



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

TESIS DOCTORAL

MV JORGE DANIEL DIAZ

AÑO 2015



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**DESARROLLO DE DILUYENTES DE BAJA COMPLEJIDAD Y COSTO PARA LA
PRESERVACIÓN A CORTO Y MEDIANO PLAZO DE SEMEN CANINO**

**AUTOR: DIAZ, Jorge Daniel, MV
DIRECTORA: CORRADA, Yanina Alejandra, DMV**

**LUGAR DE TRABAJO:
Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Facultad de Ciencias
Veterinarias - UNLP**

**MIEMBROS DEL JURADO:
DMV, Bact. ARAUZ, Sandra
DMV. FISCHMAN, María Laura
PhD, MSC - MV. MIRAGAYA, Marcelo**

AÑO 2015

Me inclino más que a medias a comparar las reglas de Descartes con este precepto de no recuerdo que químico: si tomas lo que debes y procedes como debes, obtendrás lo que desees. No admitas nada que no sea verdaderamente obvio (es decir, admite solo aquello que tienes que admitir); divide el tema en las partes necesarias (es decir, haz lo que tengas que hacer); procede de acuerdo a un orden (el orden según el cual tienes que proceder); proporciona numeraciones completas (es decir, las que tienes que proporcionar): ese es precisamente el tipo de gente que dice que debes buscar lo bueno y evitar lo malo. Todo lo cual es sin duda apropiado, salvo que falta el criterio de lo bueno y de lo malo.

GW Leibniz,

Escritos filosóficos (extracto de “La práctica de la sociología reflexiva de Pierre Bourdieu”)

AGRADECIMIENTOS

A La Dra Cristina Gobello, por darme la oportunidad de introducirme en la producción científica permitiéndome llegar hasta acá, y por mostrarme la eficiencia y audacia con la que trabaja un científico en nuestro país.

A la Dra Yanina Corrada por acompañarme con calidad humana durante todo este tiempo y haber tomado las riendas de mi formación incondicionalmente; a quien le debo hoy estar culminando el presente trabajo.

A mi compañera y amiga la Dra Carla Valiente, simplemente por ser buena persona, por transmitirme sus conocimientos con humildad, por acompañarme en el día a día, este trabajo también le pertenece.

A la Dra Anita Carranza, que complementó este gran equipo de trabajo, de compañerismo, de amistad; que tomó lo remos para ir cuesta arriba demostrando perseverancia, tenacidad e inteligencia.

A Damián, por ser mi sostén día a día, por atreverse a compartir la vida juntos, a quien le debo mi bienestar presente, sin el cual no podría encarar este proyecto profesional y de vida.

A mis viejos, hermana y abuelos simplemente por aceptarme como soy, por apoyarme, por creer en mí desde siempre.

A mis amigos Edith y Leo, por la ayuda brindada para el desarrollo de este trabajo con Athos, Leila y Lorencito. Por haber estado presente en momentos imborrables de mi memoria, por ser una parte importante de mi vida.

A mi amiga Nadina, por ser incondicional, por haberme acompañado en gran parte de este proyecto profesional y ser una hermana en innumerables momentos.

A mi amiga Marisol por estar ahí, siempre con calidad y calidez humana, porque nuestros caminos transitan juntos aliviándonos el paso.

A mi grupo bello que siempre de una u otra forma está presente y llevo en mi corazón: Toia, Maca, Eli, Isa, Azu y Lau

A Cele, Mariano, Agus y Tere por acompañarme en este último tiempo y darme un lugar en sus vidas, a los que siento parte de mi familia.

A los queridos Mario y Cristina, Huberto y Ana María; por haberme acompañado durante parte de este trayecto y dejar un afectuoso recuerdo.

A Marcos, por haber estado presente y colaborado durante mi desarrollo personal y profesional.

Al criadero Brum&Gret por toda la ayuda brindada con Coquito, Mardy's y Terry. Por haber traído a Elmer (Grego) a mi familia.

A Fidel por acompañarnos mutuamente desde hace 10 años, por enseñarme esas cosas maravillosas de los animales que solo se comprenden estando juntos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para llevar adelante parte de este proyecto.

Al Estado Argentino por permitir desarrollarme profesional y laboralmente.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Presentaciones a Congresos

Díaz JD, Valiente C, Corrada Y, Abeyá M, Gobello C. Efficacy of skimmed milk, with and without egg yolk, for canine semen preservation at 4º C. I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal, Viña del Mar, Chile, 07-08/11/2011.

Díaz J, Valiente C, Corrada Y, Abeya M, Gobello C. Efficacy of skimmed milk, with and without egg yolk, for canine semen preservation at 4º C. Morris Animal Foundation's Annual Meeting, Denver, Colorado, USA, 23-24 /07/11.

Publicaciones Científicas

Díaz J, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. Estandarización de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico. *Analecta Veterinaria* 2011; 31 (2): 19-22.

Díaz J, Corrada Y, Blanco P, Gobello C. In vitro and in vivo assessment of skim milk with and without egg yolk on canine spermatozoa incubated at 4 °C. *Anim. Reprod.* 2013, 10(4): 670-76.

Publicaciones de Divulgación

Díaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. Refrigeración de semen canino. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Pcia de Bs As.* 2011; 48: 56-58.

Díaz JD, Valiente C, Gobello C. Inseminación artificial en la perra. Revista del Colegio de Veterinarios de la Pcia de Bs As. 2012; 51: 53-55.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
CAPÍTULO I <i>Puesta a punto de técnicas de evaluación y refrigeración de semen canino en nuestro medio</i>	15
CAPÍTULO II <i>Estandarización de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico</i>	29
CAPÍTULO III <i>Evaluación y comparación del efecto de la leche descremada, con y sin el agregado de yema de huevo, sobre las características del semen canino refrigerado a 4°C</i>	38
CAPÍTULO IV <i>Características del semen canino congelado-descongelado, previamente estabilizado por hasta 2 días a 4°C, en un diluyente a base de leche descremada y yema de huevo</i>	50
CAPÍTULO V <i>Eficacia de la leche descremada y yema de huevo, sobre la fertilidad in vivo de los espermatozoides caninos refrigerados a 4 °C</i>	59
CONCLUSIONES FINALES	68
PUBLICACIONES	70

ABREVIATURAS

CASA: Computer- Assisted Semen Analyzer

COM: diluyente comercial

CV: coeficiente de variación

FCA: Federación Cinológica Argentina

FCI: Federación Cinológica Internacional

FSD: semen fresco sin diluir

IA: inseminación artificial

Le: diluyente leche descremada

LH: hormona luteinizante

LY y DLY: diluyente leche descremada – yema de huevo

OMS: Organización Mundial de la Salud

P₄: progesterona

PRO: diluyente prostático

SEM: error estándar de la media

TGI: diluyente tris glucosa – yema de huevo

DESARROLLO DE DILUYENTES DE BAJA COMPLEJIDAD Y COSTO PARA LA PRESERVACIÓN A CORTO Y MEDIANO PLAZO DE SEMEN CANINO

Palabras clave: refrigeración seminal, diluyente seminal, perro, espectrofotometría, inseminación artificial.

Resumen

Bajo el objetivo general de contribuir al mejoramiento de la eficiencia reproductiva en caninos domésticos, a nivel nacional; en el presente trabajo de tesis se pusieron a punto técnicas de evaluación y refrigeración de semen canino, como así también se estandarizó la espectrofotometría como un método para el conteo espermático. Por otro lado se evaluó y comparó el efecto de la leche descremada con (LY) y sin yema de huevo (Le) como diluyente seminal, sobre espermatozoides caninos incubados a 4°C *in vitro*, y luego se probó la eficacia de LY *in vivo*. También fue evaluado *in vitro* el efecto del semen refrigerado en este diluyente, como una alternativa de estabilización previa a la congelación.

Se lograron reproducir técnicas simples de evaluación (motilidad total y progresiva, vitalidad e integridad de las membranas plasmática y acrosómica) y de refrigeración seminal, las que luego de haber sido medidas a través de parámetros espermáticos pre y post dilución, pudieron incorporarse de manera confiable a los sucesivos experimentos. Por otro lado se evaluó y comparó el uso del espectrofotómetro, donde se obtuvo una alta correlación con los conteos realizados por la técnica gold estándar, y demostró ser un método rápido, económico y de precisión aceptable para el conteo espermático en caninos.

Los resultados arrojados luego de 6 días de refrigeración demostraron que LY y Le mantuvieron los parámetros de espermatozoides vivos, endosmosis positiva, osmolaridad y ph similares a un diluyente comercial ampliamente utilizado en la especie. Además la LY tampoco difirió en la motilidad total y progresiva y el porcentaje de acrosomas normales en relación al diluyente comercial. Los espermatozoides diluidos en dicho diluyente, mantenidos por 24 h a 4°C mostraron tener la misma eficacia que el semen fresco para la inseminación artificial, ya que se obtuvieron iguales porcentajes de preñez y similares camadas de cachorros en los grupos de perras en los que fueron probados. Por otro lado, cuando este diluyente se estudió como método de estabilización prolongada, se observó que los parámetros seminales posdescongelado (motilidad total y progresiva, espermatozoides vivos, endosmosis positiva y acrosomas normales) luego de 24 h de refrigeración previa al congelado, no difirieron del método de estabilización tradicional de 2 h.

Aquí se demuestra que las técnicas de evaluación y refrigeración seminal empleadas, pueden ser reproducidas en clínicas veterinarias estándar de nuestro país, y ser conducidas por personal con un mínimo entrenamiento en estas biotecnologías. Por otra parte, la LY utilizada como diluyente seminal demostró a través de los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* ser un simple, de bajo costo y eficiente diluyente para refrigeración de semen canino. Además, LY podría ser exitosamente congelado luego de un día de refrigerado.

**DEVELOPMENT OF LOW-COMPLEXITY, LOW-COST DILUENTS FOR SHORT- AND MEDIUM-TERM
PRESERVATION OF DOG SPERM**

Key words: seminal chilling, seminal diluent, dog, spectrophotometry, artificial insemination.

Abstract

Under the goal of contributing to improvement of reproductive efficiency in domestic dogs at a national level, this thesis aims at adjusting canine sperm evaluation and chilling techniques; as well as standardizing spectrophotometry as a sperm-counting method. In addition, this study evaluated and compared the effect of skim milk with (MEY) and without (SMI) egg yolk as a sperm diluent on canine spermatozoa incubated at 4 °C in vitro, and then it assessed the efficacy of LY in vivo. Also the effect of chilled semen on this diluent was assessed in vitro, as a stabilization alternative prior to freezing.

It was possible to reproduce simple evaluation techniques (total and progressive motility, vitality and integrity of plasma and acrosomal membranes) and sperm chilling techniques, which, after being measured through pre- and post-dilution sperm parameters, were reliably introduced into successive experiments. On the other hand, the use of spectrophotometer was evaluated and compared, obtaining a high correlation with the counts resulting from the gold standard technique, and it proved to be a fast, economical and adequately accurate sperm-counting method in dogs.

Results obtained after 6 days' cooling showed that MEY and SMI maintained live sperm parameters, positive endosmosis, osmolarity and pH similar to a widely used commercial diluent. Furthermore, MEY did not differ in total and progressive motility and in the percentage of normal acrosomes when compared with the commercial diluent. The spermatozoa kept over 24 hours at 4 °C in such diluent

proved to have the same efficacy as fresh sperm for artificial insemination, since equal percentages of pregnancy and similar litters of puppies were obtained in the groups of bitches in which they were tested. On the other hand, when this diluent was tested as an extended stabilization method, post-thaw sperm parameters (total and progressive motility, live spermatozoa, positive endosmosis and normal acrosomes) after 24 hour-cooling prior to freezing did not differ from the traditional 2 hour-stabilization method.

This study has shown that the sperm evaluation and chilling techniques used can be reproduced in standard veterinary clinics in our country, and conducted by staff with minimum training in these biotechnologies. Also, both in vitro and in vivo results have shown MEY to be a simple, low-cost, efficient diluent for canine sperm chilling. Furthermore, MEY could be successfully frozen after 1 day-cooling.

INTRODUCCIÓN GENERAL

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 biotecnologías reproductivas en esta especie a nivel mundial. En línea con esta conducta, a fines del año 2008 la Federación Cinológica Argentina (FCA), reconocida por la Federación Cinológica Internacional (FCI), aprobó la inseminación artificial (IA) con semen preservado (enfriado o congelado). Este hecho representó un importantísimo avance en la cinofilia del país, y abrió un panorama alentador para el intercambio de semen preservado tanto a nivel nacional como internacional.

Sin embargo en nuestro medio, el equipamiento y entrenamiento de los profesionales de pequeños animales promedio, es aún insuficiente para el empleo masivo de estas biotecnologías en sus formas más complejas. En este aspecto la refrigeración, en lugar de la congelación, como técnica de preservación seminal, constituye indudablemente una opción mucho más sencilla, económica y rápida para iniciar la aplicación de estas biotecnologías a nivel nacional (Stornelli y de la Sota, 2006; Diaz y col., 2011)

A la hora de medir la eficacia de las técnicas y diluyentes empleados para la refrigeración o congelación de semen, la prueba más adecuada es la determinación de los porcentajes de concepción (Oettlé, 1986; Watson, 1996) y el tamaño de la camada resultante de la inseminación artificial (Farstad, 1996). Sin embargo, como una alternativa previa a los ensayos de fertilidad, existen pruebas *in vitro* que valoran las diferentes características del espermatozoide necesarias para la fecundación, como son la motilidad progresiva, la viabilidad y la integridad de las membranas plasmática y acrosómica. Combinando dos o más de ellas es posible obtener una correlación importante con el potencial fertilizante de la muestra de semen (Amann y Hammerstedt, 1993). Para

evaluar estos parámetros, las diluciones y tinciones simples observables al microscopio óptico se encuentran entre las técnicas más usadas por su bajo costo y fácil preparación.

En adición, independientemente de la técnica de preservación elegida como así también del método de evaluación seminal, es importante tener en cuenta que una adecuada recolección y procesamiento del semen serán la clave inicial para la obtención de una muestra de calidad, y condicionarán los posteriores resultados del almacenamiento de los espermatozoides en frío (Aurich, 2008). Por tal motivo cualquier procedimiento que permita mejorar estas condiciones es factible de ser evaluado.

Teniendo en cuenta que la medición de la concentración seminal es un requisito necesario dentro del procesamiento del semen para su posterior dilución y preservación, se infiere que la realización de la misma a través de una herramienta que mejore las condiciones de su ejecución, mejorará dicho procesamiento. En ese sentido, la espectrofotometría como técnica de conteo espermático, demostró ser precisa y de rápida ejecución en varias especies (Paulenz y col., 1995; Nilendran y col., 2006; Castellini y col., 2007), planteando con estos resultados el interrogante acerca de su implementación en perros. Si a esta sentencia, sumamos el hecho de que dicha técnica es accesible para laboratorios de baja complejidad, podría ser potenciado el interés de su evaluación en nuestro medio.

El envío de semen refrigerado es una técnica financieramente razonable y segura, ya que evita los riesgos en salud y el stress de transporte que pueden ser ocasionados por el traslado del animal para su reproducción (Linde-Forsberg, 2001). Además el semen conservado de esta forma, al favorecer su llegada a poblaciones o razas de perros geográficamente aisladas o pequeñas en número, permite evitar la consanguinidad y las enfermedades hereditarias (Morton y Bruce, 1989). Incluso en las mejores condiciones, apunta a la distribución de genética superior que incide sobre la mejora en la estirpe de las razas.

Sin embargo, el intercambio internacional de semen canino es parcialmente limitado en la mayoría de los países en desarrollo, debido al proporcionalmente alto costo de los diluyentes disponibles.

El enfriado es posible de ser realizado en laboratorios de baja complejidad, además de poder actuar, potencialmente, como una estabilización prolongada previa a la congelación en centros con equipamiento sofisticado y personal entrenado (Hermansson y Linde Forsberg, 2006; Ponglowhapan y col., 2006; Santana y col., 2013). También, el semen refrigerado puede ser fácilmente depositado intravaginalmente sin el entrenamiento y/o equipamiento que la deposición intrauterina del congelado requiere obligatoriamente en la especie (Fontbonne y Badinand, 1993; Linde-Forsberg, 1995). Además, está documentado que cuando son comparados ambos métodos para IA en perros, independientemente de cual fuere el sitio de deposición del semen, la tasa de éxito es usualmente mayor para el semen refrigerado que para el semen congelado (Linde Forsberg, 1995).

En los perros, la dilución y refrigeración de semen a 4°C ha demostrado que permite conservar espermatozoides fecundantes por períodos que varían desde los 2 ó 3 días hasta los 10 con técnicas especiales (Linde-Forsberg, 1995; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Verstegen y col., 2005; Bencharif y col., 2013). Este periodo resulta suficiente para trasladar y utilizar el semen de un reproductor en lugares geográficamente distantes. Al respecto, también las regulaciones para el transporte y exportación de semen refrigerado son menos complicadas y costosas que para el congelado (Linde-Forsberg, 2001, Bielanski, 2005).

Es sabido que uno de los mayores problemas, en los procesos de conservación del semen, es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide designadas colectivamente como “choque térmico”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0 °C y cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento (Quinn y White, 1966). Asimismo, la evidencia de que la motilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen

enfriado, permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación puede alterar irreversiblemente las membranas (Parks y Graham, 1992; Burgess y col., 2001).

A pesar de lo citado se reconoce que la técnica de congelado posee indicaciones específicas e irremplazables (Rota y col., 1997), pero a la hora de decidir la implementación de una técnica según su complejidad y eficacia en situaciones prácticas, siempre que se pueda, sería recomendable optar por el refrigerado.

La refrigeración condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, en consonancia con la utilización de diluyentes seminales, que tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides; además proveen sustratos energéticos y permiten el mantenimiento de condiciones estables de pH y osmolaridad en el medio extracelular (Batellier y col., 2001).

Diferentes diluyentes seminales, comerciales o preparados en el laboratorio, han sido evaluados con respecto a su capacidad para mantener el potencial fecundante del semen canino refrigerado (Province y col., 1984; Bouchard y col., 1990; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Goericke-Pesch y col., 2012). No obstante, muy poco se ha probado sobre el uso de la leche descremada en la especie (Rota y col., 1995, Pinto y col., 1999).

Este compuesto natural ha sido ampliamente utilizado para refrigeración en equinos, desde su primer aparición en la década del 70 (Pickett y Amann, 1987) hasta la actualidad (Aurich, 2008), donde además son empleadas sus fracciones proteicas por separado (Pagl y col., 2006). Incluso, se incorporó su utilización en especies zootécnicas (Salamon y Maxwell, 2000; Leboeuf y col., 2003; Gil y col., 2011; Namula y col., 2014), como así también recientemente en la reproducción de felinos domésticos (Valiente y col., 2014); manifestando en todos los casos resultados que permiten considerar a este diluyente como una alternativa vigente para la conservación seminal en estas

especies. Teniendo en cuenta estas observaciones, y considerando que la leche descremada es un compuesto de fácil acceso, no solo por su disponibilidad comercial sino además por su bajo costo, resulta interesante evaluar en caninos sus características como diluyente en refrigeración, y las posibilidades de implementación en IA en nuestro medio.

En conclusión, el enfriamiento con diluyentes de baja complejidad y valor, se vislumbra como la primera técnica a adoptar en esta nueva etapa de la producción canina nacional, facilitando y aumentando las posibilidades de uso de los reproductores caninos.

Basándonos en todo lo mencionado anteriormente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue contribuir al mejoramiento de la eficiencia reproductiva en caninos domésticos a nivel nacional, mediante el desarrollo de diluyentes prácticos y económicos para la preservación seminal a corto y mediano plazo. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Poner a punto distintas técnicas de evaluación y refrigeración de semen canino en nuestro medio.
- Estandarizar el uso de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico.
- Evaluar y comparar el efecto de la leche descremada con y sin el agregado de yema de huevo sobre las características de semen canino refrigerado a 4°C.
- Medir las características del semen canino congelado-descongelado que fuera previamente estabilizado, por hasta 2 días a 4°C, en un diluyente a base de leche descremada y yema de huevo.
- Probar la eficacia de la leche descremada y yema de huevo sobre la fertilidad *in vivo*, de los espermatozoides caninos incubados a 4°C.

