

Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino

E. Herrera¹, L. Castro^{2*} y J. Chacón²

1 Agroservicios El Salitre, Santa Ana, San José, Costa Rica.

2 Cátedra de Reproducción, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estandarizar el procedimiento de congelamiento de semen canino y evaluar diversas concentraciones y tiempos de agregación de glicerol en el diluyente "Tris-fructosa con yema de huevo" sobre la motilidad espermática y la morfología del acrosoma posdescongelamiento. Se usaron 4 protocolos con dos diluciones en cada uno, la primera dilución se realizó entre 37°C y 36°C y se equilibró por una hora a 7°C; la segunda se realizó a 7°C y se equilibró por una hora a 4°C. Los protocolos utilizados fueron los siguientes: 1) la primera dilución se realizó con glicerol al 0% y la segunda con glicerol al 7%; 2) la primera y segunda dilución se hicieron con glicerol al 3.5%; 3) la primera y segunda dilución con glicerol al 7%; y 4) la primera dilución con glicerol al 0% y la segunda con glicerol al 14%.

Para el estudio, se seleccionaron 14 perros de diversas razas, que presentaban al examen andrológico un estatus satisfactorio y cuyo examen seminal mostraba una motilidad progresiva y una morfología normal igual o mayor al 80%. De cada animal, se recolectó la segunda fracción del eyaculado y se dividió en 4 porciones iguales. El semen fue empacado en pajillas de 0,5 ml y congelado bajo el método manual. Las pajillas se descongelaron en un baño de agua a 70°C por 8 segundos y seguidamente se evaluó la motilidad y el daño acrosómico con un microscopio de contraste de fases.

Posterior al descongelamiento, se obtuvo una motilidad promedio de 51.25% (48.57% con el protocolo 1, 50.71% con el protocolo 2, 52.50% con el protocolo 3 y 53.21% con el protocolo 4) y al evaluar la morfología de los acrosomas por contraste de fases posdescongelamiento, se determinó un porcentaje de acrosomas normales de 56.82% con el protocolo 1, 59.96% con el protocolo 2, 59.18% con el protocolo 3 y 63.86% con el protocolo 4.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) al variar la concentración de glicerol y el tiempo de agregación del mismo. Por lo tanto, el semen canino parece ser resistente a diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente Tris-fructosa con yema de huevo y la variación en el tiempo de agregación del mismo no parece afectar la motilidad progresiva e integridad del acrosoma posdescongelamiento.

PALABRAS CLAVES: Semen, Canino, Congelamiento, Descongelamiento, TRIS-fructosa, Yema de huevo, glicerol.

Evaluation of the effect of glicerol in the freezing process of canine semen

ABSTRACT

The main objective of this study was to standardize and evaluate the effect of different glycerol addition protocols over the sperm motility and the acrosome morphology after thawing in canine semen. Different concentrations of glycerol and different times of Tris-fructose with egg yolk addition were used. Four different protocols were prepared. Each protocol had two dilution steps. In protocol 1, the first dilution used the extender but no glycerol and the second dilution used the extender plus 7% of glycerol. In protocol 2, both dilutions included the extender plus 3.5% of glycerol. In protocol 3, both dilutions used the extender plus 7% of glycerol. In protocol 4, the first dilution used the extender plus 0% of glycerol, while the second dilution used the extender plus 14% of glycerol. In all the protocols, the first dilution was carried out between 37 and 36°C, the extended

Fecha de recepción: 7 de agosto de 2009.

Fecha de aceptación: 26 de julio de 2011.

Fecha de publicación: 16 de setiembre de 2012.

*Autor para correspondencia: lcastro@medvet.una.ac.cr

semen was equilibrated at 7°C for one hour, while the second dilution was carried out at 7°C and subsequently equilibrated at 4°C for one hour.

A total of 14 dogs of different breeds were selected for the study, which had a satisfactory andrological status and their semen presented a minimum of 80% normal morphology and progressive motility. From their ejaculates, only the second fraction was collected and subsequently divided in 4 equal parts. The semen was packed in straws of 0.5 ml and they were frozen using the manual method. The straws were thawed in a water bath at 70°C for 8 seconds, and the motility and acrosome morphology were immediately evaluated using a phase contrast microscope.

