

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y FERTILIDAD DE SEMEN CANINO
CRIOPRESERVADO

Méd. Vet. María Alejandra Stornelli

Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Instituto de Teriogenología,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

La Plata, 2004

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA Y FERTILIDAD DE SEMEN CANINO
CRIOPRESERVADO

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: Méd. Vet. María Alejandra Stornelli
Director: Méd. Vet. M. Sc., Ph. D., Diplom. ECAR. Rodolfo Luzbel de la Sota
Codirector: Méd. Vet., Dr. Cs. Vet., Humberto Cisale
Lugar de Trabajo: Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Instituto de Teriogenología,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Miembros Titulares del Jurado:

Méd. Vet., Dr. Cs. Vet. Eduardo Aisen

Dr. Francisco Osvaldo Boccia

Ing. Zoot., Dr. Cs. Vet. Juan Carlos Gardon

La Plata, 2004

DEDICATORIA

A Horacio, Matías y Joaquín

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue realizada en la Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. El trabajo fue desarrollado en cooperación con la división perros del Servicio de Penitenciaria Bonaerense. Deseo agradecer a todos aquellos que me ayudaron a llevar a cabo este trabajo y especialmente a las personas que nombro a continuación:

Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota, Profesor Titular de la Cátedra de Reproducción Animal, director de mi tesis por abrir una puerta y mostrarme todo lo que había detrás, por haber creído y confiado en mi y por haberme acompañado a lo largo de todo el camino.

Dr. Humberto Cisale, co-director de tesis por haber colaborado desde el inicio en el desarrollo de este proyecto.

Med. Vet. Russo Angel, Profesor Adjunto de la Cátedra de Reproducción Animal, por ser para mí un ejemplo en la vida y en la docencia.

Med. Vet. María Cecilia Stornelli por acompañarme en el trabajo y en la vida día a día, por ayudarme a subir las lomas y a no caer en las pendientes.

Med. Vet. Cesar Savignone por haber trabajado conmigo todo este tiempo y lograr el equilibrio durante las crisis.

Med. Vet. Claudia Tittarelli por haberse unido a nosotros en el trabajo sin preguntar como, donde o cuando y ayudarnos a llevar todo hacia delante.

Med. Vet. Arauz María Sandra, Jefe del Servicio Central de Laboratorio por haberme permitido trabajar en dicho laboratorio durante el primer experimento de esta tesis.

Dra. Susana Jurado por haber prestado su asistencia técnica en el procesado y observación de las muestras destinadas a microscopía electrónica

Med. Vet Lorena Migliorisi, Verano Gómez, Andrés Soto, Sara Williams por hacer cálido, ameno y divertido el laboratorio de reproducción.

Med. Vet. Eugenia Pintos por su ternura y compañerismo en el trabajo.

Med. Vet. Ana Dragonetti por hacer más ameno mi trabajo en el consultorio clínico.

Med. Vet. Edgardo Guerrero por ayudarme con los perros del Servicio de Penitenciaría Bonaerense.

Lucy, mi profesora de inglés por haberme ayudado a comprender los trabajos en ese idioma.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE PUBLICACIONES	XIII
RESUMEN	XV
SUMMARY.....	XVI
 CAPITULOS	
1. INTRODUCCIÓN	1
Introducción	1
Bibliografía	14
 2. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE TRES DILUYENTES SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA A 4° C Y 15° C	 26
Introducción	26
Materiales y métodos	28
Experimento 1	29
Experimento 2	32
Resultados	33
Experimento 1	33

Experimento 2.....	39
Discusión y Conclusiones.....	42
Bibliografía	50
3. EFECTO DEL AGREGADO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EQUEX STM PASTE AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN CANINO CONGELADO-DESCONGELADO	56
Introducción	56
Materiales y métodos	59
Experimento 1	59
Experimento 2.....	62
Microscopía electrónica de transmisión.....	63
Resultados	64
Experimento 1	64
Experimento 2.....	64
Microscopía electrónica de transmisión.....	67
Discusión y Conclusiones.....	70
Bibliografía	75
4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREALOSA AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN CANINO CONGELADO-DESCONGELADO	82
Introducción	82

Materiales y métodos	85
Experimento 1	85
Experimento 2	88
Resultados	90
Experimento 1	90
Experimento 2	90
Discusión y Conclusiones	93
Bibliografía	96
5. PORCENTAJES DE PREÑEZ OBTENIDOS MEDIANTE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO UTILIZANDO UN DILUYENTE TRIS BASE CON Y SIN EL AGREGADO DE 1,5% DE EQUEX STM PASTE.....	101
Introducción	101
Materiales y métodos	106
Resultados	108
Discusión y Conclusiones	108
Bibliografía	112
6. BIOGRAFÍA PERSONAL.....	118

LISTA DE TABLAS

Tabla

- 2-1. Coeficientes de correlación de Pearson entre el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, el vigor, la osmolaridad y el pH de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferente (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA). El efecto de temperatura fue NS 38
- 2-2. Coeficientes de correlación de Pearson entre el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, el vigor, la osmolaridad y el pH de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferente (fracción prostática y MRA). El efecto de temperatura fue NS 42
- 5-1. Porcentaje de preñez y tamaño de camada obtenido en diferentes trabajos en los cuales se utilizó semen congelado-descongelado en pajuelas de 0,5 ml con diferentes técnicas de inseminación artificial 105

LISTA DE FIGURAS

Figura

- 2-1A. Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 1..... 31
- 2-1A. Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 2..... 33
- 2-2. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA; interacción de diluyente por día, $P < 0,01$) 35
- 2-3. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA; interacción de diluyente por perro, $P < 0,01$). 36
- 2-4. Cuadrados medios mínimos \pm ES de osmolaridad y pH de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA). A: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; B: pH, efecto de diluyente, $P < 0,01$; C: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; D: pH, efecto de diluyente, $P < 0,01$)..... 37
- 2-5. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferentes (fracción prostática y MRA; efecto de temperatura, NS; interacción de diluyente por día, $P < 0,01$) 40
- 2-6. Cuadrados medios mínimos \pm ES de osmolaridad y pH de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferentes (fracción prostática y MRA; efecto de

temperatura, $P > 0,25$). A: osmolaridad, efecto de diluyente, $P < 0,04$; B: pH, efecto de diluyente, $P > 0,36$; C: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; D: pH, efecto de diluyente, $P > 0,07$).....	41
3-1A. Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 1.....	60
3-1B. Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 2.....	63
3-2. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 4 perros (Experimento N° 1) en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB con el agregado de 0,5%, 1,0% y 1,5% de Equex STM paste. Contrates: TB vs. TBEQ05, TBEQ10 y TBEQ15; TBEQ05 vs. TBEQ10 y TBEQ15; TBEQ10 vs. TBEQ15; barras con diferentes letras difieren a $P < 0.01$	65
3-3. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros (Experimento N° 2) en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB con el agregado de 1,0%, 1,5% 2,0% y 2,5% de Equex STM paste. Contrates: TB vs. TBEQ10, TBEQ15, TBEQ20 y TBEQ25 TBEQ10 vs. TBEQ15, TBEQ20 y TBEQ25; TBEQ15 vs. TBEQ20 y TBEQ25; TBEQ20 vs. TBEQ25; barras con diferentes letras difieren a $P < 0.01$	66

3-4.	Fotomicrografías (MET) de anomalías espermáticas observadas en semen fresco. A: lipping acrosomal (30.000 X); B: macrocefalia (16.000 X); C: Defecto de “Dag” enrollamiento de la cola sobre si misma (25.000 X); D: defecto de “Dag” enrollamiento de la cola sobre la cabeza (31.000 X).....	68
3-5.	Fotomicrografías (MET) de anomalías espermáticas observadas en semen fresco. A: hinchazón de la membrana plasmática (30.000 X); B: hinchazón de la membrana acrosomal (30.000 X); C: formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y plasmática (40.000 X); D: Ruptura de la membrana (76.000 X)....	69
4-1A.	Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 1.....	87
4-1B.	Diseño experimental utilizado en el Experimento N° 2.....	89
4-2.	Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB más el 5%, 7% y 9% de trealosa. Barras con diferentes letras difieren a P<0.01.....	91
4-3.	Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB más el 2.5% y 5.0% de trealosa. Barras con diferentes letras difieren a P<0.01	99

ABREVIATURAS

ACR	Porcentaje de acrosomas intactos
CASA	Computer assisted sperm analysis (sistema computarizado de análisis espermático)
CON	Concentración espermática total
EP	Endósmosis positiva
FA	Fosfatasa alcalina
IA	Inseminación artificial
ME	Porcentaje de malformaciones espermáticas primarias y secundarias
MOT	Motilidad progresiva individual
PVI	Porcentaje de espermatozoides vivos
TB	Tris base
TYH	Tris-yema de huevo
VIG	Vigor
VOL	Volumen

LISTA DE PUBLICACIONES**Capítulo II**

1. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Sauvignone 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. IETS Meeting. Foz do Iguassu, Brazil. January 12-15. *Theriogenology*. 57:483.
2. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, de la Sota RL. 2004. Effects of three different extenders on canine semen stored at 4°C and 15°C. *Reprod. Domest. Anim.* (Enviado).

Capítulo III

1. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Sauvignone CA, de la Sota RL. 2002. Comparison of different concentrations of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Third European congress on reproduction in companion, exotic and laboratory animals. Liège, Belgium. May 10-12. p 174-175.
2. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Jurado SB, de la Sota RL. 2004. Viability study and ultrastructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex-STM paste concentrations. 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Porto Seguro, Brasil. August 8-12. 2:516.
3. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Jurado SB, de la Sota RL. 2005. Viability study and ultrastructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex-STM paste concentrations. *Theriogenology*. (En preparación).

Capítulo IV

1. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MS, Tittarelli CA, de la Sota RL. 2003. Efecto de diferentes concentraciones de trealosa sobre la supervivencia espermática posdescongelación en caninos. V Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba. 27-29 de Junio. p 456.
2. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MS, Tittarelli CA, de la Sota RL. 2003. Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Rev. Bras. Reprod. Anim. 27:359-361.
3. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MS, Tittarelli CA, de la Sota RL. 2005. Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. (En preparación).

Capítulo V

1. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MS, Tittarelli CA, de la Sota RL. 2005. Porcentajes de preñez obtenidos mediante inseminación artificial con semen congelado-descongelado utilizando un diluyente Tris Base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM paste. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba. (En preparación).

Título: Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado

Resumen: El objetivo de esta tesis fue de optimizar un protocolo de refrigeración y uno de congelación de semen canino para implementarlos en Argentina. Se realizaron 4 experimentos. En el primero se estudió el efecto de tres diluyentes (fracción prostática, Tris yema de huevo, MRA) y dos temperaturas (4° C, 15° C) sobre la supervivencia espermática durante 4 días. El MRA mantuvo el semen con más del 50% motilidad, endósmosis positiva y acrosomas intactos, con más del 25% de espermatozoides vivos y con vigor superior a 3 luego de 4 días a 4° C. Además, mantuvo la osmolalidad dentro del rango del semen fresco. No hubo diferencias en los parámetros espermáticos cuando el semen fue refrigerado con MRA a 4° C y 15° C. En el segundo experimento se estudió el efecto del agregado de diferentes porcentajes de Equex al diluyente con Base Tris (TB) sobre la viabilidad espermática y los cambios ultraestructurales ocurridos en los espermatozoides al descongelado. Aquí se observó que el diluyente TB con el agregado de 1,5% de Equex protegía más eficientemente a los espermatozoides (índice al descongelado >80%), y reducía un 20% el daño celular observado por microscopía electrónica al descongelado. Posteriormente se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de trealosa incorporadas al diluyente en TB sobre la viabilidad espermática al descongelado. El agregado de trealosa al TB no mejoró la calidad del semen al descongelado. Finalmente se evaluó la fertilidad mediante un programa de inseminación artificial (IA) utilizando un diluyente TB con y sin el agregado de 1,5% de Equex. Las IA en las cuales se utilizó el diluyente TB con el agregado de 1,5% de Equex si bien tuvieron un 28% más de preñez con respecto a las IA con el diluyente TB sin el agregado de Equex, estas diferencias no fueron significativas. Si bien en las IA en las cuales se utilizó el diluyente TB con el agregado de 1,5% de Equex se observó un 28% más de

preñez con respecto a las IA realizadas con el diluyente TB sin el agregado de Equex, las diferencias encontradas no fueron significativas.

Palabras claves: canino-semen-criopreservación

Title: Canine semen cryopreservation: viability and fertility studies

Summary: The aim of this dissertation was to optimize a protocol for chilling and freezing canine semen to be used by clinicians in routine reproductive practice in Argentina. We accomplished this aim by conducting four experiments. In the first experiment, we examined the effect of three extenders (prostatic fraction, tris-egg yolk, MRA) and two temperatures (4° C, 15° C) on sperm characteristics of canine semen stored chilled for four days. The MRA maintained sperm motility, membrane and acrosome integrity above 50%, live spermatozoa above 25% and velocity above 3 after four days of storage. Furthermore, the MRA was the most efficient extender to maintain osmolarity within the range of fresh semen. No differences in sperm characteristics were detected between semen stored at 4° C and 15° C. In the second experiment, the effect of different Equex STM past concentrations added to a tris base (TB) extender on sperm viability and cell changes at the electron microscopy level were assessed in frozen-thawed semen. The TB extender with 1.5% of Equex was more efficient protecting spermatozoa (post thawing index >80%), and reduced by 20% cell damage as observed by electron microscopy after thawing. The third experiment assessed the effect of adding different trehalose concentration to the TB extender on sperm viability after thawing. Adding trehalose to the extender did not have any beneficial effect on sperm viability at thawing. The fourth experiment was designed to test the fertility of an artificial insemination (AI) program were frozen-thawed semen with TB extender with or without 1.5% of Equex was used. When 1.5% Equex was included in the extender, the pregnancy rate was 28% higher. However, these differences were not statistically significant.

Key words: canine-semen-cryopreservation

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

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

La IA ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Conjuntamente con las metodologías de criopreservación de semen, actualmente se está aplicando cada vez con más frecuencia y urgencia métodos para preservar gametas que permitan establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (50). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (24).

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (63, 80). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (38) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954, Rowson (74) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (78) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación

de semen han aumentado en forma creciente. Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas (25, 26, 27, 28, 34). Este hecho se relaciona tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en esta área. Esto puede ser fácilmente comprendido si pensamos en las claves del éxito de la IA en caninos: momento adecuado de IA, uso de semen buena calidad y selección de la técnica de IA adecuada (28). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios.

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, el espermatozoide debe ser capaz de expresar su capacidad funcional a través de la ocurrencia de variados procesos con una adecuada secuencia temporal. Es así que un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (5, 95). Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática. Sin embargo, es imposible reemplazar las pruebas de campo, pues las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente que ocurrirá cuando se encuentren óvulo y espermatozoide *in vivo* (5, 49). Los métodos más precisos para evaluar la capacidad de fecundante del semen luego de ocurrido un proceso de criopreservación son las

pruebas de campo, es decir la inseminación de un gran número de hembras (4). Este hecho fue posible en los animales de granja (17, 18, 77). Sin embargo, en pequeños animales las pruebas de fertilidad a campo son sumamente costosas y usualmente solo un pequeño número de hembras está disponible para el estudio, razón por la cual poseen baja sensibilidad.

Las pruebas *in vitro* de evaluación seminal pueden relacionarse con la morfología o viabilidad espermática (75). Las pruebas que se relacionan con el estudio morfológico del espermatozoide se considera que reflejan la producción espermática y el almacenamiento extragonadal. Las pruebas que evalúan la viabilidad espermática proveen información no solo de la viabilidad espermática del semen producido sino también del efecto causado por el estrés de la recolección y la criopreservación sobre las células espermáticas (76). Los procesos de congelación y descongelación someten a los espermatozoides a diferentes tipos de estrés provocando daños de membrana, alteración del metabolismo espermático y pérdida de la motilidad, factores que afectan la capacidad fecundante del semen (52, 89, 93, 94).

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la criopreservación. Los espermatozoides necesitan ser motiles y capaces de sufrir hiperactivación para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito cuando ambas células se encuentran en el oviducto. La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. A pesar de que la evaluación de la motilidad mediante esta metodología es suficientemente repetible entre los investigadores de un laboratorio, es difícil comparar resultados entre diferentes laboratorios ya que es el parámetro más influenciado por el operador (75). El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática (43), y permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (e.g. espermatozoides que muestran movimientos

lineales o de hiperactividad) (41). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración (86). Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática.

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (93, 94). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (52, 53, 93). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Existen variadas metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Una de estas metodologías está representada por tinciones que permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos, como por ejemplo eosina-nigrosina o azul tripán y la posterior visualización de los espermatozoides en microscopio de luz. (44). Otra posibilidad consiste en evaluar simultáneamente viabilidad espermática e integridad acrosomal usando triple tinción (80). También pueden emplearse sustancias fluorescentes permeables como marcadores de integridad de membrana, por ejemplo yoduro de propidio o bisbencimida (propidium iodide o bisbenzimidide) usando microscopio de fluorescencia (33). La aplicación del citómetro de flujo permite realizar una evaluación exacta y objetiva de la célula espermática mediante la aplicación de pruebas fluorescentes (37). Sin embargo el costo de los equipos impide el uso de esta técnica en muchos laboratorios de investigación y centros comerciales. Una prueba sencilla, poco costosa y que posee buena correlación con la capacidad fecundante del semen es la prueba de endósmosis

positiva (EP) la cual induce enrollamiento de la cola de los espermatozoides que poseen membrana plasmática intacta (39, 69).

Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica. El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización. La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lectinas marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (47, 81). Dentro de las lectinas marcadas con fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (47). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC (55).

El semen canino puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (89). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (30, 66). En 1956, Harrop (38) comunica la primera preñez en caninos con semen refrigerado a 4° C durante 4 días usando un diluyente a base de leche. Desde entonces varios diluyentes han sido probados para su uso con semen canino (7, 13, 70). Uno de los diluyentes más comúnmente usados es el Tris-citrato conteniendo 20% de yema de huevo (7, 28, 70). La longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C (12). Xia-Zou (96) comunicó que la

motilidad del semen de toro se mantenía mejor a 15° C que a 4° C. Semen diluido con MRA® y almacenado a 15 °C fue usado satisfactoriamente en cerdos (61). En conejos, los diluyentes con Tris Base son efectivos para almacenar el semen a 15° C y los resultados obtenidos son más satisfactorios que los obtenidos al almacenar el semen a 5° C (67). Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenado son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración. Por lo tanto son necesarias nuevas investigaciones sobre la capacidad de diferentes diluyentes y temperaturas para mantener altos porcentajes de espermatozoides vivos y funcionales en el tiempo.

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco, este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (94).

Los espermatozoides criopreservados de canino, exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática (73). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y mejorando la calidad de los espermatozoides sobrevivientes (93, 94). Existen variados tipos de daños asociados a las diferentes formas de estrés que debe soportar la célula durante los procesos de criopreservación. Estas formas de estrés están relacionadas con cambios de temperatura (shock de frío), estrés tóxico (estrés relacionado con los efectos tóxicos provocado por los crioprotectores), formación y disolución de hielo en el

medio ambiente extracelular (31, 32, 87, 89, 90). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de membrana así como el metabolismo y función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (36).

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (6, 78). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (6, 11, 19, 20, 21, 22, 25, 63, 68, 71). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen, habiendo sido utilizado también el dimetilsulfoxido (DMSO) (21, 23). Existen otros compuestos como el duodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (48, 64, 65, 71).

La yema de huevo es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío y es generalmente incluido en los diluyentes utilizados para criopreservación. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (40, 42). 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 (87). Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejora el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (9, 35, 62, 65). Compuestos detergentes que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) solos o como un componente del Equex STM paste han sido incluidos en diluyentes de semen usados para la congelación de semen canino (28, 29, 59, 66). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia espermática al descongelado (65, 71, 81) así

como la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos (82, 83, 84). Peña (65), observó un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al utilizar dos pasos de dilución en el protocolo de congelación cuando incorpora Equex STM paste al diluyente. Sin embargo no se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad espermática al descongelado. Notlthing (58) obtuvo altos porcentajes de preñez mediante IA intravaginal con semen criopreservado utilizando un diluyente con el agregado de Equex STM paste. Así mismo Rota (72) obtuvo buenos resultados utilizando inseminación artificial intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste. Sin embargo no existen estudios de fertilidad en relación con las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en la formulación de los diluyentes.

Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino (57, 97). Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (88). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos (88). La suplementación del diluyente con azúcares influencia la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. El tipo y localización del impacto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (10, 14, 15, 88).

La trealosa es usada como una molécula protectora en la estabilización celular durante la desecación-congelación. En ambos procesos (congelación, desecación) ocurren fenómenos de deshidratación celular. Este azúcar es acumulado en altas concentraciones (superiores al 20%) en

muchos organismos capaces de sobrevivir a la deshidratación completa. Por ejemplo las levaduras utilizadas en panadería, las cuales han sido estudiadas exhaustivamente, no sobreviven a la desecación durante la fase de crecimiento logarítmico (en la cual no poseen cantidades significativas de trealosa), pero durante la fase estacionaria ellas acumulan este azúcar y pueden desecarse satisfactoriamente (8, 15).

Se ha comunicado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado en espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con trealosa (2, 3, 46). Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce y su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (14).

Por debajo de aproximadamente -5°C , las células y el medio que las rodea permanece no congelado gracias al superenfriamiento y al descenso del punto de congelación producido por los solutos protectores presentes frecuentemente en el medio externo, es así que el contenido de la célula permanece no congelado y superenfriado, presumiblemente pues la membrana plasmática bloquea el desarrollo de cristales de hielo dentro del citoplasma. El agua superenfriada de la célula, tiene por definición un potencial químico mayor que el agua parcialmente congelada existente en el exterior de la célula. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo. Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. Si el enfriamiento es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua y concentrar suficientemente los solutos para eliminar el superenfriado y mantener el potencial químico del

agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior (54).

Los azúcares no permeables (trehalosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (1, 14, 15). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular por la cristalización del hielo (3).

El mayor grado de estrés sufrido por los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana resulta en una transición de fase termotrópica, fusión y aumento de la permeabilidad de membrana. Debido a que el agua, ligada al hidrógeno de los grupos polares de las cabezas, es removida por la deshidratación aumenta la temperatura de transición (T_m) de gel a líquido cristalino. Sin embargo la solubilidad fosfolipídica de la fase gel está siempre disminuida relativamente en comparación con lo que se observa en la fase líquida cristalina y podrían existir diferencias de sensibilidad en la T_m en el estado de hidratación lo cual puede resultar en separación fosfolipídica (14). La trehalosa posee una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (10, 14, 15, 16) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (14). Este azúcar muestra una interacción directa con los fosfolípidos de las cabezas de los grupos polares durante la desecación y congelación, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que se relacionaría con la disminución de T_m (14, 15). El agregado de trehalosa al diluyente utilizado para la congelación de semen canino podría mejorar la viabilidad espermática al descongelado.

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

de membrana asociados con la fertilización. La membrana plasmática es considerada como el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (56). En humanos, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica fue estudiada mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) y se observó una correlación positiva entre los daños observados y la fertilidad (51). En caninos se han estudiado los cambios ultraestructurales presentes in las cabezas espermáticas usando MET (60, 81). Cuando se compararon dos métodos de congelación (CLONE[®]) (7, 72) no se observaron diferencias entre los métodos, y ningún método provocó daño más extenso que el otro, ni mejoró significativamente la calidad espermática al descongelado. Sin embargo en ambos métodos se observaron importantes cambios a nivel de las cabezas en el semen congelado, lo cual puede causar reducida longevidad espermática y explicar las bajas tasas de concepción obtenidas con IA intavaginal en comparación con IA intrauterina cuando se usa semen congelado (81). Estudios dirigidos a caracterizar el tipo y extensión de los cambios ultraestructurales presentes en espermatozoides caninos congelados con diferentes diluyentes podrían ayudar a desarrollar nuevos diluyentes prediciendo en forma más segura la fertilidad de ese semen. El semen congelado puede ser almacenado por largo tiempo en bancos de semen y preservar así material genético, es así que un reproductor puede ser usado mucho tiempo después de su muerte.

Tres puntos conforman las llaves del éxito para obtener buenos resultados con la implementación de IA en caninos: 1) Determinación del momento óptimo para la IA, 2) Uso de semen de buena calidad, 3) Uso de una adecuada técnica de IA (28). Es así que, la IA con semen congelado requiere especiales condiciones para obtener tasas aceptables de preñez. El semen congelado luego de la descongelación posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de

estrés que pueden producir variados cambios en el espermatozoide. Es así que en caninos, si se usa semen congelado, la IA debe realizarse entre el día 4 y 7 del estro, ya que este es el período óptimo para la concepción. En este momento, el espermatozoide posee altas probabilidades de interaccionar con ovocitos fértiles en relación al tiempo de vida de los mismos (26).

La IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe considerarse un protocolo de criopreservación que no solo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (Tsutsui, 1989). En el perro se estima que entre 150 y 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (44).

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

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio

natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

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

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

El objetivo general de esta tesis fue estudiar diferentes modificaciones en los protocolos de criopreservación de semen canino con el fin de introducir mejoras para aumentar la supervivencia espermática luego de la criopreservación y la fertilidad en programas de inseminación artificial.

Los objetivos particulares fueron:

- Comparar el efecto de diferentes diluyentes y temperaturas sobre la supervivencia espermática de semen refrigerado (Capítulo 2).
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM sobre la supervivencia espermática al descongelado (Capítulo 3).
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de trealosa sobre la supervivencia espermática al descongelado (Capítulo 4).
- Evaluar la fertilidad obtenida en un programa de IA utilizando semen congelado con el diluyente Tris base y con un nuevo diluyente formulado a partir de los resultados obtenidos en los objetivos anteriores (Capítulo 5).

BIBLIOGRAFÍA

1. AISEN, E.; CISALE, H.; FERNÁNDEZ, H. (1990). Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. Vet. Arg. 63: 177-182.
2. AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology. 53: 1053-1061.
3. AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. Theriogenology. 57: 1801-1808.

