis familiaris*) en un diluyente a base de tris-yema de huevo sobre la calidad seminal y su capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides postdescongelación. Se utilizaron cinco machos criollos en edad reproductiva, talla mediana-grande (1.5 años). Se obtuvieron 10 eyaculados mediante manipulación digital. Cada eyaculado se evaluó macro y microscópicamente, para posteriornemte someterlos al proceso de criopreservación. El semen procesado se descongeló a 37°C durante un minuto y posteriormente fue evaluada la movilidad progresiva y viabilidad espermática. La capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides caninos postdescongelados se evaluó mediante dos ensayos de unión espermatozoide-ovocito: Uno heterólogo, con ovocitos de cerda y otro homólogo con ovocitos de *canis familiaris*. Los resultados postdescongelación fueron: movilidad progresiva del 42.2 % ± 9.3 y viabilidad del 70 % ± 6.15. En el ensayo de unión homóloga, se observó que los espermatozoides congelados-descongelados tiene la capacidad de adherirse a las células de la granulosa pero no a la zona pelúcida de los ovocitos de la hembra canina. En el ensayo de unión heteróloga no se observó

adhesión de espermatozoides. Por lo tanto, se concluye que el diluyente a base de Tris-yema de huevo-glicerol es capaz de conservar la movilidad y viabilidad del semen canino después de la descongelación, pero es necesario confirmar su capacidad fertilizante mediante fertilización *in vitro* o *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

La familia Canidae cuenta con aproximadamente 34 especies, de las cuales 22 son consideradas como amenazadas o en peligro de extinción como lo afirma la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (Zindl, 2006). Las biotecnologías reproductivas (BR), tienen el objetivo de manejar la reproducción de los animales, teniendo gran impacto en el mejoramiento animal (Palma, 2008). En la actualidad, la crianza de perros es una afición de distribución mundial; consecuentemente, la conservación de semen y la inseminación artificial se han constituido en temas de alta relevancia en la actividad médico veterinaria (Linde-Forsberg, 1993). Uno de los temas más investigados dentro de la biología de la reproducción del perro, ha sido la conservación de gametos (Bohórquez *et al.*, 2005). La congelación de semen de perro se inició a finales de los años 60 (Seager, 1969; Gill *et al.*, 1970; Andersen, 1972) y ha sido adaptada de las técnicas utilizadas en las especies pecuarias. Se han evaluado diversos protocolos para la criopreservación de semen canino para ser utilizados en programas de inseminación artificial o fecundación *in vitro*. Sin embargo, existe una tasa de fertilidad baja respecto al semen criopreservado. Esta circunstancia hace que la inseminación artificial canina, se realice principalmente empleando semen fresco o refrigerado (Parrado y Casallas 2004). De ahí la necesidad de desarrollar técnicas de criopreservación y de mejores metodologías sistemáticas para evaluar el espermatozoide y su capacidad fertilizante. Finalmente, el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas no solo sería en beneficio del "*Canis familiaris*", ya que, debido a sus similitudes filogenéticas de este animal con otros carnívoros, constituiría un papel importante para la conservación de especies silvestres, en cautiverio o en peligro de extinción. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la criopreservación del semen de perro doméstico (*Canis familiaris*) en un diluyente a base de tris-yema de huevo sobre la calidad seminal y su capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides postdescongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.M.S.N.H., misma que se ubica en el km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán. Se utilizaron 5 perros criollos en etapa reproductiva (1.5 años) talla mediana-grande. Se obtuvieron un total de 10 eyaculados (2 muestras seminales por animal, con una frecuencia de una vez por semana) mediante la técnica de manipulación digital. Cabe señalar que los machos recibieron previo entrenamiento para su colección, el cual consistió en estimular el pene del animal mediante masajes vigorosos. Inmediatamente después, cada muestra fue evaluada por el mismo técnico de manera macroscópica (volumen, color, consistencia y pH) y microscópica (movilidad masal, movilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad y anomalías morfológicas) según lo describe Conejo (1991). Para su procesamiento cada eyaculado se diluyó en la solución comercial Triladyl (MR por Minitube, hecho en Alemania) con una proporción de 1:3. Posteriormente el semen se envasó en pajillas de 0.5 ml con una concentración de 50×10^6 . Las pajillas se sellaron en uno de sus extremos con alcohol polivinílico para ser colocadas dentro de los gobelets, para su refrigeración. El semen diluido en Triladyl se mantuvo a una temperatura de 5 °C durante 3 horas. Durante el período de equilibrio, las lipoproteínas de la yema de huevo se incorporaron a las membranas plasmáticas de los espermatozoides, para su protección contra el choque térmico. Las pajillas con semen refrigerado fueron sometidas a vapor de nitrógeno (-120 °C) durante 10 minutos y luego se sumergieron en nitrógeno líquido a -196 °C durante 2 minutos y finalmente se almacenaron en termos criogénicos de 20 L hasta su evaluación. Para descongelar el semen, se tomó una de las pajillas al azar y se mantuvo 1 minuto a baño María (Fisher Scientific) a 37 °C. Después se realizó la evaluación de la movilidad progresiva y viabilidad del semen postdescongelación. Para la viabilidad espermática se realizó un frotis utilizando una tinción supravital eosina-nigrosina (10 µl de semen más 10 µl de la tinción). Finalmente se realizó un ensayo de unión heteróloga y homóloga *in vitro*. La recolección de ovocitos fue a partir de ovarios de perras domésticas ovariectomizadas en la Secretaría de Salud y