Post thawing, the semen showed an average motility of 51.25% (48.57% with protocol 1, 50.71% with protocol 2, 52.50% with protocol 3 and 53.21% with protocol 4) and the acrosome morphology using a phase contrast microscope showed a percentage of normal acrosomes of 56.82% with protocol 1, 59.96% with protocol 2, 59.18% with protocol 3 and 63.86% with protocol 4.

Finally, there were not significant effects ($p>0.05$) of the time of glycerol addition or the different glycerol concentrations used, on the percentages of progressive motility and normal acrosome morphology in post-thawed semen samples. Therefore, the canine semen appears to be resistant to the use of different concentrations of glycerol in the extender Tris-fructose with egg yolk. Likewise, the variation of time of glycerol addition did not have any influence on the post-thaw semen quality, in relation to the progressive motility and acrosome integrity.

KEYWORDS: Semen, Canine, Freezing, Thawing, TRIS-fructose, Egg yolk, Glycerol.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día la crianza de perros no es solo un pasatiempo, sino que también una importante fuente de remuneración económica tanto en el ámbito nacional como internacional, por lo que se ha incrementado en los últimos años el interés en el comercio mundial de material genético, tal como el semen congelado. Esto genera una mayor demanda de médicos veterinarios especializados en la evaluación, preservación del semen y realización de las inseminaciones, así como también, en la investigación sobre el tema. La posibilidad de preservar y transportar material genético de los mejores perros del mundo ha abierto, por tanto, un nuevo capítulo en la historia de la crianza de los perros (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

La primera inseminación artificial con semen congelado exitosa fue lograda por Seager y Platz en 1969. Actualmente, se obtienen porcentajes de preñez satisfactorios, tanto en la práctica clínica como en la experimental, siempre y cuando el protocolo de criopreservación usado sea adecuado y

el tiempo de la inseminación esté bien determinado (Rota et al., 1998). Se han reportado mejores resultados cuando la deposición del semen se da directamente en el útero, debido a la corta supervivencia de los espermatozoides criopreservados (England, 1993; Silva y Verstegen, 1995; Rota et al., 1998; England, 2000; Fastad, 2000), la cual se ha estimado en no más de 24 horas posdescongelación (Badinand et al., 1993).

La deposición del semen intrauterinamente se puede realizar al pasar el cérvix con un catéter Escandinavo o con endoscopía vaginal atravesando el cérvix con un catéter urinario (Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001; Stornelli et al., 2001; Tomasen et al., 2001; Linde-Forsberg, 2002). También se ha descrito el uso de la laparoscopía para tal fin (Silva et al., 1995).

A pesar de lo anterior, aún se desconoce cuál es el número de espermatozoides requeridos para una inseminación efectiva (Nöthling et al., 1997), recomendando algunos autores realizar deposiciones de 150 a 200 x 10⁶ espermatozoides móviles por inseminación (Morton y Bruce, 1989; Rodríguez-Martínez et al., 1993),

aunque otros han publicado buenos resultados utilizando sólo 50×10^6 espermatozoides (Nöthling et al., 1997). Las tasas de preñez podrían rondar entre un 60 y un 70%, siempre y cuando se cuente con un método eficiente para determinar el momento más indicado para la inseminación (Linde-Forsberg, 2001).

Los diluyentes para congelamiento deben tener una composición que proteja a los espermatozoides de los daños que causan el choque de frío y los procesos de congelación y descongelación, teniendo una osmolaridad similar a la del líquido seminal, manteniendo el pH, proporcionando un sustrato para el metabolismo del espermatozoide y conteniendo antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano (Linde-Forsberg, 2002).

Uno de los componentes que juega un papel determinante en el éxito de la congelación de espermatozoides es el crioprotector, ya que este es esencial para la supervivencia del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación (Linde-Forsberg, 2002).

Los crioprotectores pueden tener una acción extracelular (azúcares como la lactosa, proteínas y polivinyl pirrolidona) o intracelular (glicerol, DMSO y metanol) (England, 1993; Silva et al., 2003). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector más frecuentemente usado para el congelamiento de semen canino (England, 1993; Peña et al., 1998a; Rota et al., 1998; Linde-Forsberg, 2002; Silva et al., 2003). La concentración óptima del glicerol está determinada por la composición del diluyente, la velocidad de enfriamiento, el método de congelación y descongelación empleado y la especie animal, siendo este último factor el más determinante (Peña et al., 1998a). Diferentes concentraciones de glicerol han sido estudiadas en el canino, con mejores resultados obtenidos en el rango del 2 al 8% (Rota et al., 1998; England, 2000;

Farstad, 2000). Su principal función es reducir la concentración de sales y mejorar la cantidad de agua no congelada, tanto en el interior como en el exterior de la célula a cualquier temperatura (Linde-Forsberg, 2002).