REFERENCIAS

1. Stornelli MA, de la Sota RL. fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*. 2006; 25 (2): 29-38.
2. Diaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. Refrigeración de semen canino, nota técnica. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*. 2011; 48: 56-58.
3. Oettlé, EE. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci*. 1986; 12: 145-150.
4. Watson, PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim*.1996; 31: 135-140.
5. Farstad, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* . 1996; 42: 251-260.
6. Amann, RP, Hammerstedt, RH. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*. 1993; 14: 397-406.
7. Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology *Anim Reprod Sci*. 2008; 107(3-4): 268-275.
8. Paulenz, H., I. S. Grevle, A. Tverdal, P. O. Hofmo, and K. Andersen Berg. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reprod Dom Anim*. 1995; 30: 107-111.
9. Nilendran S. Prathalingam, William W. Holt, Stuart G. Revell, Sian Jones, Paul F. Watson. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl*. 2006; 27 (2): 257-62.
10. Castellini C., Lattaioli P., Cardinali R., Dal Bosco A., Mourvaki E. Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Sci*. 2007; 15: 115-19.

11. Linde Forsberg, C. 2001. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. En: Recent Advances in Small Animal Reproduction. Concannon P, England G, Verstegen J; (eds.). Ithaca. International Veterinary Information Service. Disponible en: www.ivis.org
12. Morton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989; 39: 311-316.
13. Hermansson U, Linde-Forsberg C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology.* 2006; 65: 584-593.
14. Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology.* 2006; 66: 1633-1636.
15. Santana M, Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen-thawed semen samples in dogs. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48: 165-170.
16. Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled, extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1995; 10: 48-58.
17. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993; 47: 325-7.
18. Iguer-Ouada, M, Verstegen JP. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology.* 2001; 55: 671-684.
19. Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M. Long term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology.* 2005; 64: 720–733.
20. Bencharif D, Amirat-Briand L, Le Guillou J, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Barrière P, Tainturier D. Canine-chilled

- sperm: study of a semen extender made with low-density lipoproteins from hen egg yolk supplemented with glutamine. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48(2): 258-66.
21. Bielanski A. Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology.* 2005; 63: 1946-1957.
 22. Quinn PJ; White IG. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1966; 12: 263-270.
 23. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992; 38: 209-222.
 24. Burgess CM, Bredl JCS, Plummer JM, England GCW. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *J Reprod Fertil.* 2001; 57: 357–363.
 25. Rota A, Strom B, Linde-Fosberg C, Rodriguez-Martinez H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. *Theriogenology.* 1997; 47: 1093-1101.
 26. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* 2001; 68: 181-190.
 27. Province C, Amann R, Pickett B, Squires E. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology.* 1984; 22: 409-415.
 28. Bouchard G, Morris J, Sikes J, Youngquist R. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology.* 1990; 34: 147-157.
 29. Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Anim Reprod Sci.* 2012; 135(1-4): 97-105.
 30. Rota A, Strom B, Linde Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995; 44: 885-900.

31. Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*. 1999;52(4): 609-16.
32. Pickett BW, Amann RP. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1987; 7(5): 289-302.
33. Pagl R, Aurich JE, Müller-Schlossere F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology*; 2006; 66 (5): 1115–1122.
34. Salamon S, Maxwell. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62(1-3): 77–111.
35. Leboeuf B., Guillouet P., Batellier F., Bernelas D., Bonné J.L., Forgerit Y., Renaud G., Magistrini M: Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology*. 2003; 60: 867-77.
36. Gil J, Fierro S, Bentancur O, Olivera-Muzante J . Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reprod Domest Anim*. 2011; 46(3): 503-7.
37. Namula Z, Kodama R, Tanihara F, Morita Y, Sato Y, Wittayarat M, Taniguchi M, Otoi T. Effects of skim-milk supplementation on the quality and penetrating ability of boar semen after long-term preservation at 15 °C. *Acta Vet Hung*. 2014; 62(1): 106-16.
38. Valiente C, De La Sota PE, Arauz S, Gobello C. Ejaculation training, seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. *J Feline Med Surg*. 2014; 16(4): 312-6.

CAPÍTULO I

PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS DE EVALUACIÓN Y REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO EN NUESTRO MEDIO

Introducción

Las investigaciones alternativas a los ensayos de fertilidad incluyen pruebas *in vitro* que valoran las diferentes características del espermatozoide necesarias para la fecundación, como son la motilidad progresiva, la viabilidad y la integridad de las membranas plasmática y acrosómica. Combinando dos o más de estas pruebas es posible obtener una correlación importante con el potencial fertilizante de la muestra de semen (Amann y Hammerstedt, 1993).

La motilidad espermática es el parámetro más usado para la evaluación seminal *in vitro*. Puede ser subjetivamente estimada por observación directa al microscopio u objetivamente determinada por sistemas computarizados (Computer-Assisted Semen Analyzer; Verstegen y col., 2002). Por otro lado, un número de espermatozoides que permanecen inmóviles pueden estar aún vivos (Homonnai y col., 1976) y ser viables, por lo tanto es útil su determinación. Tanto para evaluar este parámetro como la integridad de las membranas plasmáticas y acrosómicas, entre las técnicas más usadas por su bajo costo y fácil preparación se encuentran las diluciones y tinciones simples observables al microscopio óptico.

Es sabido, que actualmente han sido desarrolladas técnicas con mayor precisión y eficiencia, como los mencionados sistemas computarizados, o incluso aparatos sofisticados como la citometría de

flujo que permiten evaluar varios parámetros a la vez, como ser la concentración, la viabilidad y la proporción de espermatozoides con reacción acrosómica, entre otros (Morrell, 1991).

No obstante, estos sistemas no están exentos de limitaciones, principalmente relacionadas con los elevados costos del equipo, la necesidad extrema de validación, el control de calidad y de la estandarización de las mediciones realizadas (Rodríguez- Martínez, 1998; Verstegen y col, 2002).

Por lo tanto, actualmente desde el punto de vista de la evaluación rutinaria en la clínica reproductiva de la especie canina, se hace dificultosa su aplicación, quedando reservada para centros de investigación y desarrollo sofisticados. (Johnson y col., 1996).

Situación similar a lo antes descrito puede observarse en la implementación de las técnicas de preservación seminal. Históricamente, la refrigeración de semen ha sido la primer alternativa para iniciarse en la conservación de espermatozoides (Linde Fosberg, 1995); además es el paso previo a la congelación de espermatozoides. Tiene como principales ventajas su sencillez y bajo costo para ser llevada a cabo.

Son requisitos necesarios para el empleo de una u otra técnica, la medición de la concentración seminal de la muestra, y su posterior dilución en un medio que permita la adecuada conservación de los distintos parámetros a evaluar (Batellier y col., 2001).

En nuestro medio el entrenamiento y equipamiento de los profesionales veterinarios clínicos, es aún insuficiente para la implementación de biotecnologías en sus formas más complejas. Por este motivo, la refrigeración seminal sería una técnica adecuada para comenzar con el desarrollo de biotecnologías reproductivas (Stornelli y de la Sota, 2006; Diaz y col., 2011).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue poner a punto distintas técnicas de evaluación y refrigeración de semen canino, con la finalidad de demostrar la factibilidad de implementarlas en laboratorios de baja complejidad.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron un mínimo de 5 caninos machos de 2 a 5 años de edad, saludables al examen físico de rutina, con un peso que varió de 5 a 30 kg, de razas puras y mestizas, todos pertenecientes a propietarios privados, que dieron su aprobación para la realización de las pruebas de laboratorio mediante su consentimiento por escrito.

Recolección del semen

Los animales utilizados fueron previamente entrenados para eyacular mediante masturbación (Linde Forsberg, 1995). Cada canino requirió diferentes tiempos para ser introducido en las pruebas, debido al comportamiento manifestado durante la realización de la maniobra de extracción y el grado de aceptación a la misma.

El semen obtenido fue colectado en recipientes de plástico, calibrados, estériles, libres de contaminantes químicos y atemperados a 37°C aproximadamente.

En cada extracción se colectó la segunda fracción del eyaculado (espermática), y se conservó a baño maría (37 °C) hasta su procesamiento.

Procesamiento del semen

Las fracciones espermáticas de los eyaculados caninos fueron mezcladas, con el fin de aumentar el volumen de la muestra y disminuir las diferencias individuales. Se tomó una alícuota para la evaluación en fresco.

Luego se introdujo el pool de eyaculados en una macro centrifuga y se procesó la muestra a 450g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante obtenido, reservando el pellet que contenía los espermatozoides.

1. Técnicas de evaluación seminal in vitro

Las pruebas que se describirán a continuación, fueron realizadas por duplicado teniendo en cuenta que la diferencia de conteo entre ambas evaluaciones no superara el 10%; en caso contrario se realizó nuevamente la prueba.

A excepción de la concentración, los resultados se expresaron en porcentajes de espermatozoides viables para cada parámetro evaluado. Se contabilizaron 100 espermatozoides por prueba, exceptuando el conteo en el hemocitómetro y la evaluación de la motilidad.

1a. Concentración espermática

Se diluyó 10 µl (microlitros) de la muestra en un mililitro de solución fisiológica formolada 10% v/v (dilución 1:100). Luego de 5 minutos de espera se montó la muestra diluida en una cámara de Neubauer mejorada (Neubauer improved, BOECO, Germany) y se realizó el conteo a 40X, del total de espermatozoides en el interior de 5 cuadrados grandes equidistantes entre sí (4 esquinas y uno central). Se promedió el conteo de ambas hemicámaras.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente forma:

$$\text{Esp} = \frac{\text{E}}{\text{S A D}} \times 1000$$

S A D

Esp: número de espermatozoides / mm³

E: número de espermatozoides contados

S: superficie empleada en mm³

A: altura de la cámara

D: grado de dilución

1b. Motilidad espermática (Malmgren, 1997)

Para la observación en fresco se diluyeron en igual proporción 5 µl de semen en citrato de sodio (2,92% p/v). Posteriormente sobre un portaobjetos atemperado en platina térmica (37°C), se montó la muestra (diluida en fresco o refrigerada) entre porta y cubreobjetos (12 mm x 12 mm). Pasados 5 minutos se observó a 40 X.

Motilidad total: la motilidad total fue evaluada como la cantidad de espermatozoides móviles en escala de 0% (todos inmóviles) a 100% (todos móviles).

Motilidad progresiva: fue evaluada como la cantidad de espermatozoides que atraviesan un campo visual microscópico, en escala de 0% (inmóviles o móviles sin progresión) a 100% (todos móviles y atravesando el campo)

1c. Vitalidad espermática

Tinción supravital eosina/nigrosina (Iguer-Ouada y Versteegen, 2001):

Fueron mezclados previamente en partes iguales 5 µl de eosina y de nigrosina (minitub, Tiefenbach, Germany), atemperados a baño maría (37 °C); luego se mezclaron nuevamente en partes iguales 5 µl de muestra seminal con la tinción preparada, sobre un porta y cubreobjetos en platina térmica. La gota obtenida se mantuvo 20 segundos, y luego con el lado más angosto de un portaobjetos (cuyo borde fue previamente limado), colocado a un ángulo de contacto de 45°, se deslizó la gota rápidamente. El frotis obtenido fue expuesto a aire suave por aproximadamente 30 segundos, a fin

de lograr el secado de la muestra. Inmediatamente, se procedió al conteo en microscopio de luz a 100X con objetivo de inmersión.

El criterio de evaluación fue, espermatozoides vivos: cabeza sin teñir, muertos: cualquier grado de tinción en el interior de la cabeza.

1d. Acrosomía

Se preparó previamente en el laboratorio la tinción Rosa de Bengala (Cardoso y col., 2007).

Luego fueron mezclados en partes iguales 5 μ l del preparado de tinción y de la muestra seminal, y se mantuvieron por 45 minutos a baño maría (37°C). Posteriormente se montó la muestra entre porta y cubreobjetos atemperados (37°C) para ser inmediatamente observado al microscopio con objetivo de inmersión a 100X.

Los acrosomas se evaluaron según el siguiente criterio:

Acrosomas normales versus acrosomas no viables (ausentes, hinchados, membranas rotas o festoneadas; Oettlé, 1993)

1e. Endosmosis (England y Plummer, 1993)

Se preparó previamente en el laboratorio una solución hipotónica 150 miliosmolar. Se diluyó una muestra seminal (5 μ l) en tres partes de solución hipotónica; pasados 30 minutos a baño maría (37°C) se procedió a tomar una alícuota (5 μ l) de la dilución, y se colocó entre porta y cubreobjetos atemperados.

Bajo objetivo de inmersión a 100X se consideró como plasmalemas intactos, aquellos que presentaban cualquier grado de enrulamiento de la cola espermática, y de estos se obtuvo el porcentaje de viables.

2. Refrigeración de semen

2a. Preparación del diluyente

Se utilizó un diluyente comercial, compuesto por los siguientes ingredientes:

Agua destilada

Glucosa

Fructosa

Citrato de sodio

Tris

Gentamicina

Componentes no divulgados

Se le adicionó 20% de yema de huevo de gallina (Manual Minitüb 2008), con las siguientes características:

Los huevos utilizados fueron provistos por una misma granja, y se recolectaron con 24 h como límite máximo entre la puesta y su utilización en el estudio. Al momento de su utilización se lavó la cáscara con agua de canilla y desinfectó con alcohol etílico (de uso medicinal), procurando que este se evapore por completo.

Previo al estudio, se cascó la cáscara y posteriormente se eliminó la clara, para tomar una porción del centro de la yema por punción con jeringa estéril de 2,5 ml sin émbolo.

Una vez mezclado el diluyente con el huevo, este preparado se mantuvo atemperado a baño maría (37°C) para su utilización en un lapso no mayor a 15 minutos.

Según la concentración obtenida en el pool, se mezcló la muestra (pellet) con el diluyente, a fin de obtener una proporción de 75 a 100 x 10⁶ espermatozoides por ml.

Luego, el tubo con la muestra se introdujo en un frasco de vidrio a baño maría (37°C), y posteriormente se almacenó en heladera estándar a 4 °C, para ser mantenida refrigerada.

Pasadas 6 h se retiró una fracción de 150 µl para la realización de las siguientes pruebas: motilidad, vitalidad, acrosomía y endosmosis.

Este experimento se realizó consecutivamente cinco veces, a intervalos semanales.

2b. Análisis estadístico

Se compararon cada uno de los parámetros seminales (media ± SEM) previo a la dilución, con aquellos arrojados inmediatamente posterior a la misma. Se utilizó un test de Student para determinar diferencias entre ambos grupos (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados

La media de concentración espermática en los pools seminales fue de 300 x 10⁶ esp/ml, con un rango de 130 a 460 x 10⁶ esp/ml. La dilución utilizada para el refrigerado fue de 1:2 a 1:6 (espermatozoides: diluyente), y se obtuvo una concentración final promedio en la dilución de 88,2 x 10⁶ esp/ml (rango, 76 a 100 x 10⁶ esp/ml).

Los resultados arrojados para cada una de las técnicas realizadas (motilidad total y progresiva, vitalidad espermática, acrosomía y endosmosis) no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras observadas pre y pos dilución (tabla 1).

Discusión

Teniendo en cuenta que las tasas de preñez y prolificidad son las mejores maneras de evaluar la eficacia de un diluyente de semen, en condiciones experimentales la combinación de varias pruebas por lo general se correlaciona con el potencial de fertilidad (Rota y col., 1995).

En este capítulo se puso a punto técnicas de evaluación y refrigeración seminal, utilizando procedimientos, insumos y equipamiento, que permiten el desarrollo de las mismas en un laboratorio de baja complejidad, como el que puede instalarse en un consultorio veterinario promedio de nuestro país.

Con la finalidad de disminuir la subjetividad de las evaluaciones seminales (Brazil y col., 2004). diversos aspectos técnicos fueron estandarizados; como es el caso de la previa dilución del semen fresco, evitando así la aglutinación de los espermatozoides y la influencia de la concentración y del pH seminal durante la evaluación de la motilidad. También se tuvo un control estricto de la temperatura del equipamiento, el material y el uso de la misma ampliación microscópica en cada una de las técnicas empleadas (Malmgren, 1997). Por otro lado el entrenamiento del observador fue un aspecto igualmente importante a la hora de llevar a cabo la evaluación de las muestras.

Una adecuada recolección del semen y su procesamiento, serán la clave principal para el mantenimiento de la calidad del semen durante el almacenamiento refrigerado (Aurich, 2008). En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas entre las muestras previo al refrigerado y

pos refrigerado, demostrando la efectividad de las técnicas de procesamiento y refrigeración seminal utilizadas.

Posteriormente, con los resultados logrados en este capítulo, se procedió a la incorporación de las mismas en los experimentos del resto de los capítulos del presente trabajo de tesis.

Prueba	Parámetros seminales	
	predilución	posdilución
Motilidad total	90,0 ± 5,1	91,2 ± 6,2
Motilidad progresiva	88,9 ± 6,0	90,0 ± 4,5
Espermatozoides vivos	94,0 ± 3,8	91,3 ± 3,0
Acrosomía	92,1 ± 5,4	96,2 ± 4,6
Endosmosis	94,8 ± 5,2	91,2 ± 5,3

Tabla 1. Parámetros seminales caninos (media ± SEM) observados previa y posteriormente a la refrigeración a 4 °C, en un diluyente comercial.

A continuación se muestra un registro fotográfico de las técnicas de vitalidad espermática (foto 1), acrosomía (foto 2) y endosmosis (foto 3):



Foto 1. Tinción de eosina-nigrosina para la evaluación de espermatozoides caninos vivos (blancos) y muertos (rosas), observación con microscopio a 100X.

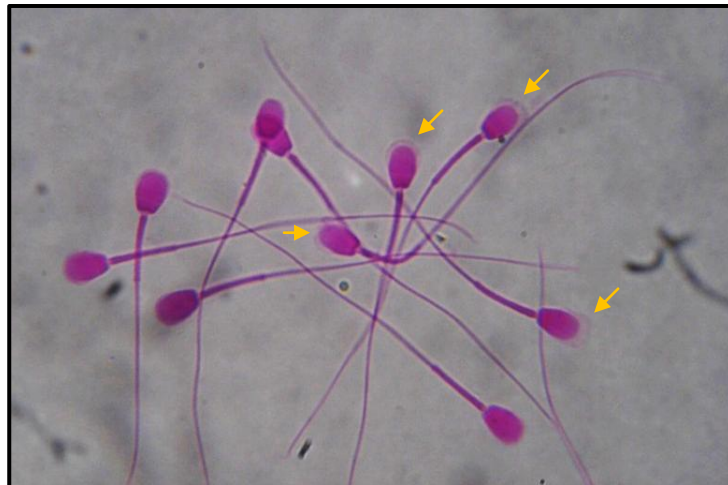


Foto 2. Tinción rosa de bengala para evaluación de morfología y acrosomía espermática canina, observación con microscopio a 100X. Las flechas indican acrosomas dañados (hinchados).



Foto 3. Prueba hiposmótica para evaluación de plasmalemas caninos. Se muestran espermatozoides con cola enrollada (plasmalema intacto) o estirada (plasmalema dañado), observación con microscopio a 100X.

REFERENCIAS

1. Amann, RP, Hammerstedt, RH. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. J Androl. 1993; 14: 397-406.
2. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Luz M, Onclin K. Conservation of canine semen motility parameters assessed using the Hamilton–Thorn computer assisted motility analyser and acrosome reaction integrity in semen frozen after up to 3 days conservation at 4°C (chilled). Proc.3rd EVSSAR congress, 2002, p. 109–110, Liege, Belgium.
3. Homonnai ZT, Paz G, Sofer A, Kraicer PF, Harell A. Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. Int J Fertil. 1976; 21, 162–170.
4. Morrell, JM. Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. Vet Rec. 1991; 129: 375-378.
5. Rodriguez-Martinez H. Optimization of sperm quality in AI bulls. Reprod Domest Anim. 1998; 33: 233-237.
6. Johnson, LA, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. Staining sperm for viability assessment. Reprod Domest Anim. 1996; 31: 37-47.
7. Linde Fosberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. Semin Vet. Med. Surge (Small Anim).1995; 10: 48-58.
8. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci. 2001; 68: 181-190.
9. Stornelli MA, de la Sota RL. fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Analecta Veterinaria. 2006; 25 (2): 29-38
10. Diaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. Refrigeración de semen canino, nota técnica. Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires. 2011; 48: 56-58.