4. AMANN, R.P. (1989). Can be the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-98.
5. AMANN, R.P.; HAMMERSTED, R.H. (1993). In vitro evaluation of sperm quality. An opinion. *J. Androl.* 14: 397-406.
6. ANDERSEN, K. (1972). Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet. Scand.* 13: 128-134.
7. ANDERSEN, K. (1980). Artificial insemination and storage of canine semen. En: Morrow, D.A. (ed.): *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals.* W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 661-665.
8. ARGÜELLES, J.C. (2000). Physiological roles in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174: 217-224.
9. ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. (1987). Glycerolation, and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 70: 1664-1670.
10. BAKAS, L.S., DISALVO, E.A. (1991). Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology.* 28: 347-353.
11. BATTISTA, M.; PARKS, J.; CONCANNON, P. (1988). Canine sperm post thaw survival following freezing in straws or pellet using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. (ICAR)* 3: 229.
12. BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. (1990). Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology.* 34: 147-157.
13. CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. En: Kirk RW. (ed). *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice.* W.B. Saunders, Philadelphia. 1247-1259.

14. CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; ANCHORDOGUY, T.J. (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. California. 219-229.
15. CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W.; TABLIN, F. (2001). The threalosa myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105.
16. CHEN, T.; FOWLER, A.; TORNER, M. (2000). Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology*. 40: 277-282.
17. CHUPIN, D.; SCHUH, H. (1993). Survey of a present status of artificial insemination in developing countries. *Wild Anim. Rev.* 74: 26-35.6
18. CHUPIN, D.; THIBIER, M. (1995). Survey of the present status of artificial insemination in developed countries. *Wild Anim. Rev.* 82: 58-68.
19. DAVIES, P.R. (1982). A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs. (Doctoral Thesis). University of Sidney.
20. ENGLAND, G.C.W. (1992). The cryopreservation of dog semen. (Doctoral Thesis). Royal College of Veterinary. University of London.
21. ENGLAND, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 47: 243-255.
22. FASTARD, W. (1984). Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 25:561-565.
23. FASTARD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 251-260.

24. FASTARD, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 53: 175-186.
25. 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.
26. FOSBERG, C.L.; FOSBERG, 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.
27. FOSBERG, C.L., FOSBERG, M. (1993). Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47: 313-323.
28. FOSBERG, C.L. (1995). Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery*. 10: 48-58.
29. FOSBERG, C.L.; 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.
30. FOULKES, J.A. (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 49: 277-284.
31. GAO, G.Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, .P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 49: 112-123.
32. GAO, G.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, .P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 10: 1109-1122.

33. GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol. Reprod*, 34: 127-138.
34. GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F.; FOOTE, R.H.; KIRK, R.W. (1970) Artificial insemination of Beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1807-1813.
35. GRAHAM, E.F.; RAJAMANNAN, A.H.J.; SCHEMEHL, M.K.L.; MAKI-LAURILA, M.; BOWER, R.E. (1971). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A.I. Digest.* 19: 6-7.
36. HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAN, J.K.; NOLAN, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
37. HARRISON, R.P.A.; MILLER, N.G.A (1998). Applying flow cytometry to the investigation of live and sperm suspensions. *Proc. BAS Advances topics in andrology. Sperm Biology, New techniques, New Insights.* 1-3.
38. HARROP, A.E. (1956). Artificial Insemination in a bitch with preserved semen. *Brit. Vet. J.* 110: 424-425.
39. HIDEKI, F.; MASASHI, I.; TAKASASHI, K. (1993). Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 38: 311-315.
40. HOLT, W.V.; NORTH, R.D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 91: 451-461.
41. HOLT, C., HOLT W,V., MOORE, H.D.M. (1996). Choice of operating condition to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer assisted semen analysis. *J Androl.* 17: 587-595.

42. HOLT, W. V.; MORRIS, G.J.; COULSON, G.; NORTH, R.D. (1998). Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 246: 305-314.
43. IRVINE, S. (1995). Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod.* 10 (Suppl 1): 53-59.
44. JOHNSTON, S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 545-551.
45. JOHNSTON, D.J.; KUZTRITZ, M.V.R.; OLSON, P. (2001). Canine and feline *Theriogenology*. Ed. Saunders. Philadelphia. 287-306.
46. JULIANI, G.C.; SNOECK, P.P.N.; HENRY, M. (2003). The effect of threalose ou rafinose associated to acetamide/methyelulose on post thaw equine sperm viability. *Braz. J. Anim. Reprod.* 27: 355-356.
47. KAWAKAMI, E.; VANDEVOOTRT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; TOLLNER, T.L.; OVERSTREET, J.W. (1993). Comparison of fluoreseinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm. *J. Exp. Zool.* 265: 599-603
48. KOUTSAROVA, N.; TODOROV, P.; KOUTSAROV, G. (1997). effect of pentoxifyline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51: 117-121.
49. LARSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 327-336.
50. LUVONI, G. C. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod. Nutr. Develop.* 40: 505-512.

51. MAHADEVAN, M. N., TROUSON, A. O. (1984). Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fert. Ster.* 41: 287-293.
52. MAZUR, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 168: 939-949.
53. MAZUR, P.; LEIVO, S.P.; CHU, E.H.Y. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exper. Cell Res.* 71: 345-355.
54. MAZUR, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125-142.
55. MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS J.; TSARIK, J. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 95: 755-763.
56. MORRIS, G.J. (1981). Liposomes as a model system for investigating freezing injury. In Morris, G.J.; Clarke, A. (eds). *Effects of low temperature on biological membranes.* Academic press, London. 241-262.
57. NORTON, D.B.; BRUCE, S.G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39: 311-316,
58. NOTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C, VOLKMAN, D.H. (1995). Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 66: 49-55.
59. NOTHLING, J.O.; VOLKMAN, D.H. (1997). Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 51:109-116.
60. OETTLÉ, E.E. (1998). Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Med. Ve. Rev.* 59: 28-70.

61. PAQUIGNON, M.; BARITEAU, J.; BOUSSIÈRE, M.; COUROT, M. (1979). Conservation prolongée du sperm frais du verrant. Journées Rech. Porcine en France. 1: 323-328.
62. PENDFOLD, L.M.; MOORE, H.D.M. (1993). A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 99: 131-134.
63. PEÑA MARTÍNEZ, A.I. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
64. PEÑA MARTÍNEZ, A.I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. (1998). Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. Reprod. Dom. Anim. 35: 5-9.
65. PEÑA A; FORSBERG, L.C. (2000). Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology 54: 859-875.
66. QUINN, P.J., CHOW, P.J.W.; WHITE, I.G. (1980). Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J. Reprod. Fert. 60: 403-407.
67. ROCA, J.; MARTINEZ, S.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; PARILLA, I.; MARTINEZ, E.A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer and stored at 15 °C. Anim. Reprod. Sci. 64:103-112.
68. RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRÍGUEZ-GIL, J.E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. Theriogenology. 56: 801-815.

69. RODRIGEZ-GIL, J. E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 885-900.
70. ROTA, A.; STROM, B.; FOSBERG, C.L. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.
71. ROTA, A.; STROM, B.; FOSBERG, C. L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 47: 1093-1101.
72. ROTA, A. (1998). Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences.
73. ROTA, A.; PEÑA, A.I.; FOSBERG, L.C.; RODRÍGUEZ MARTINEZ. (1999). In vitro capacitation fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 199-215.
74. ROWSON, L.E.A. (1954) infertility of cow, sow and bitch. *Irish Vet. J.* 8: 216-221.
75. SAACKE, R.G. (1982). Components of semen quality. *J. Anim. Sci.* 55: 1-13
76. SAACKE, R.G. (1983). Semen quality in relation to semen preservation. *J. Dairy Sci.*, 66: 2635-2644.
77. SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (Review). *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
78. SEAGER, S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest*; 17: 6-7.

79. SPALLANZANI, L. *Observatione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell' homo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola. II. Modena.1776.* (citado por, Peña, 1997).
80. STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; SAVIGNONE, C.; BELUZAN, I., ARAUZ, M.S.; DE LA SOTA, R.L. (2001) Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen. *Braz. J. Anim. Reprod.* 25: 464-466.
81. STROM HOLST, B.; ROTA A.; ANDERSEN BERG, K.; LINDE FOSBERG, C.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (1998). Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of select elements. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 77-82.
82. STROM HOLST, B. (1999). *In vitro* characterization of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post thaw survival time and pellucida capacity. (Doctoral Thesis).
83. STROM HOLST, B.; LARSON, B.; FOSBERG, L.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (2000a). Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 119: 77-83.
84. STROM HOLST, B.; LARSON, B.; FOSBERG, L.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (2000b). Evaluation of chilled and frozen -thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 119: 201-206.
85. TSUTSUI, T.; SHIMIZU, O.; OHARA, N. (1989). Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *J. Vet. Med. Sci.* 51:257-263.
86. VESTERGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57:149-179.

87. WATSON, P. F. (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.
88. WATSON, P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 1: 283-350.
89. WATSON, P. F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris, G.J.; Clarke, A. (ed). *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press. Orlando. Fla. 189-417.
90. WATSON, P. F.; DUNCAN. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 25: 131-142.
91. WATSON, P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. In: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 1: 283-350.
92. WATSON, P.F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lamming, G.E. (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 2. Reproduction in the male. Churchill Livingstone. Edinburgo. 747-869.
93. WATSON, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 781-791.
94. WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
95. YANAGIMACHI, R. (1994). The physiology of reproduction. En: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. 189-317.

96. XIA-ZOU, C.; MING-YANG, Z. (2000). Evaluation of sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*. 53: 1477-1488.
97. 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. *Theriogenology*. 54:579-585.

CAPÍTULO II

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE TRES DILUYENTES SOBRE LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA A 4° C Y 15° C

INTRODUCCIÓN

La adición de diluyentes al semen y su posterior refrigeración, permite conservar espermatozoides con capacidad fecundante por cortos períodos de tiempo pero suficientes para trasladar y utilizar el semen de un reproductor en lugares distantes al de su hábitat. Ya en 1776, Lázaro Spalanzani había observado que el frío disminuía la tasa metabólica de los espermatozoides y permitía conservarlos (40). Con el paso del tiempo, esta observación permitió implementar la refrigeración de semen.

Es bien conocido el daño que es producido por las bajas temperaturas a las que son sometidos los espermatozoides en el proceso de criopreservación (30, 44). El estrés sufrido por los mismos durante el descenso de temperatura es conocido como shock de frío y puede instaurar daños irreversibles en las células, es así que estas deben ser protegidas para soportar este tipo de estrés (29, 44). Las alteraciones físicas y químicas que se producen en la membrana celular de los espermatozoides debido a las modificaciones térmicas durante el enfriamiento pueden comprometer parcial o totalmente su fertilidad. Los cambios más evidentes resultan en la pérdida de la motilidad espermática, así como pérdida de integridad acrosómica. Múltiples factores afectan la integridad de las membranas del espermatozoide. Los más importantes están

relacionados con las condiciones físico-químicas de los diluyentes y los métodos de refrigeración. Estos procesos afectan principalmente el sistema de membranas celulares, causando alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales (44). Los cambios ocurridos a nivel de las membranas serían similares a los de la capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide (25, 29).

Usualmente se incluye la yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos (33) y las lipoproteínas de baja densidad (13) de esta poseen un efecto protector contra el shock de frío. De esta forma el semen puede ser conservado por un corto período de tiempo mediante la dilución y posterior refrigeración a 4° C o 15° C.

En cerdos, la refrigeración de semen es utilizada en centros de Inseminación Artificial (IA), para comercializar dosis inseminantes con establecimientos cercanos. En esta especie, el MRA[®] es un diluyente que posibilita buena conservación del semen a 15° C tanto en relación a la viabilidad espermática como a la preservación de la capacidad fecundante (27). Se ha observado que los espermatozoides de conejo conservan su capacidad fecundante durante 48 utilizando TB como diluyente seminal y almacenando el semen diluido a 15°C (34). En caninos el diluyente en base a TYH permite el uso de semen refrigerado con buena capacidad fecundante durante 24-48 horas pos-refrigeración, obteniéndose porcentajes de preñez aceptables (62,5%; 11, 36). Este diluyente se ha comparado *in vitro* con diluyentes preparados en base a leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en cuanto a la conservación de motilidad espermática e integridad de membrana (36). El semen refrigerado ha sido utilizado en caninos con buenos resultados, no requiere el uso de equipos sofisticados para su preparación

y puede utilizarse mediante la aplicación de inseminación artificial vaginal, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos (7, 11, 12).

Dentro de las biotecnologías reproductivas disponibles en caninos, la IA es una de las más importantes para implementar el mejoramiento genético. Sin embargo no se trata de un método nuevo, ya en 1787 fue descrita por Lazzaro Spalanzani quien usó semen fresco (30). La IA canina puede realizarse usando diversas técnicas de inseminación y variados métodos de conservación seminal. Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado.

En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen refrigerado es una práctica rutinaria, sin embargo no ocurre lo mismo en Sudamérica. Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, factores que pueden determinar, en el futuro, su uso rutinario en Sudamérica.

El objetivo de este estudio fue estudiar el efecto de la temperatura y tipo de diluyente sobre la conservación del semen canino refrigerado. La hipótesis del trabajo fue que la utilización del diluyente MRA[®] y la refrigeración a 15° C permitirían obtener una supervivencia espermática pos-refrigeración similar a la obtenida con el diluyente TYH y la refrigeración a 4° C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos experimentos fueron diseñados con el fin de estudiar el efecto de la temperatura y el tipo de diluyente sobre el semen canino refrigerado.

Experimento 1

Se determinó la supervivencia espermática del semen canino diluido en fracción prostática (FP), TYH (Tris 3,025 gr.; ácido cítrico 1.7 gr.; fructosa 1.25 gr.; agua destilada csp 100ml.; yema de huevo 20%.; penicilina 1mg/ml.) y MRA[®] yema de huevo (glucosa, EDTA, citrato de sodio, acetato de potasio, aminoglucósidos, excipiente tampón y yema de huevo 20%) durante 4 días a 4 °C. Se utilizaron 8 caninos machos (1 Rottweiler, 1 Doberman, 1 Cocker Spaniel, 2 Ovejero Alemán, 1 Basset Hound, 1 Caniche Toy, 1 Ovejero Belga) de entre 2 y 5 años de edad, en actividad sexual y con buena calidad seminal y estado de salud en un diseño de parcelas sub-divididas (Figura N° 2-1A) (31). Previamente al inicio del experimento los caninos fueron entrenados para eyacular mediante masturbación (11, 22). Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: CON $\geq 200 \times 10^6$, MOT $\geq 70\%$, VIG ≥ 4 , PVI $\geq 80\%$, ACR $\geq 80\%$, ME $< 20\%$, FA ≥ 4000 (2, 8, 22, 32). Fueron incluidos en el experimento aquellos machos que produjeron semen de calidad igual o superior a la requerida como criterio de aceptación en 3 extracciones preliminares consecutivas en un período de 3 semanas). Se seleccionaron 6 machos, y se realizó la recolección de semen 1 vez por semana. Se recolectaron un total de 3 eyaculados de cada macho utilizado durante cada experimento. El semen obtenido por masturbación fue recolectado en un recipiente de plástico, calibrado, estéril, libre de contaminantes químicos y atemperado a 36° C. Se recolectó solo la fracción espermática, discontinuando la recolección al comienzo de la eyaculación de la tercera fracción. Inmediatamente luego de la recolección se determinó el volumen y luego una alícuota fue separada para la realización de una evaluación (concentración espermática, motilidad progresiva y vigor), que permitiera determinar que había ocurrido la eyaculación de la segunda

fracción. La fracción espermática del semen fue dividida en 3 partes cada una de las cuales fue mezclada con un diluyente diferente (FP, TYH, MRA[®]) en una proporción 1:4. La concentración final del semen en el diluyente fue de 40 a 160 x 10⁶ espermatozoides por ml. El semen diluido fue evaluado inmediatamente luego de la dilución (día 0), almacenado a 4° C y evaluado diariamente cada 24 h por 4 días (días 1, 2, 3, 4). Se realizaron las siguientes pruebas de contrastación *in vitro* macroscópicas, microscópicas y bioquímicas por duplicado al semen fresco: 1) VOL (ml): se midió directamente en el tubo colector graduado; 2) CON (10⁶/ml) se determinó mediante cámara de Neubauer (22); 3) MOT (%) se realizó por microscopia de luz a 400 X, se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles; 4) VIG (escala 1-5) se realizó por microscopia de luz a 400 X, se estimó el tipo de movimiento individual (22); 5) ACR (% acrosomas intactos): se determinó con microscopia de contraste de fase (32); 6) PVI (% vivos): se utilizó la tinción de eosina-nigrosina (22); 7) ME (% normales): se utilizó microscopia de contraste de fase (26); 8) EP (% colas enrolladas): se utilizó una solución hipotónica de 150 mOsm y se evaluó el porcentaje de células con colas enrolladas (17, 35); 8) FA (U/L): se utilizó el método colorimétrico usando fenilfosfato de sodio como sustrato (14). Las pruebas fueron realizadas por dos observadores independientes y en el caso de ACR, EP, PVI y ME se contaron 200 células. Al semen diluido se le realizó durante los días 1, 2, 3, y 4 las mismas pruebas de contrastación que al semen fresco exceptuando VOL, CON, ME, y FA. Además, se incorporó la medición del pH y osmolalidad (OSM) de los diluyentes previamente al uso y luego de la dilución del semen durante los días 1, 2, 3 y 4.

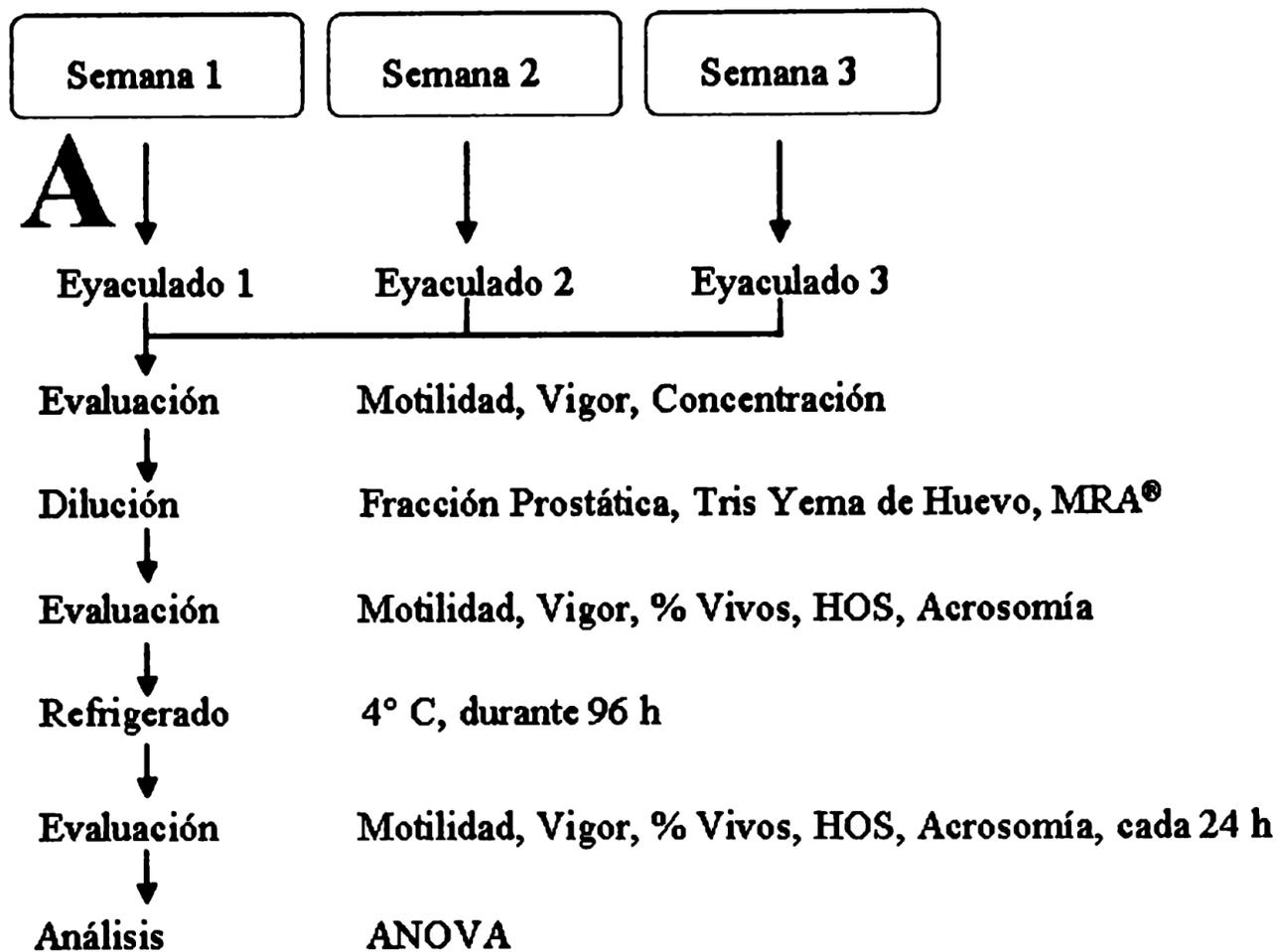


Figura N° 2-1A. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 1.

Las comparaciones entre tratamientos (diluyentes) se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS® (38) para mediciones repetidas en tiempo. El modelo matemático para analizar las variables dependientes continuas incluyó los efectos principales de animal, eyaculado anidado en animal, diluyente, replicación y las interacciones de 2°, 3° y 4° orden correspondientes. Las pruebas de significancia para los efectos principales de animal, diluyente y evaluación se realizaron utilizando como término de error el efecto eyaculado anidado en animal, diluyente por eyaculado anidado en animal y evaluación por diluyente por eyaculado anidado en animal respectivamente. Las variables dependientes analizadas fueron: MOT, VIG, PVI, EP y ACR.

Experimento 2

Se determinó la supervivencia espermática del semen canino almacenado en FP y MRA[®] a 4° C o 15° C durante 4 días.

Se utilizaron los mismos animales utilizados en el experimento N° 1 con buena calidad seminal en un diseño parcelas sub-divididas (Figura N° 2-1B) (31). Se utilizaron los mismos criterios de aceptación de los animales que en el Experimento N° 1. Se recolectó semen 1 vez por semana durante 3 semanas. La fracción espermática del semen fue diluida en FP o MRA[®] en una proporción 1:4, dividida en 2 alícuotas y almacenada una a 4° C y otra a 15° C. La concentración final del semen en el diluyente fue de 40 a 160 x 10⁶ espermatozoides por ml. El semen diluido fue evaluado inmediatamente luego de la dilución (día 0), almacenado a 4° C y a 15° C, y evaluado diariamente cada 24 h durante 4 días (días 1, 2, 3, 4). Se realizaron las mismas pruebas de contrastación del semen y el análisis estadístico que se utilizaron en el Experimento N° 1.

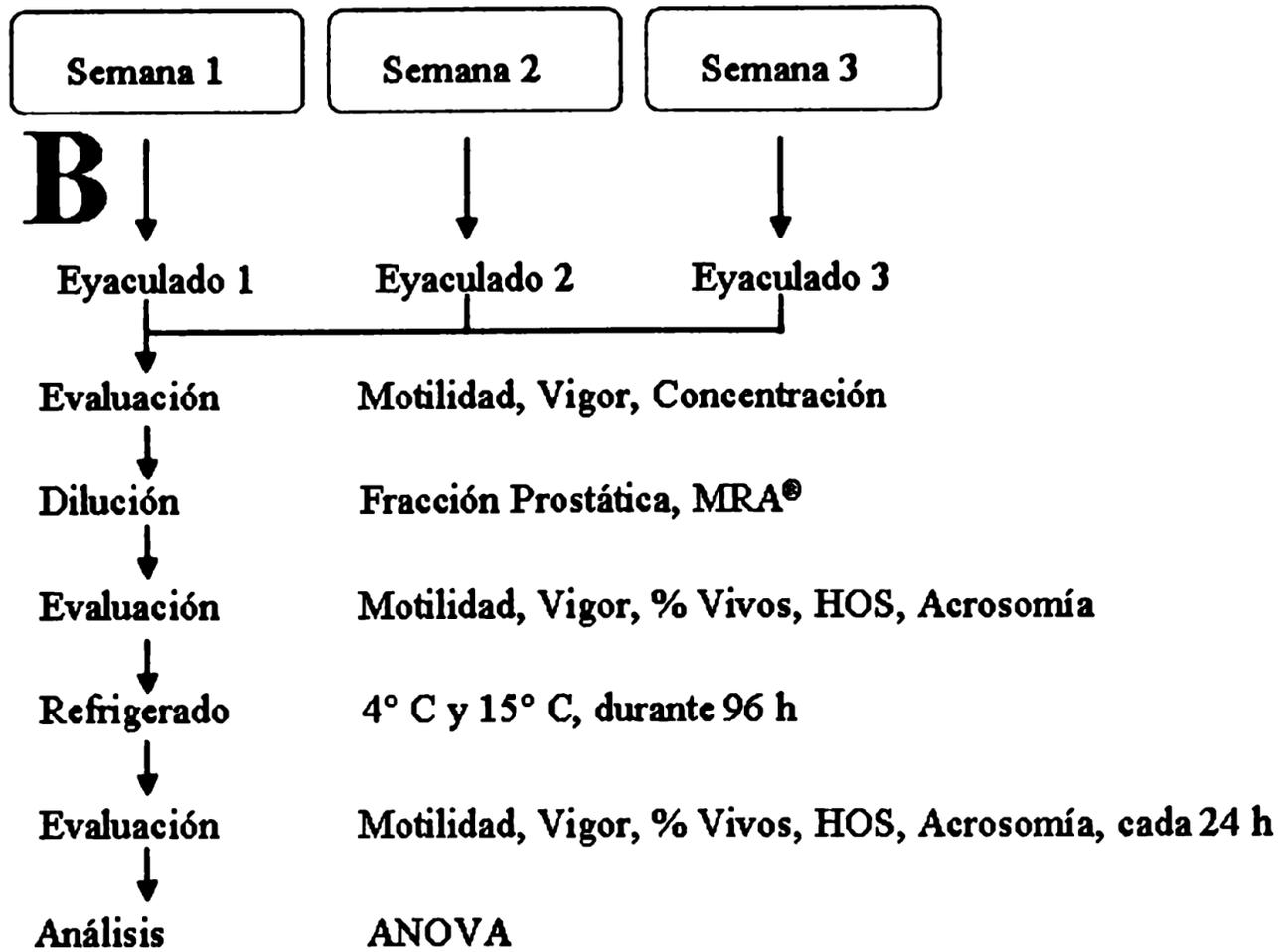


Figura N° 2-1B. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 2.