También es conocido que el glicerol tiene efectos adversos sobre el espermatozoide durante su adición y en el proceso de congelación y descongelación, viéndose afectada la motilidad posdescongelación (Rota et al., 1998). La velocidad de congelamiento y descongelamiento, y la composición del diluyente interactúan con la concentración del crioprotector, por lo que se hace necesario variar los porcentajes de glicerol según el método de congelación (England, 1993; Linde-Forsberg, 2002). Esto indica que la supervivencia de las células durante la criopreservación depende de la concentración del crioprotector y la velocidad de congelamiento y descongelamiento escogidas (Rota et al., 1998).

Por lo anterior, se hace necesario estudiar más a fondo los efectos que sobre variables como motilidad espermática y morfología del acrosoma puedan tener las diferentes concentraciones de glicerol que se pueden utilizar con el diluyente Tris-fructuosa bajo el método de congelación manual y las variaciones en el tiempo de adición del glicerol al semen diluido (Linde-Forsberg, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en los laboratorios de las cátedras de Fisiología, Reproducción y Andrología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Se seleccionaron 14 machos adultos de las siguientes razas: Cocker Spaniel Americano (n=2), Rottweiler (n=3), Bouvier de Flandes (n=1), Cobradores Dorados (n=2), Beagle (n=2), Pastor Alemán (n=1), Schnauzer (n=1), Fox Terrier (n=1) y Pastor

Cuadro 1. Características seminales que debieron cumplir los donadores para ser incluidos en el estudio.

Color del eyaculado	Primera fracción: clara. Segunda fracción: entre blanco-cremoso. Tercera fracción: clara.
Porcentaje de motilidad progresiva	Mayor o igual a 80%.
Número total de espermatozoides	Igual o mayor a 200 X 10 ⁶ .
Morfología	Mayor o igual a 80% de espermatozoides normal.

Shetland (n=1), todos provenientes del gran área metropolitana. La selección se hizo con base en los resultados del examen andrológico (Keenan, 2000) que se realizó a cada uno de ellos, tomando como parámetro de selección solo aquellos animales que contaran con una conformación anatómica normal y con las características seminales que se detallan en el cuadro 1.

Estandarización de la muestra

Todos los machos fueron sometidos a una estandarización de las reservas seminales para la evaluación de la calidad de los eyaculados. Para ello, se extrajeron 3 eyaculados con un intervalo de 2-3 días entre cada uno. Los primeros 2 eyaculados fueron descartados y el tercero se recolectó para la evaluación y determinación de la calidad

seminal. Solo a los perros seleccionados, se les tomó un cuarto eyaculado, el cual se sometió a los cuatro protocolos en estudio.

Extracción del semen

La extracción se realizó usando el método manual (England, 2000; Keenan, 2000 y Johnston et al. 2001). Solo se recolectó la segunda fracción, la cual se colocó rápidamente en un baño de agua a 37 °C para evitar un choque térmico (Gutiérrez, 1988; Feldman y Nelson, 1996; Eilts, 1997; England, 2000; Keenan, 2000).

El cuadro 2, describe la composición de los diferentes diluyentes utilizados.

Protocolos puestos en práctica

Los protocolos utilizados en el presente estudio se detallan en los cuadros del 3 a 6.

Cuadro 2. Composición de los diluyentes usados en el estudio para el congelamiento del semen canino.

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Tris ^a	3.025g	Dihidroestreptomina ^c	0.2g
Ácido cítrico monohidratado ^b	1.7g	Agua bidestilada	A*. 80 ml B*. 77 ml C*. 73 ml D*. 66 ml
Fructosa ^c	1.25g	Yema de huevo	20 ml (20%)
Penicilina cristalina ^c	200 000 UI	Glicerol	A*. 0 ml B*. 3.5 ml C*. 7 ml D*. 14 ml

A*. Diluyente Tris sin glicerol.

B*. Diluyente Tris con 3.5% de glicerol.

C*. Diluyente Tris con 7% de glicerol.

