

# DETERMINACIÓN DEL PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CANINO: REPORTE PRELIMINAR

## Determination of the Protocol for the Criopreservation of the Canine Semen: Preliminary Report

Rafael Bohórquez Corona<sup>1,2</sup>, Aitor De Ondiz<sup>1</sup>, Roberto Palomares<sup>1</sup> y Fanny Gallardo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Reproducción Animal. <sup>2</sup>Unidad de Investigaciones Clínicas.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Apartado 15252, Maracaibo 4005, Venezuela. E-mail rbohorquez@luz.edu.ve

### RESUMEN

Se recolectaron muestras de semen a 7 machos caninos de varias razas, a las cuales se les practicó un espermograma completo. Aquellas muestras seminales clasificadas como óptimas fueron utilizadas para ser sometidas al proceso de criopreservación. Se procedió a congelar el semen utilizando un diluyente a base de TRIS, ácido cítrico, glucosa, penicilina, estreptomicina, yema de huevo, agua destilada y glicerol. El semen fue congelado en vapores de nitrógeno líquido a 10 centímetros por encima de su nivel. El semen fue sometido a pruebas de evaluación considerándose los parámetros de volumen, color, pH, motilidad, concentración y morfología. Se realizaron pruebas de resistencia térmica en placas calentadas para el semen fresco, diluido, glicerinado y descongelado, por períodos de tiempo de 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, obteniéndose resultados de motilidad de hasta 30% al cabo de 90 minutos. Se pudo observar la versatilidad y sencillez del uso de este diluyente y de la técnica de congelación en vapores de nitrógeno líquido para la criopreservación del semen canino.

**Palabras clave:** Caninos, semen congelado, diluyente, TRIS, resistencia térmica.

### ABSTRACT

Semen samples of seven canine of various breeds were collected and evaluated by a complete spermatogram. Those samples classified as optimal were used to follow the freezing protocol. A TRIS buffer solution containing citric acid, glucose, penicillin, streptomycin, egg yolk, distilled water and glycerol was used to dilute and freeze the semen. The semen was fro-

zen on liquid nitrogen vapors at 10 centimeters above the level of nitrogen. Semen volume, color, pH, sperm motility, concentration and morphology were evaluated. Thermal resistance tests were conducted for fresh, diluted, chilled and post thawed samples of semen, been observed up to 30% motility after 90 minutes. The essay probed the versatility and practicality of the use of this dilutor, and the easiness of the technique of freezing semen with vapors of liquid nitrogen.

**Key words:** Canine, frozen semen, dilutor, TRIS, thermal resistance.

### INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en caninos ha tenido un auge en las últimas dos décadas especialmente en el área de semen criopreservado [2, 8, 9, 11], en la cual se han desarrollado diversos protocolos de investigación para estudiar diferentes técnicas de congelación y dilutores del material seminal. Actualmente la crisis económica que sufre el país ha obligado a modificar las técnicas actuales y ayudan a suplantar esquemas de importación de tecnologías o productos elaborados, por la imposibilidad de costearse los mismos.

Las inseminaciones realizadas con semen congelado tienen una mayor tasa de preñez cuando el material seminal es depositado intrauterinamente en comparación a la manera tradicional vaginal [2, 5-7]. La razón fundamental para que las tasas de preñez sean más bajas es debido a que el semen canino luego de la descongelación presenta una vida útil muy corta.

Se han probado muchos dilutores para realizar el proceso de congelación seminal, siendo uno de los componentes más comunes el TRIS [2, 3, 6]. A su vez se agregan porcentajes diferentes de glicerol, carbohidratos y otras sustancias para aumentar la vida del semen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las características espermáticas post-congelación del semen canino criopreservado mediante un protocolo basado en tris-glicerol utilizado por primera vez en Venezuela y la evaluación del semen canino mediante técnicas modernas de fotometría para la determinación de la concentración del eyaculado. Dicho protocolo incluye insumos de fácil consecución en el país, no importados a altos costos, y de una manera sencilla se aborda el tópico de la reproducción canina con programas de biotecnología actualizados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Siete machos caninos de varias razas, edades y pesos fueron sometidos a una evaluación integral de manera de incorporarlos al Programa de Criopreservación de Semen Canino, que adelanta la Unidad de Reproducción Animal (UNIRA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia. Esta evaluación incluyó un examen físico completo, haciéndose especial énfasis en la revisión del pene, prepucio, testículos, escroto y glándula prostática. La TABLA I muestra la distribución de razas, edades y pesos de los animales incluidos en la presente investigación.