RESULTADOS

Experimento 1

Si bien inmediatamente luego de la dilución (día 0) no se observaron diferencias en MOT, PVI, EP, ACR y VIG entre los tres diluyentes; una significativa disminución de dichos parámetros se observó a partir del día 1 con FP, a partir del día 3 con TYH y el día 4 con MRA (interacción de diluyente por día, $P < 0,01$; Figuras N° 2-2). El efecto de perro y las interacciones de perro por día no fueron estadísticamente significativas. Cuando la FP no fue incluida en el análisis, MRA tuvo valores superiores de MOT, PVI, EP y VIG que el TYH durante los 4 días ($P < 0,01$); por otra

parte ACR, OSM y pH no mostraron diferencias significativas entre ambos diluyentes durante los 4 días ($P > 0,13$). En dos perros (1 y 3), el semen diluido en MRA tuvo más MOT, PVI, EP, ACR y VIG comparado con TYH, y el TYH comparado con la FP. Sin embargo, en los otros 4 perros (2, 4, 5 y 6), los parámetros espermáticos siempre fueron superiores con MRA y TYH comparado con FP, y no se observaron diferencias significativas entre TYH y MRA (interacción perro por diluyente, $P < 0,01$; Figura N° 2-3). Tanto OSM como pH aumentaron a medida que transcurrió el tiempo ($P < 0,01$; Figura N° 2-4C y D). Así mismo, MRA presentó el valor más bajo de OSM y el valor más alto de pH comparándolo con TYH y FP ($P < 0,01$; Figura N° 2-4A y B).

Los coeficientes de correlación de Pearson entre las características del semen refrigerado a 4° C en 3 diluyentes diferentes pueden observarse en la Tabla N° 2-1. La OSM presentó una ligera correlación negativa con MOT, PIV, EP, ACR, VIG y pH ($P < 0,01$). Inversamente, la MOT, PVI, EP, ACR y VIG mostraron una fuerte correlación positiva entre ellos ($P < 0,01$). También, el pH presentó una ligera correlación positiva con MOT, EP, ACR y VIG ($P < 0,01$).

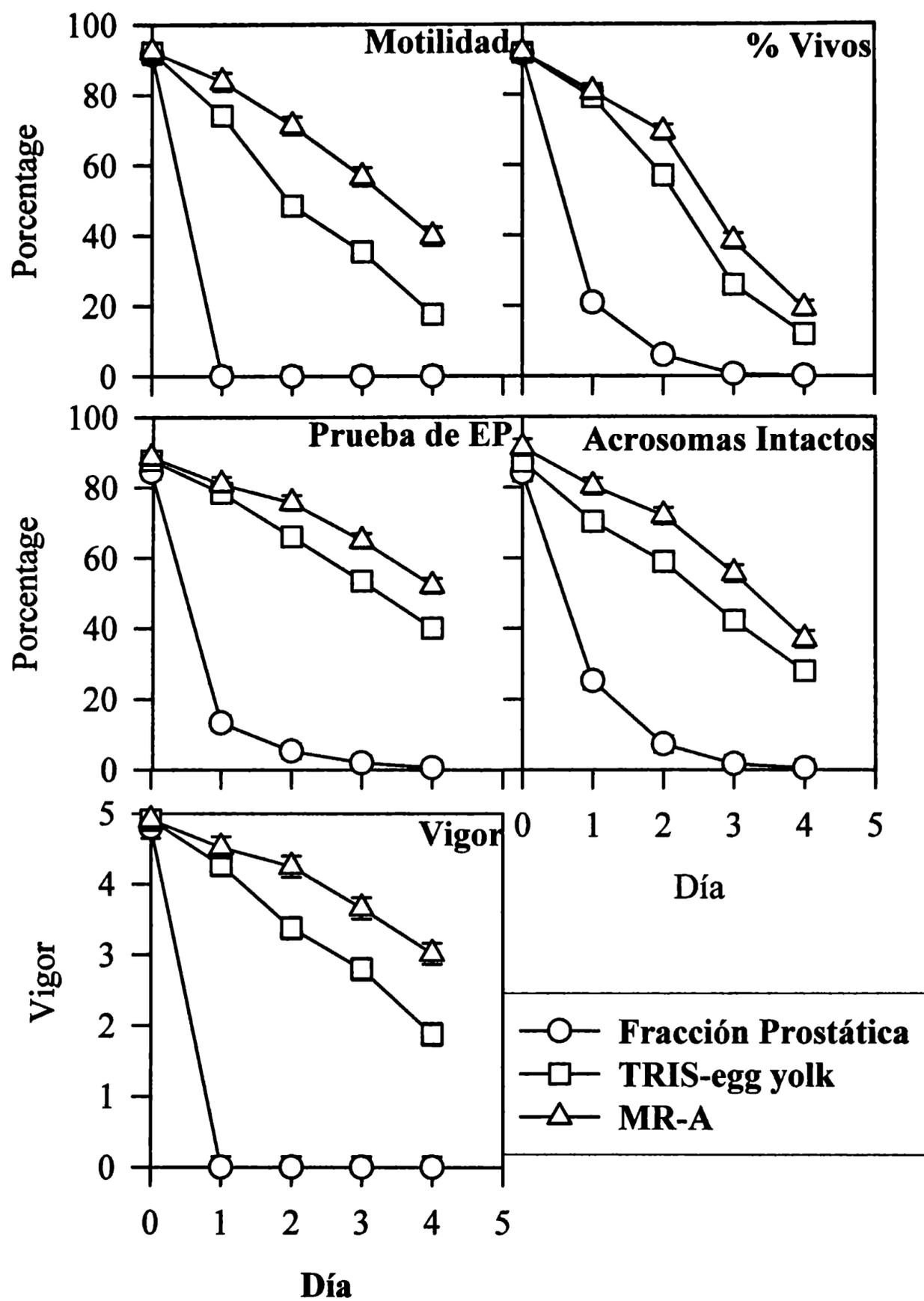


Figura N° 2-2. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA; interacción de diluyente por día, $P < 0,01$).

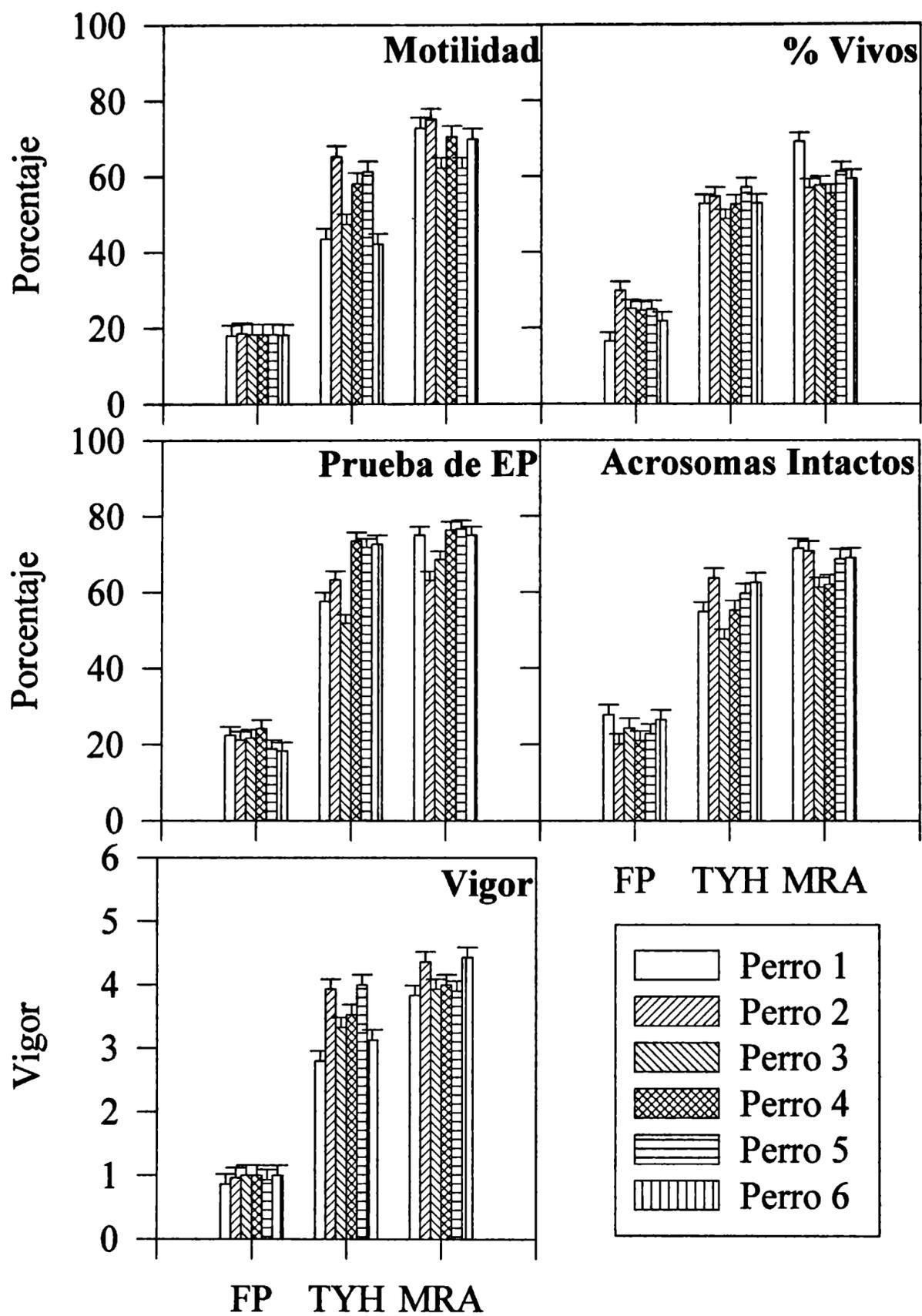


Figura N° 2-3. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA[®]; interacción de diluyente por perro, $P < 0,01$).

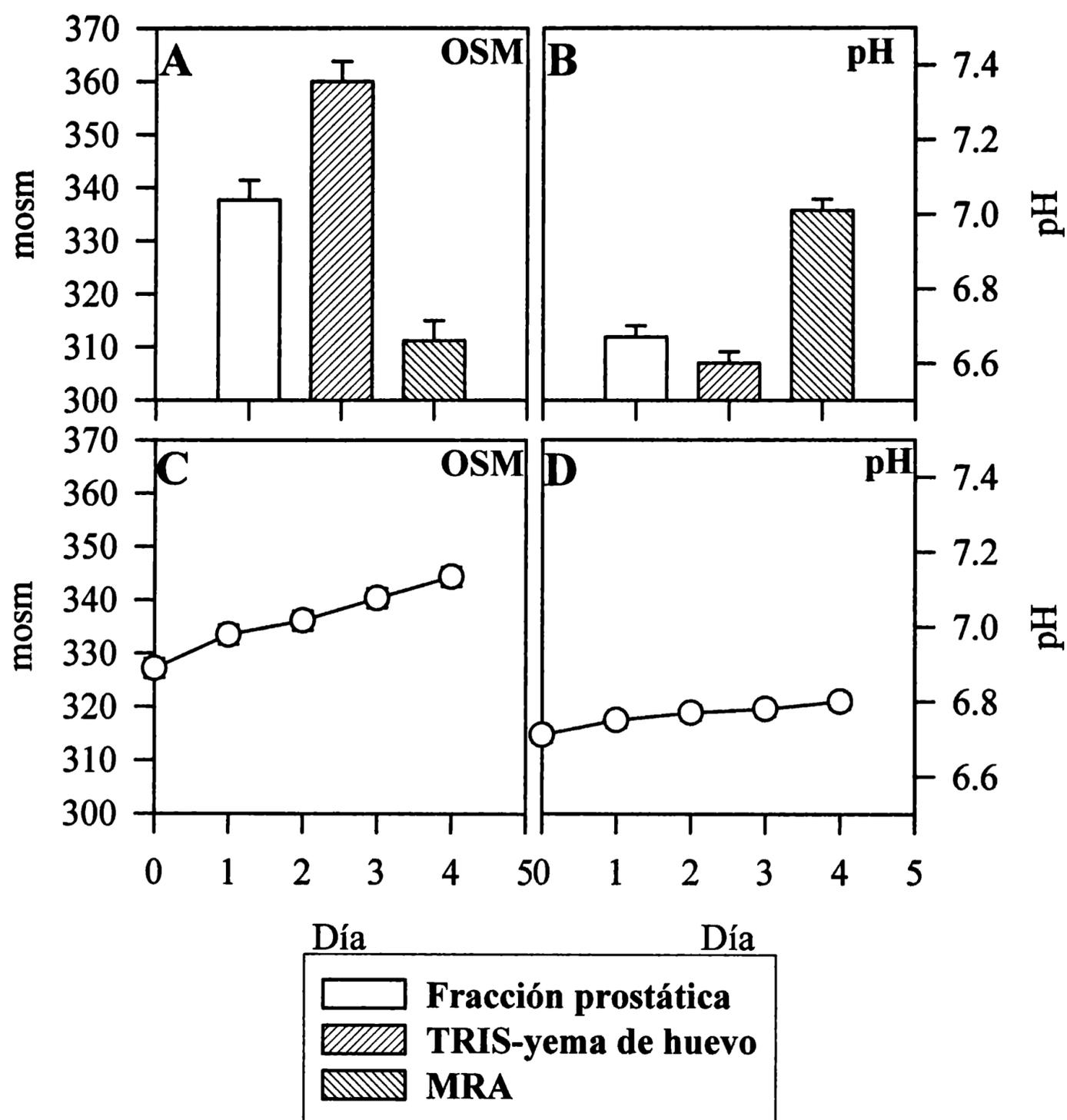


Figura N° 2-4. Cuadrados medios mínimos \pm ES de osmolaridad y pH de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferentes (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA). A: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; B: pH, efecto de diluyente, $P < 0,01$; C: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; D: pH, efecto de diluyente, $P < 0,01$).

Tabla N° 2-1. Coeficientes de correlación de Pearson entre el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, el vigor, la osmolaridad y el pH de semen canino refrigerado a 4° C en tres diluyentes diferente (fracción prostática, tris yema de huevo y MRA). El efecto de temperatura fue NS.

Variable	MOT	PVI	EP	ACR	VIG	OSM	pH
MOT		0.86**	0.88**	0.89**	0.94**	-0.12**	0.17**
PIV			0.82**	0.85**	0.80**	-0.14**	0.07
EP				0.89**	0.89**	-0.13**	0.18**
ACR					0.87**	-0.17**	0.14**
VIG						-0.08*	0.22**
OSM							-0.10*
pH							

MOT: % motiles; PVI: tinción supra vital, % vivos; EP: endósmosis positiva, % colas enrolladas; ACR: acrosomas normales, % acrosomas intactos; VIG: vigor, 0-5; OSM: osmolalidad, mOsm; y pH: pH.

** P<0.01, *P<0.05.

Experimento N° 2

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre temperaturas para los parámetros estudiados, se analizaron los datos en su conjunto y se eliminó temperatura como fuente de variación. Mientras que inmediatamente luego de la dilución (día 0), no se observaron diferencias significativas en MOT, PVI, EP, ACR y VIG entre los diluyentes; luego de 1 día dichos parámetros disminuyeron en forma significativa para la FP, pero no lo hicieron hasta el día 4 para el MRA (interacción de diluyente por día, $P < 0,01$; Figuras N° 2-5). El efecto principal perro, y la interacción perro por día, perro por diluyente y perro por diluyente por día no fueron estadísticamente significativos.

Mientras que la OSM aumentó a medida que transcurrió el tiempo ($P < 0,01$; Figura N° 2-6C), el pH no se modificó ($P > 0,07$; Figura N° 2-6D). Además, el MRA presentó valores de OSM inferiores si lo comparamos con FP ($P < 0,04$; Figura 2-6A). No se encontraron diferencias en el pH al comparar los dos diluyentes ($P > 0,36$; Figura N° 2-6B).

Los coeficientes de correlación de Pearson entre las características del semen refrigerado a 4° C y 15° C en los dos diluyentes pueden observarse en la Tabla N° 2-2. La OSM presentó una correlación moderada y negativa con PVI, EP, ACR, VIG y pH ($P < 0,01$). Por el contrario, la MOT, PVI, EP, ACR y VIG mostraron una fuerte correlación positiva entre ellos ($P < 0,01$). Así mismo, el pH mostró una débil correlación negativa con PVI, EP y ACR ($P < 0,01$).

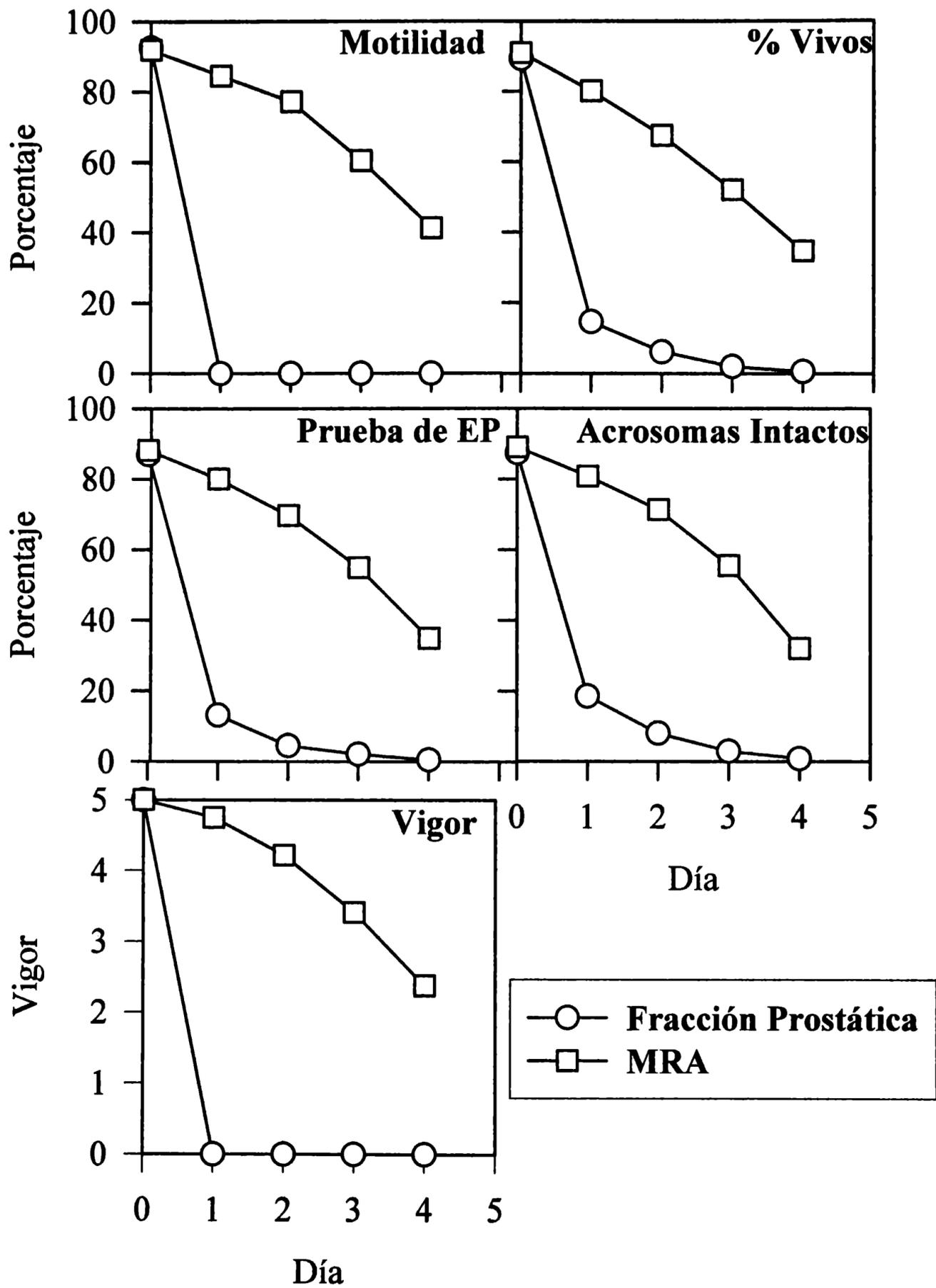


Figura N° 2-5. Cuadrados medios mínimos \pm ES de motilidad, porcentaje de vivos, endósmosis positiva, integridad acrosómica y vigor de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferentes (fracción prostática y MRA; efecto de temperatura, NS; interacción de diluyente por día, $P < 0,01$).

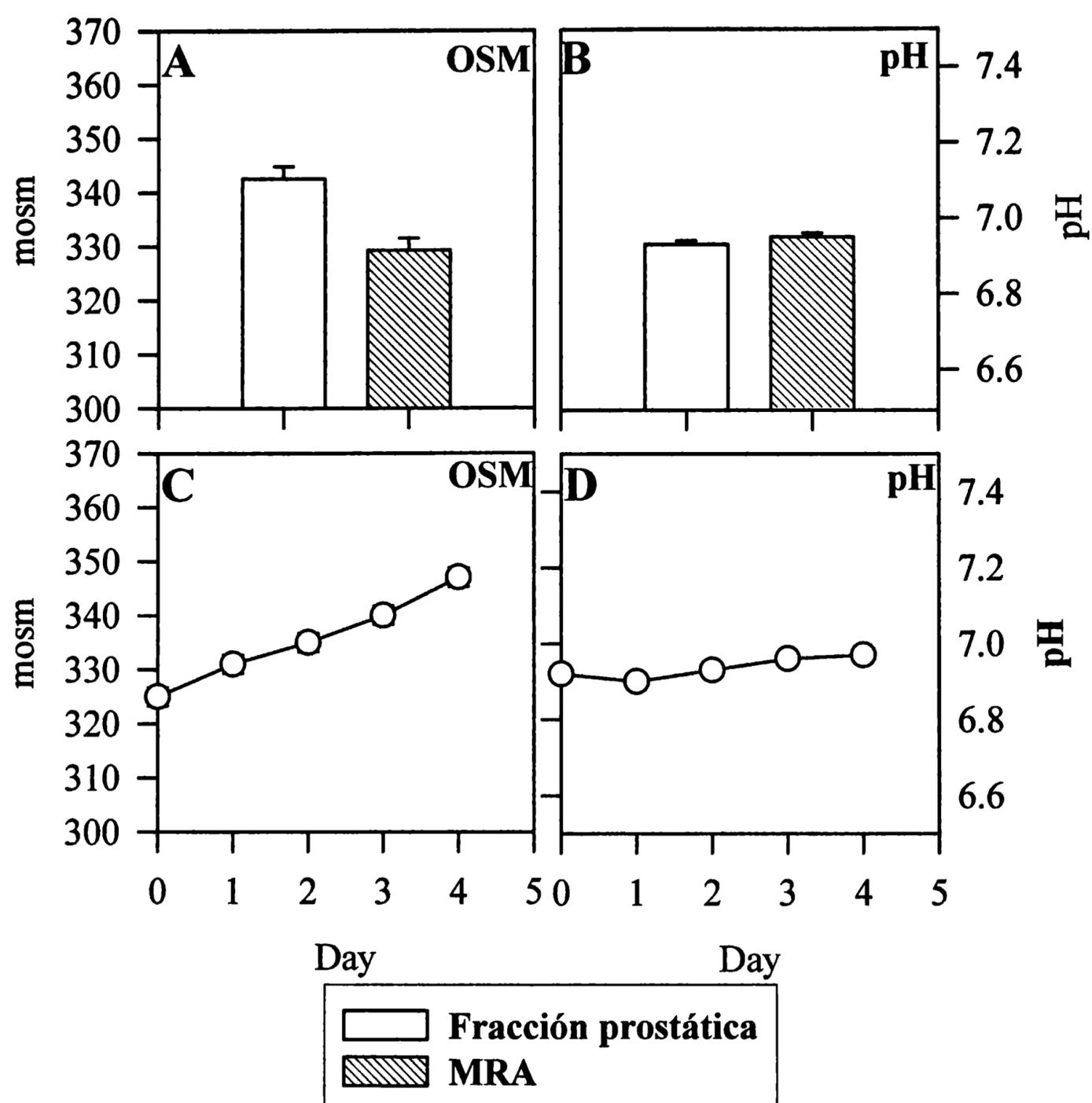


Figura N° 2-6. Cuadrados medios mínimos \pm ES de osmolaridad y pH de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferentes (fracción prostática y MRA®; efecto de temperatura, $P > 0,25$). A: osmolaridad, efecto de diluyente, $P < 0,04$; B: pH, efecto de diluyente, $P > 0,36$; C: osmolaridad, efecto de día, $P < 0,01$; D: pH, efecto de diluyente, $P > 0,07$).

Tabla N° 2-2. Coeficientes de correlación de Pearson entre el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos, el vigor, la osmolaridad y el pH de semen canino refrigerado a 4° C y 15° C en dos diluyentes diferente (fracción prostática y MRA). El efecto de temperatura fue NS.

Variable	MOT	PVI	EP	ACR	VIG	OSM	pH
MOT		0.97**	0.97**	0.97**	0.98**	-0.37**	-0.08
PVI			0.98**	0.97**	0.95**	-0.36**	-0.11*
EP				0.98**	0.96**	-0.34**	-0.12*
ACR					0.96**	-0.37**	-0.11*
VIG						-0.39**	-0.06
OSM							-0.06
pH							

MOT: % motiles; PVI: tinción supra vital, % vivos; EP: endósmosis positiva, % colas enrolladas; ACR: acrosomas normales, % acrosomas intactos; VIG: vigor, 0-5; OSM: osmolalidad, mOsm; y pH: pH.