Jurisdicción Sanitaria de Morelia y transportados al laboratorio en solución salina (PBS) y ovarios de cerda, sacrificadas en el rastro municipal de Morelia. La recolección de ovocitos de cerda se realizó mediante la aspiración de folículos visibles de la superficie del ovario de 3 a 6 mm de diámetro, utilizando una jeringa. El fluido folicular se recuperó en tubo cónico dejando sedimentar a 38 °C el paquete celular. Los ovarios de perra se diseccionaron con una hoja de bisturí para la recuperación de los ovocitos. Se obtuvieron un total de 100 ovocitos de cerda y 30 de perra. Posteriormente los ovocitos se mantuvieron en PBS para ser seleccionados en medio de manipulación (2.5ml SFB, 500µl estreptomycin-penicilina). Se seleccionaron los complejos cúmulo-ovocito (CCOs), considerando aquellos que presentaron 3 o más capas celulares y un citoplasma homogéneo obteniendo un total de 60 de cerda y 30 de perra. Una vez seleccionados, se removieron parcialmente las células de la granulosa con 0.1% de hialuronidasa en vortex. Para llevar a cabo las pruebas de unión homóloga-heteróloga se emplearon los ovocitos inmaduros de cerda y perra, los cuales fueron distribuidos de manera equitativa y colocados en gotas de 500µl en cajas de cuatro pozos (nunc) e incubados con los espermatozoides criopreservados (2000/ovocito). Para esto se utilizaron pajillas al azar de diferentes machos. Las microgotas se cubrieron con aceite mineral y se incubaron a 38 °C en 5 % de CO₂ durante 8 h tiempo necesario para que ocurra una interacción. Transcurrido el tiempo, los ovocitos con los espermatozoides fueron lavados en medio TALP y se procedió a teñir el núcleo con el fluorocromo Hoechst 33248 durante 3 min, para posteriormente ser evaluados al microscopio de contraste de fases (Zeiss) y determinar si los espermatozoides se adhirieron a la zona pelúcida o penetraron la membrana del ovocito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron un total de 10 eyaculados, los cuales presentaron parámetros seminales acordes a lo reportado en la literatura (tabla I) (Nelson y Couto, 2000, para volumen de eyaculado; Threlfall, 2005; Burke, 1986 y Allen, 1992, para movilidad espermática; Sánchez *et al.*, 2006, para concentración espermática; Peña 2004, para espermatozoides anormales y finalmente Concannon, 1993 para viabilidad).