11. Malmgren L. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*. 1997; 48: 523-530.
12. Iguer-Ouada, M, Verstegen JP. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 2001; 55:671-684.
13. Cardoso RC, Silva AR, Silva LD, Chirinéa VH, Souza FF, Lopes MD. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod Domest Anim*. 2007; 42:11-16.
14. Oettlé E. Sperm morphology and fertility of the dog. *J. Reprod. Fertil*. 1993; 47 Suppl 257-260.
15. England G; Plummer J. Hipoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*. 1993; 47 Suppl 261-270.
16. Manual Minitub, Germany 137000/0060. 2008; p. 12.
17. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl*. 2004b; 25: 645-56.
18. Rota A, Strom B, Linde Fosberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology*. 1995; 44:885-900.
19. Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology *Anim Reprod Sci*. 2008; 107(3-4): 268-275.

CAPÍTULO II

ESTANDARIZACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SEMINAL EN EL PERRO DOMÉSTICO

Introducción

El descubrimiento de la hemocitometría produjo un hito en la evaluación de la calidad seminal del macho. Desde entonces esta técnica se ha llamado oficialmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el “gold standard” para el conteo espermático (World Health Organization, 1987). No obstante, a pesar de la fe depositada en ella, son varias las limitaciones observadas desde su descubrimiento, tales como el tiempo insumido en la ejecución de la misma (Mahmoud y col., 1997), la variación de resultados entre los diferentes hemocitómetros disponibles (Christensen y col., 2005), e incluso entre dos conteos de una misma muestra en el mismo hemocitómetro (Johnson y col., 1996) o entre distintos operadores (Brazil y col., 2004). En base a esto, surge la necesidad de mejorar la técnica y las herramientas disponibles para el conteo espermático, lo que fomentó el desarrollo de dispositivos con un grado mayor de eficiencia. Es así, que hoy en día se ofrecen al mercado numerosos equipos; entre ellos pueden mencionarse como los más usados, el CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) y el Spermacue® de Minitub, como así también un nuevo y prometedor método, la citometría de flujo. Algunos de estos dispositivos han logrado vencer los inconvenientes de la hemocitometría, pero presentan otra importante restricción a tener en cuenta: su elevado costo.

El espermatocrito por ejemplo, es una técnica práctica y económica, pero no ha podido ser reproducida en caninos (Kustritz y col., 2006).

Por otra parte, el espectrofotómetro convencional además de ser un equipo de bajo costo, permite con un mínimo entrenamiento medir en pocos minutos (2 a 3 minutos, Brillard y McDaniel, 1987) la cantidad de luz dispersada por una muestra de semen, correlacionándola con un alto grado de precisión con la concentración seminal (Hansen y col., 2002). Quizás con el surgimiento de dispositivos con mayor grado de desarrollo como los mencionados anteriormente, se ha llegado a desestimar la utilidad de la espectrofotometría para el conteo seminal. No obstante, es factible de demostrar que la espectrofotometría es uno de los métodos con mejores resultados para este fin; además, por su moderado costo, podría considerarse como una herramienta de considerable valor para laboratorios de bajos a medianos recursos.

Es sabido que las diferentes glándulas accesorias de las especies mamíferas secretan partículas (Minelli y col, 2001) y que hay una variación biológica en la calidad y cantidad de estas entre las especies. Considerando estas diferencias, así como también las de tamaño y concentración seminal, resulta razonable validar y estandarizar el conteo seminal por espectrofotometría en cada una de las especies. Por lo tanto, los objetivos de este capítulo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro, realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal canina y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos.

Materiales y Métodos

Animales y recolección de las muestras seminales

Se utilizaron un total de 5 caninos machos adultos, entre 2 y 5 años de edad, saludables y con parámetros reproductivos normales, que fueron proporcionados por sus propietarios previo consentimiento escrito. La recolección de las muestras se realizó en forma higiénica mediante masturbación (Linde Forsberg, 1995); para dicho procedimiento se utilizaron recipientes de plástico, calibrados y limpios. Se realizaron dos extracciones de semen por animal con un intervalo de 3 días entre cada una de ellas. Uno de los eyaculados no pudo ser utilizado por dificultades en la obtención de esa muestra, por lo que se procesaron un total de 9 eyaculados.

Dilución de los eyaculados

Cada uno de los eyaculados se fraccionó en 4 partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en solución fisiológica (CINa 0,9 gr, agua destilada 100 ml), dejando una de las fracciones sin diluir. De esta forma se generaron un total de 36 muestras. La finalidad de estas diluciones fue obtener distintos valores de concentración que permitieran crear una mayor variabilidad entre los datos a analizar y por consiguiente un rango más amplio de absorbancia.

Conteos en el hemocitómetro

Para el conteo en cámara de Neubauer (Neubauer improved, BOECO, Germany) cada una de las muestras generadas por dilución y las fracciones no diluidas, se mezclaron con solución fisiológica formolada (CINa 0,9 gr, agua destilada 100 ml y formol 40%, 0,3 ml) en una proporción 1:20 ó 1:200. La elección de la dilución a utilizar se basó en el aspecto macroscópico de la muestra (grado de opacidad), teniendo así diluciones 1:200 para las muestras con mayor opacidad y 1:20 para aquellas

translúcidas. Utilizando una micropipeta autoajustable (PZ HTL, Daniszewska 4, 03-230 Warsaw, Polonia) se tomó una alícuota de cada muestra por separado, se cargaron las cámaras, y se procedió al conteo bajo microscopio de luz a 40 aumentos. Fueron contabilizados los espermatozoides de 5 cuadrados equidistantes entre sí delimitados por 3 líneas paralelas. Se tuvo la precaución de no superar el 10% de diferencia de conteo entre ambas cámaras del hemocitómetro. Los conteos fueron realizados en 3 réplicas para calcular la repetibilidad de los resultados.

Lecturas en el espectrofotómetro

Para la medición en el espectrofotómetro (Metrolab RC 325 junior, Argentina) la dilución se hizo en agua destilada 1:30 (0,05 ml de la muestra en 1,5 ml de agua destilada), y la longitud de onda utilizada en dicho procedimiento fue de 620 nm.

Previo a la lectura, el aparato fue calibrado a 0 de absorbancia y transmitancia utilizando como blanco un tubo de vidrio limpio y sin rayaduras, al cual se le agregó 1,5 ml de agua destilada en su interior. Luego a ese mismo tubo, se le colocó la muestra diluida como se detalló más arriba, se ajustó la longitud de onda indicada y se procedió a la lectura. Cada una de las lecturas se realizó 3 veces consecutivas.

Análisis de datos

Se calculó la repetibilidad de cada método mediante el análisis del coeficiente de variación ($CV = \sigma/X \cdot 100$) de las tres réplicas realizadas en cada una de las muestras. Luego, se realizó una curva de estandarización entre los valores de absorbancia y de concentración mediante la utilización de la ecuación de regresión lineal, según la fórmula $y = a + bx$, donde “x” fue el conteo en cámara e “y” los valores de absorbancia. Por último, se compararon las concentraciones seminales obtenidas por cada

equipo a través de un Test de Student. De no hallar diferencias significativas entre los conteos se calculó del coeficiente de correlación de Pearson para dichos datos.

Resultados

Los valores obtenidos a través del cálculo del CV fueron 7,8% y 16,9% para el espectrofotómetro y la cámara de Neubauer, respectivamente. Mediante la ecuación de regresión general se logró la alineación de la dispersión de los datos, lo cual permitió la estandarización de los valores tanto de absorbancia como de concentración (Figura 1).

No se encontraron diferencias significativas entre los conteos espermáticos obtenidos con ambos equipos ($p > 0,05$). El coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de $r=0,89$ ($p < 0.01$).

Discusión

A nuestro conocimiento, no existen reportes acerca de la repetibilidad de las mediciones realizadas por espectrofotometría en semen canino. Este dato permite, no solo el conocimiento de la misma sino también comparar la repetibilidad con la de otros métodos, e incluso con la del “gold standard”. Este conocimiento comparativo en la especie canina es de ayuda en la toma de decisiones para la elección y compra de equipamiento en un laboratorio de reproducción.

En nuestro trabajo la cámara de Neubauer mostró tener menos de la mitad de la precisión del espectrofotómetro. Similar proporción entre la precisión de ambos métodos fue previamente reportada en la especie bovina (Nilendran y col., 2006).

En este trabajo, al igual que en un estudio anterior en la misma especie ($r = 0,99$; Rodríguez y col., 2008) y en otras especies como bovinos ($r = 0,99$; Nilendran y col., 2006), cerdos ($r = 0,96$; Paulenz y col., 1995) y conejos ($r = 0,97$; Castellini y col., 2007) entre otros, se encontró una alta correlación para los conteos espermáticos obtenidos por ambos métodos.

Por otro lado, la alta correlación entre los aparatos permitió generar un índice de equivalencias para la lectura de la concentración en el espectrofotómetro a partir de los datos obtenidos por cámara de Neubauer. Debido a la dispersión de dichos datos fue necesario su alineamiento por medio de una ecuación de regresión lineal para la homogeneización de los mismos, como se realizó en anteriores trabajos (Haag, 1959, Anzar y col., 2009), ya que su modelo de comportamiento fue similar. Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

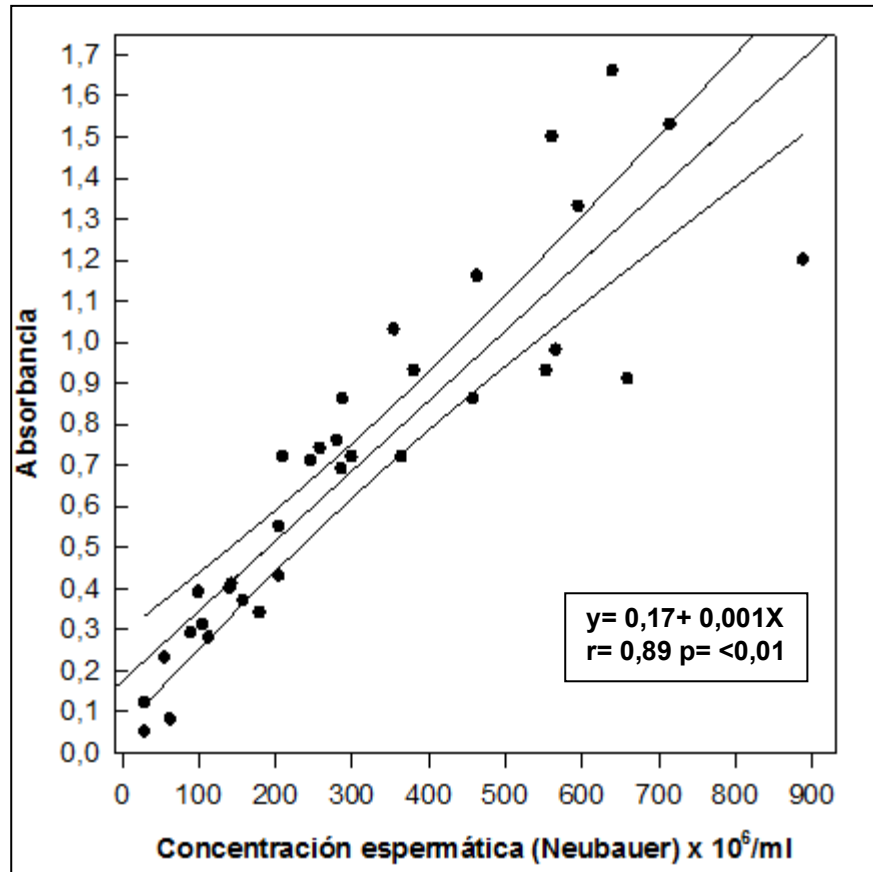


Figura 1. Relación mediante regresión lineal, entre la concentración espermática medida por hemocitometría (cámara de Neubauer) y la absorbancia por espectrofotometría de muestras seminales caninas.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 1987; p. 14-7.
2. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril*. 1997; 68 (2): 340-5.
3. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005; 63:992-1003.
4. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril*. 1996; 65:150-5.
5. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl*. 2004b; 25: 645-56.
6. Kustritz MV, Kilty C, Vollmer M. Spermatocrit as a measure of the concentration of spermatozoa in canine semen. *Vet Rec*. 2007; 161(16): 566-7.
7. Brillard JP, McDaniel GR. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult Sci*. 1985; 64: 155-8.
8. Hansen C, Christensen P, Stryhn H, Hedeboe AM, Rode M, Boe-Hansen G. Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen. *Reprod Domest Anim*. 2002; 37: 330-4.
9. Minelli A, Moroni M, Castellini C. Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J Exp Zool*. 2001; 290: 279-90.
10. Linde Forsberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Semin Vet Med. Surge (Small Anim)*. 1995; 10: 48-58.

11. Nilendran S. Prathalingam, William W. Holt, Stuart G. Revell, Sian Jones, Paul F. Watson. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl.* 2006; 27 (2): 257-62.
12. Rodríguez P., Franco E., Jiménez C. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Rev Med Vet Zoot.* 2008; 55: 22-8.
13. Paulenz, H., I. S. Grevle, A. Tverdal, P. O. Hofmo, and K. Andersen Berg. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reprod Dom Anim.* 1995; 30: 107-11.
14. Castellini C., Lattaioli P., Cardinali R., Dal Bosco A., Mourvaki E. Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Sci.* 2007; 15: 115-19.
15. Haag. Determination of the approximate sperm concentration of horse semen with the aid of a spectrophotometer. *J Am Vet Med Assoc.* 1959; 134 (7): 314-6.
16. Anzar M., Kroetsch T., Buhr M. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *J Androl.* 2009; 30(6): 661-8.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA LECHE DESCREMADA, CON Y SIN EL AGREGADO DE YEMA DE HUEVO, SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CANINO REFRIGERADO A 4 °C

Introducción

Los diluyentes seminales protegen a los espermatozoides, lo que permite la conservación de la motilidad y la fertilidad en el tiempo mediante la estabilización del plasmalema; además proporcionan sustratos de energía y previenen los efectos deletéreos frente a los cambios del pH y la osmolaridad (Linde Fosberg, 1995).

La leche es un componente comúnmente utilizado como diluyente de semen en la mayoría de las especies, y tiene un buen rendimiento tanto *in vitro* como *in vivo* (Maxwell y Salamon, 1993; Batellier y col., 2001). Las proteínas de la leche descremada amortiguan el pH del semen y también pueden quelar iones de metales pesados (Jones y Martin, 1973). La adición de yema de huevo a la leche descremada mejora la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento en la refrigeración (Salamon y maxwell, 2000), como así también su fracción de fosfolípidos proporciona protección a los espermatozoides y membrana acrosomal contra golpe de frío (Jones y Martin, 1973, White, 1993). También ha sido especulado que la leche y la yema de huevo tienen un efecto sinérgico, de protección sobre el esperma a causa de su acción análoga en el secuestro de proteínas del plasma seminal.

Han sido desarrollados diluyentes para refrigeración seminal, que reemplazan la yema de huevo entera por proteínas específicas de la misma (LDL, Bencharif y col., 2013a), o incluso por componentes de origen no animal como la lecitina de soja (Beccaglia y col., 2009). Si bien se pueden apreciar resultados favorables tras dicho reemplazo, su uso todavía no se encuentra difundido masivamente, por lo cual la incorporación de yema de huevo de manera convencional, es actualmente la forma más ampliamente utilizada en la especie.

Situación similar ocurre con la leche; donde se probaron diluyentes de semen a 5°C que contienen fracciones micelares de las proteínas presentes en esta, que arrojaron buenos resultados en equinos y pequeños rumiantes (Batellier y col., 1998; Leboeuf y col., 2003); lamentablemente en perros estos resultados no fueron favorables, ya que se observaron parámetros de motilidad a los pocos días de almacenamiento, notablemente inferiores a otros diluyentes de uso común en la especie (Bencharif y col., 2013b).

Sólo hay un informe de la leche descremada probada como diluyente para la refrigeración de semen canino con resultados *in vitro* aceptables (Rota y col., 1995). Aunque el efecto de mejora potencial que tiene el agregado de yema de huevo a la leche descremada no se ha descrito en esta especie aún.

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue evaluar y comparar el efecto de leche descremada con y sin el agregado de yema de huevo sobre las características de semen refrigerado a 4°C.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron para este estudio caninos machos (n=10), de 1 a 5 años de edad, de raza Ovejero Alemán (n=5) y mestizos (n=5), con un peso entre 10 y 30 kg. Los animales se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes parámetros seminales: concentración de espermatozoides $>100 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidad espermática progresiva $> 70\%$, e integridad del acrosoma $> 85\%$.

Todos los caninos pertenecían a propietarios privados, y permanecieron saludables al examen físico de rutina durante todo el estudio. Fueron alimentados en sus correspondientes hogares con balanceado premium de diferentes marcas comerciales, y traídos al laboratorio una hora antes del inicio de cada prueba. El protocolo de investigación fue aprobado por el CICUAL institucional de la FCV-UNLP.

Recolección de semen

Cada uno de los animales utilizados fue previamente entrenado para eyacular mediante masturbación (Linde Forsberg, 1995). El semen obtenido fue colectado en recipientes de plástico, calibrados, estériles, libres de contaminantes químicos, y atemperados a 37°C aproximadamente.

En cada extracción se colectó la segunda (espermática) y la tercera fracción (prostática), utilizando diferentes recipientes (37°C), a fin de mantenerlas separadas para la realización de las pruebas.

Procesamiento del semen

Las fracciones espermáticas de los eyaculados caninos fueron mezcladas (pool), con el fin de aumentar el volumen de la muestra y disminuir las diferencias individuales.

Inicialmente se tomó una alícuota, y se midió concentración seminal mediante espectrofotometría, tal como se desarrolló previamente en el capítulo II de esta tesis.

Luego se centrifugó el pool de eyaculados (450 g por 10 minutos), y se reservó el pellet de espermatozoides, que posteriormente se dividió en 4 partes iguales.

Por último, se mezclaron las partes con alguno de los diluyentes que se detallan a continuación:

Diluyentes de semen

1) Líquido prostático (PRO): líquido prostático autólogo (tercer fracción del eyaculado), utilizado como control negativo;

2) Diluyente espermático comercial® (COM): agua destilada, glucosa, fructosa, citrato de sodio, Tris, componentes no divulgados por los propietarios, gentamicina y 20% de yema de huevo, utilizado como control positivo;

3) Leche descremada (Le, Tabla 1);

4) Leche descremada-yema de huevo (LY, tabla 1): 80% Le y 20% de yema de huevo para probar el efecto de su suplementación en combinación con la leche descremada.

Todos los diluyentes se prepararon frescos antes de cada ensayo.

La dilución final en las muestras fue de 1: 4 a 1: 6 (espermas: diluyente), quedando una concentración de 75 a 100 esp/ml en cada diluyente. Una vez diluidas, se mantuvieron refrigeradas (4 °C) con el fin de ser evaluadas todos los días, durante seis días. Para mantener la coherencia de los resultados, este experimento se repitió 5 veces a intervalos semanales.

Evaluación del semen

Se comenzó con la evaluación de las muestras diluidas desde el momento de la mezcla del semen con el diluyente (día 0), y luego se fueron repitiendo cada 24 h durante 6 días, o hasta que la motilidad total fue menor al 10%.

Para el análisis, una alícuota de 150 μ l se obtuvo de cada diluyente, manteniéndola para la realización de las pruebas a una temperatura estable (20 °C) en el laboratorio.

Se realizaron las siguientes evaluaciones seminales: motilidad total y progresiva, vitalidad, acrosomía, endosmosis, pH (pH-009 [III] ATC, China) y osmolaridad (Wescor, inc mod. 5520, USA).