** P<0.01, *P<0.05.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diferentes parámetros seminales tales como CON, MOT, VIG, PVI, EP, ACR, OSM y pH fueron utilizados para evaluar la eficacia de tres diluyentes y dos temperaturas para almacenar semen canino refrigerado durante 4 días. Los diluyentes usados en los dos experimentos realizados fueron seleccionados pues se encuentran disponibles para el veterinario práctico y por

haberse demostrado previamente su eficacia en la refrigeración seminal. El MRA, es un diluyente comercial que se encuentra disponible en la mayoría de los países ya que es habitualmente usado en la práctica porcina (MRA[®], Romage, Argentina). El TYH es comercializado por varios laboratorios para su uso en centros de inseminación artificial de grandes animales lo cual los convierte en productos fácilmente disponibles y fáciles de preparar en la clínica reproductiva diaria (Fresh-Phos[®], IMV, International Corp., L'Aigle Cedex, Francia; Biladyl[®], Minitub GMBH, Tiefenbach, Alemania). Así mismo, estudios previos han demostrado que el semen canino diluido y almacenado en TYH conserva una motilidad superior comparado con TYH leche o TYH crema (36). En estudios previos así como en nuestro estudio, FP fue usada como control (36).

Las temperaturas usadas en este estudio fueron seleccionadas pues los equipos necesarios para conservar semen refrigerado se encuentran disponibles en el mercado. La mayoría de las heladeras pueden ser reguladas a 4° C y la mayoría de las clínicas veterinarias dispone de al menos una heladera para ser usada con este fin. La industria porcina, con el fin de trasladar el semen desde los centros de IA hasta las granjas, ha desarrollado varios modelos de refrigeradores portátiles los cuales mantienen la temperatura a 15° C (CN° 25050; Romage, Buenos Aires, Argentina). Estas refrigeradoras pueden utilizar la energía provista por la batería de un automóvil, de esta manera puede mantenerse el semen a 15° C y transportarse sin problemas.

En grandes animales, las especies destinadas a la producción de leche o carne, realizan habitualmente las pruebas de fertilidad a campo con grupos de 50 o 100 animales por tratamiento. Los animales destinados a la prueba conviven en un mismo ambiente y reciben la misma dieta. A diferencia de las especies de producción, la realización de pruebas de fertilidad en caninos es realmente difícil pues no se cuenta con grupos de animales destinados para la realización de

experiencias. Generalmente se utilizan animales de diferentes dueños lo que implica que el grupo sea muy heterogéneo en cuanto a la alimentación, ambiente y manejo, este hecho influenciará el porcentaje de preñez, el porcentaje de parición y el tamaño de camada.

Si bien la evaluación de semen *in vitro* no posee una alta correlación con las pruebas de fertilidad a campo (1, 15), la combinación de varias pruebas *in vitro* nos permitirá mejorar la correlación entre calidad seminal y posibilidad de obtener un porcentaje de preñez y un tamaño de camada aceptables (37). Considerando lo difícil que resulta en la especie canina, a diferencia de especies de producción, disponer de un número adecuado de hembras para realizar un prueba de campo, las pruebas *in vitro* resultan un indicador de suma importancia a la hora de tomar decisiones para implementar nuevas biotecnologías reproductivas. Si bien nosotros no realizamos una prueba de fertilidad a campo, evaluamos motilidad, vigor, integridad de membrana e integridad acrosomal en el semen fresco y refrigerado con el fin de seleccionar la mejor combinación entre diluyente y temperatura para realizar futuras pruebas de fertilidad.

En nuestro trabajo los promedios de las características seminales obtenidas en el semen fresco fueron similares a las comunicadas previamente por otros autores (9, 10, 36). En nuestro estudio la motilidad individual y el vigor fueron estimadas subjetivamente por dos operadores individuales con el protocolo utilizado en estudios previos (16, 36). Estudios mas recientes han usado sistemas computarizados de análisis espermático (CASA) para evaluar la motilidad individual, vigor y morfología (20, 41). Sin embargo el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración con la implementación de controles de calidad. Estos hechos junto a las características y costo del equipo hacen que esta metodología no esté disponible para muchos laboratorios (41).

En este estudio, la motilidad progresiva del semen permaneció superior al 50% durante 3 días de almacenado en TRIS y 4 días en MRA, mientras que el semen diluido con FP sufrió una reducción en la motilidad del 90% el primer día de almacenado a 4° C. Norton y Bruce (25) habían comunicado una disminución de la motilidad espermática al usar semen no diluido en comparación con TYH, y más recientemente, Harrison y Vickers (1990), y Rota et al. (1998), también comunicaron resultados similares en la disminución de la motilidad seminal en el semen diluido con plasma seminal en comparación con TYH. Sin embargo en ninguno de estos trabajos se ha usado MRA. En nuestro estudio el MRA fue capaz de preservar la motilidad espermática por encima del 50% un día más que el TYH. Así mismo, el vigor en MRA permaneció en un valor ≥ 4 los tres primeros días mientras que en TYH, el vigor disminuyó el día 2. Es así que, el MRA fue efectivo para conservar más altos ambos parámetros un día más que el TYH.

La integridad de membrana fue evaluada mediante la prueba de EP y la tinción vital. La prueba de EP ha sido previamente usada para evaluar integridad de membrana en espermatozoides caninos (4, 6, 24). Las lipoproteínas de la yema de huevo presentes en TYH y MRA probablemente hayan brindado protección a los espermatozoides del shock de frío (13). Si bien este efecto ha sido demostrado solo en semen de toro y carnero, es muy probable que el efecto protector de las lipoproteínas de la yema de huevo ocurra también en el semen canino (33, 42). Si bien nuestro estudio no ha sido diseñado para evaluar este efecto, puede observarse que la FP es mucho menos efectiva para preservar el semen canino comparado con el TYH y MRA. Luego del primer día, la integridad de membrana permaneció intacta solo en aproximadamente el 20% de los espermatozoides diluidos en FP mientras que después de 3 días la membrana plasmática permaneció intacta en más del 50% de los espermatozoides diluidos en TYH y MRA. Si bien los resultados de los parámetros seminales comunicados en nuestro estudio son inferiores

a los comunicados por Rota, sus resultados muestran los mismos patrones de comportamiento (36). Mientras que en ambos estudios al día 0, los valores EP estuvieron por sobre el 90%, al día 4 en el estudio anterior se mantuvieron por sobre el 85% en TYH y en el 46,2 en FP. De la misma manera, en el presente estudio, luego de 4 días, se mantuvieron por sobre el 50% en MRA y TYH y por debajo del 5% en FP. Estas diferencias podrían ser explicadas en parte debido a que diferentes soluciones hipo-osmóticas fueron utilizadas en ambos estudios. Mientras que en este estudio, una solución de fructuosa de 150 mOsm fue utilizada, en el estudio anterior se utilizó una solución de fructuosa de 60 mOsm.

La integridad acrosómica fue evaluada mediante microscopia de contraste de fase. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de acrosomas anormales observados a lo largo tiempo de almacenado sin compararnos el semen diluido con TYH y MRA. Así mismo, se observaron diferencias significativas en este parámetro al comparar los diluyentes mencionados con el semen diluido en FP.

Si bien cada individuo soporta la criopreservación en diferente forma (46), la sobrevivencia espermática en el semen refrigerado depende en gran parte de la habilidad del diluyente para proveer un medio ambiente adecuado. Es así que, mantener el pH y la osmolalidad dentro del rango de valores del semen fresco, es un requisito importante para la conservación de la viabilidad espermática. En nuestro estudio, los valores de osmolalidad y pH medidos, en el semen fresco, el día 0, fueron de 327 mOsm and 6,7 respectivamente. Estos resultados fueron similares a los comunicados por England (1992), England y Allen (1992) y por Rota et al. (1995). Para la célula espermática, osmolalidades altas o bajas en relación a las del semen fresco constituyen un importante factor de estrés (43). La sobrevivencia del semen refrigerado depende en gran parte de la habilidad del diluyente para mantener el pH y la osmolalidad dentro del rango de valores del

semen fresco durante el almacenado (43). En los dos experimentos, luego de 4 días de almacenado TYH y MRA fueron capaces de mantener la osmolalidad dentro de un rango que varió en un 10% en relación al semen fresco. Este aumento de la osmolalidad en el tiempo se evidenció por la disminución de los parámetros seminales luego de 2 días en el TYH y tres días en el MRA. Así mismo los coeficientes de correlación confirman claramente esta relación. Cuando la OSM aumenta en el tiempo todos los parámetros seminales disminuyen. En el primer experimento los valores de OSM en el semen diluido con MRA fueron inferiores a los del semen fresco y los coeficientes de correlación entre OSM y todas las características espermáticas fueron ligeramente negativos. Por el contrario, en el segundo experimento los valores de OSM en MRA fueron similares al semen fresco y la correlación entre OSM y todas las características fueron negativas y moderadas. Es así que podemos deducir que un 10% de reducción en la OSM como la observada en MRA en el primer experimento no posee ningún efecto importante sobre las características espermáticas. En relación a estas observaciones podemos concluir que para almacenar semen refrigerado en MRA, el valor de osmolalidad alcanzado a los tres días es un factor limitante para el almacenado.

La función del buffer incluido en el TYH y el MRA es minimizar las fluctuaciones de pH producidas tanto por los productos metabólicos de los espermatozoides como de las bacterias contaminantes (45). Si bien en el primer experimento podemos observar un aumento del pH a través del tiempo en el segundo experimento el pH permanece constante durante los días de almacenado. Mientras que en el primer experimento, en el MRA, el pH alcanza el valor más alto, en el segundo experimento no se observan diferencias entre los diluyentes en relación al valor del pH. Lo mismo puede observarse en los coeficientes de correlación. Mientras que en el primer experimento, existe una correlación positiva con y todos los parámetros seminales, en el segundo

experimento, se observa una correlación negativa con todos los parámetros seminales. Basándose en los resultados observados, debido a la capacidad buffer de los diluyentes el pH no es un factor limitante, en el almacenado de semen refrigerado. Esto podría explicarse por la capacidad buffer que poseen los diluyentes, la cual permite minimizar las fluctuaciones de pH producidas tanto por los productos metabólicos de los espermatozoides como de las bacterias contaminantes (45).

El haber trabajado con el semen de los caninos en forma individual nos permite observar el comportamiento del semen de cada perro en particular pudiendo observar las diferencias individuales que quedan enmascaradas al trabajar con un pool seminal. Nuestros hallazgos son similares a los descritos por Yu (46). Nuestros resultados muestran que en dos perros el MRA permite almacenar el semen refrigerado en forma más eficientemente que el TYH, por el contrario el semen de otros 4 perros no muestran diferencias de conservación si comparamos TYH y MRA. Estas diferencias entre perros podrían reflejar propiedades de membrana determinadas genéticamente. Songsasen y Leivo (1997) han comunicado que los espermatozoides de cepas de ratones endocriados muestran diferencias significativas en viabilidad y capacidad de penetración luego de la criopreservación. Holt (2000) ha hipotetizado que, las diferencias individuales observadas en la respuesta celular durante la criopreservación están predeterminadas genéticamente. Sin embargo, muchos investigadores usan en sus trabajos una muestra combinada de semen de varios machos (20, 30, 37). Nosotros creemos que analizar y considerar las diferencias individuales relacionados con la respuesta seminal a los procesos de criopreservación es sumamente importante, ya que se relaciona directamente con lo que ocurre en la práctica clínica diaria. En relación a nuestros hallazgos, podría ser útil realizar una prueba de refrigeración con diferentes diluyentes antes de seleccionar el diluyente a utilizar con individuo determinado.

Se observó que espermatozoides de conejo diluidos en TYH y almacenados a 5° C poseían una motilidad progresiva de 45% luego de 24 h y de 25% luego de 48 h de almacenamiento (3). Roca demostró que 15° C puede ser una temperatura adecuada para almacenar espermatozoides de conejo durante 48 h cuando se utilizan diluyentes con Tris Base (34). En cerdos, el semen refrigerado y almacenado a 15° C posee buena fertilidad (porcentaje de preñez 90%, porcentaje de parición 83%; 21). No se ha establecido en el perro la temperatura en la que ocurren cambios de membrana que alteran la viabilidad espermática (transición de fase lípídica; 18, 28), pero la mayoría de los investigadores almacenan semen refrigerado a 4° C (36). En el Experimento N° 2 puede observarse que no hubo diferencias significativas en los parámetros seminales estudiados, cuando el semen fue diluido en MRA y almacenado durante 3 días a 4° C y 15° C. Nuestras observaciones sugieren que el semen canino puede ser almacenado a 15° C por tres días y mantener el porcentaje de espermatozoides con MOT, VIG, PVI, EP y ACR por encima del 50%. El MRA permite una buena conservación del semen en el tiempo tanto a 4° C como a 15° C y por lo tanto brindaría un período de tiempo de utilización considerable para IA intravaginal con buenos resultados. Si nuestra hipótesis se confirma con una prueba a campo, podríamos afirmar que el semen diluido en MRA y almacenado a 15° C es una excelente opción para el transporte del semen al igual que el almacenado a 4° C. Si consideramos que el transporte a 15° C es sumamente sencillo podría ser implementado en la práctica reproductiva diaria.

La implementación de refrigeración de semen con diluyentes protectores en nuestro país, permitirá conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hará posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en

otra provincia u otro país limítrofe o cercano con un gasto mucho menor y baja complejidad de manejo. De esta manera se ampliarán las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos. Por otro lado el semen refrigerado puede utilizarse realizando inseminación artificial intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. Es así que la implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. AMANN, R.P. (1989). Can be the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-98.
2. DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain *J. Reprod. Fertil.* 28: 443-445.
3. EL-GAAFARY, M.N. (1994). Quality and fertility of cooled rabbit semen supplemented with cyclic-AMP stimulators. *Anim. Reprod. Sci.* 34: 307-313.
4. ENGLAND, G.C.W. (1992). The cryopreservation of dog semen. (Doctoral Thesis). Royal Veterinary College, University of London.
5. ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology.* 37:373-381.

6. ENGLAND, G.C.W.; PLUMMER, J.M. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47: 261-270.
7. FASTARD, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
8. FONTBONNE, A.; BADINAND, F. (1996). Prélèvement et examen de la semence chez le chien. En: Dumond C, Fontbonne, A (eds). *Les indispensables de l'animal de compagnie*. PMCAC, Paris. 153-159.
9. FOOTE, R.H.; Leonard, E.P. (1964). Influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on survival of dog sperm in buffered yolk extenders. *Cornell Vet.* 54:78-89.
10. FOOTE, R.H. (1972). Tris and other organics buffers for the conservation of semen of various species. En: *Riproduzione Animale e Fecondazione Artificiale*. Italian Society for the Advancement of Animal Scienc. Edizione Agricole. Bologna. 99-105.
11. FOSBERG, C.L. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 467-485.
12. FOSBERG, L.C. (1995). Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim).* 10: 48-58.
13. FOULKES, J.A. (1977). The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49:277-284.
14. FRENETTE, G.; DUBE. J.Y.; TREMBLAY, R.R.; (1986). Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch. Androl.* 16: 235-241.
15. HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAN, J.K., NOLAN, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.

16. HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88: 343-352.
17. HIDEKI, F., MASASHI, I.; TAKASASHI, K. (1993). Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 38: 311-315.
18. HOLT, W.V.; NORTH, R.D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91: 451-461.
19. HOLT, W.V. (2000). Basic aspect of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 47-58.
20. IGUER-OUADA, M.; VESTERGEN, J. (2001). Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology.* 55: 671-684.
21. JOHNSON, A.L. (1998). Developments in swine semen: preservation, artificial insemination, and sperm sexing. *Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, England.* 225-229.
22. JOHNSTON, S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 545-551.
23. KUMI-DIAKA J. (1993). Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology.* 39:1279-1289.
24. KUMI-DIAKA J, BADTRAM G. (1994). Effects of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay of canine semen. *Theriogenology.* 41:1355-1366.
25. NORTON, D.B.; BRUCE, S.G. (1989) Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39: 311-316.

26. OETTLÉ, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 47: 257-260.
27. PAQUIGNON, M.; BARITEAU, J.; BOUSSIÉRE, M.; COUROT, M. (1979). Conservation prolongée du sperme frais du verrant. *Journées Rech. Porcine en France.* 323-328.
28. PARKS, J.E.; GRAHAN, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.
29. PAULENS, H. (1993). The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock. *Norw. J. Vet. Med.* 105: 1135-1142.
30. PEÑA-MARTINEZ, A.I. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
31. PETERSEN R.G. (1985). *Design and analysis of experiments.* Marcel Dekker, Inc. New York. 314-429.
32. PURSEL, V. G., JONSHON L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology.* 1: 63-68.
33. QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. (1980). Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403-407.
34. ROCA, J.; MARTINEZ, J.M.; VAZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 6: 4103-112.
35. RODRIGEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology.* 44: 885-900.

36. ROTA, A.; STROM, B.; FOSBERG, C.L. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.
37. ROTA, A. (1998.). Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences.
38. SAS. SAS/STAT. (1989). User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1684.
39. SONGSASEN, N.; LEIVO, S.P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. *Cryobiology* 35: 255-269.
40. SPALANZANI, L. (1776). *Observatione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell'homo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola. II. Modena.* (citado por Peña, 1997).
41. VESTERGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57:149-179.
42. VISHAWANATH, R.; SHANNON. P.; CURSON, B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci*. 29:185-194.
43. WATSON, P.F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lanning G.E. (ed). *Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh. 747-869.
44. WATSON, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 781-791.

45. WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 481-492.
46. YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIVO, S.P. (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL AGREGADO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EQUEx STM PASTE AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN CANINO CONGELADO-DESCONGELADO

INTRODUCCIÓN

En la última década, impulsada por el interés de criadores de perros y veterinarios dedicados a clínica reproductiva, la criopreservación de semen canino ha llamado la atención de los investigadores. La observación de los bajos resultados de tasa de preñez obtenidos mediante la implementación de inseminación artificial, en especial intravaginal, con semen canino criopreservado (28,6% [dosis inseminante 100×10^6 espermatozoides], 45,8% [dosis inseminante 200×10^6 espermatozoides]; (11, 14), ha llevado a los investigadores a tratar de mejorar la supervivencia espermática al descongelado. Los diluyentes TB con el agregado de 20% de yema de huevo han sido los más utilizados, tanto en la práctica reproductiva diaria como en situaciones experimentales (2, 10, 13, 28). En la búsqueda de nuevos diluyentes que permitan obtener una mayor población de espermatozoides viables luego del proceso de congelación-descongelación, se ha incluido en los diluyentes TB dodecil sulfato de sodio (SDS) o compuestos que lo contienen (Equex STM Paste, Orvus ES Paste; 32, 40, 41, 47, 48, 49). Estos compuestos han sido utilizados no solo en caninos sino también en verracos, carneros, toros, ratones y conejos (3, 4, 7, 18, 35, 40, 41). La yema de huevo protege a los espermatozoides del shock de frío, previene el

enrollamiento de las colas y la pérdida de motilidad espermática (20). El componente activo de la yema de huevo es la fracción lipoproteica de baja densidad, con un componente de alto peso molecular que ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (50). El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Se ha observado que este detergente posee un efecto benéfico sobre la motilidad e integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (37). Toyama (46) observó que con la adición de Orvus ES al diluyente, la ultraestructura acrosomal se conservaba normal. El efecto benéfico del Equex STM Paste es mayor cuando los espermatozoides son expuestos al Equex inmediatamente antes de la congelación y no antes del período de equilibración (32). En el porcino, la adición de SDS al diluyente se correlaciona con altas tasas de fertilidad tanto in vivo como in vitro (37). La adición de Orvus ES Paste al diluyente aumenta la longevidad de los espermatozoides descongelados y almacenados a 22° C (45). Notlhing (27) ha obtenido altas tasas de preñez (85%) en perras, mediante inseminación intravaginal de semen criopreservado con Equex STM Paste. En trabajos previos se ha estudiado el efecto de 0,5% (40, 41) o 1% (32) de Equex STM Paste, no habiendo estudios en los cuales se hayan utilizado concentraciones mayores. Así mismo, en la especie canina, algunos trabajos previos en los cuales se utilizó el Equex, con el fin de disminuir la variación experimental, los investigadores han realizado la mezcla del semen de diferentes animales previamente a su evaluación, por lo cual no se ha podido observar el comportamiento del semen en el diluyente en relación a cada individuo (40, 41). Por lo anteriormente expuesto, sería necesario realizar nuevos estudios utilizando un rango más amplio de concentraciones de Equex para determinar cuál es la concentración adecuada que se debe utilizar en el diluyente TB en caninos y además realizar dichos estudios utilizando eyaculados individuales y no una mezcla o pool de varios eyaculados.

El espermatozoide es una célula altamente especializada, la cual posee una membrana plasmática que no solo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membranas asociados a la fertilización. El proceso de criopreservación puede producir alteraciones morfológicas y fisiológicas en las membranas espermáticas (52), considerándose la membrana plasmática el sitio en donde se inicia la injuria inducida por la congelación (25). El daño ocurrido es mayor si aumenta el estrés producido por el shock por frío y se relaciona con pérdida de funcionalidad espermática y disminución de la fertilidad. El acrosoma, citoesqueleto, aparato motil y núcleo también pueden dañarse durante el proceso de congelación-descongelación (51). Los daños ocurridos durante la criopreservación pueden observarse usando microscopio electrónico de transmisión (MET). Los cambios ultraestructurales ocurridos en la célula espermática en relación a los procesos de congelación y descongelación han sido estudiados en diferentes especies (1, 5, 21, 39). Así mismo se ha evaluado mediante MET la integridad de la membrana plasmática y acrosómica de semen humano congelado y se observó una correlación positiva entre integridad de membranas y porcentaje de preñez obtenido mediante IA (23). El estudio ultramicroscópico del semen canino congelado nos permitirá evaluar el daño celular ocurrido, relacionarlo con el tipo de diluyente utilizado y correlacionar estos hallazgos con los resultados obtenidos en las otras pruebas de contrastación seminal utilizadas en la evaluación rutinaria del semen.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM Paste incorporados al diluyente TB sobre la viabilidad espermática de semen canino congelado-descongelado, y estudiar mediante MET los cambios ultraestructurales ocurridos en la célula espermática luego del proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos experimentos fueron diseñados con el fin de investigar diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad del semen de perro al descongelado.

Experimento N° 1

El experimento N° 1 fue diseñado para evaluar el efecto del agregado de 0% (0,0g), 0.5% (0,5g, TBEQ05), 1.0% (1,0g, TBEQ10) y 1.5% (1,5g, TBEQ15) de Equex STM en el diluyente 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 estreptomicina 0,1 g, agua destilada csp 100ml; (40) sobre la viabilidad del semen canino congelado-descongelado.

Se utilizaron 4 caninos, ovejero alemán, de entre 2 y 5 años, en actividad sexual y con buena calidad seminal en un diseño de parcelas sub-divididas (Figura N° 3-1A) (34). Los animales fueron alojados en caniles con un régimen de luz natural y alimentados con alimento balanceado de calidad premium. Previamente al inicio del experimento los caninos fueron entrenados para eyacular mediante masturbación (2, 9, 12). Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: CON $\geq 200 \times 10^6$, MOT $\geq 70\%$, PVI $\geq 80\%$, ACR $\geq 80\%$, ME $<20\%$, FA ≥ 4000 (8, 10, 22,36). Los 4 animales incluidos en el experimento produjeron semen de calidad igual o superior a la requerida como criterio de aceptación en 3 extracciones preliminares consecutivas en un período de 3 semanas.

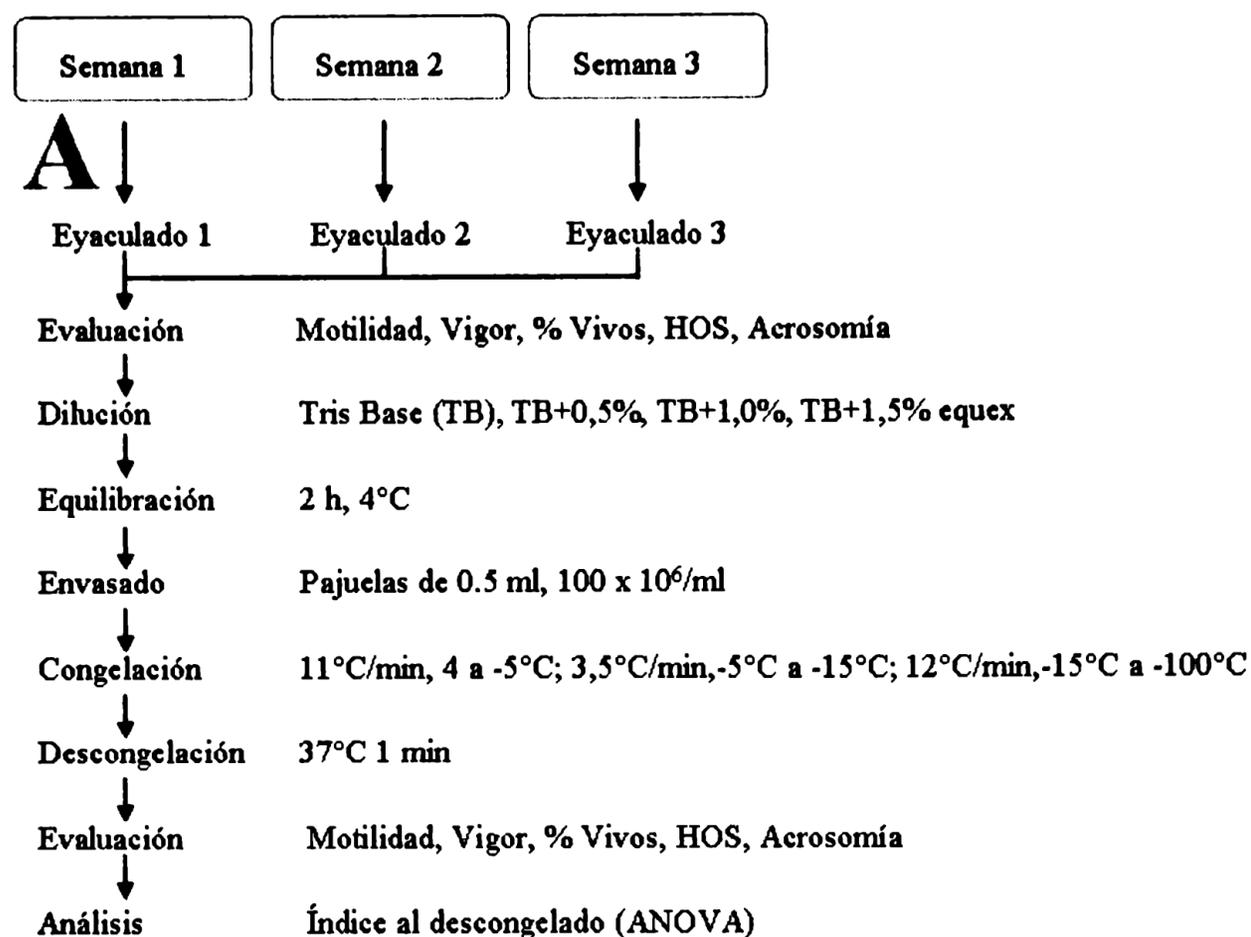


Figura N° 3-1A. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 1.

