

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CANINO Y SU APLICACIÓN EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

CRYOPRESERVATION OF CANINE SEMEN AND ITS APPLICATION IN ARTIFICIAL INSEMINATION

Giovanni Restrepo Betancur¹, Neil Vásquez Araque², Edwin Andrés García³

Recibido El 28 de julio de 2009 y aceptado El 20 de noviembre de 2009

Resumen

La inseminación artificial (IA) en caninos ha aumentado su importancia durante los últimos años, dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de distribución mundial; mientras la criopreservación de semen canino se ha constituido en un tema de interés para veterinarios y criadores con el fin de mejorar la reproducción de ejemplares de alto mérito genético, comercial o afectivo; de reproductores separados geográficamente, de perras con problemas de conducta o con vagina estrecha, y de perros con dificultades para la cópula. Diversas técnicas son empleadas para la IA y la evaluación de la calidad el semen canino fresco y criopreservado, con el fin de predecir su fertilidad. En la criopreservación algunos factores pueden afectar la capacidad fertilizante del semen, como la exposición a bajas temperaturas con la formación de cristales intracelulares de hielo, la generación de daños espermáticos por choque térmico, y la exposición a soluciones con algún grado de toxicidad. Una nueva generación de protocolos de criopreservación basados en el aumento de las velocidades de congelación y el uso de nuevas sustancias diluyentes y crioprotectoras, están permitiendo la optimización de la criopreservación de semen y de la técnica de IA en caninos.

Palabras clave

Reproducción en caninos, evaluación seminal, crioprotectores, congelación de semen.

Abstract

Artificial insemination (AI) in dogs has increased in importance in recent years, as the reproduction and breeding of dogs is a hobby of worldwide distribution; while the cryopreservation of canine semen has become a topic of interest to veterinarians and breeders in order to improve the reproduction of animals of high genetic, commercial or emotional merit; canines separated geographically; bitches with conduct problems or tight vagina; and dogs with difficulties of copulation. Various techniques are used for the IA and to evaluate the quality of the fresh and cryopreserved canine semen, in order to predict their fertility. In cryopreservation some factors may affect the fertilizing capacity of semen, such as exposure to low temperatures with the formation of intracellular ice crystals, the generation of sperm damage by heat shock and exposure to solutions with some degree of toxicity. A new generation of cryopreservation protocols based on increasing the speed of freezing, and the use of new, are enabling the optimization of the cryopreservation of semen and AI in dogs.

¹Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Magister en Biotecnología, Grupo de investigación en biotecnología animal (GIBA), carrera 48 N° 7-151 Medellín - Colombia, E-mail: grestrepo@elpoli.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Magister en Reproducción, Grupo de investigación en Biotecnología (BioA), Calle 59A No 63 - 20 Medellín - Colombia, E-mail: nvasquez@unal.edu.co

³Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Estudiante Ingeniería Agropecuaria, Grupo de investigación en biotecnología animal (GIBA), Carrera 48 N° 7-151 Medellín - Colombia, E-mail: eagarcia@yahoo.com

Reproduction in dogs, seminal evaluation, cryoprotectants, semen freezing.

Introducción

Desde que Lazzaro Spallanzani (1787) realizó la primera inseminación artificial (IA) con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales ⁽³⁸⁾. Varios métodos de preservación de espermatozoides mediante la refrigeración o la congelación han sido desarrollados para espermatozoides caninos; sin embargo, la tasa de fecundación artificial es baja, posiblemente por daños celulares aún no determinados ⁽¹⁸⁾.

La IA en caninos ha tenido un auge principalmente en los últimos años, dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de interés mundial. Por lo cual, la preservación de semen canino se ha constituido en una actividad importante para veterinarios y criadores. Algunas situaciones hacen relevante el uso de la IA en caninos, como es el caso de reproductores separados geográficamente, en hembras con problemas de conducta y con vagina estrecha, cuando los machos presentan rigidez o debilidad en las extremidades inferiores, presentan rápido engrosamiento del bulbo del pene imposibilitando la penetración, o sencillamente son de menor tamaño respecto a las hembras ⁽³¹⁾.