### Dilutores

Se preparó un dilutor en dos fracciones (A y B). Ambos contenían básicamente los mismos ingredientes en su composición, y su diferencia estribaba en el uso de una concentración mayor de glicerol en el dilutor B. Los componentes de los dilutores fueron: TRIS, ácido cítrico, glucosa, penicilina bencetínica, estreptomocina, yema de huevo, glicerol y agua destilada a un volumen final de 100 mL. El dilutor 1 fue utilizado para equilibrar el semen antes de la congelación. El dilutor 2 fue adicionado antes del proceso de congelación, en cuatro alícuotas para lograr la glicerinización final. La TABLA II muestra los ingredientes y las cantidades de cada dilutor, así como también el pH final.

### Evaluación seminal

Los parámetros evaluados en el semen recolectado fueron los tradicionales [1-3] tales como: volumen, color, pH, motilidad, concentración y morfología; adicionalmente se realizaron pruebas de resistencia térmica en el semen fresco, diluido, refrigerado, glicerinado y post descongelación.

La motilidad fue evaluada subjetivamente mediante la apreciación al microscopio de 2 alícuotas de semen y fueron observadas en varios campos del microscopio, y evaluando en cada uno de ellos la motilidad individual progresiva y el vigor espermático.

*TABLA I*  
**DISTRIBUCIÓN DE RAZA, EDAD Y PESO DE LOS ANIMALES MUESTRA**

| Nº | Raza                           | Edad (años) | Peso (Kg) |
|----|--------------------------------|-------------|-----------|
| 1  | American Staffordshire Terrier | 3           | 35        |
| 2  | American Staffordshire Terrier | 4           | 36        |
| 3  | Labrador Retriever             | 3           | 38        |
| 4  | Labrador Retriever             | 7           | 37        |
| 5  | Labrador Retriever             | 9           | 42        |
| 6  | Dogo Alemán                    | 2 ½         | 69        |
| 7  | Cocker Spaniel                 | 3           | 8         |

*TABLA II*  
**COMPOSICIÓN DE LOS DILUTORES SEMINALES PARA LA CONGELACIÓN**

| Ingrediente            | Dilutor 1  | Dilutor 2  |
|------------------------|------------|------------|
| TRIS                   | 2,4 g      | 2,4 g      |
| Ácido cítrico          | 1,4 g      | 1,4 g      |
| Glucosa                | 0,8 g      | 0,8 g      |
| Penicilina bencetínica | 1000 UI/mL | 1000 UI/mL |
| Estreptomocina         | 0,1 g      | 0,1 g      |
| Yema de huevo          | 20 mL      | 20 mL      |
| Glicerol               | 3 mL       | 7 mL       |
| Agua destilada         | A 100 mL   | A 100 mL   |
| pH                     | 6,53       | 6,53       |

Sólo fueron congelados las muestras seminales consideradas como óptimas y que presentarían: color, pH y volumen normal de acuerdo a la talla del macho, concentración espermática superior a 200 millones de espermios por mililitro, motilidad de más del 80% y menos del 10% de anomalías primarias o secundarias.

La concentración se determinó por fotometría mediante el uso de un fotómetro (SpermaCue, Minitub, Tiefenbach, Germany), el cual fue previamente calibrado, haciéndose comparaciones entre los resultados manuales realizados con una cámara de Neubauer y los detectados por el aparato.

La morfología se determinó en un frotis seminal teñido previamente con el colorante Diff-Quick-Stain®, y en el mismo se contó la cantidad de anomalías existentes.

El test de termoresistencia fue realizado manteniendo las diferentes alícuotas de semen en placa térmica a 37°C, y determinando su motilidad y vigor por un período de 90 minutos.