Se recolectó semen 1 vez por semana durante 3 semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en alícuotas de igual volumen. Cada una de las alícuotas fue mezclada con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes descritos para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml.

La dilución fue realizada en 2 pasos. Luego de un tiempo de equilibración de 2 h a 4° C (31, 32), el semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,5 ml, congelado en una caja de poliuretano expandido sobre un soporte colocado a 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos (tasa de congelación medida con una electrocupla y termómetro digital dentro de una pajuela: 11° C/min de 4 a -5° C; 3.5° C/min de -5° C a -15° C y 12° C/min de -15° C a -100° C), luego la pajuelas se sumergieron y almacenaron dentro de nitrógeno líquido hasta su evaluación (2). Las pajuelas fueron descongeladas a 37 ° C durante 1 minuto (26).

Se realizaron las siguientes pruebas de contrastación *in vitro* macroscópicas, y microscópicas por duplicado al semen fresco: 1) VOL (ml): se midió directamente en el tubo colector graduado; 2) CON (10^6 /ml): se determinó mediante cámara de Neubauer (22); 3) MOT (% con motilidad progresiva): se realizó por microscopía de luz a 400 X, se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; 4) VIG (escala 1-5) se realizó por microscopía de luz a 400 X, se estimó la velocidad de movimiento individual (22); 5) ACRO (% de acrosomas intactos): se determinó con microscopía de contraste de fase (36); 6) PVI (% vivos): se utilizó la tinción de eosina-nigrosina (22); 7) ME (% normales): se utilizó microscopía de contraste de fase (29); 8) EP (% colas enrolladas): se utilizó una solución hipotónica de 150 mOsm. Se evaluó el porcentaje de células con colas enrolladas (19, 38). Al semen descongelado se le realizó las mismas pruebas de contrastación que al semen fresco exceptuando VOL y CON. Las pruebas fueron realizadas por dos observadores independientes y en el caso de ACR, EP, PVI y ME se contaron 200 células (40).

Se analizaron las características espermáticas del semen fresco y los índices al descongelado ($[\text{características espermáticas al descongelado} / \text{características del semen fresco}] \times 100$) mediante análisis de varianza. El modelo matemático incluyó el efecto perro, eyaculado anidado dentro de perro, diluyente y la interacción de perro por diluyente y eyaculado por diluyente anidado dentro de perro. El efecto principal de perro fue analizado con eyaculado anidado dentro de perro como término de error. Se usaron los siguientes contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre diluyentes (34): TB vs. TBEQ05 + TBEQ10 + TBEQ15; TBEQ05 vs. TBEQ10 + TBEQ15; TBEQ10 vs. TBEQ15.

Experimento N° 2

El experimento N° 2 fue diseñado para estudiar el efecto del agregado de 0% (0,0g), 1,0% (1,0g, TBEQ10), 1,5% (1,5g, TBEQ15), 2,0% (2,0g, TBEQ20) y 2,5% (2,5g, TBEQ25) de Equex STM en el diluyente Tris Base (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 estreptomicina 0,1 g, agua destilada csp 100ml; 40) sobre la viabilidad del semen de perro congelado-descongelado.

Se utilizaron los 4 caninos ovejeros alemanes utilizados en el Experimento N° 1, y además se seleccionaron 2 caninos más. Los 6 animales se utilizaron en un diseño split-plot (Figura N° 3-1B; 34). Se usaron los mismos criterios de aceptación de los animales que en el Experimento N° 1. Se recolectó semen 1 vez por semana durante 3 semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en alícuotas de igual volumen. Cada una de las alícuotas fue mezclada con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes descritos para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizaron los mismos procesos de dilución, congelación, descongelación, evaluación y análisis estadístico que los utilizados en el Experimento N° 1. Se utilizaron los siguientes contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre las distintas concentraciones de Equex utilizadas en el diluyente (34): TB vs. TBEQ10 + TBEQ15 + TBEQ20 + TBEQ25; TBEQ10 vs. TBEQ15 + TBEQ20 + TBEQ25; TBEQ15 vs. TBEQ20 + TBEQ25; TBEQ20 vs. TBEQ25.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Para realizar los estudios de MET, una alícuota de semen fue obtenida y procesada inmediatamente luego de la recolección del eyaculado. Luego de la descongelación se tomaron y procesaron muestras de semen congelado con tres de los diluyentes estudiados (TB, TBEQ15, TBEQ25). Las muestras fueron prefijadas en glutaraldeido al 3% en buffer cacodilato y luego fijadas con 2% de OsO₄ en buffer cacodilato 0,1 M durante 2 h. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 1000 revoluciones/min, los pellets obtenidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol e incluidos en resina plástica Lx-112. Los bloques fueron cortados en forma serial con un ultramicrotomo, los cortes fueron colocados en grillas de cobre, teñidas con acetato de uranilo y fueron examinadas a 8000 X con un MET JEM 1200 EX II a 60-80 Kv (Tokio, Japón). Se evaluaron 50 cabezas y 50 colas por cada tratamiento.

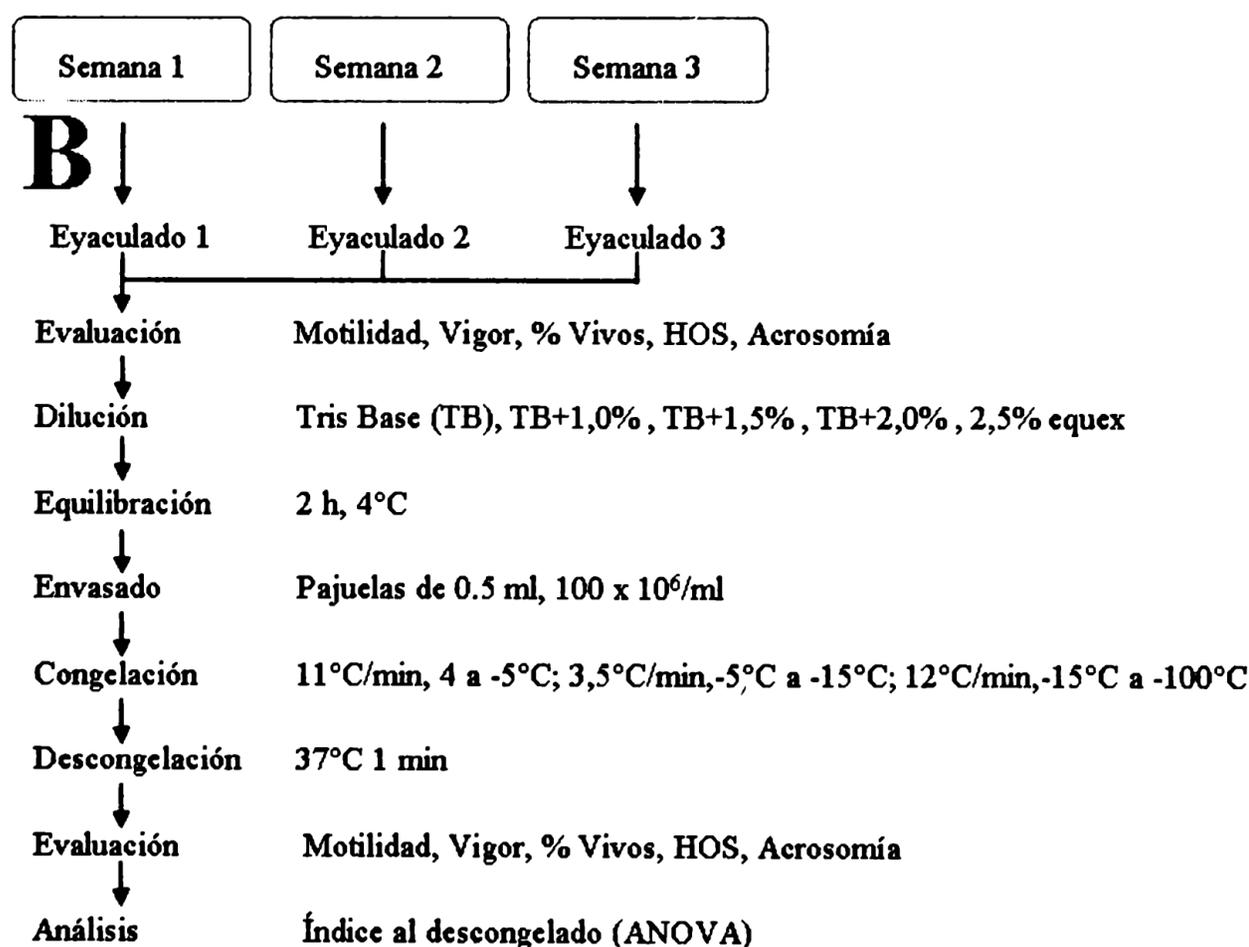


Figura N° 3-1B. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 1.

RESULTADOS

Experimento 1

El semen diluido con TB sin el agregado de Equex mostró índices de descongelación inferiores a los obtenidos con el semen diluido con TB con el agregado de Equex (TB vs. TBEQ05, TBEQ10 y TBEQ15; MOT, VIG, PVI, HOS, ACR, $P < 0,01$; Figura N° 3-2). Así mismo, el semen diluido con el diluyente TB con el agregado de 1,5 % Equex mostró en los parámetros MOT y ACR índices superiores a los observados en el semen diluido con 1.0 % Equex ($P < 0,03$) y mostró una tendencia a poseer mayores índices de HOS y TSV ($P < 0,10$). No se observó efecto de perro ($P > 0,20$) ni interacción entre perro y diluyente ($P > 0,07$) en los índices de congelabilidad estudiados.

Experimento 2

El semen diluido con TB con el agregado de Equex mostró índices de descongelación superiores a los obtenidos con el semen diluido con TB sin el agregado de Equex (TB vs. TBEQ10, TBEQ15, TBEQ20 y TBEQ25; MOT, PVI, HOS, ACR, $P < 0,001$; VIG, $P < 0,05$; Figura N° 3-3).

Así mismo, el semen diluido con un diluyente TB con el agregado de más de 1,0 % de Equex STM paste (i.e., 1,5%, 2.0% y 2.5%) mostró índices de MI, HOS y PVI superiores a los obtenidos a partir del semen diluido con 1.0 % Equex ($P < 0,001$). Por otra parte la adición de más de 1,5% de Equex STM paste al diluyente TB (i.e. 2,0% y 2,5%) no mejoró los índices de congelabilidad de los parámetros estudiados ($P > 0,15$). No se observó efectos negativos en los índices de congelabilidad con ninguna de las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en

este estudio. No se observó efecto de perro ($P>0,30$) ni interacción entre perro y diluyente ($P>0,07$) en los índices de congelabilidad estudiados.

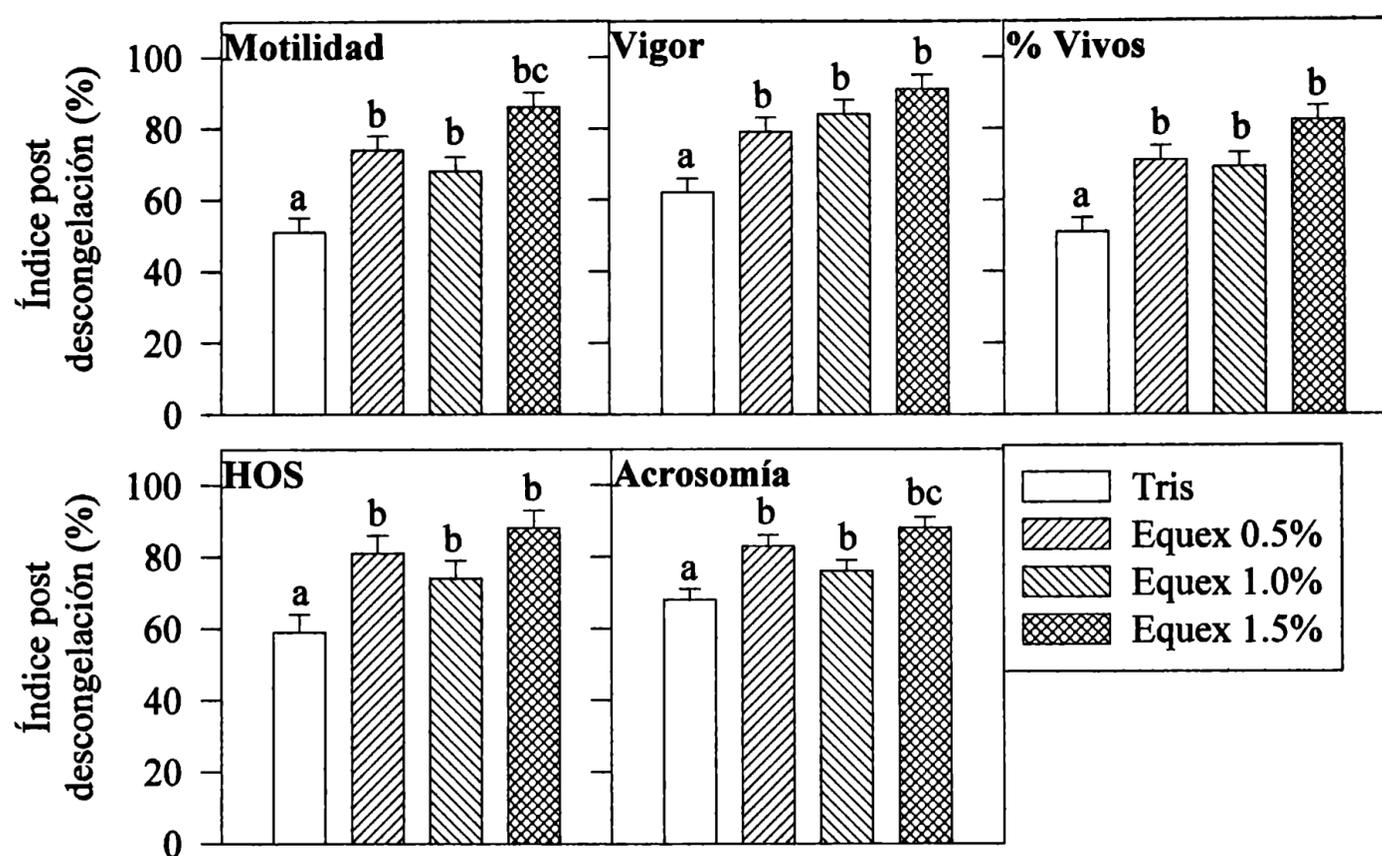


Figura N° 3-2. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 4 perros (Experimento N° 1) en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB con el agregado de 0,5%, 1,0% y 1,5% de Equex STM paste. Contrates: TB vs. TBEQ05, TBEQ10 y TBEQ15; TBEQ05 vs. TBEQ10 y TBEQ15; TBEQ10 vs. TBEQ15; barras con diferentes letras difieren a $P<0.01$.

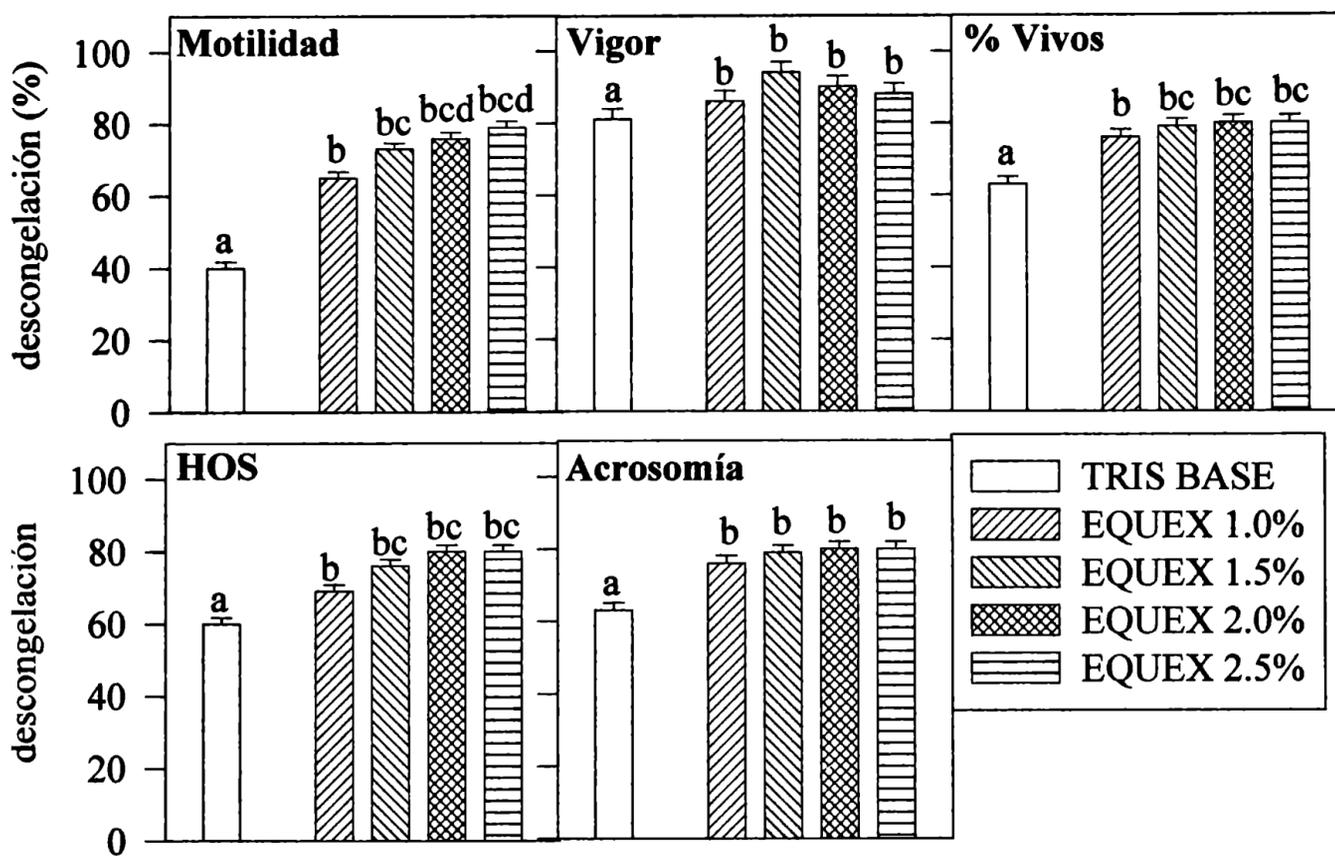


Figura N° 3-3. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros (Experimento N° 2) en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB con el agregado de 1,0%, 1,5% 2,0% y 2,5% de Equex STM paste. Contrastes: TB vs. TBEQ10, TBEQ15, TBEQ20 y TBEQ25; TBEQ10 vs. TBEQ15, TBEQ20 y TBEQ25; TBEQ15 vs. TBEQ20 y TBEQ25; TBEQ20 vs. TBEQ25; barras con diferentes letras difieren a $P < 0.01$.

Microscopia Electrónica de Transmisión

En el semen fresco, el 86% de los espermatozoides mostraron una apariencia normal. Se observó la presencia de algunas anomalías (lipping acrosomal, macrocefalia, varias colas rodeadas por una membrana plasmática común, defecto de "Dag" (Figura N° 3-4A, B, C, D). En las muestras de semen descongelado se observaron espermatozoides que presentaron diferentes alteraciones ultraestructurales. Las alteraciones observadas fueron: hinchazón y Las alteraciones observadas fueron: 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 (Figura N° 5-A, B, C, D). En las muestras de semen descongelado, se observó un índice post descongelación significativamente más alto de espermatozoides normales en el semen diluido con TB sin el agregado de Equex STM paste en comparación con el semen diluido con TB y el agregado de Equex STM paste (53,0% vs. 69,5%±; P<0,04). Por otra parte pudo observarse un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides que presentaron alteraciones espermáticas en el semen diluido con TB y el agregado de 2,5% de Equex STM paste en comparación con el semen diluido con TB y 1,5% de Equex STM paste (60,0% vs. 79,2%±; P<0,02).

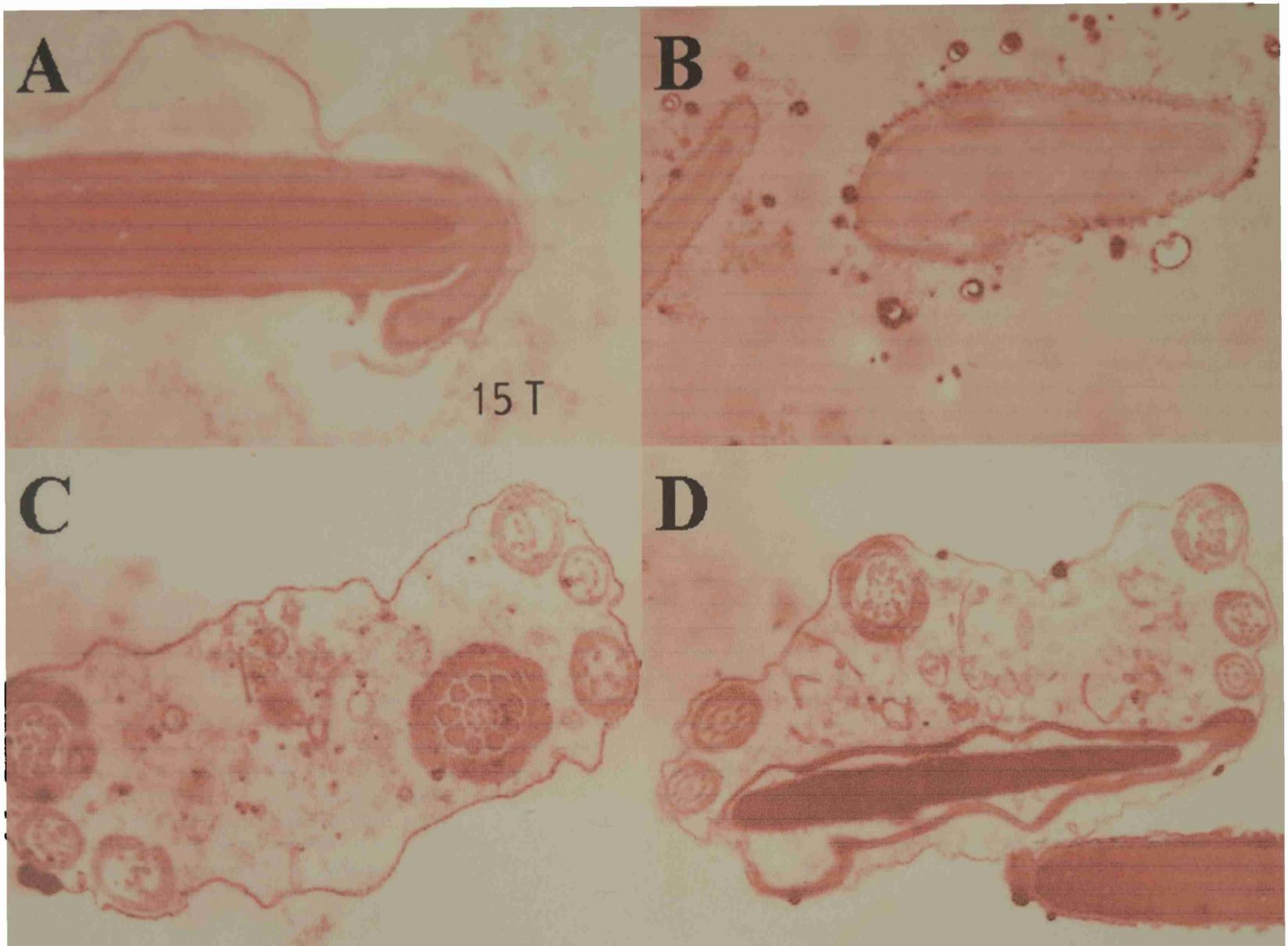


Figura N° 3-4. Fotomicrografías (MET) de anomalías espermáticas observadas en semen fresco. A: lipping acrosomal (30.000 X); B: macrocefalia (16.000 X); C: Defecto de “Dag” enrrollamiento de la cola sobre si misma (25.000 X); D: defecto de “Dag” enrrollamiento de la cola sobre la cabeza (31.000 X).