D*. Diluyente Tris con 14% de glicerol.

a Fisher Scientific, New Jersey, USA.

b Merck, Alemania.

c Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento del semen canino

Cuadro 3. Protocolo 1: Solución Tris sin glicerol más solución Tris con un 7% de glicerol (0-7).

1° dilución (37°C)	1° periodo de equilibrio	2° dilución (7°C)	2° periodo de equilibrio	Congelación
1:1 (diluyente:semen) utilizando el diluyente Tris sin glicerol.	Se coloca la muestra a 7°C por una hora.	Se agrega el diluyente Tris con un 7% de glicerol hasta lograr una dilución 2:1.	Se coloca la muestra a 4°C por una hora.	Manual

Cuadro 4. Protocolo 2: Solución Tris con un 3.5% de glicerol (3.5-3.5).

1° dilución (37°C)	1° periodo de equilibrio	2° dilución (7°C)	2° periodo de equilibrio	Congelación
1:1 (diluyente:semen) utilizando el diluyente Tris con un 3,5% de glicerol.	Se coloca la muestra a 7°C por una hora.	Se agrega el diluyente Tris con un 3.5% de glicerol hasta lograr una dilución 2:1.	Se coloca la muestra a 4°C por una hora.	Manual.

Cuadro 5. Protocolo 3: Solución Tris con un 7% de glicerol (7-7).

1° dilución (37°C)	1° periodo de equilibrio	2° dilución (7°C)	2° periodo de equilibrio	Congelación
1:1 (diluyente:semen) utilizando el diluyente Tris con un 7% de glicerol.	Se coloca la muestra a 7°C por una hora.	Se agrega el diluyente Tris con un 7% de glicerol hasta lograr una dilución 2:1.	Se coloca la muestra a 4°C por una hora.	Manual

Cuadro 6. Protocolo 4: Solución Tris sin glicerol más solución Tris con un 14% de glicerol (0-14).

1° dilución (37°C)	1° periodo de equilibrio	2° dilución (7°C)	2° periodo de equilibrio	Congelación
1:1 (diluyente:semen) utilizando el diluyente Tris sin glicerol.	Se coloca la muestra a 7°C por una hora.	Se agrega el diluyente Tris con un 14% de glicerol hasta lograr una dilución 2:1.	Se coloca la muestra a 4°C por una hora.	Manual

Procesamiento del semen y dilución

Para fines de este estudio, se hizo una dilución 1:2 (semen:diluyente), con el fin de lograr un balance adecuado entre las cantidades de diluyente, volumen de fluido recolectado, amortiguador de pH y criopreservante (Johnston et al., 2001).

Al momento de utilizar los diferentes diluyentes, estos fueron descongelados en un baño de agua a 35°C (Farstad, 2000). Posteriormente, se procedió a la extracción del semen del macho seleccionado, colectando sólo la segunda fracción, como ya se ha descrito. En pocos casos en los que no se pudo separar de forma adecuada las fracciones a la hora de la recolección, se procedió a centrifugar la muestra (Rijsselaere et al., 2002). Luego, se anotó la motilidad progresiva, la cual fue evaluada utilizando cristalería precalentada a 38°C en una platina térmica a una magnificación de 400X, y el volumen de la fracción recolectada. Este volumen se dividió entre cuatro para obtener la cantidad tanto de semen como de diluyente para los diferentes protocolos.

Congelación y descongelación

El semen se congeló en vapor de nitrógeno utilizando el método descrito por Linde-Forsberg (2002), mientras que las pajillas se descongelaron en un baño de agua a 70°C por 8 segundos (Rodríguez-Martínez et al., 1993; Rota et al., 1998; England, 2000; Farstad, 2000; Linde-Forsberg, 2002; Tomassen et al., 2001). Antes de evaluar la motilidad, se dejó el semen a 37°C por 5 minutos para asegurar una buena activación del metabolismo espermático. Se consideraron con acrosomas dañados a aquellos espermatozoides que presentaron un desprendimiento parcial o total del acrosoma en un microscopio de contraste de fases (Figura 1).