#### Recolección seminal

Se recolectó únicamente la fracción 2 del eyaculado (fracción espermática), mediante manipulación digital [2] con un cono de recolección tradicional, con su correspondiente tubo graduado de colección añadido al mismo. La estimulación de los perros se efectuó mediante torundas de gasa empapadas en secreciones vulvares (feromonas) de perras en celo.

#### Dilución seminal y congelación

El semen recolectado fue centrifugado a 500 G por 6 minutos y el sobrenadante fue descartado y medido [12, 13, 15, 16], para proceder a diluir el precipitado resultante con el dilutor A, a una rata de dilución de hasta 1:6, dependiendo de la concentración espermática previamente determinada; posteriormente, el semen fue refrigerado a 4°C por una hora. Al cabo de este tiempo una cantidad similar de dilutor 2 fue añadida en 4 alícuotas en un período de 45 minutos. En cada uno

de estos pasos fue tomada una gota de semen para ser sometida a la prueba de resistencia antes mencionada.

Luego de la dilución final, el semen fue envasado en pajuelas de 0,5 mL y pasado a equilibración por 60 minutos. Luego el semen fue congelado en vapores de nitrógeno líquido, a 10 centímetros sobre el nivel del mismo, por un período de 10 minutos.

#### Descongelación

El semen fue descongelado en agua a la temperatura de 38°C por 1 minuto. Luego de secar perfectamente la pajuela, la misma fue vaciada y sometida a su evaluación final.

### RESULTADOS

Los resultados de la evaluación seminal de las siete muestras de semen se muestran en la TABLA III. Las anomalías encontradas al momento del estudio microscópico de la morfología fueron: gota citoplasmática proximal, defectos de acrosoma, defectos de la cabeza y cola, los cuales fueron detectados, en su mayoría, en los animales identificados con los números 4 y 5. El perro número 6 mostró una cantidad exagerada de anomalías secundarias, expresadas como cabezas sueltas.

Las pruebas de resistencia térmica mostraron una supervivencia máxima de espermatozoides de hasta > 70% a los 90 minutos en el semen fresco, de hasta 30% en el semen diluido, 25% en el semen glicerinado y de 30% en el semen post congelación a los 30 minutos. Estos resultados para cada animal en cada una de las categorías evaluadas se muestran en las FIGS. 1, 2, 3 y 4.

El dilutor utilizado en este primer ensayo de congelación en Venezuela, no afectó los parámetros seminales apropiados para realizar la inseminación artificial en caninos, aun cuando la concentración final de la pajuela resultó ligeramente elevada, al estar en 410 millones por mL.

TABLA III  
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

| Valor N° | Vol.   | Color        | pH  | Mot.  | Con/mL                | Con/Ey                   | Anom. |
|----------|--------|--------------|-----|-------|-----------------------|--------------------------|-------|
| 1        | 2,5 mL | Crema        | 6,3 | > 90% | 691 × 10 <sup>7</sup> | 1727,5 × 10 <sup>7</sup> | < 10% |
| 2        | 2,0 mL | Opalescente  | 6,3 | > 90% | 580 × 10 <sup>7</sup> | 1160 × 10 <sup>7</sup>   | < 10% |
| 3        | 1,8 mL | Opalescente  | 6,4 | > 90% | 480 × 10 <sup>7</sup> | 864 × 10 <sup>7</sup>    | < 10% |
| 4        | 2,6 mL | Blanco claro | 6,7 | 70%   | 150 × 10 <sup>7</sup> | 390 × 10 <sup>7</sup>    | 30%   |
| 5        | 3,0 mL | Blanco claro | 6,3 | 40%   | 120 × 10 <sup>7</sup> | 360 × 10 <sup>7</sup>    | > 60% |
| 6        | 6,5 mL | Blanco claro | 6,3 | 40%   | 113 × 10 <sup>7</sup> | 734,5 × 10 <sup>7</sup>  | 70%   |
| 7        | 1,2 mL | Blanco claro | 6,3 | 80%   | 200 × 10 <sup>7</sup> | 240 × 10 <sup>7</sup>    | 20%   |

Vol: volumen. Mot: motilidad. Con/mL: concentración por mL. Con/Ey: concentración del eyaculado. Anom: anomalías.