Tabla I. Resultados de la evaluación de semen fresco de perro (*Evaluation results of dog fresh semen*).

Muestra No.	Vol./ml	Movilidad masal	% Movilidad progresiva	% Muertos	% vivos	Concentración espermática /ml	% Anormalidades
1	1.0	5	90	20	80	463.5 X10 ⁶	24
2	1.0	4	70	23	77	290.500 X10 ⁶	28
3	1.5	5	100	20	80	1.080 X10 ⁶	23
4	1.0	4	70	15	85	360 X10 ⁶	26
5	1.0	5	80	25	75	440 X10 ⁶	27
6	2.0	5	90	24	76	495 X10 ⁶	21
7	1.5	5	90	20	80	480 X10 ⁶	13
8	2.0	5	100	18	82	345 X10 ⁶	24
9	2.5	5	90	25	75	410 X10 ⁶	16
10	2	5	80	20	80	390 X10 ⁶	30
Media	1.55	4.8	86	21	79	475 X10 ⁶	23.2
D.E.	±0.55	±0.42	±10.75	±3.23	±3.23	±163.455X10 ⁶	±5.31

Respecto al semen postdescongelado el parámetro de movilidad progresiva (tabla II) fue superior a lo reportado por Bohórquez *et al.*, (2005), quienes obtuvieron un 30 % de espermatozoides móviles utilizando un diluyente a base de TRIS y por Rota *et al.*, (2005) con un porcentaje de 39.8 %. Finalmente, algunos autores hacen referencia a inseminaciones realizadas con semen congelado que presentaba una movilidad ligeramente por encima del 35 % (Santana, 2007). Sin embargo, Restrepo *et al.*, (2011) obtuvieron una movilidad progresiva del 58 % utilizando un diluyente comercial específico para la especie canina, superando los resultados logrados en el presente trabajo. Para la viabilidad espermática (tabla II), Peña y Linde Forsberg (2000), señalan que los valores normales para esta variable oscilan entre un 55-65 %, por lo que en este estudio este parámetro es ligeramente superior. Acerca del ensayo de unión heteróloga para determinar la capacidad fertilizante, se

observó que los espermatozoides no se adhirieron a la zona pelúcida de los ovocitos de cerda (figuras 1 y 2). Por lo cual se confirman los resultados de estudios previos en los que demuestran que la Zona Pelúcida (ZP) está compuesta principalmente por glicoproteínas (Sánchez y De los Reyes, 2004) con diferencias específicas de especie. En el ensayo de unión homóloga se pudo observar múltiples adhesiones de espermatozoides a las células de la granulosa, que se mantuvieron pegadas al ovocito a pesar de que se trataron con hialuronidasa (figura 3,4 y 5). Sin embargo, no se observaron espermatozoides adheridos a la ZP (figura 5), contrario a lo que informa Gadea (2001) quién afirma que este método se ha convertido en una herramienta para valorar la capacidad fecundante en la mayoría de las especies.

Tabla II. Movilidad y viabilidad espermática de semen postdescongelación (*Motility and sperm viability of semen postthawing*).

No. Muestra	(%) Movilidad Progresiva	(%) Viabilidad
1	40	70
2	35	60
3	50	70
4	45	60
5	32	80
6	60	80
7	40	70
8	40	60
9	30	60
10	50	60
Media	42.2	70
Desv. Est.	± 9.3	± 8.3