En las razas caninas la criopreservación de semen es utilizada básicamente para la IA y para el almacenamiento de muestras de perros de alto valor genético ⁽²²⁾, y se considera una opción económica para el criador ya que se optimiza la accesibilidad de semen a largo plazo ⁽⁶⁾. En el proceso de la criopreservación hay un gran número de factores que pueden afectar la capacidad fertilizante del semen canino. En dicho proceso, las células están expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores que evitan la formación de hielo intracelular y el daño en la membrana celular ⁽⁸⁾, sin embargo los crioprotectores pueden igualmente tener efectos adversos sobre los espermatozoides, lo cual limita su función. Por otra parte, el

crioprotector más utilizado para la preservación de semen canino es el glicerol, el cual posee la limitante de su toxicidad parcial debida al estrés osmótico, ya que tiene una menor velocidad de difusión a través de la membrana, respecto a otros crioprotectores ⁽¹¹⁾.

Diversas técnicas son empleadas para evaluar y predecir la capacidad fecundante del semen canino, mediante la determinación de parámetros espermáticos como: la integridad de la membrana plasmática, la reacción acrosómica, la morfología espermática, y la movilidad de los espermatozoides; siendo dichos factores igualmente utilizados para establecer los efectos de la criopreservación sobre el semen canino ^(9, 27). El creciente interés y la cada vez, mayor relevancia comercial de la IA, han motivado que en el mundo, numerosos investigadores trabajen para desarrollar y mejorar las técnicas relacionadas con la criopreservación del semen canino, así como las metodologías para realizar la IA ⁽⁶⁾.

El objetivo de esta revisión es abordar información general y derivada de investigaciones recientes respecto a la inseminación artificial, la evaluación del semen canino y los diferentes procedimientos para su criopreservación; dada la relevancia que este tema ha suscitado por la limitada aplicación e imperiosa necesidad de procedimientos de vanguardia en la reproducción asistida para la especie canina en nuestro medio.

Evaluación del semen canino

Existen una gran variedad de parámetros y pruebas de laboratorio que han sido probadas para evaluar la calidad del semen usado para IA, y así predecir la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática ⁽³⁷⁾. Los principales parámetros para la evaluación del semen canino son:

Apariencia: El semen debe ser de aspecto cremoso y de color blanquecino, debido a la presencia de los espermatozoides. Sin embargo, estas características varían dependiendo fundamentalmente de la concentración espermática del eyaculado y de la presencia de contaminantes. Por ejemplo, una coloración amarillo intenso, indica presencia de orina, la cual es espermicida por sus contenidos ureicos y pH ácido, afectando la calidad del semen. Una coloración verde o roja, pueden indicar patologías o contaminaciones que pueden conducir a la decisión de descarte del semen ⁽¹⁰⁾.

Volumen: El volumen es medido mediante un tubo colector graduado; donde la cantidad de eyaculado varía según la edad, el tamaño, la frecuencia de colecta, métodos y duración de las colectas. El volumen normal varía de 1 a 40 mL por eyaculado ⁽¹⁾.

Movilidad masal: Para la observación de la movilidad masal se examina una muestra de semen no diluido en aumento de 4X o 10X para observar la existencia eventual de “oleadas”, movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior dispersión de los espermatozoides. La existencia de estas ondas se considera generalmente como indicio de buena vitalidad y alta concentración de los espermatozoides en el eyaculado ⁽¹⁰⁾.

Movilidad individual: Este parámetro es utilizado como indicador de la función espermática ⁽³⁷⁾. La movilidad es normal cuando el espermatozoide presenta un movimiento progresivo que le permite avanzar con cierta rapidez. Normalmente se desplazan gracias a movimientos de la cola al mismo tiempo que experimentan una rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que la progresión final resulta rectilínea. Para evaluar la movilidad individual se utiliza un microscopio óptico y aumento de 40X. Una movilidad progresiva adecuada para inseminación artificial debe ser de 70% aproximadamente ⁽¹⁰⁾.