La motilidad total y progresiva fueron las únicas determinaciones señaladas en el diluyente prostático.

Análisis estadístico

Todos los parámetros del semen (media \pm SEM) se compararon entre 3 diluyentes (Com vs Le vs LY) utilizando un análisis de varianza de mediciones repetidas en el tiempo, seguido por la prueba de comparación de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). En el caso de las motilidades totales y progresivas, el diluyente PRO también fue incluido en el análisis. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados

La motilidad total ($P < 0,01$) y progresiva ($P < 0,01$) disminuyó en el tiempo en los cuatro diluyentes (Figura 1), con Com y Pro con el mejor y el peor desempeño, respectivamente. Además, LY difirió de Pro ($P < 0,01$) y Le ($P < 0,01$), pero no de Com.

El porcentaje de acrosomas normales ($P < 0,05$; Figura 2) y endósmosis positiva ($P < 0,01$, Tabla 2) en los 3 tratamientos disminuyó a lo largo del período de estudio. Si bien no hubo diferencias significativas en el porcentaje de endósmosis entre los tres diluyentes, la integridad del acrosoma fue mayor en LY si se compara con Le ($P < 0,05$).

El pH se mantuvo dentro de los rangos fisiológicos normales en los 3 grupos durante todo el período de estudio ($P > 0,1$). El resto de las características del semen tales como espermatozoides vivos ($P > 0,1$) y osmolaridad ($P > 0,1$) se redujeron ligeramente durante todo el estudio, sin diferencias entre los diluyentes (Tabla 2)

Discusión

Los efectos beneficiosos de la suplementación de la yema de huevo al diluyente a base de leche descremada se demostraron en ambas motilidades y evaluaciones de la integridad del acrosoma. Estos resultados están en línea con informes previos utilizando diluyentes de laboratorio preparados en otras especies (Rota y col., 2004; Gil y col., 2011) y en perros (Iguer Ouada y Verstegen, 2001).

En este experimento in vitro, LY mostró un mejor rendimiento que en un estudio previo en perros (Rota y col., 1995) manteniendo $>70\%$ de motilidad progresiva durante 2 días y $>80\%$ de acrosomas normales hasta 4 días, en cambio la integridad del plasmalema fue menor a lo reportado para este

diluyente. Estas diferencias podrían ser atribuidas a los componentes del diluyente (es decir, la leche y yema de huevo), los animales utilizados, o a las evaluaciones subjetivas llevadas a cabo sobre las muestras.

Es de destacar que los valores de pH encontrados a lo largo de todo el estudio estuvieron dentro de los rangos fisiológicos, demostrando la buena capacidad de amortiguación de los diluyentes a base de leche. Estos hallazgos de pH están en línea lo reportado en el estudio mencionado más arriba (Rota y col., 1995).

Por otro lado el diluyente utilizado como control positivo, es aquel que ha sido más ampliamente utilizado tanto en situaciones prácticas como experimentales de las últimas décadas en caninos, demostrando muy buenos resultados hasta por 10 días de almacenamiento a 4°C (Goericke-Pesch y col., 2012). Cuando se comparó con los diluyentes a base de leche, para LY todos los parámetros estudiados se mantuvieron sin diferencias significativas con COM durante los 6 días de evaluación. Para el caso de Le se observaron diferencias al cuarto y quinto día con respecto a la motilidad y la integridad del acrosoma, respectivamente.

Se puede concluir que los hallazgos del presente capítulo, demuestran aceptables parámetros de refrigeración seminal *in vitro*, cuyos resultados alientan la realización de pruebas *in vivo*, utilizando diluyentes a base de leche con la adición de yema de huevo.

Componentes	Le	LY
Leche descremada (0% grasa) tratada a ultra alta temperatura (UHT, Ilolay®, Argentina)	100%	80%
Bencilpenicilina	1 mg/ml	1 mg/ml
Sulfato de dihidroestreptomicina	1 mg/ml	1 mg/ml
Yema de huevo	--	20%

Tabla 1. Composición de los diluyentes de semen leche descremada (Le) y Leche descremada-yema de huevo (LY).

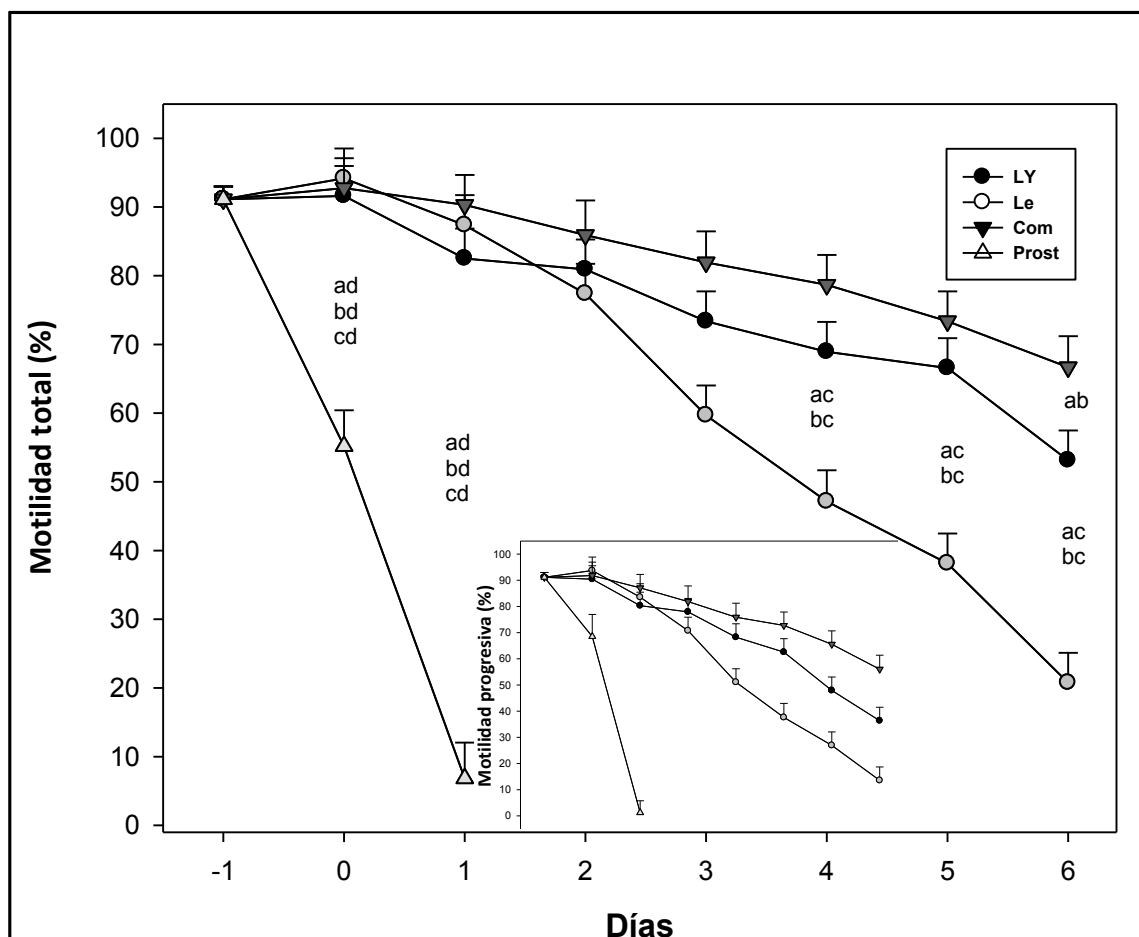


Figura 1. Porcentaje (media \pm SEM) de motilidad espermática canina, total y progresiva, en cuatro diluyentes diferentes (comercial, COM; leche descremada, Le; leche descremada-yema de huevo, LY; líquido prostático, PRO) refrigerados a 4°C por 6 días. Las diferentes letras en cada día de análisis, indican las diferencias ($P < 0,05$) entre los grupos.

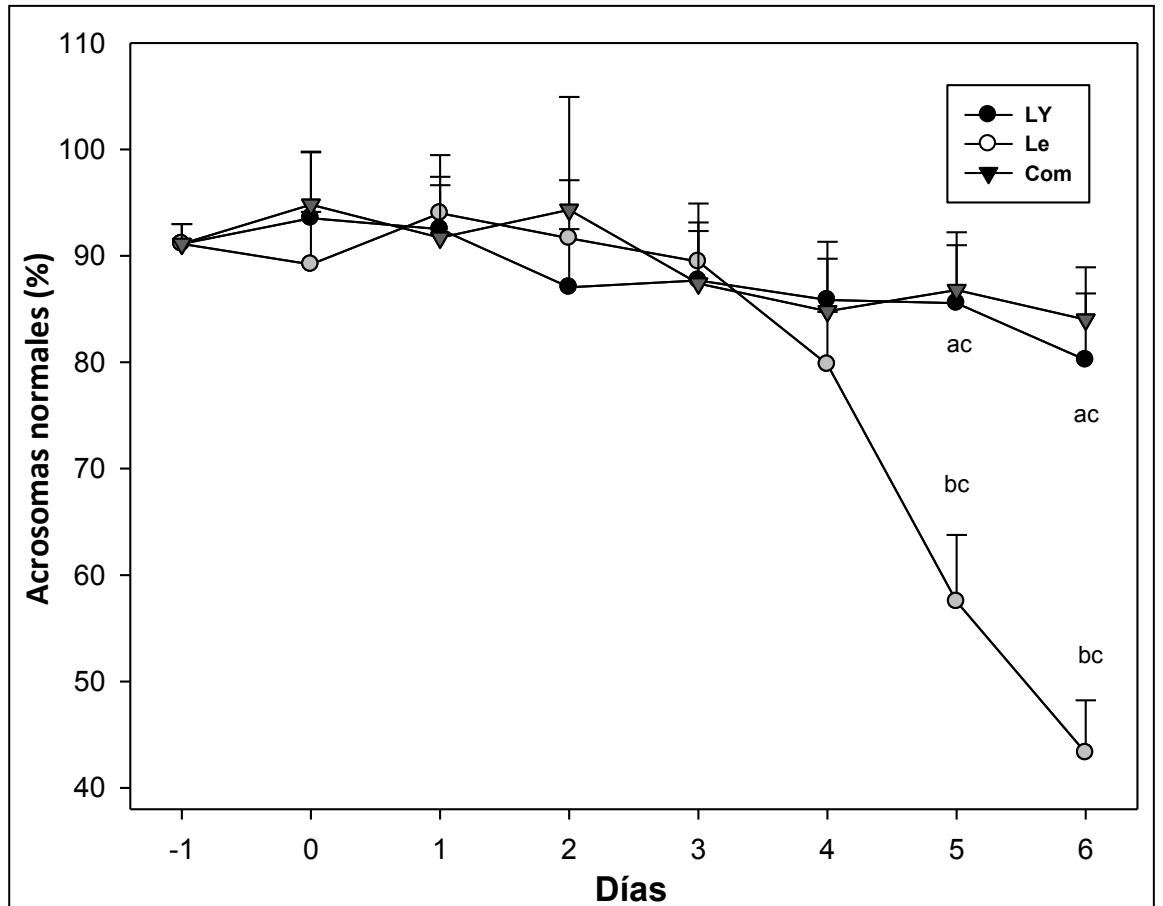


Figura 2. Porcentaje (media \pm SEM) de acrosomas normales, de espermatozoides caninos, en tres diluyentes diferentes (comercial, COM; leche descremada, Le; leche descremada- yema de huevo, LY) refrigerados a 4°C por 6 días. Las diferentes letras en cada día de análisis, indican las diferencias ($P < 0,05$) entre los grupos.

Parámetros seminales												
Días	Espermatozoides vivos (%)			Endosmosis positiva (%)			Osmolaridad (mOsm)			pH		
	Com	Le	LY	Com	Le	LY	Com	Le	LY	Com	Le	LY
0	91,3 ± 4,9	94,5 ± 7,4	91,6 ± 6,9	93,3 ± 4,9	93,0 ± 4,9	93,0 ± 4,9	311,5 ± 8,0	308,0 ± 9,1	309,1 ± 9,1	6,7 ± 0,0	6,7 ± 0,0	6,6 ± 0,0
1	81,6 ± 5,4	82,8 ± 6,9	90,5 ± 6,9	88,7 ± 4,9	87,7 ± 4,9	87,7 ± 4,9	316,5 ± 8,0	312,0 ± 9,1	312,8 ± 9,1	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0
2	82,4 ± 6,3	83,7 ± 6,9	89,1 ± 6,9	76,5 ± 4,9	83,2 ± 4,9	83,2 ± 4,9	325,1 ± 11,4	304,6 ± 9,6	319,6 ± 9,1	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0
3	77,2 ± 5,1	76,9 ± 7,9	87,9 ± 7,3	71,5 ± 5,1	69,1 ± 5,4	69,1 ± 5,1	326,0 ± 8,0	299,8 ± 14,5	321,1 ± 11,3	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0
4	76,0 ± 5,1	66,8 ± 6,9	82,5 ± 6,9	59,1 ± 4,9	62,3 ± 4,9	62,3 ± 4,9	321,0 ± 8,0	330,7 ± 9,6	328,7 ± 10,4	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0
5	75,2 ± 5,8	61,4 ± 7,9	77,3 ± 7,3	54,8 ± 5,4	54,5 ± 5,4	54,5 ± 5,1	307,0 ± 8,0	338,8 ± 14,4	329,9 ± 12,6	6,5 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,6 ± 0,0
6	73,1 ± 5,1	53,3 ± 7,9	55,3 ± 7,3	36,5 ± 5,8	39,4 ± 5,8	39,4 ± 4,6	319,0 ± 8,0	355,5 ± 14,5	363,5 ± 11,3	6,6 ± 0,0	6,6 ± 0,0	6,5 ± 0,0

Tabla 2. Parámetros seminales caninos (media ± SEM) refrigerados a 4°C, en tres diluyentes diferentes (comercial COM; Le, leche descremada; LY, leche descremada-yema de huevo) durante 6 días.

REFERENCIAS

1. Linde Fosberg, C.. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surge (Small Anim)*. 1995; 10: 48-58.
2. Maxwell W, Salamon S.. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev*. 1993; 5: 613-638.
3. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrini M.. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*. 2001; 68: 181-190.
4. Jones RC, Martin ICA.. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1973; 35: 311-320.
5. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 162:77-111.
6. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 1993; 5: 639-658.
7. Bencharif D, Amirat-Briand L, Le Guillou J, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Barrière P, Tainturier D. Canine-chilled sperm: study of a semen extender made with low-density lipoproteins from hen egg yolk supplemented with glutamine. *Reprod Domest Anim*. 2013a; 48(2): 258-66.
8. Beccaglia M, Anastasi P, Chigioni S, Luvoni GC. TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44 Suppl 2: 345-9.
9. Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. Delayed insemination is successful with new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. *Theriogenology*. 1998; (50): 229-236.
10. Leboeuf B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonné JL, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology*. 2003; (60): 867-77.

11. Bencharif D, Amirat-Briand L, Le Guillou J, Vialtelle C, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Barriere P, Tainturier D. Refrigeration of canine sperm at + 4°C: Comparative study of four different extenders for the refrigeration of canine sperm at +4°C: LDL, Tris egg yolk, Equex®, and INRA96®. *Revue Méd. Vét.* 2013b; (164) 5: 252-262.
12. Rota A, Strom B, Linde Fosberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology.* 1995; 44: 885-900.
13. Rota A, Furzi C, Panzani D, Camillo F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39(2): 103-9.
14. Gil J, Fierro S, Bentancur O, Olivera-Muzante J. Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reprod Domest Anim.* 2011; 46(3): 503-7.
15. Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology.* 2001; 55:671-684.
16. Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Anim Reprod Sci.* 2012; 135(1-4): 97-105.

CAPÍTULO IV

CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CANINO CONGELADO-DESCONGELADO, PREVIAMENTE ESTABILIZADO POR HASTA 2 DÍAS A 4°C, EN UN DILUYENTE A BASE DE LECHE DESCREMADA Y YEMA DE HUEVO.

Introducción

Actualmente en nuestro país, la congelación de espermatozoides caninos y su posterior almacenamiento es llevada a cabo en exiguos centros especializados para tal fin. Pero en cambio, la refrigeración de semen es factible de ser realizada en laboratorios de menor complejidad. De esta forma, la misma podría actuar como una estabilización previa al congelado, para que luego la muestra sea enviada a un banco de semen para su almacenamiento. Este hecho, no solo evita el traslado del reproductor, con el riesgo que sugiere su desplazamiento, sino que además facilita el proceso para el dueño del animal.

Por otro lado, el transporte de sustancias en nitrógeno líquido está sujeto a regulaciones estrictas según las normativas vigentes, ya que el mismo es considerado potencialmente peligroso (Bielanski, 2005). Esas restricciones desaparecen cuando el semen se envía refrigerado (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006).

Ya se ha demostrado que el semen canino puede ser congelado con éxito luego de 1 o 2 días de almacenamiento refrigerado, en un diluyente a base de Tris-glucosa y yema de huevo (TGY; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Santana y col., 2013). Incluso, en un estudio donde se utilizaron espermatozoides provenientes del epidídimo, se encontró que los valores de motilidad y acrosomas intactos eran aceptables hasta por 4 días (Ponglowhapan y col., 2006).

Particularmente en equinos, se pudo demostrar que mediante la utilización de un diluyente a base de leche descremada y yema de huevo (LY), la motilidad post descongelado no fue diferente, entre las muestras que fueron congeladas inmediatamente luego de ser refrigeradas, y aquellas mantenidas por 12 h a 5 °C (Crockett y col., 2001).

Por otro lado, el uso del mencionado diluyente fue probado en perros, arrojando parámetros seminales post-descongelación comparables a los obtenidos por diluyentes a base de Tris (Rota y col., 2001); aunque aún no ha sido determinado cual es el efecto sobre los espermatozoides de esta especie, luego de ser mantenidos refrigerados en LY por un cierto tiempo previo a su congelación.

Por lo tanto se planteó, como objetivo de este capítulo, evaluar las características del semen congelado-descongelado que fuera previamente estabilizado, por hasta 2 días a 4 °C, en un diluyente a base de leche descremada-yema de huevo.

Materiales y Métodos

Animales y recolección del semen

Se utilizaron para este estudio caninos machos (n=10), de 1 a 5 años de edad, de raza Ovejero Alemán (n=5) y mestizos (n=5), con un peso entre 10 y 30 kg. Los animales se seleccionaron teniendo en cuenta los siguientes parámetros seminales: concentración de espermatozoides $>100 \times 10^6$ espermatozoides / ml, motilidad espermática progresiva $>70 \%$, e integridad del acrosoma $>85 \%$.

Todos los caninos pertenecían a propietarios privados, y permanecieron saludables al examen físico de rutina durante todo el estudio. Fueron alimentados en sus correspondientes hogares con balanceado premium de diferentes marcas comerciales, y traídos al laboratorio una hora antes del inicio de cada prueba.

Cada uno de los animales utilizados fue previamente entrenado para eyacular mediante masturbación (Linde Forsberg, 1995).

El semen obtenido fue colectado en recipientes de plástico, calibrados, estériles, libres de contaminantes químicos, y atemperados a 37°C aproximadamente.

En cada extracción se colectó la segunda fracción del eyaculado (espermática).

Procesamiento y evaluación de semen

Las fracciones espermáticas de los eyaculados caninos fueron mezcladas, con el fin de aumentar el volumen de la muestra y disminuir las diferencias individuales.

Se tomó una alícuota de la muestra para medir concentración seminal mediante espectrofotometría (capítulo II de este trabajo de tesis). Luego se introdujo el pool de eyaculados (espermática) en una macro centrífuga a 450 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante obtenido, reservando el pellet que contenía los espermatozoides.

Según la concentración observada en el pool, se mezcló la muestra (pellet) con el primer diluyente (LY-1, tabla 1), a fin de obtener una proporción de 400×10^6 espermatozoides por ml. Luego se dividió el preparado en tres partes.

Después de 2 (protocolo tradicional, Control), 24, o 48 h de equilibración a 4°C, una segunda dilución fue realizada en LY-2 (tabla 1) con cada una de las partes separadas previamente. Se ajustó la concentración espermática a fin de obtener un valor de 200×10^6 espermatozoides / ml en la dilución final (LY-1+2).