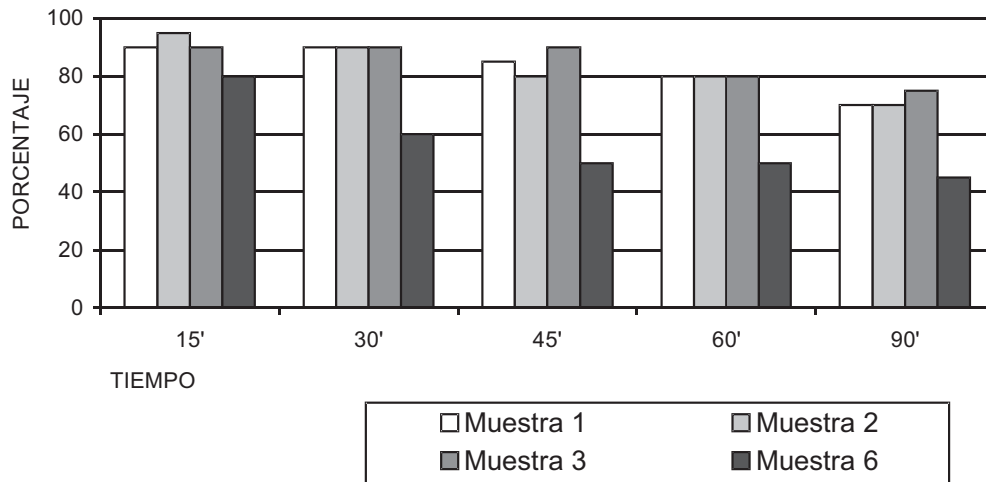


FIGURA 1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TERMO RESISTENCIA TÉRMICA EN SEMEN FRESCO.

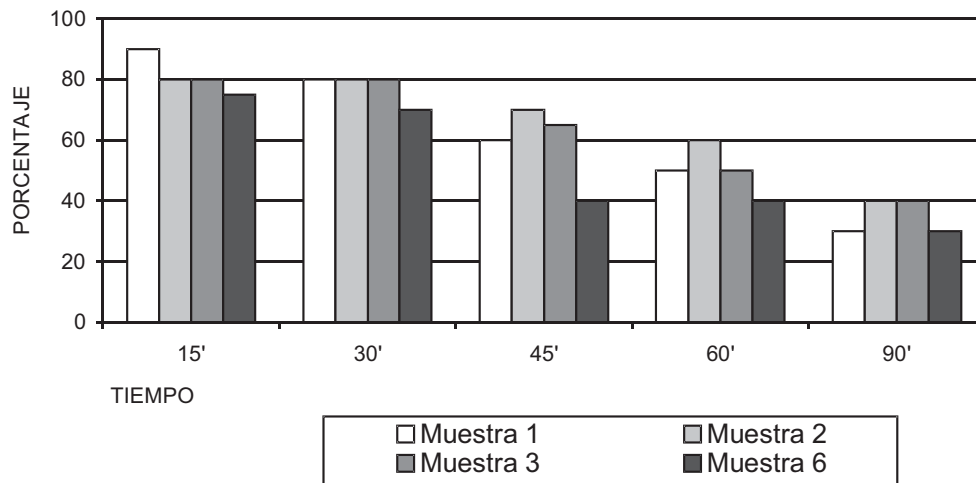


FIGURA 2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RESISTENCIA TÉRMICA EN SEMEN DILUIDO PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS.