Análisis de los resultados

El análisis estadístico de los datos fue realizado con la prueba Student's t-test del programa Microsoft® Excel 2002. Los datos fueron significativos cuando el valor p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

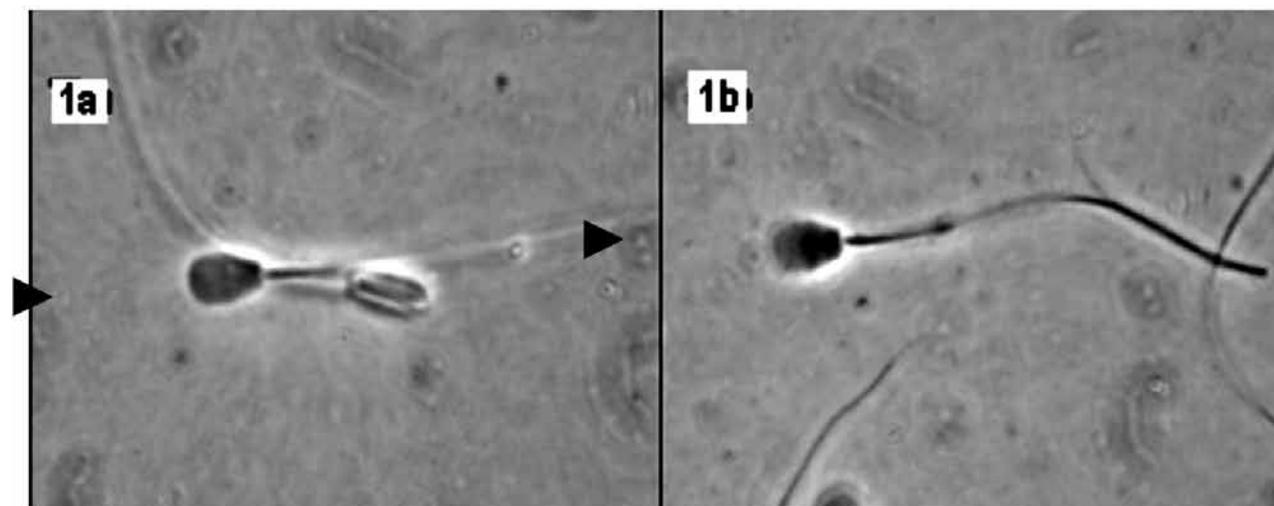


Figura 1. Fotografía de un espermatozoide con el acrosoma normal (1a) y uno con el acrosoma dañado (1b). **Figura 1a.** El contorno del borde apical (flecha) está bien definido lo que es indicativo de la integridad del acrosoma. **Figura 1b.** El contorno del borde apical (flecha) no es claro y hay un alo de distorsión alrededor del mismo lo que es indicativo del desprendimiento del acrosoma.

RESULTADOS

El promedio del volumen de la segunda fracción, motilidad progresiva, número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides normales en el eyaculado de los 14 perros en el estudio, se presenta en el cuadro 7.

Los resultados de la motilidad progresiva y de la integridad de los acrosomas, posterior a la descongelación en los cuatro protocolos evaluados, se resumen en los cuadros 8 y 9.

La evaluación del efecto que podría tener el tiempo de agregación del glicerol sobre la motilidad progresiva y el porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento, se estimó al comparar los resultados de los protocolos 1 y 2, los cuales tuvieron

una concentración final de glicerol en la dilución semen-diluyente de 2.33%, y de los protocolos 3 y 4 con una concentración final de glicerol en la dilución semen-diluyente de 4.66%. En ambos casos, (protocolo 1 vs 2, y protocolo 3 vs 4) no se obtuvieron efectos significativos sobre el tiempo de agregación del glicerol ($p > 0.05$), tanto para el porcentaje de motilidad progresiva como para el porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento.

Tampoco se obtuvieron resultados significativos ($p > 0.05$) con respecto al porcentaje de motilidad progresiva y porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento, cuando se evaluó el uso de diferentes concentraciones de glicerol y el tiempo de agregación del mismo, al comparar entre sí los cuatro protocolos utilizados.

Cuadro 7. Volumen de la segunda fracción, motilidad progresiva, número total y porcentaje de espermatozoides normales de los eyaculados que se congelaron.

Macho N°	Volumen (ml)	% Motilidad progresiva	NTS (x 10 ⁶)	% Espermatozoides Normales
1	3.20	90.00	320.00	92.00
2	4.00	95.00	1310.00	94.00
3	2.50	90.00	937.50	85.00
4	2.00	90.00	510.00	83.00
5	4.20	90.00	514.50	89.00
6	2.30	95.00	1046.50	92.00
7	2.00	90.00	215.00	80.50
8	0.80	85.00	344.00	82.00
9	1.00	90.00	206.20	87.00
10	4.50	85.00	888.75	83.00
11	2.80	90.00	203.00	93.50
12	1.10	95.00	500.50	95.00
13	0.80	90.00	316.00	93.00
14	1.80	90.00	225.00	85.00
Promedio	2.36	90.36	538.35	88.14
Desviación estándar	1.25	3.08	361.51	5.07

NTS: número total de espermatozoides (millones).