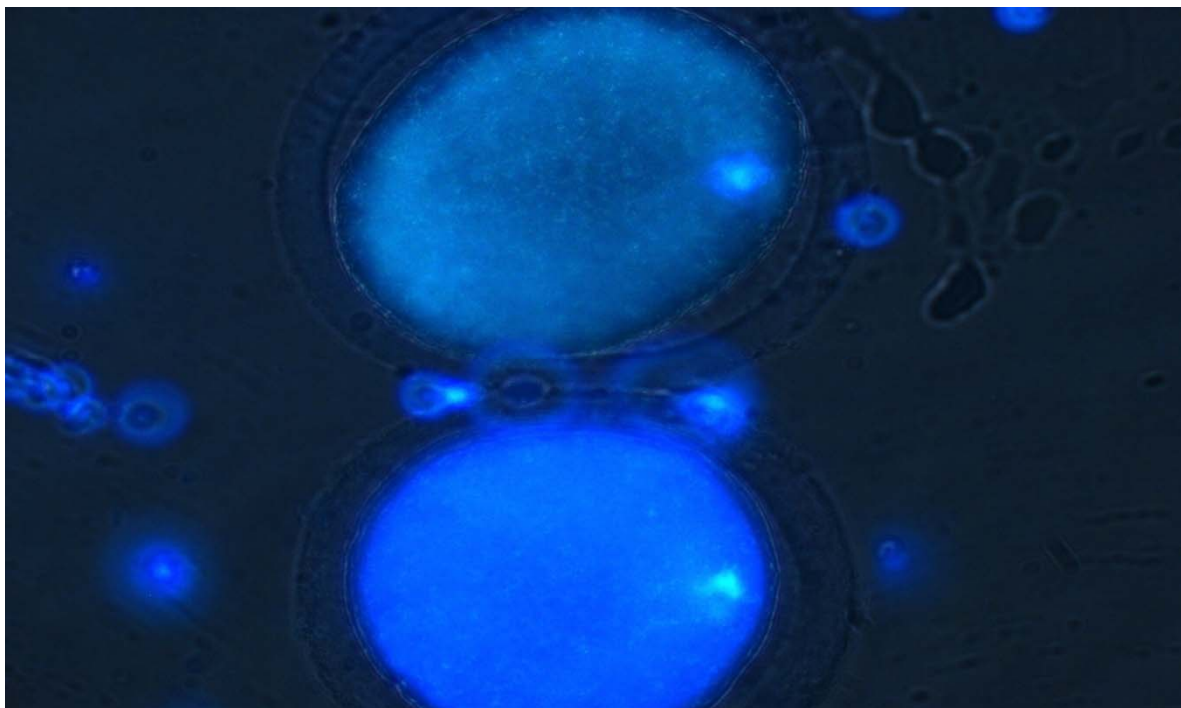


Figura 1. Ovocitos de cerda con espermatozoides de perro doméstico congelados-descongelados. Tinción Hoechst 33248. Objetivo 10X (*Sow oocytes with sperm frozen-thawed domestic dog*).