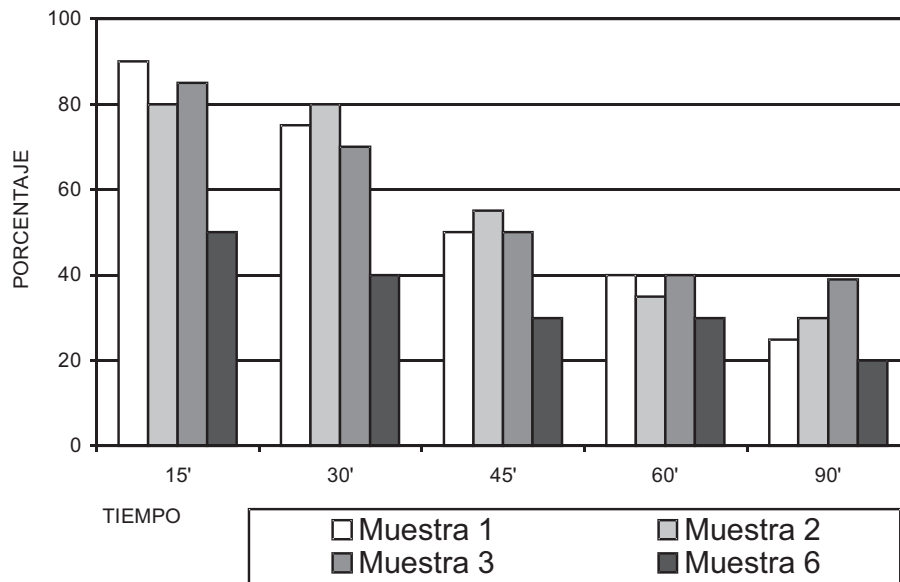
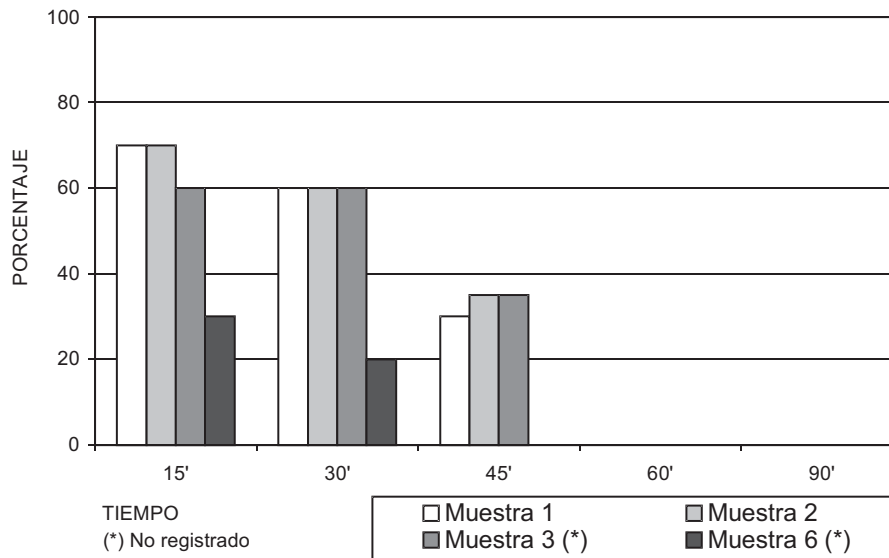


FIGURA 3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TERMO RESISTENCIA TÉRMICA EN SEMEN GLICERINADO.



**FIGURA 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE TERMO RESISTENCIA EN SEMEN DESCONGELADO.**

## DISCUSIÓN

Los animales 4, 5, y 6 no fueron incluidos en el programa de criopreservación, por no presentar un semen con características aptas para su congelación. Como se muestra en la TABLA I, los animales 4 y 5 fueron los animales más viejos en el estudio, los cuales al momento del examen físico demostraron tener serias alteraciones de próstata, lo cual es detrimental para la calidad seminal, coincidiendo con la literatura citada [2, 12, 14-16].

El canino número 6 presentó el mayor número de morfoanomalías, lo cual por anamnesis, probablemente se debió a consecuencia de una enfermedad sistémica previa.

En el análisis de los resultados obtenidos se puede observar claramente los beneficios de la utilización de los dilutores usados, puesto que los mismos conservaron la viabilidad del semen por períodos de tiempos acordes con los propuestos para realizar la inseminación intrauterina en la perra [2, 4-12, 14].

De igual manera el proceso de glicerización y estabilización del semen se mostró idóneo, al no afectar el semen recolectado y procesado, con excepción del semen del perro 7, el cual como lo señala la TABLA II, presentó un semen de aceptable calidad, pero al compararse con las demás muestras seminales, se observó una diferencia marcada en las morfoanomalías. Se decidió utilizar este semen, a pesar de lo citado en la literatura, para tenerlo como control y corroborar como afecta la congelación al semen con un alto número de morfoanomalías. Lo señalado anteriormente está en concordancia con otros autores sobre la necesidad de utilizar en los protocolos de criopreservación de semen de caninos, muestras seminales con la más óptima calidad seminal [2, 4-12, 14].