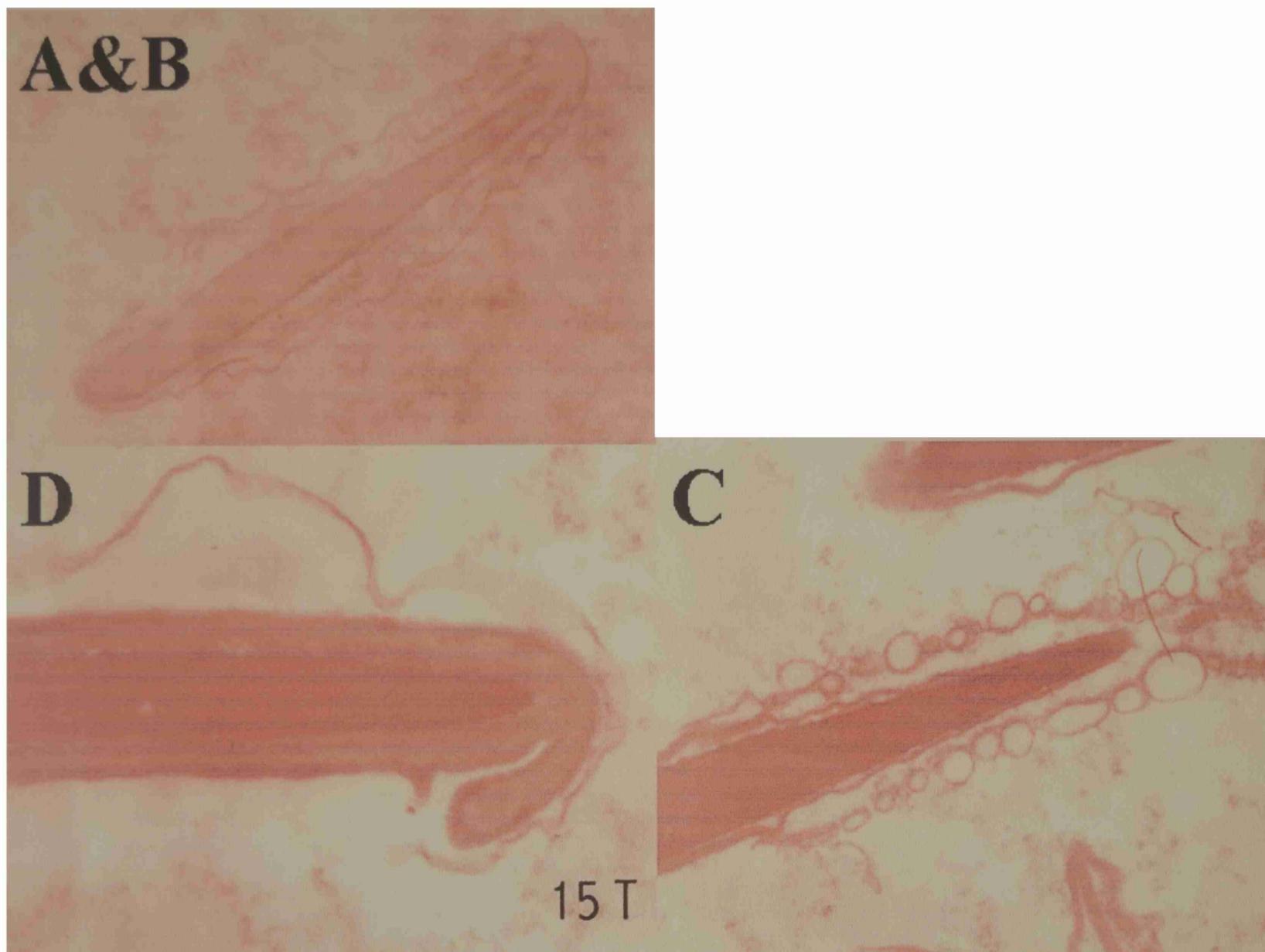


Figura N° 3-5. Fotomicrografías (MET) de anomalías espermáticas observadas en semen descongelado. A: hinchazón de la membrana plasmática (30.000 X); B: hinchazón de la membrana acrosomal (30.000 X); C: formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y plasmática (40.000 X); D: Ruptura de la membrana (76.000 X).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diferentes parámetros seminales: CON, MOT, VIG, PVI, EP y ACR fueron usados para evaluar el efecto de diferentes porcentajes de Equex STM Paste, incorporados al diluyente en base Tris, sobre la viabilidad espermática al descongelado. Los cambios ultraestructurales ocurridos en la célula espermática luego del proceso de congelación-descongelación nos permitieron evaluar el efecto de la adición del detergente al diluyente.

El diluyente TB fue seleccionado por haberse demostrado previamente su eficacia y ser el diluyente más frecuentemente utilizado en caninos tanto en la práctica reproductiva como en trabajos experimentales. La decisión de adicionar Equex STM paste al diluyente se basó en trabajos previos que indicaban su efecto benéfico al ser incorporado al diluyente TB. La acción del detergente sobre los lípidos motivó el hecho de la incorporación de diferentes porcentajes del mismo al diluyente, con el fin de observar su efecto sobre la supervivencia espermática al descongelado.

La técnica de congelación utilizada en este experimento fue seleccionada por ser una técnica sencilla, rápida, no utilizar un largo tiempo de equilibración y ser económica (no requiere equipos sofisticados o costosos). Esta metodología de congelación permite obtener altos índices de descongelación al implementar diferentes técnicas de evaluación *in vitro* lo que sugiere que podrían obtenerse buenos resultados *in vivo*. Por otra parte, podría utilizarse en la práctica reproductiva diaria sin necesidad de implementar técnicas más complejas y que requieren mayor infraestructura como la utilizada en el método de CLONE[®] (17) o el uso de sistemas automatizados de congelación de semen (equipamiento de alto costo).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Rota y Peña (32, 40) en cuanto a que la supervivencia espermática pos-descongelación en el semen diluido con TB con el agregado de 0,5 o 1,0 % de Equex es superior a la observada en el semen diluido con TB sin el agregado de Equex. Sin embargo, nuestros resultados demuestran claramente que el agregado de 1.5% de Equex al diluyente TB permite obtener en las pruebas de contrastación índices de congelabilidad superiores (MOT, PVI, VIG, EP y ACR) a los obtenidos con 0,5 y 1,0 % de Equex. Así mismo el agregado de 2,5 % de Equex no mejoró ni afectó en forma negativa los índices de congelabilidad. Estos resultados podrían explicarse por la acción del detergente sobre los lípidos de la yema de huevo la cual mejora la protección ejercida por la misma sobre el espermatozoide contra el shock de frío (37). Eventualmente, una vez que el detergente actuó sobre la totalidad de los lípidos de la yema presente en el diluyente, la protección de los lípidos sobre el shock de frío no mejorará. El efecto benéfico del detergente se observará hasta que la cantidad de detergente adicionada al diluyente sea tal que comience a actuar sobre las membranas de la célula espermática (37).

El espermatozoide es una célula altamente especializada que presenta varias zonas estructural y funcionalmente diferentes delimitadas por una membrana plasmática continua. Esta membrana plasmática no solo interviene en el mantenimiento de la integridad celular sino también en los eventos fusogénicos asociados a la fertilización (54). La membrana plasmática es considerada como el sitio donde se inicia la injuria producida por los procesos de congelación (25). Los procesos de congelación y descongelación producen alteraciones importantes en la membrana plasmática y acrosomal así como en la distribución del contenido acrosomal observables mediante el uso de MET (6, 54). Estas alteraciones afectarían la funcionalidad espermática y su capacidad fecundante redundando en la disminución de la fertilidad del semen criopreservado (52). Es así que el estudio de las alteraciones ultramicroscópicas estudiadas en el

semen fresco y congelado-descongelado nos permitió estimar el grado de daño que los procesos de criopreservación habían ejercido sobre la célula espermática. Así mismo nos permitió observar cual fue el diluyente que logró conservar la mayor cantidad de espermatozoides intactos al descongelado y por lo tanto determinar cual sería el diluyente con el cual se tendría mayor probabilidad de lograr altos índices de preñez mediante IA en la prueba de campo.

Las anomalías ultraestructurales encontradas en el semen fresco, en este trabajo, no superan el 15 % y coinciden con las descritas previamente por Oettlé (29, 30). Así mismo las alteraciones ultraestructurales encontradas en el semen descongelado coinciden con las comunicadas por, Rodríguez Martínez (39) y Strom Holst (43). En este estudio ultramicroscópico de semen se observó una mayor cantidad de anomalías en el semen congelado con un diluyente TB en comparación con el diluyente TB con el agregado de Equex. Sin embargo se observó mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales en el semen congelado con un diluyente TB con el agregado de 2,5 % de Equex comparado con el diluyente TB con el agregado de 1,5 % de Equex. Podemos concluir que si bien las observaciones obtenidas a partir de microscopía óptica indicarían que no existen diferencias entre el agregado de 1,5 y 2,5% de Equex STM paste al diluyente en TB, el estudio ultramicroscópico demuestra claramente que los daños aumentan al aumentar el porcentaje de Equex STM paste agregado al diluyente TB. Esta observación se relacionaría con la acción del detergente sobre las membranas espermáticas al aumentar la concentración del mismo en el diluyente (37), lo cual probablemente afecte en forma negativa los porcentajes de fertilidad obtenidos al usar este diluyente en pruebas de fertilidad a campo.

El efecto benéfico del agregado de SDS al diluyente TB fue observado por Thomas en 1992. El Equex STM paste posee SDS en su composición y este compuesto actúa sobre las lipoproteínas de la yema de huevo contenida en el diluyente (37). Este hecho se observa

claramente en este trabajo en el cual se obtienen índices de descongelación significativamente más altos en el TB en comparación con el TB con el agregado de Equex STM paste. El efecto nocivo de la acción directa del detergente sobre la membrana plasmática fue descrito por Pursel (37), el cual encontró un efecto nocivo al agregar cantidades de SDS tales que sobrepasaran las necesarias para actuar sobre la yema de huevo presente. Así mismo Arriola (3), observó que para el semen de toro, la cantidad óptima de SDS variaba proporcionalmente con la cantidad de yema de huevo presente en el diluyente. Por otra parte es conocido el efecto espermicida de los detergentes, incluyendo el SDS, cuando interaccionan con el semen (24). Lo mencionado anteriormente explicaría el aumento de alteraciones ultramicroscópicas encontradas al descongelado cuando se utilizan mayores cantidades de Equex incluidas en el diluyente TB.

En nuestro trabajo se seleccionó un protocolo de congelación con dos pasos de dilución. El detergente fue agregado en el segundo paso de dilución luego de la estabilización y previo al envasado en pajuelas. Esta elección se basó en los estudios realizados por Peña, quien demostró que la adición del Equex previo a la estabilización resultaba en disminución de la capacidad protectora del diluyente en comparación con el agregado del Equex luego de la estabilización previo a la dilución (32). Estos hallazgos podrían relacionarse con un prolongado tiempo de exposición espermática al SDS o a las lipoproteínas de la yema de huevo tratadas con SDS.

Existen condiciones fisiológicas en las cuales la concentración de calcio intracelular aumenta y un ejemplo de este hecho es la reacción acrosómica ocurrida en la capacitación (15, 55). El aumento de calcio intracelular también ocurre como respuesta al estrés causado en el espermatozoide por el shock de frío y los procesos de congelación y descongelación (53). Peña (33) observó que los porcentajes de motilidad y viabilidad se mantenían altos 5 y 7 h pos descongelado respectivamente cuando se utilizó el agregado de 1% de Equex a un diluyente TB y

observó que este hecho era acompañado por altas cantidades de calcio intracelular lo cual se relacionaría con un avance hacia la capacitación (33). La formación de vesículas, observadas mediante microscopía electrónica en la membrana acrosomal de algunos espermatozoides al descongelado, representa cambios similares a la capacitación inducidos por los procesos de criopreservación. La observación de mayores cantidades de alteraciones espermáticas en el diluyente TB con el agregado de 2,5% de Equex STM paste en comparación con el diluyente TB con el agregado de 1,5% de Equex STM paste podría relacionarse con el aumento de la cantidad de calcio intracelular ocurrido en las células espermáticas posdescongelación en relación al avance hacia la capacitación. La cantidad de células que han sufrido eventos relacionados con un avance hacia la capacitación sería mayor en el semen congelado con un diluyente con el 2,5% de Equex STM paste. Futuros estudios sobre las concentraciones de calcio pos descongelación en los diluyentes utilizados en este estudio podrían aclarar estos hechos. Los cambios observados en los espermatozoides al descongelado podrían en parte ser el reflejo de cambios espermáticos semejantes a los desencadenados en la capacitación, ocurridos en respuesta al proceso de criopreservación, los cuales acortarían la sobrevida espermática al descongelado, a pesar de los altos índices de congelabilidad obtenidos. Este hecho explicaría la ocurrencia de mejores tasas de concepción cuando se usa inseminación artificial intrauterina (84%) comparada con inseminación artificial intravaginal (58,9%; 14).

Estudios sobre la funcionalidad espermática en relación al tiempo transcurrido pos descongelación así como estudios que evalúen la capacidad fecundante del semen mediante pruebas de penetración en el laboratorio o pruebas de campo que determinen el porcentaje de preñez obtenido mediante la inseminación de semen congelado con diluyente TB con el agregado de Equex STM paste, son necesarios para evaluar la eficacia real del diluyente.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVARENGA, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. (2000). Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.* 32: 541-5.
2. ANDERSEN, K. (1980). Artificial insemination and storage of canine semen. En: Morrow DA (ed). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 661-665.
3. ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. (1987). Glycerolation and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 70: 1664-1670.
4. ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. (2001). Accessory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa in egg yolk-acetamide with detergent. *J. Andrology.* 22: 458-463.
5. BARTHELEMY, C.; ROYERE, D.; HAMMAHAH, S.; LEVOS, C.; THTARANNE. M.J.; LANZAC, J. (1990). Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch. Androl.* 25: 29-40.
6. BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.; PLUMMER, J.L.; ENGLAND, G.C. (2001). Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 357-363.
7. DEWIT, M., MARLEY, W.S., GRAHAN, J.K. (2000). Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology.* 40: 36-45.
8. DOTT, H.M., FOSTER, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain *J. Reprod. Fertil.* 28: 443-445.

9. FASTARD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 251-260.
10. 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.
11. FOSBERG, C.L., FOSBERG, 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.
12. FOSBERG, C.L. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 467-485.
13. FOSBERG, C.L. (1996). Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 10: 48-58.
14. FOSBERG, C.L.; 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.
15. FRASER, L.R. (1993). Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 368-376.
16. GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. (1970). Artificial insemination of beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1807-1813.
17. GOVETTE, G.; FOSBERG, L.C.; STROM, B.A. (1996). A successful concept for freezing of dog semen. 13th Int. Cong. Anim. Reprod. (ICAR). Sydney, Australia. 2: 5-8.

18. GRAHAM, E.F.; GRABO, B.G. (1972). Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa 7th Int. Cong. Anim. Reprod. (ICAR). Munich, Germany. 1627-1632.
19. HIDEKI, F., MASASHI, I.; TAKASASHI, K. (1993). Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 38:311-315.
20. HOLT, W. V.; MORRIS, G.J., COULSON, G.; NORTH, R.D. (1998). Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 246: 305-314.
21. JONES, R.C.; STEWART, D.L.(1979). The effect of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 56: 233-238.
22. JOHNSTON, S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 545-551.
23. MAHADEVAN, M.M., TROUSON, A.O. (1984). Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fert. Ster.* 41: 287-293.
24. MAN, T. (1964). Spermistatic, spermicidal and antiespermatogenic substances. En: Man, T. (ed). *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* Methuen & Co Ltd, London. 379-396.
25. MORRIS, G.J. (1981). Liposomes as a model system for investigating freezing injury. En: Morris G.J.; Clarke, A. (eds). *Effects of low temperature on biological membranes.* Academic Press, London. 241-262.
26. NORTON, D.B.; BRUCE, S.G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39: 311-316.

27. NOTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C, VOLKMAN, D.H. (1995) Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. A.* 66: 49-55.
28. NOTHLING, J.O.; VOLKMAN, D.H. (1997). Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 51: 109-116.
29. OETTLÉ, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 47: 257-260.
30. OETTLÉ, E.E. (1998). Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Med. Vet. Rev.* (59): 28-70.
31. PEÑA MARTÍNEZ, A.I. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
32. PEÑA A, FORSBERG, L.C. (2000). Effects of Equex one- or two-step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology.* 54: 859-875.
33. PEÑA, A.; LUGILDE, L. L., BARRIO, M.; HERRADÓN, P.G.; QUINTELA, L.A. (2002). Effects of Equex from different sources of post-thaw survival, longevity and Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1725-1739.
34. PETERSEN R.G. (1985). Design and analysis of experiments. Marcel Dekker, Inc. New York. 314-429.
35. PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.G.; SCHIEVE, M.C.; STUART, L.D.; WILDT, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluents and method of freeze-thawing on survival, and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 26: 341-354.

36. PURSEL, V. G., JONSHON L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1: 63-68.
37. PURSEL, V. G., SHULMAN, L.L.; JONSHON L.A. (1978). Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 47: 198-202.
38. RODRIGEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 885-900.
39. RODRIGUEZ MARTINEZ, H., ECWALL, H.; LINDE FOSBERG. C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 279-85.
40. ROTA, A.; STROM, B.; FOSBERG, C.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*. 47:1093-1101.
41. ROTA A, IGUEROUADA M, VERSTERGEN. (1999). Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*. 51:1045-1058.
42. SAS. SAS/STAT. (1989). User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1684.
43. STROM HOLST, ROTA, A.; ANDERSEN, K.; LINDE-FOSBERG, C.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (1998). Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected element. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 77-82.

44. THOMANSEN, R.; FASTARD, W., KROGENAES, A.; FOUIGNER, J.A.; ANDERSEN, K. (2001). Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 341-346.
45. THOMAS, P.G.A., SURMAN, V.; MEYERS-WALLEN V.N.; CONCANON, P.W. (1992). Addition of dodecyl sulphate to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen –thawed canine spermatozoa. 12th Inter. Cong. Anim. Reprod. 4: 1823-1825.
46. TOYAMA, Y.; ITOH, Y. (1995). Acrosomal ultra structure of boar spermatozoa cryopreserved with Orvus ES Paste. *J. Reprod. Dev.* 41: 9-13.
47. TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; ITO, T.; KAWAKAMI, E. (1999). Effects of Orvus STM Paste on canine spermatozoa longevity after freezing and thawing. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 533-535.
48. TSUTSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A., FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. (2000). Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste supplemented egg yolk tris fructose. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 603-606.
49. TSUTSUI, T.; HASE, M.; HORI, T.; KOMORIYA, K.; SHIMIZU, K.; NOGAKUBO, K.; KAWAKAMI, E. (2000). Effect of addition of Orvus ES Paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 537-538.
50. WATSON, P. F. (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.

51. WATSON, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 781-791.
52. WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
53. WHITE, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
54. YANAGIMACHI, R. (1994). The physiology of reproduction. En: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd (ed). Raven Press. New York. 189-317.
55. ZANEVELD, L.J.D.; DE JONGE, C.J.; ANDERSON, R.A.; MARCK, S.R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 6: 1265-1274.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREALOSA AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN CANINO CONGELADO-DESCONGELADO

INTRODUCCIÓN

En la última década se han estudiado variados diluyentes para criopreservar semen canino. Los diluyentes con Tris Base han sido utilizados tanto en la práctica diaria como en situaciones experimentales (4, 13, 26). En estos diluyentes se han incluido diferentes tipos de azúcares (11, 23, 24, 28, 34). Los azúcares más usados han sido la fructosa y glucosa, monosacáridos que pasan a través de la membrana celular y que actúan como sustrato energético para la célula espermática y mantienen la presión osmótica del diluyente (35).

La membrana celular es una bicapa lipídica formada por fosfolípidos (aproximadamente 50 %), colesterol y glucolípidos. Los lípidos le confieren a esta la característica de fluidez. El componente lipídico de las membranas biológicas es un líquido bidimensional en el cual las moléculas constituyentes son libres de moverse lateralmente, pero se hallan restringidas a su propia monocapa. La fluidez de la membrana depende de su composición y de la temperatura (3). La bicapa lipídica pasa del estado líquido al estado cristalino rígido (gel) en un punto de

congelación característico. Este cambio de estado recibe el nombre de transición de fase, y la temperatura a la cual se produce es mas baja (es decir la membrana es más difícil de congelar) si las cadenas hidrocarbonadas son cortas o tienen dobles enlaces cis. Las altas concentraciones de colesterol que poseen las membranas celulares impiden que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen, de esta manera el colesterol inhibe la posible transición de fase (3).

El factor de estrés más importante en el proceso de congelación resulta de la transición termotrópica de fase y la fusión lo cual se relaciona con un aumento de la permeabilidad y alteración de la función (7). Se ha demostrado que los azúcares son efectivos para estabilizar las bicapas lipídicas durante la deshidratación, y de los azúcares estudiados, la trealosa es el más efectivo. La trealosa interacciona con las cabezas polares (hidrófilas) de los lípidos de membrana mediante ligaduras de hidrógeno, aumentando el espacio existente entre los lípidos en la bicapa lipídica deshidratada estabilizándola (6, 7).

Existen gran variedad de animales que deben soportar procesos de congelación durante el invierno en relación a las bajas temperaturas imperantes en determinadas regiones del planeta. Estos animales utilizan diversas estrategias para evitar que el daño celular sea tal que al descongelarse, cuando las temperaturas se vuelven cálidas, las células no puedan cumplir con su función. Una de estas estrategias consiste en acumular cantidades considerables de determinados compuestos en el otoño, previo a la congelación. Uno de estos compuestos es la trealosa la cual interactúa con los lípidos de membrana para estabilizar la estructura de la misma durante la congelación (33).

El proceso de congelación celular implica la remoción de agua intracelular (7). Los azúcares no permeables, tales como la trealosa, sacarosa, lactosa y rafinosa (disacáridos) producen un medio hipertónico, causando deshidratación celular previa a la congelación (1, 2, 6).

El efecto osmótico disminuye la cantidad de agua intracelular congelable, disminuyendo de esta forma el grado de daño celular inducido por la cristalización (7). La trealosa no solo posee un efecto protector sobre las células durante la congelación relacionado con el efecto osmótico, sino también por interactuar en forma específica con los fosfolípidos de membrana (8). Dicha interacción ocurre con las cabezas polares de los lípidos de membrana, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas de los carbohidratos durante la congelación (6). Es así que la trealosa es capaz de limitar la transición de fase o aumentar la estabilidad de membrana (7, 10).

Se ha comunicado un efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado ejercido por la incorporación de trealosa a los diluyentes utilizados para congelación de semen de carnero (1, 2, 21). En el equino, la asociación de trealosa con acetamida permitió obtener mayores porcentajes de motilidad progresiva e integridad de membrana que la asociación de acetamida con rafinosa (20). Así mismo, se ha estudiado la influencia de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos incluidos en el diluyente de congelación, sobre la motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, estabilización y congelación de semen canino (34). El agregado de azúcares al diluyente modifica la calidad espermática luego de la equilibración y al descongelado. Se ha observado que la localización y el tipo de acción protectora, varía con relación al tipo de azúcar utilizado (6, 7, 8, 34).

Las observaciones realizadas en ovinos y equinos muestran el efecto benéfico, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la adición de trealosa a un diluyente isotónico. Así mismo resultados preliminares indicarían que el uso de este disacárido podría tener un efecto benéfico sobre la congelación del semen canino.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de trealosa incorporadas al diluyente en Tris Base sobre la viabilidad espermática del semen canino congelado-descongelado.

La hipótesis del trabajo fue que la trealosa agregada a un diluyente tris base permitiría mejorar los parámetros seminales evaluados in vitro en semen canino congelado-descongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos con el fin de investigar el efecto diferentes concentraciones de trealosa en el diluyente TB sobre la viabilidad del semen canino congelado-descongelado.

Experimento N° 1

El experimento N° 1 fue diseñado para estudiar el efecto del agregado de 0% (0 g), 5% (5 g, TBT5), 7% (7 g, TBT7) y 9% (9 g, TBT9) de trealosa en el diluyente 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 estreptomicina 0,1 g, agua destilada csp 100ml; 28) sobre la viabilidad del semen canino congelado-descongelado.

Se utilizaron 9 caninos, ovejero alemán, de entre 2 y 5 años de edad, en actividad sexual y con buena calidad seminal en un diseño de parcelas sub-divididas (Figura N° 4-1A; 30). Los animales fueron alojados en caniles con un régimen de luz natural y alimentados con alimento balanceado de calidad premium. Previamente al inicio del experimento, los caninos fueron

entrenados para eyacular mediante masturbación (5, 14, 17). Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: CON $\geq 200 \times 10^6$, MOT $\geq 70\%$, PVI $\geq 80\%$, ACR $\geq 80\%$, ME $<20\%$, FA ≥ 4000 (12, 16, 19). Se seleccionaron 6 animales los cuales fueron incluidos en el experimento debido a que produjeron semen de calidad igual o superior a la requerida como criterio de aceptación en 3 extracciones preliminares consecutivas en un período de 3 semanas.

Se recolectó semen 1 vez por semana durante 3 semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en alícuotas de igual volumen. Cada una de las alícuotas fue mezclada con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes descritos para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml.

Luego de un tiempo de equilibración de 2 h a 4°C (5), el semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,5 ml, congelado en una caja de poliuretano expandido sobre un soporte colocado a 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos (tasa de congelación estimada con electrocupla y termómetro digital dentro de una pajuela: $11^\circ\text{C}/\text{min}$ de 4 a -5°C ; $3,5^\circ\text{C}/\text{min}$ de -5°C a -15°C y $12^\circ\text{C}/\text{min}$ de -15°C a -100°C), luego la pajuelas se sumergieron y almacenaron dentro de nitrógeno líquido hasta su evaluación (5). Las pajuelas fueron descongeladas a 37°C durante 1 minuto (23).

Por duplicado, se realizaron las siguientes pruebas de contrastación *in vitro* macroscópicas y microscópicas al semen fresco: 1) VOL (ml): se midió directamente en el tubo colector graduado (19); 2) CON ($10^6/\text{ml}$): se determinó mediante cámara de Neubauer (19); 3) MOT (% con motilidad progresiva) se realizó por microscopía de luz a 400 X, se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; 4) VIG (escala 1-5) se realizó por microscopía de luz

a 400 X, se estimó la velocidad del movimiento individual (19); 5) ACR (% acrosomas intactos): se determinó con microscopía de contraste de fase (31); 6) PVI (% vivos): se utilizó la tinción de eosina-nigrosina (19); 7) ME (% normales): se utilizó microscopía de contraste de fase (25, 31); 8) EP (% colas enrolladas): se utilizó una solución hipotónica de 150 mOsm, y se evaluó el porcentaje de células con colas enrolladas (18, 27). Al semen descongelado se le realizó las mismas pruebas de contrastación que al semen fresco exceptuando VOL y CON. Las pruebas fueron realizadas por dos observadores independientes y en el caso de ACR, EP, PVI y ME se contaron 200 células (29).