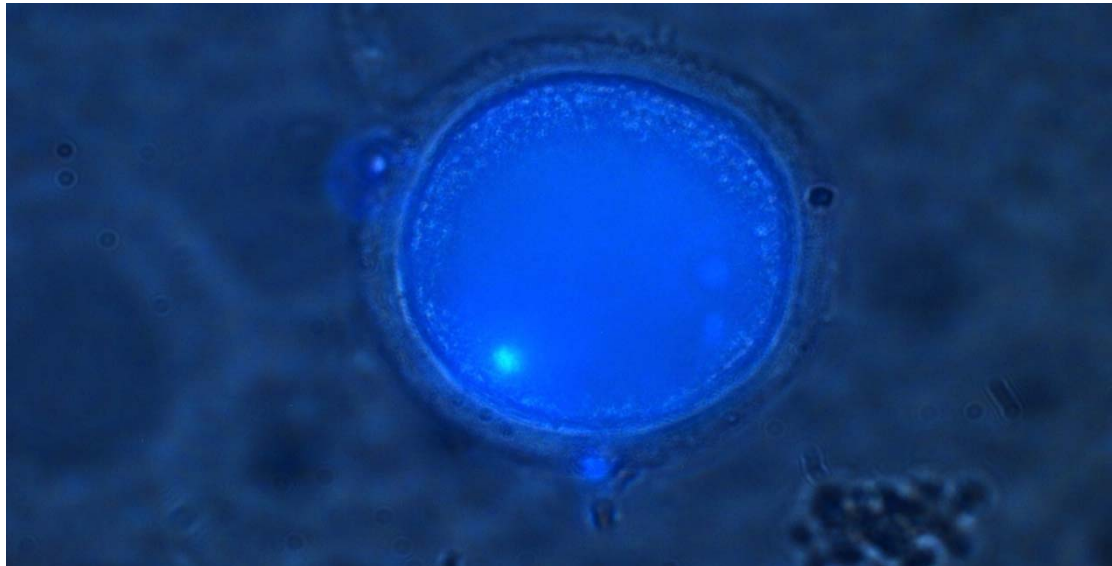
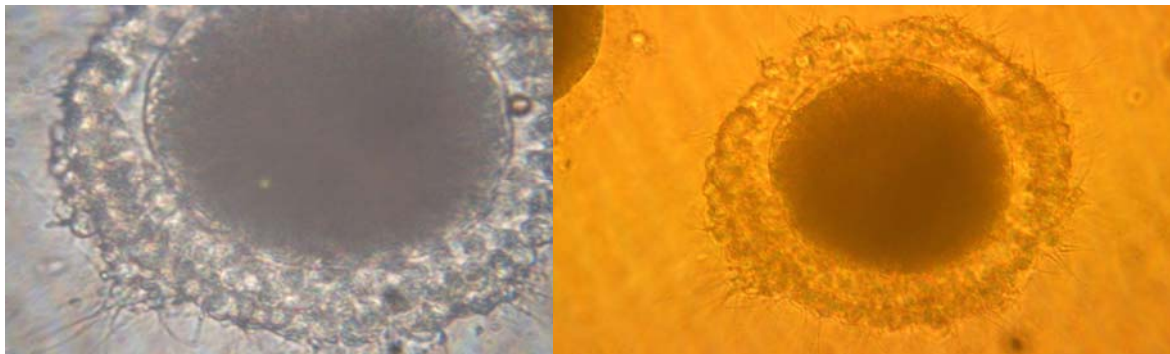


Figura 2. Ovocito de cerda sin evidencia de adherencia de espermatozoides de perro doméstico. Tinción Hoechst 33248. Objetivo 10X (*Sow oocyte without adhesion of domestic dog sperm*).



Figuras 3 y 4. Adherencia de espermatozoides en células de la granulosa de ovocito de perra Tinción Hoechst 33248. Objetivo 10X (*Adhesion of sperm in granulosa cells of the canine oocyte*).

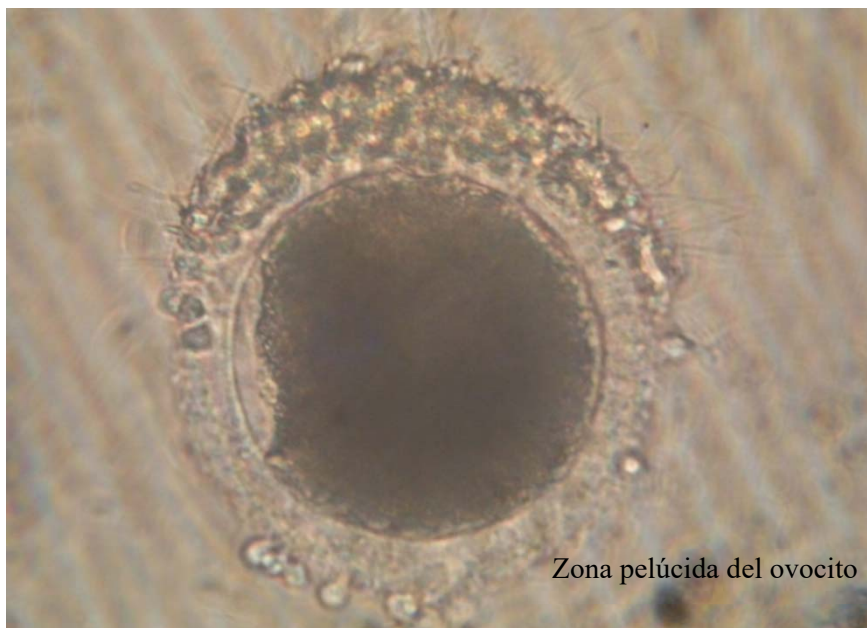


Figura 5. Ovocito de perra, en ausencia de adherencias de espermatozoides caninos en zona pelúcida Tinción Hoechst 33248. Objetivo 10X (*Canine oocyte, without adhesions of canine sperm in zona pellucida*).