Luego de cumplido en cada muestra el tiempo de equilibración, fueron sucesivamente empaquetadas en pajuelas de plástico estériles de 0,5 ml.

Posteriormente, las pajuelas obtenidas por cada muestra, fueron colocadas en una canastilla metálica y sometidas a la técnica de congelación dinámica (Linde Forsberg, 2002).

Una vez sumergidas en nitrógeno líquido, las pajuelas permanecieron así hasta el momento de su evaluación.

Transcurridas 2 semanas, las pajuelas fueron descongeladas en baño maría a 37°C durante 1 minuto, y luego se depositaron en un tubo de vidrio pre-calentado a 37°C. Pasados 5 minutos, se evaluaron los porcentajes de motilidad total y progresiva, vitalidad espermática e integridad del plasmalema y del acrosoma.

Las pruebas utilizadas para evaluar el semen pos descongelación fueron aquellas descritas en el capítulo 1.

Para mantener la coherencia de los resultados, este experimento se repitió 5 veces a intervalos semanales.

Análisis estadístico

Los datos de los espermatozoides diluidos (media \pm SEM) es decir, la motilidad total y progresiva, vitalidad, e integridad de la membrana plasmática y acrosómica; todos en porcentajes, fueron comparados entre tratamientos (2 vs 24 vs 48 h) utilizando un ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. Cuando se encontraron diferencias significativas, la media fue comparada mediante el test de Tukey. Fueron valores considerados como estadísticamente significativa cuando $P < 0,05$.

Resultados

Después de la descongelación la motilidad total y progresiva disminuyó ($P < 0.05$) con el tiempo de almacenamiento refrigerado de cada muestra antes de la congelación, aunque no se encontraron diferencias significativas en la motilidad total y progresiva, entre las muestras estabilizadas a las 2 y 24 h de almacenamiento (Tabla 2). El resto de los parámetros evaluados (espermatozoides vivos, endosmosis positiva y acrosomas normales) no presentaron diferencias significativas, entre los distintos tiempos de estabilización luego del descongelado.

Discusión

En el presente estudio, se confirmó que al menos durante las primeras 24 h el diluyente leche-yema de huevo, sirve para la estabilización previa a la congelación de semen canino. Aunque el intervalo de tiempo de almacenamiento refrigerado mostró un efecto gradual negativo sobre la motilidad del semen, durante las primeras 24 h la motilidad total y progresiva no mostró diferencias con las muestras congeladas por el método de criopreservación convencional. Además, el acrosoma, la viabilidad y las funciones de la membrana, no fueron significativamente afectados por el tiempo de refrigeración previa al congelado.

Usando este diluyente a base de leche, la membrana y la integridad del acrosoma estuvieron dentro de los rangos descritos para el diluyente TGY durante los dos días de almacenamiento refrigerado (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Santana y col., 2013); aunque la motilidad post-descongelado fue ligeramente inferior a la observada en los informes anteriormente mencionados (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Santana y col., 2013). Estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que ningún medio de descongelado fue usado en este ensayo, y las muestras fueron directamente

evaluadas después de la descongelación. Se ha comprobado que el agregado de un medio de descongelación con provisión de azúcares, mejora los parámetros de motilidad espermática post descongelado (Yildiz y col., 2000), ya que el espermatozoide es provisto de un nuevo sustrato energético; lo mismo se sospecha, sobre dichos parámetros, del “efecto dilución” sobre componentes que alteran el intercambio iónico entre el espermatozoide y el medio extracelular (Yildiz y col., 2000).

Por otro lado, los resultados demuestran que el enfriamiento de semen canino en leche yema de huevo por 24 h antes de la congelación, no produce una disminución en la calidad del semen cuando se compara con semen congelado por un procedimiento tradicional, es decir, con sólo 2 h a 4°C de enfriamiento. Incluso, los valores obtenidos de motilidad pos descongelado (63- 67 %), están dentro de la media arrojada por otros estudios (45- 70%) que han usado el protocolo tradicional de congelación (Ström y col., 1997; Martins-Bessa y col., 2006; Bencharif y col., 2010).

Con estos resultados, se puede decir que el uso de un diluyente a base de leche descremada y yema de huevo, permite la congelación de muestras seminales en caninos, luego de 24 h de almacenamiento a 4°C, manteniendo parámetros de calidad seminal aceptables luego de la congelación y posterior descongelación.

Componentes	LY-1	LY-2
Leche descremada (0% grasa) tratada a ultra alta temperatura (UHT, Ilolay®, Argentina)	80%	69%
Bencilpenicilina	1 mg/ml	1 mg/ml
Sulfato de dihidroestreptomicina	1 mg/ml	1 mg/ml
Yema de huevo	20%	20%
Glicerol	--	10%
Equex*	--	1%

* Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, EE.UU.

Tabla 1. Composición de los diluyentes LY-1 y 2 para congelación de semen canino.

Tiempo de almacenamiento(h)	Parámetros seminales (%)				
	Motilidad total	Motilidad progresiva	Espermatozoides vivos	Endosmosis	Acrosomas intactos
2	67,4 ± 6,3 ^a	63,2 ± 5,7 ^a	65,0 ± 8,2	52,8 ± 6,3	93,8 ± 0,1
24	48,1 ± 6,1 ^{a,b}	44,8 ± 5,7 ^{a,b}	53,4 ± 8,2	46,0 ± 5,8	87,8 ± 0,1
48	40,0 ± 3,5 ^b	34,2 ± 5,2 ^b	53,2 ± 4,8	47,2 ± 4,9	88,0 ± 8,0

Las letras dentro de una misma fila indican diferencias significativas (P< 0,05)

Tabla 2. Porcentaje de parámetros seminales caninos posdescongelado (media ± SEM), diluidos en leche descremada-yema de huevo, durante 2, 24 y 48 h de almacenamiento previo a la congelación.

REFERENCIAS

1. Bielanski, A. Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology*. 2005; 63: 1946-1957.
2. Hermansson U, Linde-Forsberg C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2006; 65: 584-593.
3. Santana M, Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen-thawed semen samples in dogs. *Reprod Domest Anim*. 2013; 48: 165-170.
4. Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*. 2006; 66(6-7): 1633-6.
5. Crockett EC, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*. 2001; 55: 793–803.
6. Rota A, Frishling A, Vannozzi I, Camillo F, Romagnoli S. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001; 57: 377-381.
7. Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled, extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg Small Anim*. 1995; 10:48-58.
8. Linde-Forsberg C. Hints on dog semen freezing, cryo extenders, and frozen semen artificial insemination. In: *Proceedings of SFT meeting Colorado Springs*; 2002. p. 303–20.
9. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 2000; 54:579–85.

10. Ström, B, Rota, A, Linde-Forsberg, C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 1997; 48: 247-256.
11. Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. Comparing ethylene glycol with 363 glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*. 2006; 66: 2047-2055.
12. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® 324 and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*. 2010; 119: 305-313.

CAPÍTULO V

EFICACIA DE LA LECHE DESCREMADA Y YEMA DE HUEVO SOBRE LA FERTILIDAD *IN VIVO* DE LOS ESPERMATOZOIDES CANINOS REFRIGERADOS A 4°C

Introducción

Ha transcurrido más de medio siglo desde la primer inseminación artificial (IA) exitosa en caninos con semen preservado, tanto refrigerado (Harrop, 1956) como congelado (Seager, 1969). A partir de ese momento, fueron desarrolladas numerosas técnicas y diluyentes para mejorar las condiciones espermáticas de la misma (Dobrinski y col., 1993; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Varela y col.; 2009). Si bien se puede avalar el progreso observado con dichos estudios, por un lado, aún sigue siendo compleja la implementación de la inseminación con semen congelado, principalmente debido a los requerimientos necesarios para tratar de disminuir el grado de deterioro espermático provocado por las bajas temperaturas de congelación (Strom y col.; 1998; Strom y col.; 2000).

Este hecho está asociado a los riesgos y a la complejidad que pueden sugerir en la especie, la necesidad de depositar el semen una vez descongelado dentro del útero, lo que conlleva además a elevar los costos del procedimiento general para la IA. Contrariamente, el semen refrigerado puede ser fácilmente depositado intravaginalmente y mantener buena fertilidad. Incluso, independientemente del sitio de deposición del semen, la tasa de éxito de la inseminación artificial es usualmente mayor para el semen refrigerado que para el semen congelado, cuando son usados iguales métodos para la realización de las técnicas (Linde Fosberg, 1995).

La leche es un diluyente que ha sido ampliamente utilizado para IA en otras especies. A manera de ejemplo, se pueden citar resultados en los porcentajes de concepción que van desde el 55% al 80 % en yeguas inseminadas con semen conservado por 24 h en diluyentes a base de leche (Pickett y Amann, 1987; Rota y col., 2004). Al igual que trabajos realizados en ovinos, donde se lograron similares porcentajes de concepción (aproximadamente 60%) tras una única inseminación con semen mantenido por 24 a 48 h en dichos diluyentes (Paulenz y col., 2003; Olivera- Muzante y col., 2011). Sin embargo, en caninos, la evaluación de la eficacia *in vivo* de este diluyente en refrigeración ha sido muy poco estudiada (Harrop, 1956; Pinto y col.,1999). Además, sería interesante probar si la adición de yema de huevo puede aportar algún resultado positivo, tal como se ha visto en la evaluación *in vitro* en el capítulo III de este trabajo de tesis.

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue evaluar la tasa de preñez y prolificidad en perras inseminadas con semen refrigerado por 24 h a 4°C en leche descremada - yema de huevo.

Materiales y Métodos

Animales, recolección del semen y procesamiento

Fueron seleccionados para este experimento parejas de perros machos y hembras (n=16) de razas puras, saludables al examen físico, de 4 a 35 kg de peso y de 2 a 4,5 años de edad. Todos los animales provinieron de propietarios particulares, quienes firmaron un formulario de consentimiento por escrito.

Los machos fueron evaluados previo a la incorporación al estudio de acuerdo a las siguientes características seminales: concentración de espermatozoides $>100 \times 10^6$ espermatozoides / ml, motilidad espermática progresiva $> 70\%$, e integridad del acrosoma $> 85\%$. Todos ellos registraban servicios fecundantes previos.

Las hembras asignadas al estudio se encontraban en el período óptimo de fertilidad, y solo dos de ellas no registraban partos previos, aunque observaron más de un ciclo de celo antes de la realización del estudio.

La recolección, evaluación y procesamiento del semen, se llevó a cabo tal como se explica en el capítulo I.

El diluyente leche descremada - yema de huevo utilizado para la refrigeración seminal, se preparó de acuerdo a lo explicado en el capítulo III.

Monitoreo del estro

Las perras se examinaron dos veces por semana para observar la presencia de edema vulvar y flujo vaginal serosanguinolento como indicadores del proestro. Luego de la aparición de este, se evaluaron frotis vaginales diariamente hasta el primer día del diestro citológico. Cuando la cornificación celular vaginal era >80% (Olson y col., 1984), se recolectaron muestras de sangre diariamente por punción venosa periférica para determinar progesterona (P_4 , IMMULITE®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EE.UU.) hasta la ovulación ($P_4 > 5$ ng / ml) y luego cada dos días hasta el diestro citológico.

Una única IA se realizó en el día 5 después de la estimación del pico de hormona luteinizante (LH, P_4 aproximadamente 2,0 ng / ml) y las concentraciones de P_4 para ese momento fueron de entre 7 y 20 ng / ml, dependiendo de cada caso (Linde-Forsberg, 1995).

Inseminación artificial

Las 16 parejas de perros primero fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos respetando que en cada uno existiese la misma proporción en el tamaño: perras pequeñas (menor a 10 kg de peso) y medianas- grandes (15 a 35 kg de peso), para cada tratamiento:

Semen Fresco sin diluir [FSD (n= 8)]: las perras de este grupo se inseminaron con semen fresco sin diluir.

Diluyente Leche-Yema [DLY (n = 8)]: las perras de este grupo se inseminaron con semen refrigerado en LY por 24h.

Se utilizó un mínimo de 200×10^6 espermatozoides por IA en todos los casos (Linde-Forsberg, 1995). La dosis de inseminación se colocó en una jeringa de 5 ml estéril. La técnica de deposición vaginal se llevó a cabo usando un catéter de plástico para bovinos (longitud 30 cm, diametro de 4 mm), y fue acortada la longitud del mismo según el tamaño de la hembra. Luego, la punta de la pipeta se introdujo cranealmente al lugar más lejano posible (es decir, en el área de la porción vaginal y paracérvix).

Los cuartos traseros de las perras se elevaron y el semen fue depositado en la vagina. A continuación, el catéter se retiró y la perra se mantuvo con los cuartos traseros elevados durante 20 minutos mientras se masajeaba con los dedos la zona perivulvar para evitar el reflujo de semen.

Diagnóstico de gestación y tamaño de la camada

En todos los casos, la preñez fue diagnosticada por ultrasonografía (Toshiba Core Vision Pro, Tokio, Japón) luego de un mínimo de 21 días después del pico de LH estimado. Los datos relativos al tamaño de la camada al nacer fueron proporcionados por los propietarios.

Análisis estadístico

La tasa de preñez se comparó entre los grupos (FSD vs DLY) por prueba exacta de Fisher. Los valores se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

El número de cachorros nacidos en cada grupo se comparó por medio de un test de Student (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados

Siete (7/8, $P > 0,1$) perras de cada grupo quedaron preñadas y parieron normalmente a término. Los tamaños de camada fueron similares en ambos grupos, y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,83$, tabla 1).

Discusión

A la hora de evaluar la eficacia de las técnicas y diluyentes empleados para la refrigeración o congelación de semen, la prueba más adecuada es la determinación de los porcentajes de concepción (Oettlé, 1986; Watson, 1996) y el tamaño de la camada resultante de la inseminación artificial (Farstad, 1996). Ambos son indicativos de la eficacia de la fecundación de los ovocitos por espermatozoides con capacidad para mantener y sustentar el desarrollo embrionario (Watson, 1996).

En nuestro estudio las tasas de preñez observadas con DLY fueron del 88%, demostrando la buena capacidad de este diluyente para la IA. Estos resultados están en consonancia con lo obtenido

mediante los ensayos controlados de otros diluyentes para refrigeración (90%, Uchoa y col., 2012) y de un diluyente similar a base de leche (95%, Pinto y col., 1999).

Por otro lado, el rendimiento evidenciado está en línea con los resultados *in vitro* para este diluyente, ya que el enfriado por 24 h mantuvo la fertilidad y la tasa de preñez fue normal y no diferente de la del semen fresco sin diluir.

Es sabido que la eficacia de la IA, aumenta cuando es realizada más de una vez en el mismo celo (Linde- Forsberg y Forsberg, 1993). En nuestro caso las tasas de concepción denotan los buenos resultados obtenidos tras una única inseminación llevada a cabo por cada hembra tratada, y contrastan con el mencionado estudio en leche (Pinto y col., 1999); donde además también fueron seleccionadas similar número de repeticiones del tratamiento (10 hembras inseminadas); pero en este caso fueron llevadas a cabo un mínimo de 4 inseminaciones por hembra tratada con semen refrigerado por 24 h. Por otro lado los machos reproductores seleccionados sólo fueron 2; este hecho permite disminuir el efecto en la variación de la calidad seminal y consecuente potencial fecundante, en relación a nuestro estudio, donde se usaron parejas de perros diferentes para cada repetición (8 parejas de machos y hembras inseminados con DLY).

Con respecto al tamaño de camada obtenido, estas fueron dentro de lo esperado para cada raza en particular, y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos inseminados con semen fresco o refrigerado. Estos resultados son similares a aquellos estudios que también usaron apareamientos naturales o IA con semen fresco como grupo control (Pinto y col., 1999; Uchoa y col., 2012).

El fallo de la concepción de una de las perras dentro del grupo DLY no puede ser directamente atribuido al procesamiento del semen, ya que además se produjo en ambos grupos. Por otra parte,

no hubo un examen profundo de los perros, y otras etiologías causantes de infertilidad podrían haber estado presentes.

Con estos resultados, podemos inferir que los espermatozoides caninos refrigerados en DLY, son una buena alternativa para IA hasta por 24 h de almacenamiento a 4°C.

Tratamiento	Tasa de preñez (%)	Tamaño de camada (media ± SEM)
FSD	88 (7/8)	4,9 ± 0,9
DLY	88 (7/8)	4,6 ± 0,7

Tabla 1. Tasa de preñez (% y número de perras preñadas / perras inseminadas totales) y tamaño de camada (media ± SEM), en los grupos de perras inseminadas con semen fresco sin diluir (FSD) y semen refrigerado por 24 h en un diluyente a base de leche descremada y yema de huevo (DLY).

REFERENCIAS

1. Harrop AE. Artificial Insemination in a bitch with preserved semen. *Brit. Vet. J.* 1956; 110: 424-425.
2. Seager, SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest.* 1969; 17: 6-7.
3. Dobrinski I, Lulal C, Barth AD, Post K.. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil.* 1993; 47 suppl. 291-6.
4. Iguer-Ouada M, Verstegen, JP. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology.* 2001; 55: 671-684.
5. Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MV, Bianchi I, Correa MN, Lucia T Jr, Deschamps JC. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci.* 2009; 115(1-4): 323-7.
6. Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Linde Fosberg C, Rodriguez Martinez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of select elements. *Reprod. Domest. Anim.* 1998; 33: 77-82.
7. Strom Holst B, Larson B, Fosberg L, Rodriguez Martinez H. Evaluation of chilled and frozen – thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 119: 201-206.
8. Linde Forsberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet. Med. Surge (Small Anim).* 1995; 10: 48-58.
9. Pickett BW, Amann RP. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science.* 1987; 7(5): 289-302.
10. Paulenz H, Söderquist L, Adnøy T, Fossen OH, Berg KA. Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology.* 2003; 60(4): 759-66.

11. Rota A, Furzi C, Panzani D, Camillo F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39(2): 103-9.
12. Olivera-Muzante J, Fierro S, Gil J. Conception rates in ewes after AI with ram semen preserved in milk-egg yolk extenders supplemented with glycerol. *Reprod Domest Anim.* 2011; 46(3): 508-12.
13. Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology.* 1999;52(4): 609-16.
14. Olson PN, Thrall MA, Wykes PM, Nett TM. Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Compend Cont Educ Pract Vet.* 1984; 6: 288-297.
15. Oettlé, EE. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci.* 1986; 12: 145-150.
16. Watson, PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim.* 1996; 31: 135-140.
17. Farstad, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci.* 1996; 42: 251-260.
18. Uchoa DC, da Silva TF, Cardoso J de F, Mota Filho AC, Jucá RP, Silva AR, da Silva LD. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology.* 2012;77(9): 1959-63.
19. Linde-Forsberg C, Forsberg M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993; 47: 313-23.

CONCLUSIONES FINALES

Se lograron reproducir técnicas de evaluación seminal, caracterizadas por su fácil ejecución y su bajo costo, ya que fueron realizadas mediante el uso de tinciones y observaciones al microscopio de luz convencional. Si bien algunas de ellas pueden tener un grado de subjetividad, se considera que la sumatoria de estas evaluaciones tiene buena correlación con la fertilidad en la especie. Del mismo modo, se replicaron de manera confiable las técnicas de refrigeración, que en conjunto con las anteriores, pudieron ser incorporadas en los sucesivos capítulos de este trabajo de tesis.

Se estandarizó la medición de la concentración seminal en el perro doméstico mediante espectrofotometría. Gracias al uso de este método, se logró una alternativa rápida y precisa para la mejora de la medición de este parámetro. De la misma forma que en el capítulo anterior, fue incluida esta técnica en los siguientes capítulos de esta tesis.

Los diluyentes a base de leche demostraron su capacidad para mantener parámetros seminales de buena calidad, por 4 a 6 días de refrigeración a 4 °C. Incluso se evidenció que el agregado de yema de huevo a la leche descremada mejoró dichos parámetros. Con estos resultados *in vitro* fueron establecidas condiciones propicias para las pruebas *in vivo* a posteriori.