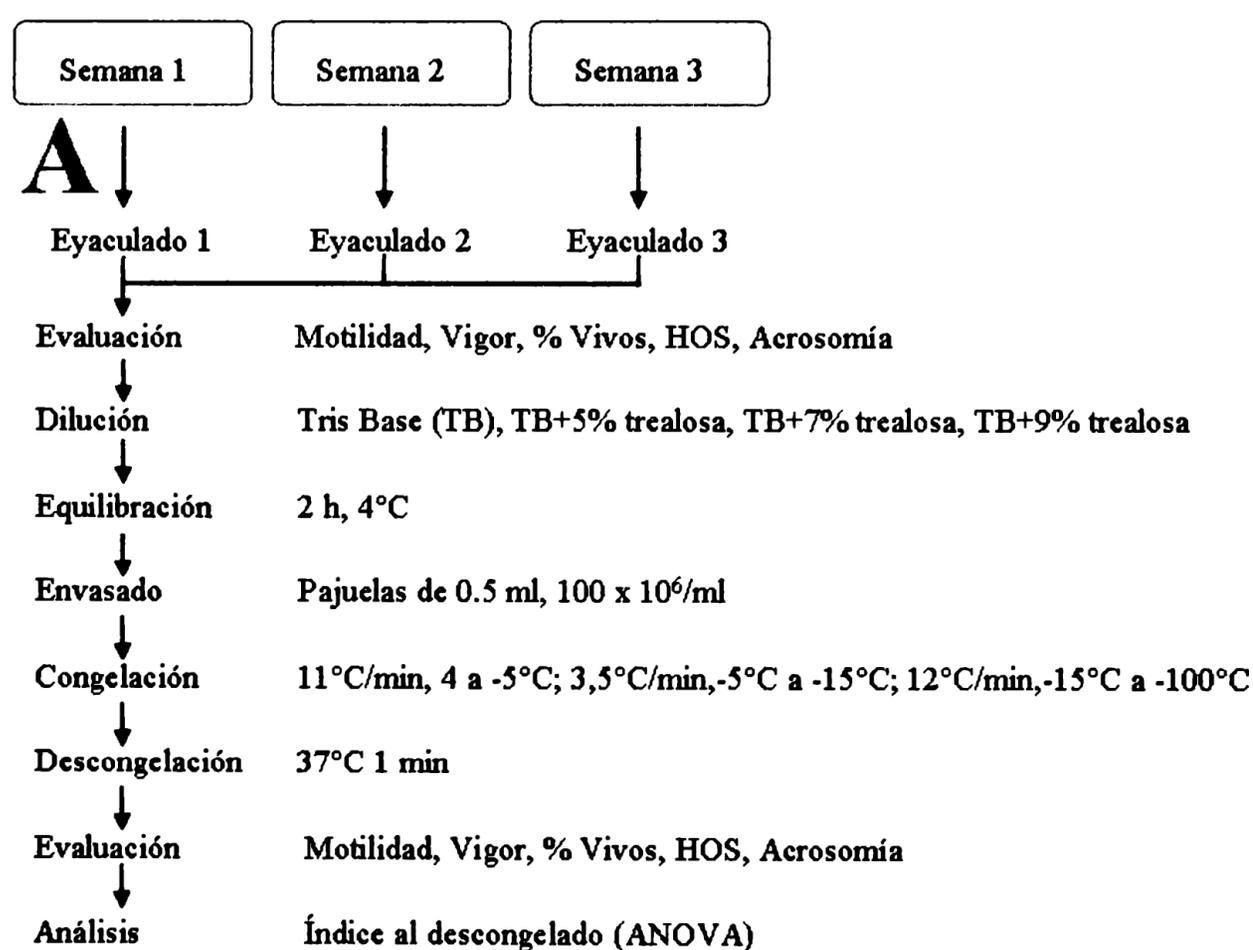


Figura N° 4-1A. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 1.

Se analizaron las características espermáticas del semen fresco y los índices al descongelado ($[\text{características espermáticas al descongelado} / \text{características del semen fresco}] \times 100$) mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS[®] (1, 32). El modelo matemático incluyó el efecto perro, eyaculado anidado dentro de perro, diluyente y la interacción de perro por diluyente y eyaculado por diluyente anidado dentro de perro. El efecto principal de perro fue analizado con eyaculado anidado dentro de perro como término de error. Se utilizaron los siguientes contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre las distintas concentraciones de trealosa utilizadas en el diluyente (30): TB vs. TBT5 + TBT7 + TBT9; TBT5 vs. TBT7 + TBT9; TBT7 vs. TBT9.

Experimento N° 2

El experimento N° 2 fue diseñado para estudiar el efecto del agregado de 0% (0 g), 2.5% (2,5 g, TBT2,5) y 5% (5 g, TBT5) de trealosa en el diluyente 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 estreptomicina 0,1 g, agua destilada csp 100ml, Rota 1997) sobre la viabilidad del semen de perro congelado-descongelado.

Se utilizaron 3 de los 6 caninos ovejeros alemanes utilizados en el Experimento N° 1 con buena calidad seminal en un diseño de parcelas sub-divididas (Figura N° 1B; 30). Se utilizaron los mismos criterios de aceptación de los animales que en el Experimento N° 1. Se recolectó semen 1 vez por semana durante 3 semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en alícuotas de igual volumen. Cada una de las alícuotas fue mezclada con un volumen calculado de cada uno de los diluyentes descritos para obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. Se utilizaron los mismos procesos de dilución, congelación, descongelación,

evaluación y análisis estadístico que los utilizados en el Experimento N° 1. Se utilizaron los siguientes contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre las distintas concentraciones de trealosa utilizadas en el diluyente (30): TB vs. TBT2,5 + TBT5; TBT2,5 vs. TBT5.

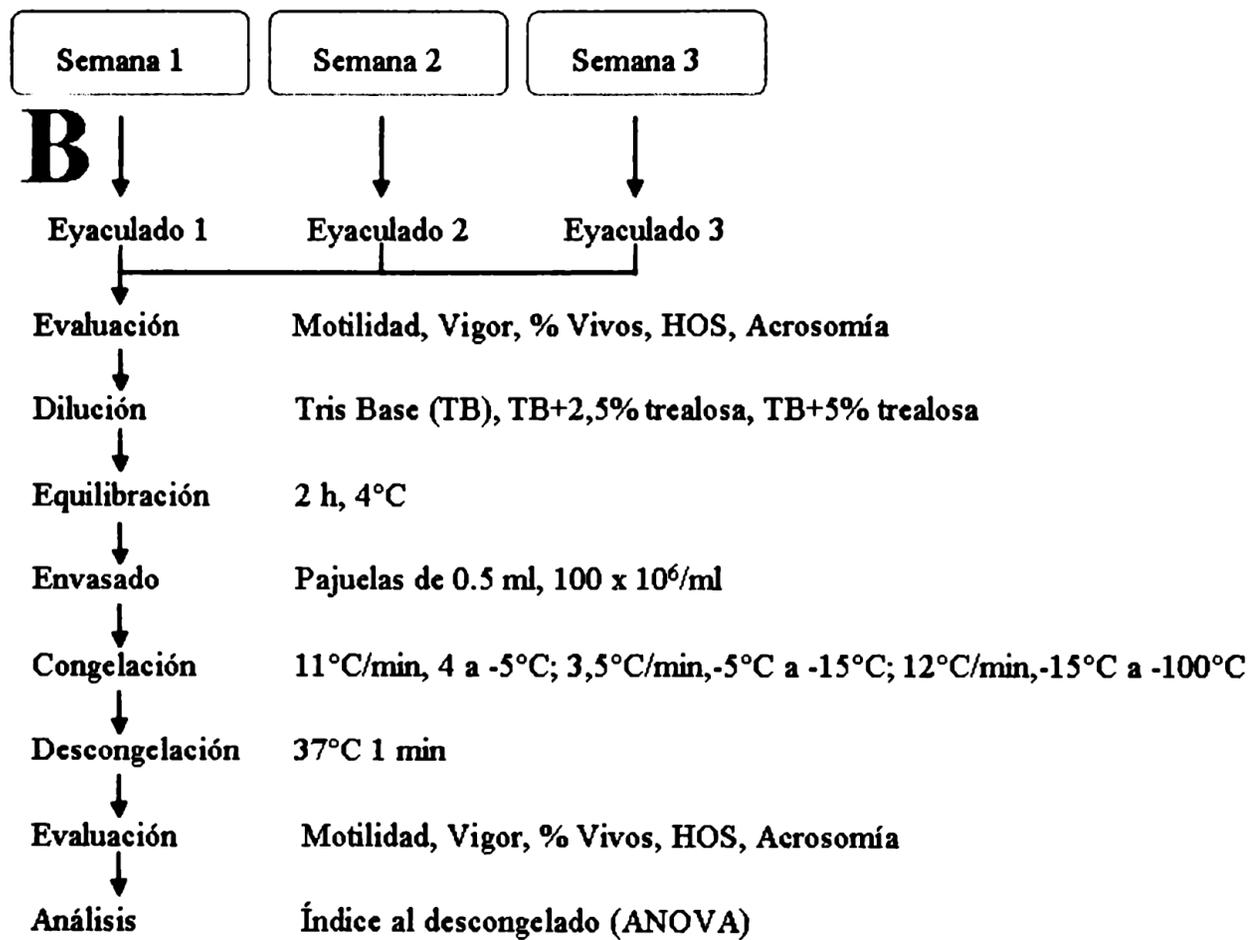


Figura N° 4-1B. Diseño experimental utilizado en los Experimento N° 1.

RESULTADOS

Experimento N° 1

El semen diluido con TB mostró índices de descongelación superiores a los obtenidos con el semen diluido con TB y el agregado de trealosa (TB vs. TBT5, TBT7 y TBT9; MOT, VEL, HOS, ACR, VS, $P < 0,001$; Figura N° 4-2). Además, el semen diluido con un diluyente TBT5 mostró índices de descongelación superiores a los obtenidos con semen diluido con TBT7 y TBT9 (MOT, VEL, VS, $[P < 0,01]$ y HOS, ACRO $[P < 0,02]$; Figura N° 4-2). Por último, el semen diluido con un diluyente TBT7 mostró índices de descongelación superiores a los obtenidos con semen diluido con TBT9 (MOT, VEL, HOS, ACRO, $[P < 0,01]$ y VS $[P < 0,02]$; Figura N° 4-2). No se observó ningún efecto de perro ($P > 0,14$) ni interacción entre perro y diluyente ($P > 0,14$) en los índices pos-descongelación evaluados.

Experimento N° 2

El semen diluido con TBT y el agregado de trealosa mostró índices de descongelación inferiores comparado con el semen diluido con TB (TBT2,5 y TBT5 vs. TB; MOT, HOS, PV, $P < 0,001$; ACR, $P < 0,01$; Figura N° 4-3). Sin embargo el semen diluido con TBT2,5 mostró índices de descongelación similares a los obtenidos a partir de semen diluido con TBT5 ($P > 0,15$). No se observó ningún efecto de perro ($P > 0,14$) ni interacción entre perro y diluyente ($P > 0,13$) en los índices pos-descongelación.

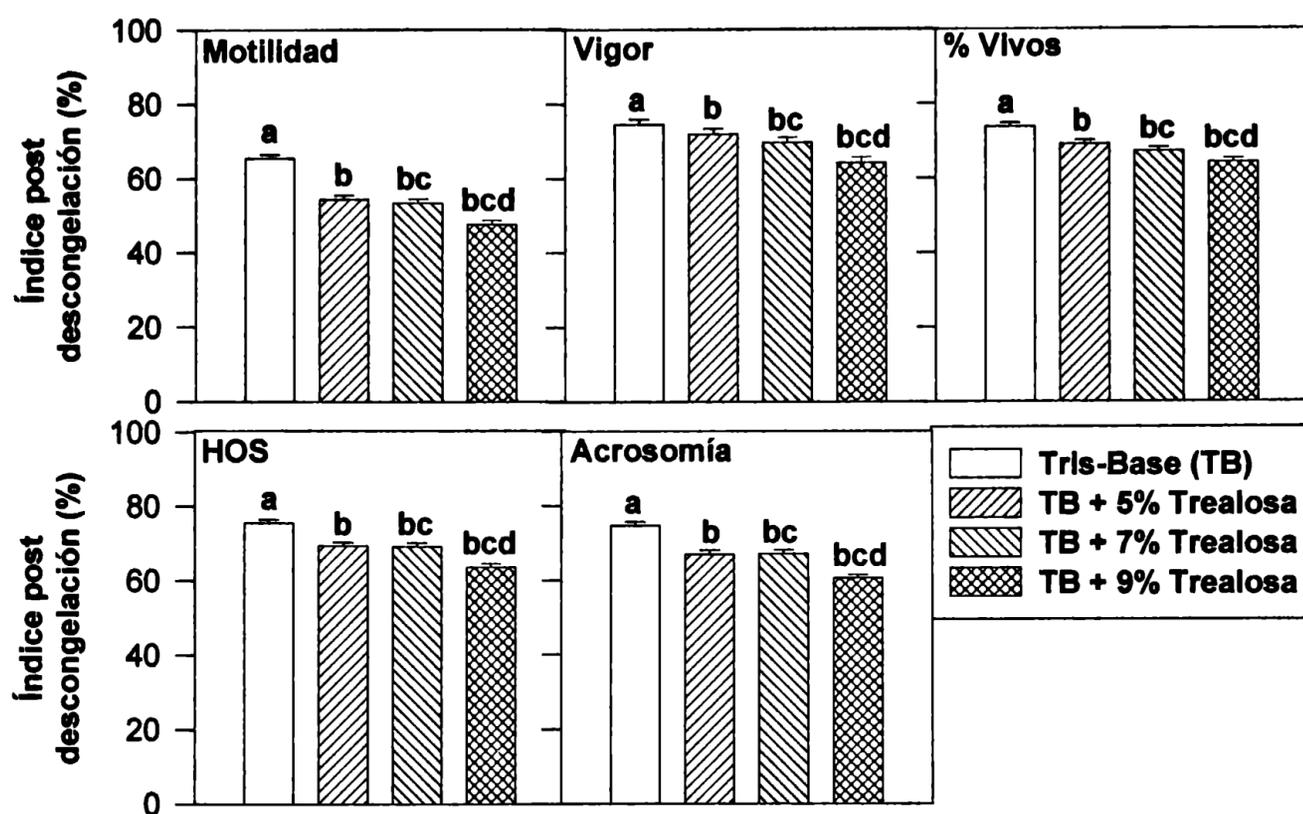


Figura N° 4-2. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB más el 5%, 7% y 9% de trealosa. Barras con diferentes letras difieren a $P < 0.01$.

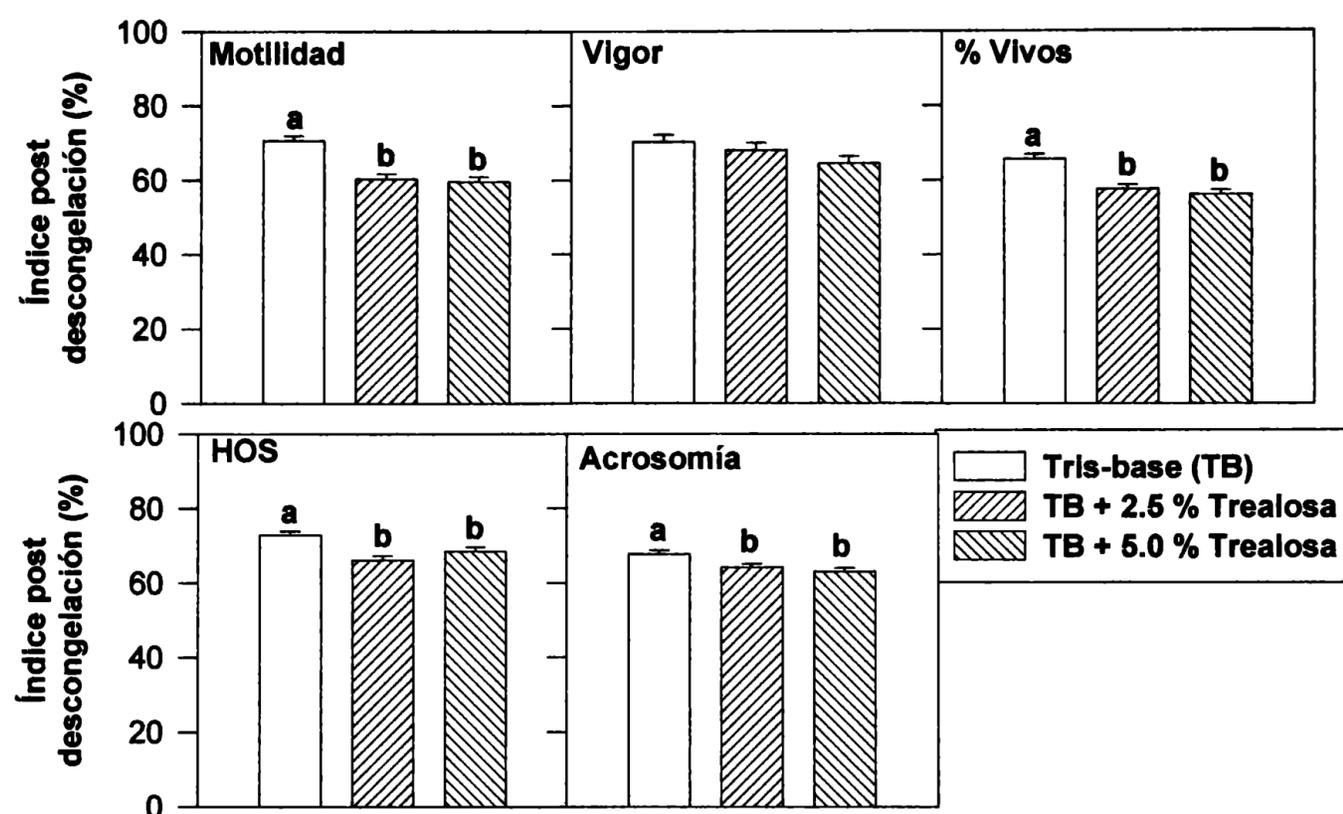


Figura N° 4-3. Cuadrados medios mínimos y desvíos estándares del índice de pos-descongelación evaluado por duplicado (%; [características espermáticas al descongelado / características del semen fresco] x 100) de motilidad, vigor, porcentaje de vivos, HOS, e integridad acrosómica en muestras individuales de semen congelado-descongelado de 3 eyaculados de 6 perros en las cuales se utilizó Tris-Base (TB) o TB más el 2.5% y 5.0% de trealosa. Barras con diferentes letras difieren a $P < 0.01$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este experimento se evaluó el efecto crioprotector de la trealosa sobre el semen canino. Aisen y col. (2002) han observado que altas concentraciones de trealosa poseen un efecto deletéreo sobre los espermatozoides de carnero sometidos a procesos de criopreservación. Sin embargo bajas concentraciones de este azúcar permiten obtener un alto porcentaje de espermatozoides de carnero viables y fértiles al descongelado. Este mismo efecto pudo observarse en este trabajo, donde concentraciones más bajas de trealosa (2,5% y 5%) permitieron obtener índices de congelabilidad superiores a los obtenidos con concentraciones más altas (7% y 9%). Sin embargo ninguna de las concentraciones utilizadas en este trabajo, mejora la calidad del semen descongelado en comparación con el diluyente Tris Base sin el agregado de trealosa. Este hecho demuestra que los espermatozoides de perro son más sensibles a medios hipertónicos que los espermatozoides de carnero.

Yildiz y col. (2000) comunicaron que, en caninos, los disacáridos (a excepción de la lactosa) permiten obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos y acrosomas intactos al descongelado, pero con bajos porcentajes de motilidad progresiva. Por otro lado, observaron que los monosacáridos, en especial la fructosa y xilosa permiten obtener altos porcentajes de motilidad progresiva, acrosomas intactos y espermatozoides vivos. De los azúcares, por ellos estudiados, la trealosa, fructosa y xilosa mejoraron la calidad seminal al descongelado en comparación con otros azúcares y el diluyente control sin azúcar.

Nuestros resultados sugieren que el semen canino diluido en un diluyente Tris-Base con el agregado de fructosa, pero sin trealosa posee al descongelado mayores porcentajes de motilidad progresiva, vigor, acrosomas intactos, y espermatozoides vivos y con membrana plasmática

íntegra si lo comparamos con el semen congelado con diluyente Tris Base con el agregado de fructosa y trealosa. Sin embargo, un mayor impacto de la acción protectora de la fructosa en relación a la trealosa, fue observado en la motilidad progresiva, lo cual se relacionaría con lo observado por Yildiz (2000). Así mismo nuestros resultados se correlacionan con los obtenidos por Molinia et al quienes observaron que los monosacáridos permiten obtener mayores porcentajes de motilidad progresiva al descongelado que los disacáridos en semen de carnero (22).

Yildiz (2000) comunicó que la trealosa mejora la integridad acrosómica y la supervivencia espermática al descongelado pero no la motilidad si se la compara con la fructosa, mientras que este último azúcar mejora la motilidad. Los datos obtenidos por Yildiz se correlacionarían con la diferente habilidad crioprotectora de acuerdo al tipo de azúcar considerado (7). Por otro lado se ha comunicado que altas concentraciones de trealosa poseen un efecto deletéreo sobre el semen de carnero durante el enfriamiento y los procesos de congelación y descongelación. Así mismo se observó que la acción protectora de la trealosa es dependiente de la concentración del azúcar en el diluyente (2, 9). En nuestro estudio se obtuvieron índices de congelabilidad inferiores con el agregado de trealosa al diluyente en comparación con el diluyente Tris Base con el agregado de fructosa. Sin embargo con el agregado de 5% de trealosa se obtuvieron índices de congelación superiores a los obtenidos con 7% y 9% de trealosa lo cual se correlacionaría con la concentración del azúcar en el diluyente y la hipertonía del medio. Cuando comparamos los índices de congelabilidad obtenidos al incorporar 2,5% y 5% de trealosa al diluyente no se observaron diferencias significativas entre los diluyentes pero si se observaron índices de congelabilidad significativamente más bajos que los obtenidos con el diluyente Tris Base sin el agregado de trealosa pero si de fructosa. Esto demuestra que el espermatozoide canino

es muy sensible al estrés osmótico y se refleja claramente sobre la motilidad espermática. Por otra parte, los índices de congelabilidad de integridad acrosómica y HOS muestran que la trealosa posee cierta acción protectora sobre las membranas, lo cual se relacionaría con la interrelación de este azúcar con los fosfolípidos de membrana brindando estabilidad a los mismos. Es así que, si bien la trealosa a bajas concentraciones ejerce cierto efecto protector no mejora la calidad del semen en comparación a la fructosa. Sin embargo mediante el uso de cantidades de trealosa inferiores a las utilizadas en este experimento podría reducirse el estrés osmótico ejercido sobre los espermatozoides caninos. De esta manera la trealosa podría interaccionar con los fosfolípidos estabilizando la membrana plasmática y ejerciendo acción protectora sobre los espermatozoides caninos durante los procesos de congelación y descongelación.

Futuros estudios podrían realizarse para evaluar la acción de concentraciones de trealosa mucho más bajas que las utilizadas en este trabajo, con el fin de evaluar el efecto de este azúcar sobre el semen canino durante la criopreservación. Así mismo estudios sobre la acción protectora de monosacáridos y disacáridos combinados en un diluyente Tris Base podrían demostrar que la acción protectora conjunta de estos azúcares, cada uno en forma diferente y con diferente impacto sobre la célula, podría resultar benéfica para la protección de los espermatozoides caninos en el proceso de congelación-descongelación.

BIBLIOGRAFÍA

1. AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE; J. J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053-1061.
2. AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 57: 1801-1808.
3. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. (1996). *Biología Molecular de la Célula*. Omega. 3º Ed. Barcelona, España.
4. ANDERSEN, K. (1972). Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet. Scand*. 13: 128-134.
5. ANDERSEN, K. (1980). Artificial insemination and storage of canine semen. En: MORROW DA (ed): *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 661-665.
6. BAKAS, L.S.; DISALVO, E.A. (1991). Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*. 28: 347-353.
7. CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; ANCHORDOGUY, T.J. (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents*. 26th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. California. 1: 219-229.

8. CROWE, J.H., CROWE, L.M., OLIVER, A.E., TSVETKOVA, N., WOLKERS, W., TABLIN, F. (2001). The threalosa myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. 43: 89-105.
9. CURRY, M.R.; WATSON, P.F. (1994). Osmotic effect on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 31: 39-46.
10. CHEN, T.; FOWLER, A.; TORNER, M. (2000). Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology*. 40: 277-282.
11. CHIRINEA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; LOPEZ, D.M.; PAPA, F.O.; TRINCA, L.A. (2003). Effect of supplementation of different sugars in the extender on freezing semen of dogs. *Bras. J. Anim. Reprod.* 27: 361-362.
12. DOTT, H.M., Foster, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain *J. Reprod. Fertil.* 28: 443-445.
13. ENGLAND, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 47: 243-255.
14. FASTARD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 251-260.
15. 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.
16. FONTBONNE, A., BADINAND, F. (1996). Prélèvement et examen de la semence chez le chien. En: *Les indispensables de l'animal de compagnie*. Dumond C, Fontbonne, A (eds). PMCAC Paris. 153-159.

17. FOSBERG, C.L. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 467-485.
18. HIDEKI, F., MASASHI, I.; TAKASASHI, K. (1993). Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 38: 311-315.
19. JOHNSTON, S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 545-551.
20. JULIANI, G.C., HENRY, M. (2003). The effect of trehalose or raffinose associated to acetamide/methylcellulose on post thaw equine sperm viability. *Bras. J. Anim. Reprod.* 27: 355-356.
21. MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; QUINTANA CÁSERES, P.I.; MAXWELL, W.M.C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellets frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 113-122.
22. MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. (1994). In vitro evaluation of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 491-500.
23. NORTON, D.B., BRUCE, S.G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39: 311-316.
24. NOTHLING, J.O., VOLKMAN, D.H. (1997). Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 51: 109-116.
25. OETTLÉ, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 47: 257-260.

26. RIGAU, T., FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRÍGUEZ-GIL, J.E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 56: 801-815.
27. RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 885-900.
28. ROTA, A., STROM, B., FOSBERG, C.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 47: 1093-1101.
29. ROTA, A. (1998). Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences.
30. PETERSEN, R.G. (1985). *Design and Analysis of Experiments*, New York: Marcel Dekker, Inc. 429.
31. PURSEL, V. G., JONSHON L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1: 63-68.
32. SAS. SAS/STAT. (1989). *User's Guide. Version 6, 4th Edition*. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1684.
33. STOREY, B.; STOREY, J.M. (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68: 27-84.
34. 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. *Theriogenology*. 54: 579-585.