Morfología. La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación seminal, dado que intrínsecamente está implicada en los problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies; además clasificaron las anomalías espermáticas caninas como primarias (aquellas que se generan en la espermatogénesis) y secundarias (aquellas ocurridas durante el trayecto

entre los testículos y el epidídimo o debido a la manipulación del semen). Los reproductores caninos deben presentar un 70% de células espermáticas normales en la evaluación seminal ^(15, 20). O según Romagnoli ⁽²⁸⁾, tener menos de un 20% de espermatozoides patológicos, en una evaluación de al menos 100 células, y hasta 200 espermatozoides en casos de infertilidad.

Concentración: La concentración de un eyaculado se determina por medio de un hemocitómetro o por espectrofotometría. Una concentración normal para el semen canino está entre 200 y 1200 millones de espermatozoides por mililitro ⁽¹²⁾, con un número total de espermatozoides por eyaculado entre 400 y 2000 millones ⁽²⁸⁾.

Integridad y funcionalidad de membrana:

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. 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 ⁽³⁷⁾. Puede utilizarse colorantes vitales tales como la eosina/azul de anilina, azul de tripano, eosina/negrosina.

Este último es uno de los más ampliamente utilizado en todas las especies domésticas debido a que es un método simple, económico, rápido y no requiere de manipulación celular para determinar las proporciones de espermatozoides vivos normales y anormales, y espermatozoides muertos. Esta técnica tiñe de color rosado aquellos espermatozoides que presentan una membrana alterada mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo púrpura. Además la tinción con eosina/negrosina, preferiblemente en un microscopio de contraste de fase, permite evaluar el estado acrosomal de espermatozoides vivos y muertos.

Actualmente se han utilizado tinciones fluorescentes, las cuales presentan una mejor

precisión en el estudio de la membrana espermática, entre los cuales se puede mencionar el diacetato de carboxifluoresceína y el yoduro de propideo, visualizando los espermatozoides funcionales de color verde, mientras que los espermatozoides muertos, se observan de color naranja ^(25, 27).

Otro método para la evaluación de funcionalidad e integridad de la membrana de los espermatozoides es el test hipoosmótico (*Hypoosmotic Swelling Test, HOST*) que consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula con el objetivo de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento y enrollamiento de la cola, mientras que las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma de la cola. Por lo tanto, esta prueba se constituye en un signo de integridad funcional de la membrana espermática.

El HOST ha sido adaptado para evaluar espermatozoides de varias especies domésticas incluyendo el perro, en donde se encontró que el hinchamiento hipoosmótico estaba relacionado directamente proporcional con la movilidad espermática, sin embargo no se ha relacionado la respuesta a HOST con la capacidad fertilizante del espermatozoide en caninos ⁽²⁵⁾. Las características del semen fresco obtenido de perros de diferentes razas se muestran en la tabla 1.

Otros parámetros de importancia en la evaluación del semen canino son el **pH**, que varía normalmente en un rango muy estrecho de 6.0-7.5, con un promedio de 6.5. ⁽¹⁰⁾. La determinación de **sedimentos**, que están generalmente ausentes, aunque pueden encontrarse células epiteliales del tracto reproductivo. El **cultivo de bacterias** que suele producir un conteo menor a 10.000 unidades formadoras de colonias por mililitro, y debe ser negativo a *Mycoplasma* y *Brucella canis*. El número de **leucocitos** normal es < 2000/ml. Y la determinación de una baja concentración o ausencia de **fosfatasa alcalina** en el plasma seminal indica una eyaculación incompleta o una obstrucción bilateral de los epidídimos o los conductos deferentes ⁽²⁸⁾.

Tabla 1. Características de semen fresco obtenido de perros de diferentes razas.