CONCLUSIONES

La criopreservación de semen canino utilizando un diluyente a base de Tris-yema de huevo, conservó los parámetros de movilidad progresiva y viabilidad de los espermatozoides caninos postdescongelación. Los ensayos de unión homóloga ayudan a determinar la capacidad de adhesión de los espermatozoides a los ovocitos, lo que es un indicativo de su capacidad fertilizante. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados mediante técnicas de fertilización *in vitro* o *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen W. E. (1992): Fertilidad y obstetricia canina. Editorial Acribia. ISBN: 8420007455.
- Andersen K. (1972). Fertility of frozen dog semen. Acta Vet Scand 13: 128-130.
- Bohórquez C.R., De Ondiz A., Palomares R., Gallardo F. (2005). Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino: Reporte preliminar. Unidad de Reproducción Animal. Unidad de Investigaciones Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Burke T. J., (1986). Small Animal Reproduction and Infertility. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia. P. 207-217.
- Concannon P.W. (1993): Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. J. Reprod. Fertil. (Suppl.), 47: 3-27.
- Conejo N.J. (1991). Manual de Inseminación Artificial del Ganado Porcino con Semen Diluido. Editorial de la Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Gadea J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión). Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim. 16 (1): 64-72.
- Gill H.P., Kaufman C.F., Foote R.H., Kirk R.W. (1970) - Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. Am J Vet Res 31: 1807-1813.
- Linde-Forsberg C., Forsberg M. (1993). Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. J Reprod Fertil Suppl. 47: 313-323.
- Nelson R. W., Couto C. G., (2000), Manual de medicina interna de pequeños animales. Elsevier. pag 912.
- Palma G., (2008). Biotecnología de la Reproducción. Ciencia, tecnología y sociedad. Biotecnología de la Reproducción, Segunda Edición, Ed. Repro Biotec. 1-72.
- Parrado J.R.B., Casallas C.P.E., (2004). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructuosa. Orinoquia, Villavicencio, Colombia. 8: 001: 26-33.
- Peña A.I. (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim. Reprod. Sci. 82: 209-224.
- Peña A.I., Linde-Forsberg C. (2000) Effects of spermatozoa concentration and post thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. Theriogenology. 54: 703-718.
- Restrepo Betancur, Giovanni; Gómez Oquendo, Jorge; Vásquez Araque, Neil. (2011). Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida Lasallista de Investigación, 8:2:9-17
- Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C. (2005). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. Theriogenology. 44: 885-900.
- Sánchez R.A., Cartagena P.A., Berland O.M., (2006). Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. Rev Inv Vet Perú. 17 (1): 1-7.
- Sánchez R.A., De los Reyes S.M. (2004). Zona pellucida: an extracellular matrix with applications in the study of immunocontraception in domestic carnivores. Revista Científica, FCV-LUZ. 14 (5): 444-450.
- Santana A.D. (2007). Criopreservación y viabilidad espermática en la especie canina, utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152 °C. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Seager S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AI Digest 17: 6-16.
- Threlfall W. (2005). Recolección y evaluación del semen. En: Manual de Reproducción del Perro y del Gato (Root Kustritz MV). Multiméica Ediciones Veterinarias, Barcelona. P: 43-54.
- Zindl C. (2006). Cryopreservation of Mexican gray wolf (*Canis lupus baileyi*) semen evaluation of different times and rates of pre-freeze cooling and Equex pasta supplementation - in comparison with semen of the domestic dog and generic gray wolf (*Canis lupus*). Verlag: Deutsche Veterinär medizin ische Gesellschaft Service GmbH, Gießen. Printed in Germany. ISBN 3-938026-89-8. P. 197.