La evaluación del diluyente LY como un medio de estabilización previa al congelado, demostró tener la misma eficacia por 24 hs a 4 °C que el método tradicional de 2 hs. Incluso el grado de integridad de las membranas plasmática y acrosómica, perduró sin diferencias hasta por 48 hs de mantenimiento a 4°C cuando fueron observadas al descongelado.

El semen mantenido en LY justificó su eficacia *in vivo*, luego de haber logrado un 88 % (7/8 hembras) de preñez con una única IA llevada a cabo con 24 h de almacenamiento previo a 4°C. Asimismo, estos valores obtenidos fueron iguales a los arrojados por el grupo control que fue inseminado con semen fresco. Las mismas condiciones se observaron en ambos grupos (control y tratado con LY por 24 hs) con las camadas de cachorros nacidas, los cuales promediaron similares tamaños de las mismas.

A partir de los hallazgos mencionados, se puede considerar a la refrigeración en el diluyente LY, como una posibilidad fiable para el envío de semen a distintos puntos de nuestro país e inclusive fuera del mismo, dentro del límite de las 24 h de traslado, posibilitando su congelación en un centro especializado de almacenamiento, como así también pudiendo ser usado directamente en la IA en perras en celo.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede concluir que tanto la refrigeración seminal como los diluyentes a base de leche descremada usados para la misma, son una alternativa además de sencilla y eficaz, también económicamente accesible, que hacen factible y alientan a los profesionales de nuestro medio, para comenzar con el desarrollo de biotecnologías reproductivas en el perro doméstico.

PUBLICACIONES

ESTANDARIZACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SEMINAL EN EL PERRO DOMÉSTICO

Díaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas seminales realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro, realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos en la especie canina. Con este fin se evaluaron 9 eyaculados de 5 perros machos reproductivamente aptos. Cada uno de los eyaculados se fraccionó en cuatro partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. Se realizaron tres lecturas consecutivas con cada uno de los métodos. Se calculó la repetibilidad de cada método y el coeficiente de correlación entre ambos. Así, los coeficientes de variación fueron 7,8% y 16,9% para el espectrofotómetro y el hemocitómetro, respectivamente y el coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de $r = 0,89$ ($p < 0,01$). Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

Palabras Clave: canino, espermatozoide, semen, hemocitometría, espectrofotometría.

STANDARDIZATION OF SPECTROPHOTOMETRY FOR THE ASSESSMENT OF SPERM CONCENTRATION IN THE DOMESTIC DOG

ABSTRACT: The aims of this study were to determine the repeatability of semen measures carried out by spectrophotometry and to compare them with that of the hemocytometer, to design a standard spectrophotometric curve for canine seminal concentration, and to correlate results obtained by both methods. For these purposes, 9 ejaculates were obtained from 5 normal male dogs. Each ejaculate was divided into four parts, and then diluted 1:25, 1:50, 1:75 in distilled water; the last fraction was not diluted. All the samples were measured three consecutive times by each method. Repeatability and correlation coefficient were calculated for both methods. The coefficient of variation of the spectrophotometer and hemocytometer was 7.8 % and 16.9 %, respectively and the correlation between absorbance and sperm count was $r = 0.89$ ($p < 0.01$). These findings further present spectrophotometry not only as a rapid and low cost method but also precise for semen evaluation in this species.

Key words: canine, spermatozoon, semen, hemocytometry, spectrophotometry.

Fecha de recepción: 19/04/11

Fecha de aprobación: 20/11/11

Dirección para correspondencia: J. D. Díaz, Laboratorio de Fisiología Reproductiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina.

E-mail: j.diaz@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la hemocitometría produjo un hito en la evaluación de la calidad seminal del macho. Desde entonces esta técnica se ha llamado oficialmente por la OMS como el "gold standard" para el conteo espermático (1). No obstante, a pesar de la fe depositada en ella, son varias las limitaciones observadas desde su descubrimiento, tales como el tiempo insumido en la ejecución de la misma (2), la variación de resultados entre los diferentes hemocitómetros disponibles (3), e incluso entre dos conteos de una misma muestra en el mismo hemocitómetro (4) o entre distintos operadores (5). En base a esto, surge la necesidad de mejorar la técnica y las herramientas disponibles para el conteo espermático, lo que fomentó el desarrollo de dispositivos con un grado mayor de eficiencia. Es así, que hoy en día se ofrecen al mercado numerosos equipos; entre ellos pueden mencionarse como los más usados, el CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) y el SpermaVue® de Minitub, como así también un nuevo y prometedor método, la citometría de flujo. Algunos de estos dispositivos han logrado vencer los inconvenientes de la hemocitometría, pero presentan otra importante restricción a tener en cuenta: su elevado costo.

El espermatocrito por ejemplo, es una técnica práctica y económica, pero no ha podido ser reproducida en caninos (6).

Por otra parte, el espectrofotómetro convencional además de ser un equipo de bajo costo, permite con un mínimo entrenamiento medir en pocos minutos (2 a 3 minutos, 7) la cantidad de luz que absorbe una muestra de semen, correlacionándola con un alto grado de precisión con la concentración seminal (8). Quizás con el surgimiento de dispositivos con mayor grado de desarrollo como los mencionados anteriormente, se ha llegado a desestimar la utilidad de la espectrofotometría para el conteo seminal. No obstante, es factible de demostrar que la espectrofotometría es uno de los métodos con mejores resultados para este fin; además, por su moderado costo, podría considerarse como una herramienta de considerable valor para laboratorios de bajos a medianos recursos.

Es sabido que las diferentes glándulas accesorias de las especies mamíferas secretan partículas (9) y que hay una variación biológica en la calidad y cantidad de estas entre las especies. Considerando estas diferencias, así como también las de tamaño y concentración seminal, resulta razonable validar y estandarizar el conteo seminal por espectrofotometría en cada una de las especies. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro y compararla con aquellas del hemocitómetro,

realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal canina y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

Se utilizaron un total de 5 caninos machos adultos de entre 2 y 5 años de edad, saludables y con parámetros reproductivos normales, que fueron proporcionados por sus propietarios previo consentimiento escrito. La recolección de las muestras se realizó en forma higiénica mediante masturbación (10); para dicho procedimiento se utilizaron recipientes de plástico, calibrados y limpios. Se realizaron dos extracciones de semen por animal con un intervalo de 3 días entre cada una de ellas. Uno de los eyaculados no pudo ser utilizado por derramarse fuera del recipiente, por lo que se procesaron un total de 9 eyaculados.

DILUCIÓN DE LOS EYACULADOS

Cada uno de los eyaculados se fraccionó en 4 partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. De esta forma se generaron un total de 36 muestras. La finalidad de estas diluciones fue obtener distintos valores de concentración que permitieran crear una mayor variabilidad entre los datos a analizar y por consiguiente un rango más amplio de absorbancia.

CONTEOS EN EL HEMOCITÓMETRO

Para el conteo en cámara de Neubauer (Neubauer improved, BOECO, Germany) cada una de las muestras generadas por dilución y las fracciones no diluidas, se mezclaron con solución fisiológica formulada (CINA 0,9 g, agua destilada 100 ml y formol 40 %, 0,3 ml) en una proporción 1:20 ó 1:200. La elección de la dilución a utilizar se basó en el aspecto macroscópico de la muestra (grado de opacidad), teniendo así diluciones 1:200 para las muestras con mayor opacidad y 1:20 para aquellas translúcidas. Utilizando una micropipeta autoajustable (PZ HTL, Daniszewska 4, 03-230 Warsaw, Polonia) se tomó una alícuota de cada muestra por separado, se cargaron las cámaras, y se procedió al conteo bajo microscopio de luz a 40 aumentos. Fueron contabilizados los espermatozoides de 5 cuadrados equidistantes entre sí delimitados por 3 líneas paralelas. Se tuvo la precaución de no superar el 10% de diferencia de conteo entre ambas cámaras del hemocitómetro. Los conteos fueron realizados en 3 réplicas para calcular la repetibilidad de los resultados.

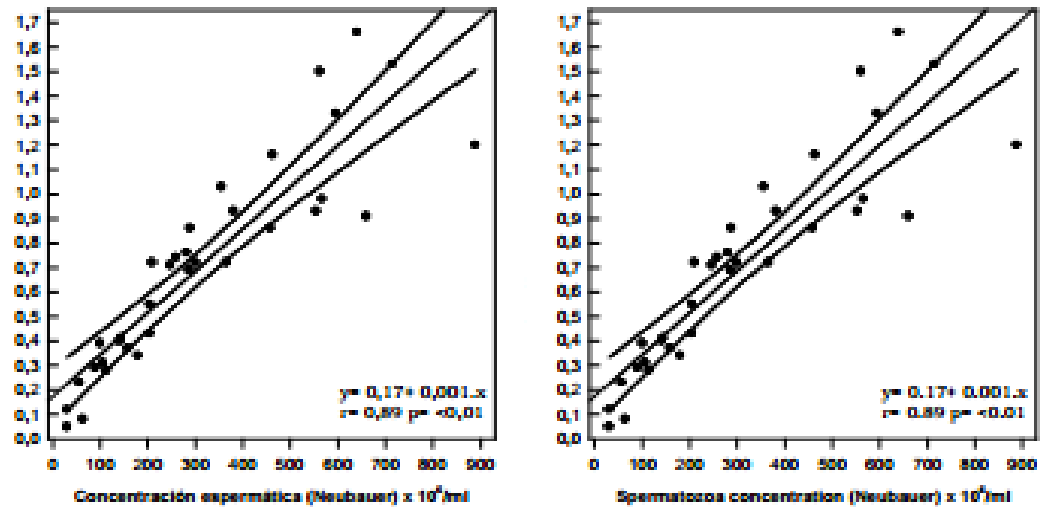


Figura 1: Relación entre la concentración espermática medida por hemocitometría (cámara de Neubauer) y la absorbancia por espectrofotometría de muestras seminales caninas.

LECTURAS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Para la medición en el espectrofotómetro (Metrolab RC 325 Junior, Argentina) la dilución se hizo en agua destilada 1:30 (0,05 ml de la muestra en 1,5 ml de agua destilada), y la longitud de onda utilizada en dicho procedimiento fue de 620 nm.

Previo a la lectura, el aparato fue calibrado a 0 de absorbancia y transmitancia utilizando como blanco un tubo de vidrio limpio y sin rayaduras, al cual se le agregó 1,5 ml de agua destilada en su interior. Luego a ese mismo tubo, se le colocó la muestra diluida como se detalló más arriba, se ajustó la longitud de onda indicada y se procedió a la lectura. Cada una de las lecturas se realizó 3 veces consecutivas.

ANÁLISIS DE DATOS

Se calculó la repetibilidad de cada método mediante el análisis del coeficiente de variación ($CV = \sigma/X \cdot 100$) de las tres réplicas realizadas en cada una de las muestras. Luego, se realizó una curva de estandarización entre los valores de absorbancia y de concentración mediante la utilización de la ecuación de regresión lineal, según la fórmula $y = a + bx$, donde "x" fue el conteo en cámara e "y" los valores de absorbancia. Por último, se compararon las concentraciones seminales obtenidas por cada equipo a través de un Test de Student. De no hallar diferencias significativas entre los conteos se calculó del coeficiente de correlación de Pearson para dichos datos.

RESULTADOS

Los valores obtenidos a través del cálculo del CV fueron 7,8 % y 16,9 % para el espectrofotómetro y la cámara de Neubauer, respectivamente. Mediante la ecuación de regresión general se logró la alineación de la dispersión de los datos, lo cual permitió la estandarización de los valores tanto de absorbancia como de concentración (Figura 1).

No se encontraron diferencias significativas entre los conteos espermáticos obtenidos con ambos equipos ($p > 0,05$). El coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de $r = 0,89$ ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, no existen reportes acerca de la repetibilidad de las mediciones realizadas por espectrofotometría en semen canino. Este dato permite, no solo el conocimiento de la misma sino también comparar la repetibilidad con la de otros métodos, e incluso con la del "gold standard". Este conocimiento comparativo en la especie canina es de ayuda en la toma de decisiones para la elección y compra de equipamiento en un laboratorio de reproducción.

En nuestro trabajo la cámara de Neubauer mostró tener menos de la mitad de la precisión del espectrofotómetro. Similar proporción entre la precisión de ambos métodos fue previamente reportada en la especie bovina (11).

En este trabajo, al igual que en un estudio anterior en la misma especie ($r = 0,99$; 12) y en otras especies como bovinos ($r = 0,99$; 11), cerdos

($r=0,96$; 13) y conejos ($r=0,97$; 14) entre otros, se encontró una alta correlación para los conteos espermáticos obtenidos por ambos métodos.

Por otro lado, la alta correlación entre los aparatos permitió generar un índice de equivalencias para la lectura de la concentración en el espectrofotómetro a partir de los datos obtenidos por cámara de Neubauer. Debido a la dispersión de dichos datos fue necesario su alineamiento por medio de una ecuación de regresión lineal para la homogeneización de los mismos, como se realizó en anteriores trabajos (15,16), ya que su modelo de comportamiento fue similar. Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1987; p. 14-7.
2. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril* 1997; 68 (2):340-345.
3. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 2005; 63:992-1003.
4. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril* 1996; 65:150-155.
5. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treace C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004b; 25:645-656.
6. Kustritz MV, Kilty C, Vollmer M. Spermatoxyl as a measure of the concentration of spermatozoa in canine semen. *Vet Rec* 2007; 161 (16):566-567.
7. Brillard JP, McDaniel GR. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Foult Sci* 1985; 64:155-158.
8. Hansen C, Christensen P, Stryhn H, Hedeboe AM, Rode M, Bøe-Hansen G. Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen. *Reprod Domest Anim* 2002; 37:330-334.
9. Minelli A, Moroni M, Castellini C. Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J Exp Zool* 2001; 290:279-290.
10. Linde Fosberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Semin Vet Med. Surg (Small Anim)* 1995; 10:48-58.
11. Prathalingam NS, Holt WW, Revell SQ, Jones S, Watson PF. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl* 2006; 27 (2):257-262.
12. Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Rev Med Vet Zoot* 2008; 55:22-28.
13. Paulenz H, Grevle IS, Tverdal A, Hofmo PO, Andersen Berg K. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reprod Dom Anim* 1995; 30:107-111.
14. Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Dal Bosco A, Mourvaki E. Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Sci* 2007; 15:115-119.
15. Haug. Determination of the approximate sperm concentration of horse semen with the aid of a spectrophotometer. *J Am Vet Med Assoc* 1959; 134 (7):314-316.
16. Anzar M, Kroetach T, Buhr M. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *J Androl* 2009; 30(6): 661-668.



In vitro and *in vivo* assessment of skim milk with and without egg yolk on canine spermatozoa incubated at 4°C

J.D. Díaz, Y. Corrada, P.G. Blanco, C. Gobello¹

Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Veterinary Medicine,
National University of La Plata-CONICET, La Plata, Argentina.

Abstract

The aims of this study were to assess and compare the effect of skim milk with (MEY) and without (SMI) egg yolk on canine spermatozoa incubated at 4°C *in vitro* and to evaluate the efficacy of MEY *in vivo*. Also, the effect of semen cooled storage before freezing was also evaluated *in vitro*. The ejaculates of 10 dogs were collected, pooled, centrifuged, and divided into 4 aliquots and diluted in one of the following 4 diluents: Prostatic fluid (PRO), commercial diluent (COM), SMI, or MEY. Extended samples were stored at 4°C and evaluated daily for 6 days. Percentage of total ($P < 0.01$) and progressive ($P < 0.01$) motility, intact acrosomes ($P < 0.05$), and positive endosmosis ($P < 0.01$) decreased over time in the diluents, with COM and PRO having as the best and the worst performances, respectively. Furthermore, MEY motility differed from PRO ($P < 0.01$) and SMI ($P < 0.01$) but not COM. Acrosome integrity was higher in MEY when compared to SMI ($P < 0.05$). Sixteen pairs of dogs were randomly assigned to either fresh undiluted semen ($n = 8$) or to 24-h cooled MEY diluted semen ($n = 8$). Seven (87.5%; $P > 0.1$) bitches from each group became pregnant and whelped normally. MEY extended semen samples were cooled for 2, 24, or 48 h at 4°C, and a second dilution was performed prior to freezing and thawing. Post-thaw total and forward sperm motility decreased with increasing cooled storage ($P < 0.05$), although no significant differences in total or forward motility, normal acrosomes, positive endosmosis, live spermatozoa, or positive endosmosis were found between 2 and 24 h storage. These *in vitro* and *in vivo* results show that MEY can be considered a simple, inexpensive, and efficient diluent for canine semen chilling. Furthermore, MEY could be successfully frozen after 1 day of cooled storage.

Keywords: artificial insemination, cooled semen, dog, frozen semen, pregnancy rate.

Introduction

Preserved semen shipment replaces the international transport of breeding animals. This is a financially reasonable and safer (i.e., reduces health risks and transport stress) technique compared to live

animal movement. Furthermore, semen preservation facilitates the wide distribution of varied and superior genetics. However, international canine semen interchange is partially limited in most developing countries by the proportionally high cost of proprietary diluents. In these countries, dogs are still travelling long distances for breeding and heterogeneity is not guaranteed. In this aspect, low cost, user-friendly, efficient, and safe diluents are needed before semen preservation can be widely applied worldwide.

Contrary to frozen-thawed semen, chilled semen can be deposited intravaginally and still maintain good fertility. Handling and shipping of chilled semen is also easier and cheaper than frozen semen. Furthermore, chilling can be carried out in ordinary veterinary clinics, whereas freezing requires expensive equipment and trained personnel that are not always available. Furthermore, the success rate of artificial insemination (AI) is usually higher for chilled semen than for frozen semen when equally good methods for timing of the estrous cycle, and for AI, are used (Linde-Forsberg, 1995). In this context, cooling appears to be the logical initial approach to canine semen preservation in certain geographical areas. It would also be of great advantage if semen could be pre-cooled in ordinary clinics and sent to semen banks for freezing and permanent storage.

Although cooling involves a number of factors that may damage the sperm plasma membrane, canine semen can be diluted in extenders, cooled, and maintained at 4°C for several days. Extenders protect spermatozoa, allowing for motility and fertility conservation over time by stabilizing plasmalemma, providing energy substrates, and preventing deleterious effects of changes in pH and osmolality over time (Linde-Forsberg, 1995).

Milk is a commonly used component of semen extenders in most species, having good performance both *in vitro* and *in vivo* (Maxwell and Salamon, 1993; Batellier *et al.*, 2001). Skim milk proteins buffer semen pH and may also chelate any heavy metal ions (Jones and Martin, 1973; Maxwell and Salamon, 1993; Batellier *et al.*, 2001). The addition of egg yolk to skim milk extender improves the viability of spermatozoa during chilled storage (Salamon and Maxwell, 2000) as its phospholipid fraction provides protection to sperm and acrosomal membranes against cold shock (Jones and Martin, 1973; White, 1993). It has also been

¹Corresponding author: cgobello@fcv.unlp.edu.ar
Phone: +54(221)482-5372
Received: January 29, 2013
Accepted: August 21, 2013



speculated that milk and egg yolk have a synergistic, protective effect on sperm because of their analogous action of the sequestration of seminal plasma proteins. In this context, skim milk with or without egg yolk could be an inexpensive, practical diluent for cooling canine semen. There is only one report of skim milk tested as a diluent for cooling canine semen with acceptable *in vitro* results (Rota *et al.*, 1995). Skim milk and egg yolk also showed post-thaw semen parameters comparable to those obtained by a Tris based buffer in this species (Rota *et al.*, 2001). Although the potentially improving effect of egg yolk supplementation to skim milk has not been described in this species yet, neither has the effect of cooled storage of milk based diluents before freezing. Furthermore, pregnancy rate and prolificacy have not been assessed for this diluent (skim milk-egg yolk) in dogs.

The aim of this study was twofold: first, to assess and compare the effect of skim milk with and without egg yolk on canine spermatozoa incubated at 4°C *in vitro* and to evaluate the efficacy of skim milk-egg yolk on canine spermatozoa fertility incubated at 4°C *in vivo*; second, to evaluate the effect of cooled storage using this diluent before freezing *in vitro*.