<i>Variable seminal</i>	<i>Promedio ± DE</i>	<i>Referencia</i>
Volumen (ml)	1,7 ± 0,5	(31)
	1,2 ± 0,2	(10)
	1,9 ± 0,87	(32)
Concentración (x10 ⁶)	260,4 ± 72,9	(31)
	610,5±87,6	(10)
	324 ± 188,6	(32)
Movilidad progresiva (%)	95,7 ± 3,6	(31)
	88,7±1,2	(10)
	83,8% ± 9,5	(32)
Espermatozoides vivos (%)	86,5 ± 4,5	(31)
	94,5±0,6	(10)
	92 ± 4,7	(32)
Espermatozoides normales (%)	87,7 ± 6,9	(31)
	93,4±0	(10)
	83,5 ± 20	(32)
Integridad de membrana (%)	87,9% ± 8,1	(32)
	79.8% ± 6.6	(33)

Recolección de semen canino e inseminación artificial

Métodos de recolección del semen canino: La colecta del semen puede realizarse estimulando al macho con presencia o no, de una hembra en estro por estimulación manual del pene, o bien en casos especiales con ayuda del electro-eyaculador. Para la recolección manual, el semen se colecta dentro de un tubo de vidrio graduado, el cual se calienta a 37 °C, y con ayuda de un embudo igualmente precalentado. Para facilitar la recolección del semen, una persona se ubica a lado izquierdo del perro y lo estimula usando movimientos hacia atrás y hacia adelante, con la mano derecha a lo largo de la región proximal del pene, detrás del bulbo peneano. Cuando se efectúe la protrusión del pene, se ubican los dedos índice y pulgar detrás del bulbo, semejando de esta forma las contracciones vaginales de la hembra ^(10, 19).

Técnicas de inseminación artificial en caninos:

En el proceso natural de cópula el macho realiza la eyaculación dentro de la vagina de la hembra, mientras en la IA el depósito del esperma puede realizarse tanto intravaginalmente (IA intravaginal) como dentro del cuerpo del útero (IA intrauterina), dependiendo de la calidad del semen, del uso de semen fresco, refrigerado o congelado, y de los equipos disponibles. Cuanto más al interior del tracto genital sea realizada la técnica de inseminación, menos espermatozoides son necesarios para lograr la fertilización ⁽³⁹⁾. La IA intrauterina puede realizarse de forma quirúrgica o no quirúrgica (transcervical). En un estudio realizado con 422 hembras caninas se obtuvo una tasa de preñez del 84.4% mediante servicio natural, mientras mediante IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 % ⁽³⁸⁾.

La **IA intravaginal** es una técnica sencilla que se aplica con semen fresco o refrigerado. Cuando se trabaja con semen congelado, la IA es usualmente intrauterina, aunque algunos autores han obtenido buenos resultados con IA intravaginal ⁽³⁸⁾. En la IA intravaginal el semen es depositado en la vagina de la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal, y la longitud de la vagina. El catéter se introduce a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia la parte dorsal para luego dirigirlo cranealmente. Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado con la ayuda de una jeringa, luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida de 10 a 15 minutos con el tren posterior sobre elevado ⁽³⁸⁾.

La **IA intrauterina transcervical** puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con catéteres de 20 a 50 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro, con la punta protegida por una cubierta de nylon (catéter Noruego), o con un endoscopio para inseminación transcervical (ver figura 1). Con la hembra en posición, el operador fija el cérvix entre sus dedos a través de la pared abdominal, con la otra mano introduce el catéter hasta la región del cuello, retira la cubierta de nylon y penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio. La hembra no necesita sedación, el operador requiere cierto entrenamiento, y el equipamiento posee un costo considerable ⁽³⁸⁾.

Figura 1. Endoscopio para inseminación transcervical. (Fuente: Minitub®, 2009)



La **IA intrauterina quirúrgica** puede realizarse mediante laparotomía, con anestesia general o epidural. Se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21, con el bisel hacia arriba y una inclinación de 45 °C. Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones. También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica haya sido utilizada sólo ocasionalmente ⁽³⁸⁾.

Criopreservación de semen canino

La IA en caninos ha tenido un gran auge principalmente en los últimos años, estimulando estudios en el diseño de protocolos para conservar el semen canino. Sin embargo, las principales dificultades para la criopreservación eficiente de semen canino, están en que la técnica induce estrés osmótico, químico y mecánico a la célula, causando la muerte de algunos espermatozoides y un daño severo en los que sobreviven a la descongelación, reduciendo la capacidad fertilizante ⁽³⁵⁾.