Cuadro 8. Resultados de los porcentajes de motilidad progresiva obtenida en los cuatro protocolos posdescongelación.

Macho N°	Protocolo 1 (0-7)*	Protocolo 2 (3.5-3.5)*	Protocolo 3 (7-7)*	Protocolo 4 (0-14)*
1	65.00	50.00	55.00	70.00
2	50.00	75.00	60.00	70.00
3	35.00	40.00	50.00	60.00
4	55.00	60.00	55.00	70.00
5	50.00	60.00	50.00	50.00
6	70.00	60.00	60.00	55.00
7	50.00	50.00	50.00	50.00
8	45.00	40.00	50.00	40.00
9	20.00	30.00	45.00	45.00
10	55.00	60.00	60.00	40.00
11	55.00	50.00	55.00	60.00
12	40.00	40.00	40.00	30.00
13	65.00	60.00	85.00	80.00
14	25.00	35.00	20.00	25.00
Promedio	48.57	50.71	52.50	53.21
Desviación Estándar	14.60	12.54	13.97	16.24

* Diluyentes usados en la primera y segunda dilución según su concentración de glicerol.

Cuadro 9. Resultados del porcentaje de acrosomas normales obtenidos en los cuatro protocolo posdescongelamiento.

Macho N°	Protocolo 1 (0-7)*	Protocolo 2 (3.5-3.5)*	Protocolo 3 (7-7)*	Protocolo 4 (0-14)*
1	55.00	62.00	65.00	71.00
2	57.50	58.50	63.00	56.00
3	58.00	57.00	53.50	67.00
4	49.00	48.00	56.00	64.00
5	69.50	68.50	63.00	58.50
6	64.50	73.00	52.00	70.50
7	64.00	54.00	56.00	50.00
8	60.50	49.50	56.00	65.00
9	42.50	59.50	59.00	65.50
10	55.00	54.00	65.00	47.00
11	54.00	65.00	64.00	70.00
12	42.00	66.00	53.00	55.00
13	79.00	80.00	90.00	90.50
14	45.00	44.50	33.00	64.00
Promedio	56.82	59.96	59.18	63.86
Desv. Estándar	10.45	9.94	12.11	10.75

* Diluyentes usados en la primera y segunda dilución según su concentración de glicerol.

DISCUSIÓN

El glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), un alcohol polihídrico altamente permeable, es el crioprotector con más frecuencia usado en el congelamiento de semen en diferentes especies (Silva et al., 2003), incluyendo el canino (England, 1993; Peña et al., 1998a; Rota et al., 1998; Linde-Forsberg, 2002; Silva et al., 2003). Sin embargo, es conocido que este crioprotector exhibe efectos nocivos sobre el espermatozoide, tales como alteraciones físico químicas que pueden producir la ruptura de la membrana plasmática o la remoción de importantes proteínas de la membrana. Además, puede causar daño al acrosoma, lo cual se refleja en una reducida fertilidad (Silva et al., 2003). Estas alteraciones pueden ser atribuidas al estrés osmótico que sufre el espermatozoide cuando está en contacto con el glicerol (Hay et al., 1997). Los daños se pueden presentar en su adición y eliminación, como también durante el proceso de congelación y descongelación, reconociéndose un efecto adverso en la motilidad posdescongelamiento en el semen canino (Rota et al., 1998).