Con este ensayo se demuestra fehacientemente que la criopreservación del semen canino en el país es perfectamente factible, al poder implementar protocolos de congelación acordes con los insumos fácilmente obtenibles.

De igual manera se constató la facilidad de utilización del protocolo de congelación propuesto en base a los vapores de nitrógeno líquido, observándose versátil y de muy práctica implementación.

## CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Los resultados del presente ensayo demuestran claramente que el inicio de programas de congelación de semen canino pueden ser realizados a mayor escala en Venezuela, y además se propone la implementación de otras prácticas con diferentes dilutores, que permita establecer cual de ellos resultaría el más apropiado a las condiciones de trabajo observadas en el país.

Es fundamental la conformación de equipos de trabajo multidisciplinarios cuando se trabaja en el campo de la criopreservación del semen de caninos, que incluyan clínicos, patólogos clínicos y por supuesto especialistas en reproducción, esto debido a la importancia que tiene el estado de salud general del perro que se va a someter a una recolección de semen.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la empresa VIATECA, sus directores y todo su personal, por su desinteresada colaboración para la conducción de este ensayo en su laboratorio especializado de congelación de semen.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] AXNER, E. Sperm Morphology Is Better In the Second Ejaculate than In the First in Domestic Cats Electroejaculated Twice During the Same Period of Anesthesia, **Theriogenol** 47:929-934, 1997.
- [2] BOHÓRQUEZ, R. **Curso Teórico-Práctico Sobre Teriogenología e Inseminación Artificial en Pequeños Animales**, Sociedad Venezolana de Médicos Veterinarios de Pequeños Animales SOVEMEVEPA, Capítulo Guayana, Puerto Ordaz, Venezuela, Cap. 6, 2-16 pp, 2003.
- [3] BOUE, F.; DELHOMME, A.; CHAFFAUX, S. Reproductive Management of Silver Foxes (*Vulpes vulpes*) in Captivity, **Theriogenol** 53: 1717-1728, 2000.
- [4] CARDOSO R. DE C.; RODRIGUES, A.; COUTO, D.; MACHADO, L. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations, **Theriogenol** 59(3-4): 743-51, 2003.
- [5] FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction, **Animal Reproduction Science** 60-61. 375-387 pp. 2000.
- [6] FRESHMAN, J. Using Chilled and Frozen Semen for Canine AI, **Western Veterinary Conference**, Colorado Springs, Colorado, July 13-17, USA. 2002.
- [7] HUTCHISON, R. Maximizing Conception Rates Using Fresh Cooled or Frozen Canine Semen, **Tufts' Canine and Feline Breeding and Genetics Conference**, North Ridgeville, OH, October 2-6, USA, 2003.
- [8] MEYERS-WALLEN, V. Breeding Management Methods for the Bitch, **Western Veterinary Conference**, Ithaca, November 13-18, USA. 2002.
- [9] NIZANSKI W.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DEYNEKA, G.I.; Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing, **J Reprod Fertil Suppl** 57:365-9, 2001.
- [10] PENA A.; LUGILDE, L.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L., HERRADÓN, P.; Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions, **Reprod Domest Anim** 38(1):27-35, 2003.
- [11] PENA, A.; LUGILDE, L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.; QUINTELA, L. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2</sup> concentration of dog spermatozoa, **Theriogenol** 59(8): 1725-39, 2003.
- [12] RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa, **Theriogenol** 57[6]:1669-81, 2002.
- [13] RIJSSLAERE T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; KRUIF, A. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa, **Theriogenol** 61(7-8): 1589-1602, 2004.
- [14] SILVA A.; CARDOSO, R.; UCHOA, D.; SILVA, L. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process, **Theriogenol** 59(3-4):821-9, 2003.
- [15] SIRIVAIDYAPONG, S.; URSEN, P.; BEKERS, M.M.; COLENBRANDER, B.; Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa, **J Reprod Fertil Suppl** 57:383-6, 2001.
- [16] THOMASSEN, R.; FARSTAD, W.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; BERG, K.A.; Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study, **J Reprod Fertil Suppl** 57:341-6, 2001.