Además, las células se ven expuestas a ambientes hipertónicos que contienen agentes crioprotectores; lo que inicialmente causa que éstas se contraigan debido a la salida de agua, y luego retomen su volumen normal por la rápida difusión del crioprotector, evitando la formación de hielo intracelular que puede generar daño en la membrana celular. Durante la descongelación, las células sufren cambios similares en el volumen cuando el agua regresa a la célula y el crioprotector es desplazado hacia el medio extracelular ⁽⁸⁾.

Después de la descongelación el espermatozoide muestra varios cambios ultraestructurales tales como daño en el DNA ⁽⁵⁾, rompimiento de la membrana plasmática, peroxidación de lípidos de la membrana ⁽³⁹⁾, daños

acrosomales como es el hinchamiento del acrosoma, distribución del contenido acrosomal no uniforme, y vesiculación de la membrana externa acrosomal y de la membrana plasmática ⁽⁸⁾.

Además, la adición y el retiro de agentes crioprotectores durante la congelación y la descongelación, pueden inducir tensión mecánica mortal para la célula, e incluso otros problemas que incluyen la toxicidad química de los crioprotectores y su influencia negativa en el aparato genético de los espermatozoides ⁽¹⁴⁾.

Diluyentes y crioprotectores utilizados en la criopreservación de semen canino:

Diferentes diluyentes han sido evaluados para criopreservar semen en caninos. Los trisacáridos han sido incluidos en diluyentes Tris-Base (TB) con el fin de estabilizar las membranas mediante la interacción de estos azúcares con los fosfolípidos de la misma ⁽³⁸⁾. La adición de crioprotectores modifica la permeabilidad de la membrana, disminuyendo la conductibilidad hidráulica y por lo tanto limitando la pérdida de volumen y el estrés osmótico.

Los crioprotectores que penetran en las células son más efectivos después de que ellos han alcanzado un equilibrio a través de membrana, por lo que se considera que un crioprotector óptimo debe atravesar rápidamente la membrana celular con una baja dependencia de temperatura y debe tener baja toxicidad. El crioprotector más comúnmente utilizado para semen canino es el glicerol, seguido por el polietilenglicol (PEG), y el dimetilsulfoxido (DMSO) ⁽²⁹⁾.

Para el caso del glicerol, se reporta que causa una disminución de la unión del espermatozoide al oocito, lo cual disminuye su capacidad fertilizante ⁽¹⁶⁾. El DMSO ha mostrado tener baja capacidad protectora en semen canino, mientras que el PEG aunque no presenta diferencias significativas en cuanto a movilidad, vigor y porcentaje de anormalidades morfológicas respecto al glicerol, tiene un efecto post descongelación de aumento en el porcentaje de espermatozoides con velocidad curvilínea y desplazamiento lateral de la cabeza, las cuales son características de una condición similar a la capacitación que afecta la membrana del espermatozoide y posiblemente tiene un efecto negativo sobre la longevidad de éste ⁽²⁹⁾.

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 movilidad. 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 ⁽³⁷⁾.

Ensayos realizados por Stornelli *et al.* ⁽³⁸⁾ con diluyentes como TB (Tris 2,4 g, ácido cítrico 1,4 g, fructosa 0,8 g, glicerol 5 mL, yema de huevo 20% v/v, penicilina sódica 0,06 g, sulfato de estreptomina 0,1 g, agua destilada csp 100 mL o con TB y agregado de 2,5% y 7% de trealosa, demuestran que el semen diluido con TB presenta índices de descongelación para movilidad, vigor, integridad de membrana y acrosomía superiores a los obtenidos con el semen diluido con TB y agregado de trealosa.

Se han estudiado amidas tales como la dietilformamida (DEF) y la dimetilformamida (DMF), como posibles agentes crioprotectores, debido a que tienen propiedades físico-químicas que les permite tener una alta difusión a través de la membrana celular y no son tóxicos cuando se adicionan antes de la criopreservación ⁽⁴⁾. La DMF ha sido evaluada para su efecto protector en la criopreservación de semen equino, presentando mejores parámetros espermáticos que cuando es congelado con glicerol ⁽³⁾.