Se estima que entre el 40 y 50% de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación y descongelación (Stornelli et al., 2002), si se toma como parámetro de sobrevivencia, el porcentaje de espermias móviles posdescongelamiento. Este dato concuerda con los resultados de motilidad que se obtuvieron en los cuatro protocolos (cuadro 8). Por otro lado, un porcentaje de los espermatozoides que sobreviven también pueden haber sufrido daños estructurales a nivel de la cromatina nuclear, los cuales comprometen su capacidad fecundante (Stornelli et al., 2002), aunque su motilidad

sea aparentemente normal. Además, el proceso de congelación y descongelación no solo provoca alteraciones en los espermatozoides que no sobreviven, sino que también puede producir modificaciones en la membrana plasmática y el acrosoma en algunos de los espermatozoides sobrevivientes al proceso (Ström Host et al., 1998), reduciendo el tiempo de sobrevivencia y la capacidad de fertilizar los óvulos en el útero. Las alteraciones del acrosoma son de gran relevancia, dado que la integridad del acrosoma es fundamental en el proceso de fertilización (Silva y Verstegen, 1995). Lo anterior marca la necesidad de que, al implementar un programa de inseminación artificial con semen descongelado, la escogencia del momento de la inseminación sea de vital importancia, dada su reducida viabilidad posdescongelamiento (Badinand et al., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Rota et al., 1998; England, 2000; Fastad, 2000).

Al cotejar los resultados de los protocolos 1 y 2 (concentración final de glicerol 2.33%), y el de los protocolos 3 y 4 (concentración final de glicerol 4.66%), se encuentra que no hay una diferencia significativa ($p > 0.05$) cuando se comparó el tiempo de agregación del glicerol en un paso (protocolo 1 y 4) *versus* dos pasos (protocolo 2 y protocolo 3), sobre la motilidad progresiva y el porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento. Estos resultados se pueden explicar basándose en la teoría propuesta por Peña y colaboradores (1998a), en la cual mencionan que el glicerol penetra rápidamente dentro del espermatozoide canino (Peña et al., 1998a). Por otro lado, hay que tener en cuenta que el espermatozoide canino es resistente al daño osmótico causado por una agregación simple del glicerol (Silva et

al., 2003), lo que explica en parte por qué no se observaron diferencias significativas cuando este se agrega a 37°C con un periodo de equilibrio de 2 horas o cuando se agrega con el semen enfriado a 7°C con un periodo de equilibrio de 1 hora. Resultados similares han reportado Peña y colaboradores (1998a), Linde-Forsberg (2002) y Silva (2003), los cuales indican que no hay diferencias significativas en la calidad del semen posdescongelación en relación con el tiempo de agregación del glicerol.

Tampoco en este estudio se encontraron resultados estadísticamente significativos ($p > 0.05$) con respecto al porcentaje de motilidad progresiva y porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento, al evaluar el uso de diferentes concentraciones de glicerol y el tiempo de agregación del mismo, cuando se compararon entre sí los cuatro protocolos utilizados. Estos datos difieren con los reportados por Peña y colaboradores (1998a), quienes compararon el diluyente Tris-fructosa con concentraciones de glicerol del 2, 4, 6 y 8%, teniendo que la mejor concentración de glicerol, con respecto a la motilidad postdescongelamiento, fue de un 8%, pero no así para las demás concentraciones. Asimismo, la utilización de un 8% de glicerol dio resultados significativos ($p < 0.05$) en el porcentaje de acrosomas normales posdescongelamiento, pero sólo cuando se comparó con el diluyente que contenía un 2% de glicerol (Peña et al., 1998a). Caso contrario es el de Olar y colaboradores (1989), quienes encontraron una mayor motilidad cuando trabajaron con concentraciones de glicerol entre un 3 a un 4% usando Tris-glucosa.

La controversia que existe al respecto, así como la resistencia que parece presentar el semen canino a diversas

concentraciones de glicerol, podría explicarse según Peña y colaboradores (1998a), por su curva de congelamiento, que es específica para cada especie, y representa la variación de la supervivencia de las células posdescongeladas en función de la velocidad de congelamiento. Por lo general, esta curva presenta un trazo sigmoideo y una fase de meseta, que varía en duración dependiendo del método de congelación. El espermatozoide canino parece sobrevivir mejor a los diferentes rangos de concentración de glicerol y velocidades de congelación estudiadas, debido a que estos valores bien podrían estar decreciendo cuando se alcanza la meseta de la curva, lo que dificultaría la identificación de la concentración de glicerol y velocidad de congelación óptimas dentro del rango de tolerancia. Esto podría explicar las muchas divergencias de opinión que existen cuando concentraciones de glicerol muy bajas (1.6-2%) o muy altas (8-12%) son usadas, sabiendo que las pequeñas diferencias que pueden tener los métodos de congelación utilizados (concentración final de espermatozoides, composición del diluyente y velocidad de congelación y descongelación) logran producir resultados diferentes (Peña et al., 1998a).