Materials and Methods

Experiment 1

Animals

Ten 1- to 5-year-old cross and pure bred (5 German shepherds), privately owned dogs weighing 11.5 to 32 kg were used for these studies. The animals were fed with different dry commercial feed and trained to ejaculate by digital manipulation (Linde-Forsberg, 1995) before the start of the experiments. All research protocols were approved by the Institutional IACUC.

Semen collection

The second and third fractions of each of the dogs' ejaculates were collected by digital manipulation in separate, calibrated plastic tubes (Linde-Forsberg, 1995). Immediately after collection, the volume, sperm

motility, sperm concentration, morphology, and acrosome integrity of each semen sample were defined (see Semen evaluation below). Total sperm number was assessed in an aliquot of semen diluted 1:100 using an improved Neubauer hemocytometer counting chamber and the total sperm output was calculated by multiplying the concentration by the volume of the second fraction. Morphology was evaluated by smearing a drop of semen on a glass slide, allowing the slide to dry, staining with Giemsa stain, and examining more than 100 spermatozoa in the sample under 200X magnification. Only ejaculates with a sperm concentration $>100 \times 10^6$ spermatozoa/ml, progressive sperm motility $>70\%$, normal acrosome integrity $>85\%$, and normal sperm morphology $>85\%$ were included in the study.

Semen processing

The second fractions of the ejaculates were pooled, centrifuged at 450G for 10 min, and the supernatant was removed. The resultant sample was divided into 4 aliquots. Each fourth was diluted 1:3 to 1:6 (volume:volume) with each of the different extenders or with a corresponding volume of autologous prostatic fluid (third fraction of the ejaculate). The sperm concentration in the extended semen samples varied from 75 to 100×10^6 /ml. Extended samples were stored in screw-cap closed sterile vials, placed into a glass tube filled with water, then moved to a refrigerator at 4°C and left for six days. For consistency of the results, this experiment was repeated 5 times at weekly intervals.

Semen extenders

The following extenders were used: 1) Prostatic fluid (PRO): autologous prostatic fluid was used as a negative control; 2) Commercial semen diluent® (COM): distilled water, glucose, fructose, sodium citrate, Tris, non-disclosed proprietary components, gentamicin, and 20% egg yolk, used as a positive control; 3) Skim milk (SMI; Table 1); and 4) Skim milk-egg yolk (MEY): 80% SMI and 20% egg yolk to test the effect of its supplementation in combination with milk. All the extenders were prepared fresh before each trial.

Table 1. Extenders (skim milk, SMI; skim milk-egg yolk, MEY) compared for dog semen stored at 4°C.

Ingredients	SMI	MEY
Ultra-high-temperature-treated skim milk (0% fat; Ilolay®, Argentina)	80%	80%
Benzyl penicillin	1 mg/ml	1 mg/ml
Dihydrostreptomycin sulphate	1 mg/ml	1 mg/ml
Egg yolk	—	20%



Semen evaluation

The following tests were performed immediately after mixing the fresh semen pellet with each extender (day 0) and then daily up to day 6 or up to <10% total motility. For each analysis, an aliquot of 150 µl of semen was collected from the 4°C preserved samples and slowly warmed at room temperature. Motility was assessed in a drop on a warmed glass slide and the percentage of total motile and progressively motile spermatozoa were subjectively assessed at 37°C in 5 µl at 400X magnification by two trained operators. Total and progressive motilities were the only determinations assessed in the prostatic diluent.

The number of live and dead spermatozoa was examined on nigrosin/eosin stained slides. Individual sperm cells were recorded as being either alive (unstained) or dead (stained). Plasmalemma integrity was evaluated by hypo-osmotic swelling (HOS) test. The percentage of curled/swollen spermatozoa (i.e., with an intact plasma membrane) was determined (England and Plummer, 1993). Acrosome normality was evaluated by Bengal Rose stain solution (Cardoso *et al.*, 2007). Acrosomes were classified as normal or abnormal (detached, damaged, or lost). Percentage live/dead, HOS positivity, and acrosome normality were calculated on a total of 200 cells. Both the pH (pH-009 ATC, China) and osmolarity (Wescor, Inc mod. 5520, USA) were also measured.

Statistical analysis

All semen parameters (mean ± SEM) were compared among 3 diluents (COM vs. SMI vs. MEY) using a repeated analysis of variance followed by Tukey comparison test when significant differences were found (SPSS 17.0, SPSS, Chicago, IL, USA). In the case of total and progressive motilities, prostatic diluent (PRO) was also included in the analysis. Values were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Experiment 2: Fertility and prolificacy of an egg yolk milk-based extender stored at 4°C for 24 h

Animals and semen collection and processing

Sixteen pairs (male and female) of healthy, 4 to 35 kg, 1.5- to 4.5-year-old, privately owned purebred dogs were used for this trial. Consent forms were signed by the clients. Semen collection, evaluation, and processing (group MEY) were carried out as explained in experiment 1.

Female estrus monitoring

Bitches were examined twice weekly for the presence of vulvar swelling and scrota sanguineous vaginal discharge as indicators of proestrus. After proestrus onset, vaginal smears were evaluated daily

until the first day of cytological diestrus. When vaginal cellular cornification was >80% (Olson *et al.*, 1984), blood samples were collected daily by peripheral venipuncture for progesterone (P4) determination (Immulite®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) until ovulation (P4 > 5 ng/ml) and then every other day until cytological diestrus. A single artificial insemination was performed on day 5 after the estimated luteinizing hormone (LH) peak (P₄ approximately 2.0 ng/ml) and P4 concentrations were between 7 and 20 ng/ml, depending on each case (Linde-Forsberg, 1995).

Artificial insemination

A minimum of 200×10^6 spermatozoa per AI was used in all cases. The females were randomly assigned to either fresh undiluted semen (UND; n = 8) or 24-h cooled MEY diluted semen (MEY; n = 8). The insemination dose was aspirated into a 5 ml sterile syringe. The vaginal deposition technique was carried out using a bovine plastic catheter (length 30 cm, width 4 mm) and the length was adjusted to the female's size. The tip of the pipette was introduced cranially to the farthest point possible (i.e., into the area of vaginal portion and paracervix (pseudocervix)). The hindquarters of the bitches were elevated and the extended semen was deposited into the vagina. The catheter was then withdrawn and the bitch was held with elevated hindquarters for 10 min with finger stroking and feathering the area of the vulva to prevent the reflux of semen (Linde-Forsberg, 1995).

Pregnancy diagnosis and litter size

In all cases, pregnancy was diagnosed by ultrasonography (Toshiba Core Vision Pro, Tokyo, Japan; Mattoon and Nyland, 1995) > 21 days after the estimated LH peak. Data concerning litter size at birth was provided by breeders.

Statistical analysis

Pregnancy rate was compared between groups (UND vs. MEY) by Fisher Exact Test. Values were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Experiment 3: Quality of frozen-thawed semen stored in an egg yolk milk extender at 4°C for up to 48 h before freezing

Animals and semen collection

Same as in experiment 1.

Semen processing and evaluation

Pooled semen samples were divided into four aliquots. Each aliquot was diluted with the first extender



(ultra-high-temperature-treated skim milk [0% fat; Holay®, Argentina], 20% egg yolk, 1 mg/ml benzyl penicillin, 1 mg/ml dihydrostreptomycin sulphate and 0% glycerol) and after 2 (traditional protocol; Control), 24, or 48 h of equilibration at 4°C, a second dilution was performed (ultra-high-temperature-treated skim milk [0% fat; Holay®, Argentina], 20% egg yolk, 1 mg/ml benzyl penicillin, 1 mg/ml dihydrostreptomycin sulphate, 10% glycerol and Equex (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA) in 0.3 ml distilled water at 1%) to reach a final concentration of 100×10^6 spermatozoa/ml, 20% egg yolk, 5% glycerol, and Equex at 0.5%. Then, the semen samples corresponding to the four aliquots were packed into 0.5 ml plastic straws which were placed horizontally on a rack situated above the surface of liquid nitrogen at a distance of 4 cm for 15 min. Finally, the straws were plunged into and stored in the liquid nitrogen until evaluation.

Approximately 2 weeks after freezing, the straws were thawed in a water bath at 37°C for 1 min and then poured into a glass tube pre-warmed to 37°C. After warming (37°C) for 5 min, the semen was analyzed to determine the percentages of total and forward sperm motility, live/dead, HOS positive, and acrosomal integrity. The techniques used to evaluate the

thawed semen were the same as those described previously in experiment 1. The experiment was repeated five times.

Statistical analysis

The sperm data (mean \pm SEM; i.e., total and forward motility, live spermatozoa, and sperm cells with intact plasmalemma and acrosomes; all in percentages) were compared among treatments (2 vs. 24 vs. 48 vs. 72) using a repeated analysis of variance. When significant differences were found, the means were compared using the Tukey test. Values were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Experiment 1

Total ($P < 0.01$) and progressive ($P < 0.01$) motility decreased over time in the 4 diluents (Fig. 1, Inset), with COM and PRO yielding the best and the worst performance, respectively. Furthermore, MEY differed from PRO ($P < 0.01$) and SMI ($P < 0.01$), but not from COM.

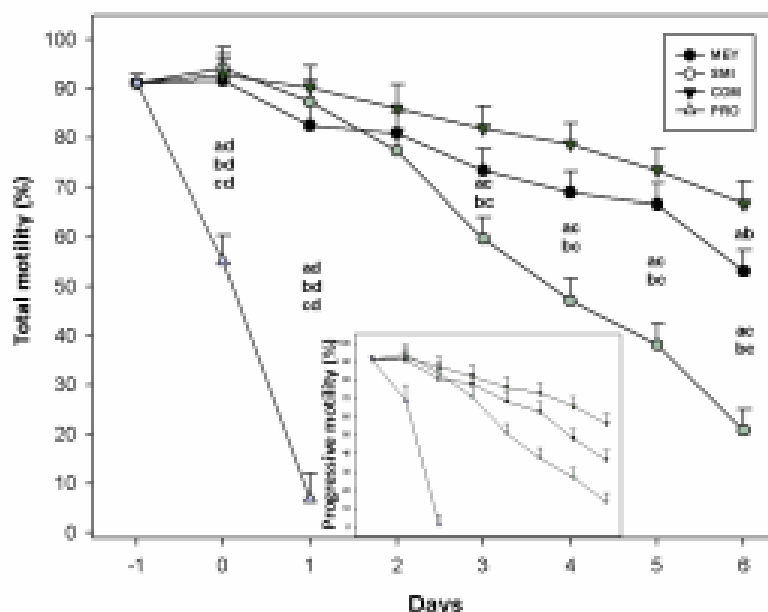


Figure 1. Percentage (Mean \pm SEM) of total and progressive (Inset) motility of dog semen stored in three different extenders (commercial, COM; skim milk, SMI; skim milk-egg yolk, MEY; control, PRO) at 4°C for six days. Different letters within the same day indicate differences ($P < 0.05$) between groups.



Percentage of normal acrosomes ($P < 0.05$; Fig. 2) and positive endosmosis ($P < 0.01$; Table 2) diminished in the 3 treatments throughout the study period. While there were no significant differences in the percentage of endosmosis among the 3 extenders, acrosome integrity was higher in MEY when compared to SMI ($P < 0.05$). The pH remained within the normal physiological range in the 3 groups throughout the study period ($P > 0.1$). The remaining semen characteristics such as live spermatozoa ($P > 0.1$) and osmolarity ($P > 0.1$) slightly declined throughout the study, with no differences among extenders (Table 2).

Experiment 2

Seven (7/8; $P > 0.1$) bitches from each group became pregnant and whelped normally at term. Litter size ranged from 4 to 12 puppies depending on dam's size, which was within the expected number for each breed.

Experiment 3

Post-thaw total and forward sperm motility decreased ($P < 0.05$) with increasing cooled storage time before freezing, although no significant differences in total and forward motility, normal acrosomes, positive endosmosis, live spermatozoa, and positive endosmosis were found between 2 and 24 h storage (Table 3).

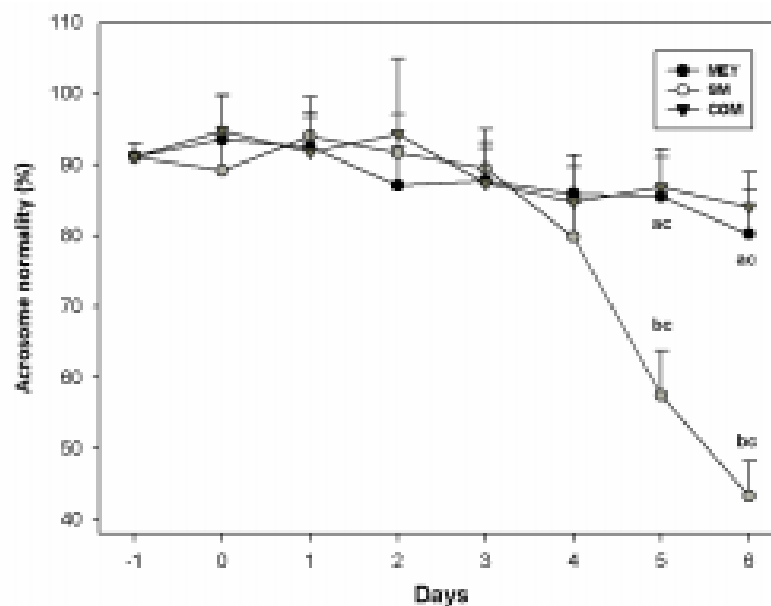


Figure 2. Percentage of normal acrosomes (mean + SEM) of dog semen stored in three different extenders (commercial, COM; skim milk, SMI; skim milk-egg yolk, MEY) at 4°C for six days. Different letters within the same day indicate differences ($P < 0.05$) between groups.

Table 2. Parameters (mean + SEM) of dog semen stored in three different extenders (commercial, COM; skim milk, SMI; skim milk-egg yolk, MEY) at 4°C for six days.

Day	Semen parameters											
	Live spermatozoa (%)			Endosmosis (%)			Osmolarity (mOsm)			pH		
	SMI	MEY	COM	SMI	MEY	COM	SMI	MEY	COM	SMI	MEY	COM
0	94.5 ± 7.4	91.6 ± 6.9	91.3 ± 4.9	91.3 ± 4.9	91.6 ± 4.9	91.1 ± 3.4	309.0 ± 9.1	309.1 ± 9.1	311.5 ± 9.0	6.7 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.7 ± 0.0
1	82.8 ± 6.9	90.5 ± 6.9	81.6 ± 5.4	88.7 ± 4.9	87.7 ± 4.9	91.0 ± 2.4	312.0 ± 9.1	312.8 ± 9.1	318.5 ± 9.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0
2	83.7 ± 6.9	89.1 ± 6.9	82.4 ± 6.3	76.5 ± 4.9	83.2 ± 4.9	85.2 ± 3.7	304.6 ± 9.6	319.6 ± 9.1	325.1 ± 11.4	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0
3	76.9 ± 7.9	87.9 ± 7.3	77.2 ± 5.1	71.5 ± 5.4	69.1 ± 5.1	75.6 ± 2.4	299.8 ± 14.5	321.1 ± 11.3	326.0 ± 9.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0
4	66.8 ± 6.9	82.5 ± 6.9	76.0 ± 5.1	59.1 ± 4.9	62.3 ± 4.9	64.1 ± 2.4	330.7 ± 9.6	326.7 ± 9.4	321.0 ± 9.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.0
5	61.4 ± 7.9	77.3 ± 7.3	75.2 ± 5.8	54.8 ± 5.4	54.5 ± 5.1	57.3 ± 3.5	338.8 ± 14.5	326.9 ± 12.6	307.0 ± 9.0	6.5 ± 0.0	6.6 ± 0.0	6.5 ± 0.0
6	53.3 ± 7.9	58.3 ± 7.3	71.1 ± 5.1	36.5 ± 5.8	39.4 ± 4.6	40.4 ± 3.2	355.5 ± 14.5	363.5 ± 11.3	319.0 ± 9.0	6.6 ± 0.0	6.5 ± 0.0	6.6 ± 0.0



Table 3. Percentage of frozen thawed parameters (mean + SEM) of milk-egg yolk diluted canine semen stored for 2, 24, or 48 h at 4°C before freezing.

Storage time (h)	Seminal parameters				
	Total motility	Progressive motility	Live spermatozoa	Endosmosis	Intact acrosome
2	67.4 ± 6.3 ^a	63.2 ± 5.7 ^a	65.0 ± 8.2	52.8 ± 6.3	93.8 ± 0.1
24	48.1 ± 6.1 ^{ab}	44.8 ± 5.7 ^{ab}	53.4 ± 8.2	46.0 ± 5.8	87.8 ± 0.1
48	40.0 ± 3.5 ^b	34.2 ± 5.2 ^b	53.2 ± 4.8	47.2 ± 4.9	88.0 ± 8.0

Different letters within the same row indicate differences ($P < 0.05$).

Discussion

This study attempted to identify a low cost, efficient, and practical canine semen extender so that chilled semen for AI could be widely available and more affordable for worldwide breeders of purebred dogs. Although pregnancy rates and prolificacy are the optimal ways to evaluate the efficacy of a semen extender, in experimental conditions, the combination of various tests usually correlates with potential fertility (Rota et al., 1995). Thus, spermatozoa must have good motility to reach the oviduct and an intact plasmalemma and acrosome for zona pellucida binding and oocyte fusion. Despite the fact that in this trial motility had to be subjectively estimated because computerized techniques (such as CASA) cannot be used for milk based extenders, this limitation was compensated for by having each sample evaluated by two trained observers and finally by the *in vivo* fertility tests.

The beneficial effects of egg yolk supplementation to this milk based extender were demonstrated in both motility and acrosome integrity evaluations. These results are in line with previous reports using other laboratory prepared chilling extenders in other species (Salamon and Maxwell, 2000) and also in dogs (Iguer-Ouada and Versteegen, 2001).

In this *in vitro* experiment, MEY showed a better performance than in a previous study in dogs (Rota et al., 1995), maintaining >70% of progressive motility up to day 2 and >80% normal acrosomes up to day 4. Conversely, plasmalemma integrity was lower than previously reported using this diluent (Rota et al., 1995). These differences could be due to the diluent components (i.e., milk and egg yolk), the animals used, or to the subjective evaluations carried out in both studies.

It is noteworthy that the changes in pH found in this experiment during the study period were within the physiological range reflecting good buffering capacity of both milk based extenders. These pH findings were in accordance with a previous report using a similar MEY extender (Rota et al., 1995). The acceptable *in vitro* semen parameters obtained guaranteed the following *in vivo* assessment of the MEY extender.

In line with the *in vitro* results, the 24 h cooled MEY diluted semen remained fertile, as pregnancy rate

was normal (approximately 88%) and not different from that of fresh undiluted semen. Interestingly, prolificacy also seemed to be normal for each particular breed. The failure of one bitch to conceive cannot directly be attributed to semen processing as it occurred in both groups. Furthermore, a complete breeding examination was not carried out on any of the dogs, and other etiologies of infertility could have been present. With these results in mind, it would also be interesting to test the *in vivo* effect of 48 h storage of the MEY diluent.

It has already been demonstrated that ejaculated dog semen can be successfully frozen after 1-2 days of cooled storage in a Tris-glucose-egg-yolk extender (TEY; Hermansson and Linde-Forsberg, 2006; Santana et al., 2013). In the present study, it was confirmed that the same is true, at least for the first 24 h, for this milk-egg yolk chilling extender which could function as a prolonged equilibration previous to freezing in semen banks. For this reason, the exact same cooling extender (i.e., without glycerol) was used for the first dilution. Although the cooled storage time interval showed a gradual negative effect on thawed semen motility, during the first 24 h both total and progressive motility did not show any differences from the samples frozen by our conventional cryopreservation method. Furthermore, acrosomes, viability, and membrane functionality were not significantly affected by cooling time.

Using this milk based extender, post-thaw motility was slightly lower than that described for TEY diluent after 24 h cooled storage (Hermansson and Linde-Forsberg, 2006; Santana et al., 2013). These differences could be attributed to the fact that no thaw medium was used in this trial, and samples were directly assessed after thawing. Conversely, membrane and acrosome integrity were within the range previously described in the previously mentioned reports (Hermansson and Linde-Forsberg, 2006; Santana et al., 2013).