Para el caso de la criopreservación de semen canino, solo se conoce un reporte de investigación ⁽²³⁾, donde utilizando un diluyente en base a lactosa y 5% DMF, se encontraron porcentajes de movilidad de $45.5\% \pm 11.3$, integridad de membrana de $49.2\% \pm 6.6$, y morfología normal de $65.3\% \pm 14.2$. Mientras en un trabajo de investigación desarrollado por los autores de esta revisión, se encontraron porcentajes de movilidad de $44,5\% \pm 17,7$, integridad de membrana de $33,4\% \pm 9,7$ y morfología normal de $60\% \pm 16,5$, para semen canino criopreservado con 5% DMF.

A pesar de diversas modificaciones que se han implementado en la criopreservación de semen canino tales como suplemento de Tris-yema de huevo ^(35, 36), kits comerciales ⁽³⁴⁾, variaciones en la concentración de glicerol, y la utilización de otros crioprotectores ^(23, 29) aún se presentan efectos adversos debido principalmente al estrés quimiosmótico que induce no solamente la muerte de algunos espermatozoides, sino también daños latentes en la población de espermatozoides que sobreviven después de la criopreservación ^(25, 35).

Técnicas para la conservación y criopreservación de semen canino

La **refrigeración** a 4°C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin embargo la refrigeración de semen es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra ⁽²⁶⁾. Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C. a pesar de esto no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C ⁽³⁶⁾.

La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura ⁽³²⁾.

La **congelación** por almacenaje en nitrógeno líquido, es considerada como la mejor técnica para preservar semen a través del tiempo, debido a que se obtiene un porcentaje de espermatozoides móviles descongelados entre el 60 y 70%, y una tasa de fertilidad del 60% ^(2, 8). Otras técnicas de criopreservación de semen canino incluyen el uso de hielo seco o congeladores automáticos para congelar las pajillas de semen (ver figura 2), sin embargo, requieren de igual manera de nitrógeno líquido para el almacenamiento final de las pajillas ⁽²¹⁾.

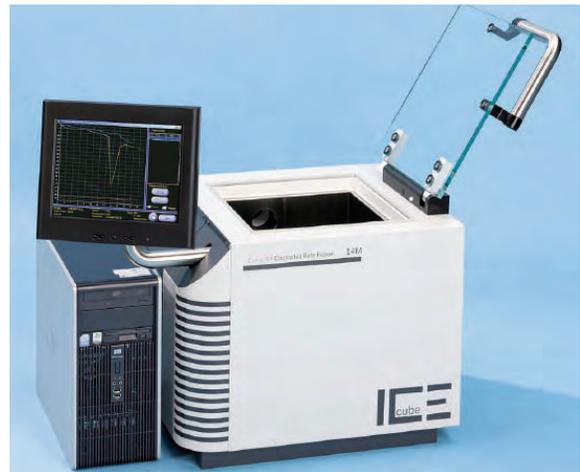
Otra alternativa para la congelación de semen esta en el uso de ultracongeladores de -152°C; pero no se han encontrado diferencias significativas en los valores de los parámetros espermáticos entre este método de congelación y el almacenaje con nitrógeno líquido ⁽²⁾.

La congelación con exposición previa del semen empacado a vapores de nitrógeno antes de sumergirlo totalmente en nitrógeno líquido, se considera como congelación rápida. Algunos trabajos de congelación rápida han sido desarrollados utilizando semen canino, evidenciando resultados superiores por congelación lenta mediante el uso de congeladores programables ^(7, 30).

El semen canino puede congelarse en pastillas o pajuelas de 0,5 ó 0,25 mL. Las pajuelas son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en la descongelación.

Las pastillas se descongelan a 37°C, utilizando una solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0.5 mL se descongelan en baño térmico a 37°C, durante un minuto, o a 75°C durante 6 segundos, mientras que las minipajillas (0,25 ml), deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos ⁽¹⁰⁾.