35. **WATSON, P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). Oxford Reviews of Reproductive Biology. Oxford University Press. 1: 283-350.**

CAPÍTULO V

PORCENTAJES DE PREÑEZ OBTENIDOS MEDIANTE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO UTILIZANDO UN DILUYENTE TRIS BASE CON Y SIN EL AGREGADO DE 1,5% DE EQUEX STM PASTE

INTRODUCCIÓN

Si bien en 1787, Lázaro Spallanzani realizó la primera IA con semen fresco en caninos (citado por Peña 1997), debieron pasar casi dos siglos hasta que en 1956, Harrop obtuvo la primera preñez con semen refrigerado (1960). Diez años más tarde, en 1969, Seager comunica la primera IA con semen congelado (1969).

Con el avance de la biotecnología, cada vez es más frecuente el uso de IA con semen fresco o con semen criopreservado. 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.

Los porcentajes de preñez y el número de cachorros obtenidos luego de utilizar IA con semen congelado generalmente son inferiores que los obtenidos luego de utilizar IA con semen

fresco (1, 14, 15, 16, 39). Ciertos factores como: momento de la inseminación, semen utilizado y técnica de IA implementada, afectan los resultados obtenidos en IA cuando se utiliza semen congelado. (18). Está ampliamente comprobado que los procesos de congelación-descongelación producen disminución de la fertilidad y longevidad espermática. Este hecho hace necesario que los espermatozoides se depositen próximos, en tiempo y espacio, al momento y lugar en el que ocurrirá la fecundación. Es así que el semen descongelado debe colocarse en el útero en el momento en que la hembra posee óvulos maduros capaces de ser fecundados (41).

La calidad de semen al descongelado así como el número de espermatozoides inseminados (dosis inseminante) son dos factores sumamente importantes. Los mismos se relacionan con la calidad del semen eyaculado, la habilidad con que los espermatozoides soportan el proceso de criopreservación y las técnicas utilizadas para la congelación y descongelación (31, 41, 44). La conjunción de una buena calidad de semen fresco con la implementación de una técnica de criopreservación adecuada para la especie permitirá obtener al descongelado un porcentaje aceptable de espermatozoides con capacidad fecundante. En caninos, la dosis de espermatozoides recomendada para IA con semen congelado es de 150×10^6 espermatozoides viables al descongelado (8, 24, 25, 27). Es así que el número de hembras inseminadas con un eyaculado varía con el número de espermatozoides eyaculados (lo cual posee gran variación racial) y el número de espermatozoides viables al descongelado.

Otro factor importante a considerar es el momento en que se realiza la IA. Si bien el servicio natural puede ocurrir varios días antes del período de fertilización debido a la longevidad del semen fresco, el semen congelado debe colocarse en el momento en que los ovocitos están listos para ser fertilizados. En las hembras caninas la duración del proestro es variable, pudiendo oscilar entre 2 y 25 días. La ovulación ocurre aproximadamente 48 horas luego de ocurrido el

pico preovulatorio de LH, al inicio del estro. En la hembra canina, el ovocito es ovulado al comienzo de la primera división meiótica y la maduración que requiere aproximadamente 2 días se completa en el oviducto (4, 5, 6, 11). Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios. Debido a la elevación de la concentración de estrógenos (E_2) en el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células luminales se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia su muerte. Este fenómeno podrá visualizarse claramente en los extendidos vaginales en los cuales aumentará el porcentaje de células superficiales a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro (24). El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (17, 26). Luego, el dosaje de las concentraciones de progesterona (P_4) sérica hará posible determinar el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de LH. La P_4 sérica asciende de niveles basales (0,5 ng/ml) a niveles superiores (≥ 2 ng/ml) cuando ocurre el pico preovulatorio de LH. El dosaje sérico de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH, sin embargo, debido a su costo y a la dificultad de encontrar laboratorios que lo realicen, este método no se utiliza rutinariamente (4). Si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de los ovocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas (4, 5, 6). Los ovocitos secundarios permanecerán capaces de ser fecundados por 4 o 5 días, momento en el cual se debería realizar la IA. Si se utiliza semen congelado, el momento indicado para realizar la IA será entre 72 y 96 horas luego de la ovulación (14).

La IA intravaginal es una técnica sencilla, sin embargo cuando se utiliza semen congelado, las tasas de preñez y el tamaño de camada son inferiores con esta técnica en comparación con IA intrauterina (12, 20). La IA intrauterina transcervical puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con el catéter Noruego y si bien esta técnica es económica y no invasiva, requiere cierto grado de entrenamiento del operador (15). Otra manera de realizar la cateterización del cuello es mediante catéteres visualizando el cervix con ayuda de un endoscopio (43). Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina. 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 21G. Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (8, 22). También puede realizarse IA mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo el costo de los equipos hace que esta técnica haya sido solo utilizada ocasionalmente (42). En la Tabla N° 1, se presenta la fertilidad y prolificidad obtenida en diferentes trabajos realizados con semen congelado-descongelado utilizando diferentes técnicas de IA.

En el Capítulo III se estudió el efecto del agregado de diferentes concentraciones de Equex STM paste al diluyente Tris Base y se concluyó que con el agregado de 1,5% se obtenían los mejores resultados de calidad espermática en semen congelado-descongelado. Por otro lado, en el Capítulo IV se estudió el efecto de la sustitución de fructuosa por diferentes concentraciones de trealosa en el diluyente Tris Base y se concluyó que la trealosa no producía ninguna mejora en la calidad espermática en el semen congelado-descongelado. Por lo tanto, para continuar con una secuencia lógica de experimentos y teniendo en cuenta que en este último se debía realizar la

prueba de campo para evaluar un diluyente que conjugara las mejores cualidades de los resultados obtenidos en los capítulos anteriores se seleccionó un diluyente Tris Base con el agregado de 1,5% de Equex STM paste y sin el agregado de Trealosa.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la fertilidad obtenida con IA intrauterina realizada con el catéter Noruego utilizando semen congelado-descongelado con el diluyente Tris base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM paste.

La hipótesis de trabajo fue que el agregado de 1,5% de Equex SMT paste al diluyente Tris Base mejoraría la fertilidad y prolificidad de las hembras inseminadas con semen congelado-descongelado en comparación con el diluyente Tris Base sin el agregado de Equex SMT.

Tabla N° 5-1. Porcentaje de preñez y tamaño de camada obtenido en diferentes trabajos en los cuales se utilizó semen congelado-descongelado en pajuelas de 0,5 ml con diferentes técnicas de inseminación artificial.

Autor	Técnica de IA	Diluyente utilizado	Hembras inseminadas	Porcentaje de preñez	Tamaño de camada
Silva, LDM (1996)	Intrauterina, laparoscópica	Diluyente (Laiciphos 478, IMV)	5	60%	SDs
Fosberg, CL (1999)	Intrauterina, laparoscópica	Diluyente (CLONE)	19	58%	6 ± 2
Fosberg, CL (1999)	Intrauterina, catéter noruego	Diluyente (CLONE)	167	84%	5,4 ± 3
Fosberg, CL (1999)	Vaginal	Diluyente (CLONE)	141	59%	4 ± 2,7
Notling, JO (1993)	Vaginal	Triladyl	10	60%	2,4 ± 2,8
Fastard, W (1984)	Intrauterina, catéter noruego	Tris base	30	67%	5,5
Andersen, K (1972)	Vaginal,	Tris base	8	0%	SD
Andersen, K (1972)	Intrauterina, quirúrgica	Tris base	1	100%	3
Rota, A (1998)	Intrauterina, transcervical endoscópica	Tris base con 0,5% de Equex STM paste	5	100%	2,2 ± 2,0

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro machos caninos Ovejero Alemán, de entre 2 y 5 años de edad, en actividad sexual y buen estado de salud. Los animales fueron alojados en caniles con un régimen de luz natural y alimentados con alimento balanceado de calidad premium. Previamente al inicio del experimento los caninos fueron entrenados para eyacular mediante masturbación (2, 10, 15). Como criterio de aceptación de un macho se tomaron los siguientes parámetros seminales: concentración espermática total (CE) $\geq 200 \times 10^6$, motilidad progresiva individual (MPI) $\geq 70\%$, espermatozoides vivos (EV) $\geq 80\%$, acrosomas normales (AN) $\geq 80\%$, presencia de malformaciones (MF) $<20\%$, fosfatasa alcalina (FA) ≥ 4000 (6, 13, 23, 34). Los 4 animales incluidos en el experimento produjeron semen de calidad igual o superior a la requerida como criterio de aceptación en 3 extracciones preliminares consecutivas en un período de 3 semanas.

La fracción espermática del eyaculado se diluyó con Tris Base (TB, Tris 2,4 g, ácido cítrico 1,4 g, glucosa 0,8 g, glicerol 5 ml, yema de huevo 20% v/v, penicilina sódica 0,06 g, sulfato de estreptomicina 0,1 g, y agua destilada csp 100ml; 35) sin agregado de Equex STM o con el agregado 1,5 ml de Equex STM paste (TBE15) en csp 100 ml de TB.

Dicha dilución fue realizada en 2 pasos y se obtuvo una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml (33). Luego de un tiempo de equilibración de 2 h a 4°C (2), el semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,5 ml, congelado en una caja de poliuretano expandido sobre un soporte colocado a 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos (tasa de congelación aproximada: $11^\circ \text{C}/\text{min}$ de 4 a -5°C ; $3.5^\circ \text{C}/\text{min}$ de -5°C a -15°C y $12^\circ \text{C}/\text{min}$ de -15°C a -100°C), luego la pajuelas se sumergieron y almacenaron dentro de nitrógeno líquido

hasta su utilización (2). Las pajuelas fueron descongeladas a 37° C durante 1 minuto (28, 29).

Además, se utilizaron catorce hembras caninas mestizas mascotas provenientes de propietarios particulares de entre 1 y 4 años de edad y 5 y 25 kg de peso en buen estado de salud. Las hembras fueron examinadas diariamente para detectar edema y descarga vulvar serosanguinolenta. Se consideró el inicio del proestro el primer día que las hembras mostraron los dos signos previamente mencionados. El ciclo estral fue monitoreado día por día mediante citología vaginal y vaginoscopia hasta que la imagen citológica y vaginoscópica coincidió con el inicio del estro. A partir de este momento, se tomaron muestra de sangre cada 48 h a fin de realizar determinación de P₄ sérica mediante un método semi-cuantitativo (Ovulation test®). Se consideró como día 0 del estro el día en que la concentración de progesterona sérica pasó de niveles basales (< 0,5 ng/ml) a niveles superiores (≥ 2,5 ng/ml). Las perras fueron inseminadas entre el día 4 y 7 del estro (4, 5, 15, 17, 26). Las 14 perras fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos de 7 animales cada uno. Las perra del grupo I fueron inseminadas con semen congelado-descongelado con diluyente TB sin el agregado de Equex STM paste, y las perras del grupo II fueron inseminadas con semen congelado con un diluyente TB con el agregado de 1,5% de Equex STM paste. Las perras fueron inseminadas una sola vez, por vía intrauterina, mediante técnica transcervical con catéter noruego, con una dosis inseminante de 150x10⁶ espermatozoides (2, 3).

Se realizó la ovario-histerectomía 28 días después del primer día del diestro estimado por citología vaginal. Los úteros obtenidos fueron estudiados a fin de observar la presencia o ausencia de gestación y contar el número de embriones existentes en los úteros gestantes.

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando los procedimientos CATMOD para analizar el porcentaje de preñez y GLM para analizar el número de embriones al diagnóstico de gestación de SAS® (37). El modelo matemático para analizar ambas variables dependientes incluyó el efecto de diluyente.

RESULTADOS

El porcentaje de preñez del grupo II (Tris Base+1,5% Equex STM paste) si bien fue numéricamente superior no fue estadísticamente diferente del porcentaje de preñez del grupo I (Tris Base; 71,4% [5/7] vs. 42,8% [3/7], $P < 0,29$). También, el número de embriones gestados en el grupo II (Tris Base+1,5% Equex STM paste) si bien fue numéricamente superior no fue estadísticamente diferente del número de embriones gestados en el grupo I (Tris Base; 2,14 vs. $1.14 \pm 0,65$, $P < 0,29$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La IA con semen congelado en caninos es aún objeto de controversias. Tres factores hacen difícil definir con precisión el alcance y las limitaciones de la implementación de IA con semen congelado en caninos. Los tres factores mencionados son: 1) el pequeño número de

animales utilizados en las pruebas de campo, 2) la escasa cantidad de pruebas de campo realizadas 3) La diversidad de técnicas de criopreservación de semen y de IA implementadas.

La ocurrencia de los factores antes mencionados puede comprenderse si se piensa en las limitantes que poseen las experiencias de campo realizadas con pequeños animales. En primer lugar existen leyes muy rígidas de protección animal que restringen el uso de los caninos y felinos para la realización de experimentos, en segundo lugar el costo de estas experiencias es realmente alto y no es fácil obtener fondos de la forma en que se disponen para trabajar con animales de producción, y en tercer lugar no hay gran disponibilidad de animales controlados y en condiciones aceptables para ser utilizados en las experiencias (los animales de refugios públicos en nuestro país poseen deficiencias alimenticias y sanitarias importantes). Los hechos discutidos hacen que los trabajos de IA con semen congelado en caninos domésticos sean realizados con un escaso número de animales y nuestro medio no permite que escapemos a esta realidad. Solo países como Suecia o Noruega, que han sido pioneros en la aplicación de esta biotecnología y en los que se utiliza la IA con semen congelado en la práctica reproductiva diaria poseen estudios retrospectivos con un número importante de hembras inseminadas (19) en un período de tiempo promedio de entre 10 y 12 años. Así mismo el número de hembras consideradas en estos estudios retrospectivos oscila entre 140 y 160 número que eventualmente no puede compararse con las experiencias realizadas en animales de producción.

Además, es importante recalcar, que en el presente trabajo, para obtener 14 perras experimentales se evaluaron más de 30 perras para seleccionar solamente aquellas hembras, en estado de salud, que estaban en proestro, realizarles la inseminación programada y luego al día 28 post inseminación realizar la ovario-histerectomía sin cargo, único incentivo por el cual los propietarios de dichas perras habían aceptado participar de la experiencia.

Por otra parte, si analizamos los trabajos publicados, existe gran variación en los resultados obtenidos con IA utilizando semen congelado en caninos, este hecho se relaciona con la diversidad de protocolos usados, la técnica de IA implementada, la dosis inseminante seleccionada, el método de congelación-descongelación implementado y el momento y número de IA realizadas. Estos hechos están íntimamente relacionados con el escaso número de hembras disponibles para los trabajos experimentales, así como con el análisis de resultados obtenidos a partir de la evaluación de hembras inseminadas en la práctica reproductiva diaria en largos períodos de tiempo (10- 12 años).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la fertilidad obtenida en un programa de IA utilizando semen congelado con el diluyente Tris Base sin el agregado de Equex STM paste y con el agregado de 1,5% de Equex STM paste.

Nuestros resultados muestran un 42,8% de preñez y un tamaño de camada gestada de 2,5 en el grupo de hembras inseminadas con semen congelado diluido en Tris base sin el agregado de Equex STM paste y un 71,4% de preñez y un tamaño de camada de 3 ± 2 en el grupo de hembras inseminadas con semen congelado diluido en Tris base con el agregado de 1,5 % de Equex STM paste. Si bien el número de hembras inseminadas fue pequeño nuestros resultados muestran una tendencia a aumentar el porcentaje de preñez y el tamaño de camada al utilizar un diluyente tris base con el agregado de Equex STM paste. Estos datos se correlacionan con los datos obtenidos en las pruebas in vitro realizadas en el experimento dos de esta tesis.

Se seleccionó la técnica de IA intrauterina debido a que el semen congelado posee menor longevidad que el semen fresco y se ha demostrado que colocar el semen más cerca del óvulo mejora las probabilidades de éxito (41). Este hecho puede observarse en el estudio retrospectivo realizado por Fosberg quien obtiene 58,9% de preñez cuando utiliza IA vaginal y 84% de preñez

cuando utiliza IA intrauterina con cateter noruego (14). La utilización del el cateter noruego para realizar la IA permitió realizar el depósito del semen utilizando la técnica transcervical y evitando someter al animal a un protocolo anestésico y a una técnica invasiva como es la IA intrauterina quirúrgica.

Por otra parte, si bien, la utilización de una IA con el uso auxiliar de un videoendoscopio disminuye el grado de error en la implementación de la técnica de IA, sin embargo el costo del equipo hace poco posible la utilización del recurso endoscópico (18).

El porcentaje de preñez obtenido por Fastard (1984) utilizando un diluyente tris-base e implementando IA intrauterina con cateter noruego fue de 67%, superior al obtenido en nuestro estudio (42,8 %) a pesar de haber utilizado el mismo diluyente y la misma metodología de IA. Sin embargo debe considerarse que Fastard utilizó dos inseminaciones con un intervalo de 48 hs entre cada inseminación, mientras que en nuestro estudio se realizó solo una IA. La implementación de dos inseminaciones aumentaría la posibilidad de obtener un mayor porcentaje de preñez (18). Así mismo Fastard inseminó 30 animales mientras nosotros utilizamos un grupo mucho más pequeño (7 animales), esta diferencia numérica también podría producir diferencias en los resultados obtenidos.

Cuando utilizamos semen congelado con un diluyente Tris base con el agregado de 1,5 % de Equex STM paste obtuvimos un 71,4% de preñez y un tamaño de camada de 3 ± 2 . Rota obtuvo 100% de preñez utilizando semen congelado con un diluyente Tris base con el agregado de 0,5 % de Equex STM paste. Sin embargo debemos considerar que utilizó IA endoscópica lo cual brinda mayor exactitud en el sitio de deposición seminal ya que el operador visualiza el cuello uterino al realizar la maniobra cosa que no ocurre al utilizar la técnica transervical con cateter noruego. Por otro lado realizó dos inseminaciones una el día 3 y otra el día 5 luego de la

estimación del pico de LH lo cual como ya discutimos aumentaría la posibilidad de obtener un mayor porcentaje de preñez (18). Otro factor a tener en cuenta es que Rota utilizó un porcentaje de Equex STM paste (0,5%) inferior al utilizado por nosotros (1,5%) este hecho podría relacionarse con la disminución de la sobrevivencia espermática al contactar el espermatozoide con mayores porcentajes de Equex STM paste (32, 33). Sin embargo el tamaño de camada obtenido por Rota (36) fue de $2,2 \pm 2,0$, mientras que en nuestro trabajo se obtuvo un tamaño de camada gestada superior (3 ± 2) lo cual podría relacionarse con la capacidad fecundante del semen diluido con Tris base con el agregado de 1,5 % de Equex STM paste. Otro factor a considerar es que Rota inseminó solo 5 animales. Futuros estudios de campo con un mayor número de hembras inseminadas permitirán relacionar estas observaciones con la capacidad real del diluyente para obtener altos porcentajes de preñez.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDERSEN, K. (1972). Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet. Scand.* 13: 128-134.
2. ANDERSEN, K. (1980). Artificial insemination and storage of canine semen. En: Morrow, D.A. (ed). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals.* W.B. Saunders, Philadelphia. 661-665.
3. CONCANNON, P.W., BATTISTA, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. En Kirk, R.W. (ed): *Current Veterinary Therapy Small Animal Practice.* 10th (ed). W.B. Saunders, Philadelphia. 1247-1259.

4. CONCANNON, P.W.; HANSEN, W.; VISEK, W.J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod.* 13: 112-121.
5. CONCANNON, P.W.; HANSEN, W.; MCENTEE, K. (1977). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reprod.* 17: 604-613.
6. CONCANNON, P W. (1997). A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen. *Proceedings of Canine Reproduction Symposium.* September. American College of Theriogenology. 1-17.
7. DOTT, H.M., FOSTER, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain *J. Reprod. Fertil.* 28: 443-445
8. DUMOND, C.; FONTBONNE, A. (1993). *Les indispensables de l'animal de compagnie.* Ed P.M.C.A.C. Paris, Francia. 153-159.
9. FASTARD, W. (1984). Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 25: 561-565.
10. FASTARD, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 251-260.
11. FASTARD, W. (2000). Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 53: 175-186.
12. 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.

13. FONTBONNE, A., BADINAND, F. (1996). Prélèvement et examen de la semence chez le chien. En: Les indispensables de l'animal de compagnie. Dumond C, Fontbonne, A (eds). PMCAC Paris. 153-159.
14. FOSBERG, C.L.; FOSBERG, 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.
15. FOSBERG, C.L. (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21: 467-485.
16. FOSBERG, C.L., FOSBERG, M. (1993). Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47: 313-323.
17. FOSBERG, C.L. (1994). Accurate monitoring of the oestrus cycle of the bitch for artificial insemination. *Proc. 19th World Congress of the WASAVA.* 601-605.
18. FOSBERG, C.L. (1995). Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 10: 48-58.
19. FOSBERG, C.L.; 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.
20. GOVETTE, G.; FOSBERG, L.C.; STROM, B.A. (1996). A successful concept for freezing of dog semen. *13th Int. Cong. Anim. Reprod (ICAR).* Sydney Australia. 2: 5-8.
21. HARROP, A.E. (1960). Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog. Ed. Tindall & Cox. London, England. 87-99.

22. HELD, J.P. (1997). Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of Canine Reproduction Symposium. September. American College of Theriogenology. 49-59.
23. JOHNSTON, S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 21: 545-551.
24. JOHNSTON, D.J.; KUZTRITZ, M.V.R.; OLSON, P. (2001). Canine and feline Theriogenology. (ed). Saunders. Philadelphia. 287-306.
25. KIRK, R.W. (1989). Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice. (ed). Saunders. Philadelphia. 1247-1259.
26. LINDSAY FE, JEFFCOATE IA, CONCANNON. PW. (1988). Vaginoscopy and fertile period in the bitch. Proc. 11th Intern. Cong. Anim. Reprod (ICAR). Dublin. Ireland. 4:565.
27. MORROW, D.A. (1980). Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals. (ed). Saunders. Philadelphia. 661-665.
28. NORTON, D.B. (1988). Artificial insemination with frozen semen in the dog. En: Joned, D.E.; Joshua, J.O. (eds): Reproductive clinical problems in the dog, 2nd (ed). Wriugh, London. 169-186.
29. NORTON, D.B., BRUCE, S.G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. J. Reprod. Fertil. 39: 311-316.
30. NOTHLING, J.O.; VOLKMAN, D.H. (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.
31. PARKS, J.E.; GRAHAN, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology. 38: 209-222.

32. PEÑA MARTÍNEZ, A. I. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
33. PEÑA A, FORSBERG, L.C. (2000). Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54: 859-875.
34. PURSEL, V. G., JONSHON L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1: 63-68.
35. ROTA, A., STROM, B., FOSBERG, C.L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*. 47: 1093-1101.
36. ROTA, A. (1998). Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences.
37. SAS Users Guide. Version 6, 4 th Ed, Cary, NC: Statistical Analysis Institute, Inc, 1989, 314.
38. SEAGER, S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* 17: 6-7.
39. SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEUGENE, B.; VESTERGEN, J.P. (1996). Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 138: 154-157.
40. SPALLANZANI, L. *Observazione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell' homo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola. II. Modena. 1776 (citado por Peña 1997).*

41. WATSON, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
42. WILDT, D.E. (1986). Laparoscopy. En Burke T. J. (ed): *Small Animal Reproduction and infertility*. Lea & Febiger. Philadelphia. 121-140.
43. WILSON, M. (1993). Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 47:307-311.
44. YU, I, SONSAGEN, N.; GODKE, R.A.; LEIVO, SP. (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology.* 44:62-78.

BIOGRAFÍA PERSONAL

La Médica Veterinaria María Alejandra Stornelli nació en la ciudad de La Plata el 28 de mayo de 1964. Realizó sus estudios secundarios en el Colegio Víctor Mercante de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la UNLP en Marzo de 1982 y obtuvo el título de Médico Veterinario en Febrero de 1987. En 1997, recibió el Título de Docente Universitario de la UNLP.

En el año 1989, ingresó como docente de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de esta Facultad y permaneció en dicha Cátedra hasta 1995 cuando comenzó a desempeñar funciones en el Laboratorio Central. En 1990 se incorporó como docente de la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales y en 1996 en la Cátedra de Reproducción Animal. Actualmente se desempeña como Jefe de Trabajos Prácticos ordinario de ambas Cátedras.

Reconociendo la imperiosa necesidad de la especialización, la mencionada profesional, en 1993 comenzó a trabajar en el área de Reproducción de Pequeños Animales, área en la que desde entonces ha desarrollado tareas dictando numerosos cursos a profesionales y publicando varios trabajos científicos y de divulgación técnica. En 1999 realizó un entrenamiento clínico y de investigación en Reproducción de Pequeños Animales durante 40 días en la Universidad de Pisa, Italia. En 2002 realizó un segundo entrenamiento de las mismas características durante 30 días en el Audubon Center for Research of Endangered Species de la Universidad de Nueva Orleans, Estados Unidos de Norte América y en Norwegian School of Veterinary Science, en Oslo, Noruega. En la actualidad es Miembro Titular de la Comisión de Actividades de Postgrado y de la Comisión de Educación a Distancia y Miembro Suplente de la Comisión Directiva del Hospital

Escuela de la FCV-UNLP. Además es miembro de la Sociedad Argentina de Medicina Veterinaria y de la Sociedad Europea de Reproducción de Pequeños Animales.

En 1996, comenzó a desarrollar su actividad en investigación como Docente Investigadora del Programa de Incentivos. Más tarde, en 2001, comenzó a desarrollar su Tesis Doctoral en esta Facultad bajo la dirección de los Drs. Rodolfo Luzbel de la Sota y Humberto Cisale. En la actualidad, dirige 3 Proyectos de Investigación acreditados en el Área de Reproducción de Pequeños Animales, y está a cargo del área de Pequeños Animales del Servicio de Reproducción Animal del Instituto de Teriogenología de esta Facultad. Una vez finalizado su Doctorado, continuará trabajando tanto en criopreservación de semen canino y felino como así también en inducción y supresión de ciclos estrales en la perra y gata, y en el mejoramiento de la técnica de inseminación artificial trans-cervical en la perra. Además continuará realizando tareas de docencia de pregrado y posgrado, y dirigiendo a graduados en la realización de Pasantías en Clínica Reproductiva.