The results clearly demonstrate that cooling canine semen in this milk-egg yolk extender up to 24 h before freezing does not produce a decrease in semen quality when compared to semen frozen by a traditional procedure (i.e., with only 2 h cooling at 4°C). More studies are still necessary to find out if the fertilizing capacity of spermatozoa is affected by cold storage prior to freezing using this practical milk based extender.

According to these *in vitro* and *in vivo* results,



this milk-egg yolk extender could be considered not only simple to prepare and economically accessible, but also efficient, for canine semen chilling. A contribution to canine welfare, genetics, and reproduction will be made, particularly in countries where the costs of expensive commercial semen extenders limit the wide application of semen preservation. Furthermore, the semen diluted in this extender could be successfully frozen after 1 day of cooled storage. This way, worldwide canine semen interchange would benefit from the inclusion of new import countries. Importantly, for zoonotic reasons, the source of these proteins (eggs and/or milk) must be controlled and should be tested prior to use.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper have a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This study was partially funded by the University Incentive Program for Teaching and Research (V 195 to CG). The authors are Career Scientists (PMB, YC and CG) and a Fellow (JDD) of the National Research Council, Argentina.

References

- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon J, Magistrali M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci*, 68:181-190.
- Cardoso RC, Silva AR, Silva LD, Chirinda VH, Souza FF, Lopes MD. 2007. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod Domest Anim*, 42:11-16.
- England G, Plummer J. 1993. Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 47:261-270.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65:584-593.
- Iguer-Ouada, M, Versteegen JP. 2001. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55:671-684.
- Jones RC, Martin ICA. 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 35:311-320.
- Linde-Forsberg C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled, extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg Small Anim*, 10:48-58.
- Mattoon J, Nyland T. 1995. Ultrasonography of the genital system. In: Nyland T, Mattoon J (Ed.), *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. Philadelphia: WB Saunders, pp. 141-164.
- Maxwell W, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5:613-638.
- Olson PN, Thrall MA, Wykes PM, Nett TM. 1984. Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 6:288-297.
- Rota A, Strom B, Linde Fosberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44:885-900.
- Rota A, Frisling A, Vannozzi I, Camillo F, Romagnoli S. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 57:377-381.
- Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 162:77-111.
- Santana M, Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Niño T, Cabrera F, Gracia A. 2013. Influence of cool storage before freezing on the quality of frozen-thawed semen samples in dogs. *Reprod Domest Anim*, 48:165-170.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5:639-658.

Refrigeración de semen canino

Jorge Díaz | Carla Yallente | Yanina Corrada | Cristina Gobello

Cátedra de Fisiología | Laboratorio de Nutrición Mineral & Fisiología Reproductiva.
FCV/UNLP-CONICET

INTRODUCCIÓN

Poco tiempo atrás (Octubre 2008), la Federación Cinológica Argentina (FCA), reconocida por la Federación Cinológica Internacional, ante petitorio realizado por criadores registrados de todo el país, aprobó la inseminación artificial (IA) con semen preservado. Esta aprobación por la FCA representa un avance importantísimo en la cinofilia del país, y abre un panorama alentador para el intercambio de semen tanto a nivel nacional como internacional.

Si bien la IA en las especies de producción representa, básicamente, un instrumento fundamental para la mejora genética, en la especie canina posee, además, múltiples aplicaciones clínicas para solucionar problemas de apareamiento o infertilidad. Además, la adecuada preservación, con la consiguiente posibilidad de transportar el semen a distintos lugares geográficos, sin necesidad de movilizar los reproductores, resulta de gran valor práctico. El transporte nacional e internacional de semen preservado reemplaza el costoso, y muchas veces riesgoso, traslado de animales para los servicios.

Considerando las grandes posibilidades que estas técnicas biotecnológicas brindarán en el futuro de la reproducción canina nacional, el objetivo de la presente actualización fue proporcionar información general sobre el uso del semen refrigerado en la especie.

USO DE SEMEN REFRIGERADO

En los perros, la dilución y refrigeración de semen a 4°C demostró que permite conservar espermatozoides fecundantes por periodos que van desde los 2 ó 3 días hasta los 10 días con técnicas especiales. Este periodo resulta suficiente para trasladar y utilizar el semen de un reproductor en lugares geográficamente distantes en el país y en países limítrofes. Al respecto, las regulaciones para transporte y exportación de semen refrigerado son mucho menos complicadas y costosas que para el caso del congelado o incluso, para el traslado del propio reproductor. El semen enfriado se envía generalmente en un recipiente térmico común o dentro de una caja de poliestireno con bolsas de hielo en su interior. Este envoltorio es liviano y no necesita devolución al lugar de origen lo cual contribuye a mantener bajos los costos de envío.

El entriado es posible realizarlo en laboratorios de baja complejidad, además de poder actuar, potencialmente, como una estabilización prolongada previa a la congelación en centros con equipamiento apropiado y personal entrenado. El semen refrigerado puede ser fácilmente depositado intravaginal sin el entrenamiento y/o equipamiento que la deposición intrauterina del semen congelado obligatoriamente requiere en esta especie que posee características anatómicas del aparato genital posterior muy particulares.



Procedimiento de inseminación artificial en el Laboratorio de Fisiología, FCV-UNLP.

Mediante el agregado de diluyentes apropiados, el semen puede refrigerarse a 4°C y de esta manera ser conservado. Las bajas temperaturas disminuyen la tasa metabólica del espermatozoide y prolongan su longevidad. Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad. Además, los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en aquellos diluyentes que contienen yema de huevo. Para la conservación de semen a 4 °C se usaron diferentes diluyentes. Dentro de los más utilizados se encuentra el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo además de una amplia gama de diluyentes comerciales importados con fórmulas no reveladas. Lamentablemente, en nuestro medio estos últimos resultan excesivamente costosos.

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del eyaculado y se la mezcla en una relación 1:3 o 1:4 con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Posteriormente, la mezcla se enfría en la heladera por un periodo que puede llevar 1 o 2 horas para luego poder acondicionarse y enviarse al lugar

donde se realizará la IA.

En conclusión, sin desmerecer las indicaciones específicas e irremplazables de la técnica de congelado, el refrigerado de semen como método de conservación seminal es, por múltiples razones, más sencillo y menos costoso. Esto hace que el enfriamiento, se vislumbre como la primera técnica a adoptar en esta nueva etapa de la producción canina nacional facilitando y aumentando las posibilidades de uso de los reproductores.

* Los Docentes - Investigadores de la Cátedra de Fisiología (Laboratorio de Fisiología Reproductiva) a fin de cumplimentar requerimientos estadísticos de sus proyectos ofrecen la inseminación artificial sin cargo a caninos derivados por Profesionales para tal fin.

Cátedra de Fisiología (Laboratorio de Fisiología Reproductiva) Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. 60 y 118, La Plata
Tel: (0221) 4236663/4 - 4249621 - 4247642. Int. 448
E-mail: jdlia@fcv.unlp.edu.ar, carvalente@fcv.unlp.edu.ar, egobello@fcv.unlp.edu.ar



Primera camada (5 cachorros) nacida de una perra inseminada con semen refrigerado en la Cátedra de Fisiología. Uno de los cachorros murió al nacer.

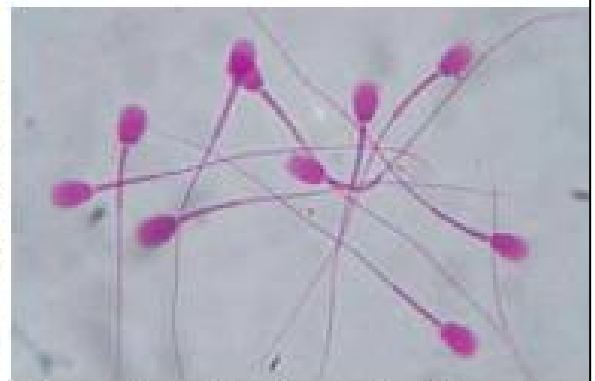


Imagen microscópica de espermatozoides caninos teñidos con rosa de Bengala (1000 X).



Parte de los Docentes – Investigadores de la Cátedra de Fisiología, FCV-UNLP

LECTURAS SUGERIDAS

1. Linde Fosberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet. Med. Surg. (Small Anim)*. 1995; 10: 48-58.
2. Linde Fosberg, C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. *Enc Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Concannon, P; G. England; J. Versteegen (eds.). Ithaca. International Veterinary Information Service. 2001.
3. Iguer-Quada, M.; Versteegen N., JF. Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 2001; 55:671-684.
4. Hermanson U, Linde Fosberg C. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2006; 65:584-593.
5. Ettinger SJ, Feldman ER. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ed. Saunders Philadelphia (United States). 1995; p.1664-1662.
6. Versteegen J, Iguer-Quada M, Ondin R. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57:149-179.
7. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Enc Kirk RW (ed). Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice*. W.B. Saunders, Philadelphia (United States). 1989; p.1247-1259.
8. Fosberg CL. Artificial insemination with semen fresh chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin in Veterinary Medicine and Surgery*. 1995; 10:48-58.
9. Watson PE. The preservation of semen in mammals. *Enc Finn CA (ed). Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 1979; 1:283-350.
10. Fosberg CL. Artificial insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin in Veterinary Medicine and Surgery*. 1995; 10:48-58.
11. Gill HF, Kaufman CE, Foote RH, Kirk RW. Artificial insemination of Beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 1970; 31:1807-1813.
12. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1991; 21:545-551.
13. Johnston DU, Kautritz MN; Olson, P. *Canine and feline Theriogenology*. Ed. Saunders. Philadelphia (J). 2001; p.287-306.

Inseminación artificial en la perra

MV Jorge Díaz | Dra. Carla Valiente | Dra. Cristina Gobello



Cátedra de Fisiología
Laboratorio de Fisiología Reproductiva
FCV/UNLP-CONICET

La Dra Carla Valiente y el MV Jorge Díaz junto a uno de los cachorros de la camada de la Foto 2 a los 50 días de su nacimiento.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) en la cría de caninos es una biotecnología que ofrece una solución a numerosas situaciones en las que el servicio natural no es posible.

Existen diversas circunstancias por las cuales se recurre a la IA, entre ellas, podemos citar: carácter agresivo por parte de la hembra o el macho, incapacidad de monta por diversas enfermedades (musculares, articulares), defectos de conformación adquiridos (impotencia coeundi), problemas de conducta (timidez, apatía o aversión hacia la hembra), inexperiencia, falta de libido por parte del perro, rechazo del macho por la hembra, distancia geográfica entre el macho y la hembra, etc.

Esta biotecnología puede ser de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen utilizado; este último puede ser: fresco, refrigerado o congelado. La inseminación con semen fresco consiste en la extracción manual del semen y su inmediata introducción en las vías genitales de la hembra. Los resultados son comparables con los de un servicio natural. En el caso de la IA con semen refrigerado, luego de la extracción, se realiza una dilución del semen en un

diluyente para tal fin y su refrigeración a 4 - 6° C grados centígrados que permite preservar a corto plazo (alrededor de 24 a 72 hs) la viabilidad espermática. Al momento de la IA, el semen es introducido directamente en el interior de la vagina al igual que el semen fresco. Esta técnica ofrece la posibilidad del transporte del semen y la inseminación a distancia y permite evitar el daño excesivo que se produce en los espermatozoides al congelarlos, siendo, generalmente, los resultados de preñez algo mejores que los obtenidos con semen congelado. Para la congelación, se requiere de una dilución previa del semen, de esta manera puede ser conservado por años. La desventaja de este último es que al contar con un bajo porcentaje de espermatozoides y con menor viabilidad, el semen congelado debe ser depositado dentro del útero, técnica que en la hembra canina es compleja y requiere de experiencia y un equipamiento especial. Además, las reglamentaciones y el costo para el transporte de semen congelado son mayores a las requeridas para el semen refrigerado.

La utilización de semen conservado permite la mayor dispersión de rasgos genéticos deseables, prevención de enfermedades, disminución de costos al no tener la necesidad de transportar los animales, reducir los peligros de embarcar un perro y evitar el estrés del transporte.

DETECCIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO PARA REALIZAR LA IA

La IA debe ser realizada en el momento adecuado para que los espermatozoides puedan interrelacionar con óvulos maduros capaces de ser fecundados. Existen distintos métodos para determinar el momento de la IA con distinta eficacia, practicidad, exactitud y costo de los mismos.

Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios. Entre los métodos subjetivos se encuentran el conteo de los días del ciclo estral, las características de la descarga vulvar, la conducta del macho frente a la hembra y de ésta frente al perro. La duración de cada etapa del ciclo es altamente variable, y muchas perras tienen descarga vulvar sanguinolenta durante la etapa fértil; a su vez, el perro es atraído por cualquier tipo de descarga que provenga de una perra, inclusive las patológicas. En el caso de la hembra, la conducta se manifiesta por la aceptación del macho e inclusive su búsqueda activa, acompañada de quietud y lateralización de la cola cuando el perro se acerca a cortejarla. También puede suceder que la perra "elija el macho", no aceptando al seleccionado por el criador para el servicio. Si bien la hembra, generalmente, acepta al macho durante el periodo fértil, puede no hacerlo, o inclusive aceptarlo fuera de su del mismo. Por lo dicho anteriormente, no se recomienda sustentarse en ninguno de estos parámetros exclusivamente, ya que tienen un alto grado de error. A continuación, se describen los métodos de mayor confiabilidad con los que contamos para determinar el momento de mayor fertilidad en el ciclo estral canino:

Inspección y palpación de la vulva: es importante evaluar los cambios del tamaño y consistencia vulvares. Durante el periodo fértil, la vulva deja de estar turgente para sufrir un ablandamiento notable a la palpación.

Vaginoscopia: Permite visualizar por medio de un vaginoscopio los cambios de la mucosa vaginal a lo largo del ciclo. Durante la etapa de mayor fertilidad, la mucosa se presenta de un color rosado pálido y con un arrugamiento que va en aumento a lo largo del estro, en correspondencia con el descenso de los niveles de estrógeno.

Citología vaginal: La citología vaginal es un método complementario que refleja los niveles de estrógeno en sangre. Debido a su elevación durante el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células luminales (denominadas superficiales) se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia la muerte. Este fenómeno puede visualizarse claramente en extendidos vaginales senados; el comienzo de los servicios o IA

con semen fresco están indicados cuando las células superficiales alcanzan un porcentaje mayor al 80% del frotis y se continúan mientras se mantenga ese cuadro citológico.

Determinaciones hormonales: El dosaje de progesterona sérica hace posible asumir el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de hormona luteinizante (LH). La ovulación ocurre, aproximadamente, 48 horas luego de ocurrido el pico preovulatorio de LH (inicio del estro). La posterior maduración del ovocito requiere aproximadamente 2 días. Por ende, podemos concluir que, una vez determinado el día del pico de LH, los óvulos estarían disponibles para ser fecundados a partir del día 4 ó 5 del ciclo, hasta unos 2 ó 3 días posteriores, momento a partir del cual comienzan a envejecer.

Estos métodos deben combinarse para poder emitir un diagnóstico más certero del momento óptimo para realizar la IA.

TÉCNICA DE INSEMINACIÓN CON SEMEN FRESCO O REFRIGERADO

Obtención del semen

Previo a la toma de muestra, se recomienda limpiar la zona prepucial y abdominal, siendo adecuado en perros de pelo largo cortar el pelo de la región. La recolección se realiza a través de la técnica de masturbación sobre un piso no resbaladizo. A fin de facilitar la eyaculación, resulta de utilidad contar con la presencia de una hembra en celo o, en su defecto, una perra a la cual se le aplica tópicamente en la región perineal un hisopo impregnado en descargas vulvares de una perra en celo. Es importante la presencia del menor número posible de persona, a fin de reducir el estrés y distracciones externas del macho al momento de la extracción.

Si el profesional es diestro, se colocará a la izquierda del reproductor. Luego de realizar una estimulación leve del bulbo del pene mediante masaje suave a través del prepucio, procederá rápidamente, y antes que se produzca una erección total, a correr el prepucio por detrás del bulbo del pene. Si esto no fuera posible, la presión del bulbo ingurgitado presionaría contra el prepucio ocasionando dolor e impidiendo la total erección y posterior eyaculación del animal. Una vez retirado el prepucio, se realiza una presión sostenida en caudal del bulbo. La primer fracción que el animal eyacula es la pre espermática, carente de espermatozoides y de muy escaso volumen. Le sigue la fracción espermática, rica en espermatozoides, por lo que se colecta en su totalidad cuando se desea realizar la inseminación artificial. Luego de la fracción espermática, comienza a eyacular de forma pulsátil la última



Momento de la IA en el que se eleva el tren posterior de la hembra mientras se masajea la zona perineal para facilitar el transporte espermático.



Camada de 3 cachorros, de raza Shih tzu, de 2 semanas de edad concebidos por IA.



Espermatozoides teñidos con Rosa de Bengala (X 1000 a) para observación de la morfología espermática.

fracción, llamada prostática, la cual es transparente, carente de espermatozoides y de mayor volumen. Es aquí donde el pene se gira 180° hacia atrás, simulando la posición tomada en el servicio natural (abotonamiento). De esta última fracción, se colecta sólo la cantidad suficiente para asegurar la recogida de toda la segunda fracción o fracción espermática. Una vez concluida la colección del semen, se controla la reintroducción normal del pene en el prepucio.

Inseminación

El semen colectado puede inseminarse en la vagina (inseminación intravaginal) o en el útero (inseminación intrauterina). En nuestro medio, la inseminación intravaginal es la empleada rutinariamente por ser una técnica sencilla y de bajo costo. Como se mencionó anteriormente, la inseminación intrauterina se reserva para el semen congelado o de mala calidad, debido a que es una técnica de mayor complejidad y que requiere de un entrenamiento y equipamiento especializado. La inseminación intravaginal se realiza con un catéter plástico, de distintas medidas según el tamaño de la perra, al que se adosa en su extremo una jeringa conteniendo el semen a inseminar, siendo posible utilizar, asimismo, una sonda urinaria rígida. En algunos casos, el dedo índice, enguantado, ayuda a evitar la fosa del clítoris y la uretra. El catéter o la sonda se introduce primero hacia dorsal y luego cranealmente, respetando la anatomía del vestíbulo y vagina, con la perra en estación. Una vez ubicado el catéter lo más craneal posible de la vagina, se adosa la jeringa donde tenemos el semen cargado y se descarga completamente. Por último, se pueden cargar 1-2 cc de aire en la jeringa a fin de expulsar semen retenido en el espacio muerto del catéter.

Inmediatamente posterior a la IA, los miembros posteriores de la hembra se elevan por alrededor de 15 minutos, masajeando conjuntamente la región perineal, a fin de estimular las contracciones uterinas, evitando

el reflujo de semen y facilitando el transporte de los espermatozoides hacia el aparato genital craneal.

CONCLUSIÓN

La realización de la IA es una técnica útil que brinda la valiosa posibilidad de dejar descendencia de perros de alto valor genético que, por diversos motivos, se encuentran imposibilitados de realizar el servicio natural. Sin embargo, es necesario tener en cuenta algunos factores sumamente importantes en su aplicación; por ejemplo, el estado de salud y nutrición de los reproductores, la detección del momento de mayor fertilidad de la hembra, el tipo, el manejo y la calidad del semen utilizado y la implementación de una técnica adecuada de IA. Teniendo en cuenta estos factores, será factible de lograr el éxito en la concepción mediante la utilización de esta técnica.

Los Docentes - Investigadores de la Cátedra de Fisiología (Laboratorio de Fisiología Reproductiva) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP ofrecen la inseminación artificial sin cargo a caninos derivados por profesionales para tal fin. Proyecto de Incentivos Docentes V 195 (FCV-UNLP)
Cátedra de Fisiología (Laboratorio de Fisiología Reproductiva) Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. 60 y 118, La Plata.

Contacto: Dra Gobello y MV Jorge Díaz, Te: (0221) 15-5864059 E-mail: jdiaz@fcv.unlp.edu.ar