Figura 2. Congelador de semen computarizado. (Fuente: Minitub®, 2009)



La **congelación ultrarrápida o vitrificación** es uno de los más importantes avances de la criobiología reciente; esta técnica previene la formación de cristales de hielo al interior de la célula, evitando el daño celular ⁽¹⁷⁾. Se considera un método de congelación ultrarrápida, dado que para la vitrificación se emplean tasas de congelación de hasta 15.000 a 30.000 °C/min ⁽³⁸⁾, y todo el proceso tarda solo algunos segundos ⁽¹⁴⁾. Las ventajas de la vitrificación son grandes respecto a los métodos tradicionales de congelación, por los menores costos de los equipos, la sencillez de los procedimientos, y la disminución del tiempo de congelación ⁽¹⁷⁾.

En la vitrificación clásica se utilizan altos porcentajes de crioprotectores permeables (30-50%) en comparación con la congelación lenta (5-7%), esto principalmente para evitar la rápida formación de cristales de hielo, lo que la hace esta técnica inaplicable en espermatozoides por los efectos osmóticos letales de dichas sustancias ⁽²⁴⁾. Sin embargo, investigaciones recientes ⁽¹⁴⁾ han demostrado que en la vitrificación se puede evitar el uso de los crioprotectores permeables clásicos, previniendo la formación de hielo intracelular, y los efectos osmóticos y tóxicos derivados de sus altas concentraciones.

En estudios de vitrificación de espermatozoides humanos realizados por Isachenko *et al.* ⁽¹³⁾, se encontró un porcentaje de movilidad espermática 2,87 veces más

alta para la vitrificación sin agentes crioprotectores, en comparación con la vitrificación en presencia los mismos. Para el caso específico del semen canino no se conocen reportes de vitrificación, sin embargo dado el éxito de esta técnica en la conservación de semen humano, la vitrificación podría constituirse en el futuro de la criopreservación del semen canino.

Abstract

Dada la importancia de la especie canina para la sociedad humana actual, en aspectos como la compañía, el servicio, el trabajo y la seguridad, su reproducción eficiente se ha tornado en un tema de amplio interés para criadores, veterinarios y propietarios. Por lo tanto la inseminación artificial se ha constituido en una alternativa viable y económica para reproducir caninos de alto valor genético, comercial o afectivo.

La IA en la especie canina ha evolucionado desde la simple recolección y transferencia de semen fresco en el tracto reproductivo de la hembra en estro hasta

la implementación de la inseminación intrauterina transcervical con semen criopreservado en hembras con celo natural o inducido. Sin embargo, aún es necesario establecer protocolos de criopreservación de semen canino que permitan la optimización de la técnica para alcanzar mayores tasas de gestación, sobretodo en lo referente a la investigación de sustancias crioprotectoras que reduzcan de manera más eficiente las alteraciones producidas en los espermatozoides.

A pesar de los avances alcanzados en los últimos años en los procesos técnicos de la IA en caninos, en muchos países esta biotecnología es apenas una técnica aplicada de manera insipiente por pocos veterinarios con niveles bajos de especialización en dichos procesos, o incluso de manera empírica por algunos criadores; por lo cual es necesario enfatizar en la relevancia de mejorar las condiciones de transferencia tecnológica, capacitación e investigación en inseminación artificial y criopreservación de semen canino, de manera que puedan ser cubiertas las expectativas de reproducción de esta especie doméstica de gran valor para la humanidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguiar P, Costa M, Abreu J, Abreu C. 1994. Coleta e avaliação de sêmen canino. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 46(5): 537 – 544.
2. Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, et. al. 2005. Cryopreservation of semen in the dog: Use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*; 63: 72 – 82.
3. Alvarenga M, Papa F, Landim-Alvarenga F. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*; 89: 105 – 113.
4. Baudot A, Boutron P. 1998. Glass-Forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. *Cryobiology*; 37: 187 – 199.
5. Baumber J, Ball B, Linfor J, Meyers. 2002. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*; 58: 301 – 302.
6. Denis R, Milanes C. 1999. Tecnología para la inseminación artificial en la especie canina. *Revista Cubana de reproducción animal*; 25: 1 – 14.
7. Dobrinski I, Lulai C, Barth A, Pos K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility. Suppl*; 47: 291 – 296.
8. Eilts B. 2005a. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*; 64: 692 – 697.
9. Eilts B. 2005b. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*; 64: 685 – 691.
10. Fontecha E, 2006, Estandarización de un protocolo para la criopreservación de semen canino con congelador programable (CI-8800), Trabajo de grado (Médico Veterinario Zootecnista), Universidad de los Llanos. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villavicencio, p 42.
11. Gilmore J, McGann L, Liu J, Gao D, Peter A, et. al. 1995. Effect of Cryoprotectant Solutes on Water Permeability of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*; 53: 985 – 995.
12. Gobello C, Olivera M. 2005. El libro latinoamericano de la reproducción canina y felina. 2da ed. Medellín. Colombia: Editorial Biogénesis.
13. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Dessole M, Nawroth S, et. al. 2004. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of reproduction*; 71: 1167 – 1173.
14. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Dessole M, Nawrot S, et. al. 2007. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Biology of reproduction*; 19: 932 – 939.
15. Johnston S, Root M, Olson P. 2001. Disorders of the canine testes and epididymes. *Canine and Feline Theriogenology*. 1ra ed. Philadelphia: WB Saunders.
16. King W, Leibo S, Goodrowe K. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by

spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*; suppl 51: 99 – 108.

17. Lopera R, Méndez I, Peña M, Góngora A. 2007. Vitricación de oocitos bovinos inmaduros por el método de la pajilla abierta y estirada (open pulled straw – ops). *Revista colombiana de ciencias pecuarias*; 20(4): 540.
18. Manosalva I, Cortés C, Leyva V, Valdivia M, De los Reyes M, et. al. 2005. Efecto de la refrigeración sobre la movilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet Perú*; 16(2): 114 – 128.
19. Nunes Da Cunha I. 2008. Exame andrológico do cão Breeding soundness evaluation of male dog. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*; 1(1): 49 – 65.
20. Oettle EE. Sperm morphology and fertility in the dog. 1993. *J Rep Fert*; 47: 257– 60.
21. Olar T, Bowen R, Picket B. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*; 31: 451 – 461.
22. Olaya A, Muñoz S, Maldonado J. 2003. Evaluación de dos protocolos de inseminación artificial con semen congelado y uno de refrigeración en caninos de criaderos del departamento de Antioquia y comparación con la monta natural. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 16: 88 – 89.
23. Oliveira E, Juliani G, Marques A, Hery M. 2006. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Escola de Veterinária UFMG. Belo Horizonte*; 58: 1116 – 1122.
24. Orief Y, Schultze-Mosgau A. 2005. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? *Middle East Fertility Society Journal*; 10(3): 171 – 182.
25. Peña A. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 209 – 224.
26. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Forsberg C. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during log-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*; 62: 1498 – 1517.
27. Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D. 2005. New techniques for assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*; 64: 706 – 719.
28. Romagnoli S. 2002. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. *Proceedings of the Veterinary Sciences Congress*; 10-12: 167-170.
29. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*; 65, 1848 – 1858.
30. Rota A, Rota A, Martini M, Milani C, Romagnol S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev*; 45: 29 – 37.
31. Sánchez A, Rubilar J. 2001. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*; 1: 105 – 108.
32. Sánchez A, Rubilar J, Gatica R. 2007. Congelación de semen canino y evaluación de la fertilidad potencial. Instituto de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. [acceso: 4 de noviembre de 2009]. URL:<http://www.veterinaria.uchile.cl/publicacion/congresoxti/produccion/J40PRO~1.DOC>

33. Sánchez R, Cartagena P, Berland O. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la Fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; 17: 1- 7.
34. Schâfer-Somi S, Kluge S, Knapp E, Klein D, Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*; 66(2): 173 – 182.
35. Silva A, Cardoso R, Silva L, Chirinéa V, Lopes M. 2006. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*; 66(2); 456-462.
36. Silva A, Cardoso R, Uchoa D, Machado L. 2002. Effect to tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The veterinary journal*; 164: 244 – 246.
37. Stornelli M, De la Sota R. 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*; 25(2): 29 – 38.
38. Stornelli M, Stornelli M, De La Sota R. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*; 21(1): 58 – 66.
39. Watson P. 2000. The Causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*; 60-61: 481 – 492.