El promedio de los porcentajes de acrosomas normales posdescongelamiento en los cuatro protocolos (protocolo 1: $56.82\% \pm 10.45\%$, protocolo 2: $59.96 \pm 9.94\%$, protocolo 3: $59.18 \pm 12.11\%$ y protocolo 4: $63.86 \pm 10.75\%$), en general, es aceptable en comparación con otros estudios, en los cuales los promedios fueron de $67.90 \pm 5.90\%$ usando Tris-glucosa y de $67.60 \pm 4.70\%$ con Tris-glucosa más Orvus ES paste (Nizanski et al., 2001), 60.25 ± 17.04 (Gutiérrez, 1988) y $46.60 \pm 7.10\%$ usando Tris-fructosa (Ström et al., 1997).

Sin embargo, la tradicional evaluación de la integridad de los acrosomas, usando un microscopio de contraste de fase, podría ser parcialmente confiable. Algunos investigadores que han realizado trabajos con microscopía electrónica para evaluar el daño sufrido por el acrosoma del espermatozoide canino durante los procesos de congelación y descongelación, han revelado un alto grado de daño, incluyendo pérdida del contenido acrosomal y vesiculación de la membrana acrosómica, las cuales no fueron detectadas por microscopía convencional o de contraste de fases. Iguales resultados se han obtenido con el uso de tinciones a base de fluorescencia, las cuales penetran la membrana plasmática y acrosomal en células dañadas, las cuales no son visibles en microscopio convencional (Peña et al., 1999; Peña et al., 1998b; Rodríguez-Martínez et al., 1993). Debido a esto, se pueden dar fallos en la interpretación con el microscopio de contraste de fases (Peña et al., 1998a). No obstante, aún así los datos de este estudio mantienen validez, dado que se puede asumir el mismo error para todos los protocolos.

Los promedios de motilidad posdescongelamiento, en general, son buenos comparándolos con los resultados de otros estudios, tales como $47.00 \pm 5.10\%$ usando Tris-glucosa y $52.10 \pm 6.10\%$ con Tris-glucosa más Orvus ES paste (Nizanski et al., 2001), $53.75 \pm 19.74\%$ usando Tris-fructosa (Gutiérrez, 1988), y $69.70 \pm 3.20\%$ usando Tris-fructuosa (Ström et al., 1997). También, si nos basamos en la clasificación de Connanon y Battista (Silva et al., 2003), donde se considera como aceptable para la realización de inseminaciones el uso de semen posdescongelado con una motilidad entre 30 a 50%, y como ideal, el

semen con más de un 50% de motilidad; los resultados obtenidos en los cuatro protocolos se pueden considerar como satisfactorios para implementar un programa de inseminación artificial con semen congelado en nuestro país.

Finalmente, cabe resaltar que en a pesar de que no se analizó estadísticamente la variación individual, los casos 9 y 14 presentaron menores porcentajes de motilidad progresiva posdescongelamiento en los cuatro protocolos (cuadro 4), al ser comparados con los demás individuos. Un aspecto importante por considerar, sobre todo en casos como estos, es que la mala calidad del semen descongelado puede ser resultado de una variación en la congelabilidad o calidad individual de la muestra de semen canino (Tomassen et al., 2001). Estas diferencias en la congelabilidad del semen entre machos de una misma especie, ya ha sido establecida para los caballos, toros y verracos, aunque la extensión de la variación en la habilidad intrínseca de sobrevivir al congelamiento es desconocida (England, 1993).

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones en las que se realizó el estudio se puede concluir que el semen canino es resistente al uso de diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente Tris-fructosa con yema de huevo y que la variación en el tiempo de agregación del mismo tampoco influye en una mejor calidad del semen descongelado en lo referente a motilidad e integridad del acrosoma.

REFERENCIAS

- Badinand, F., A. Fontbonne, M.C. Maurel, and B. Siliart. 1993. Fertilization Time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 47)*: 63-67.
- Eilts, B. 1997. The canine breeding soundness examination form: its practical role in your clinic. Pages 37-47 in *Proceedings of canine male reproduction symposium*. American College of Theriogenologists and Society for Theriogenology. Hastings, NE.
- England, G. 2000. *Allen's fertility and obstetrics in the dog*. 2nd ed. Blackwell Science, London.
- England, G. 1993. Cryopreservation of dog semen: a Review. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 47)*: 243-255.
- Farstad, W. 2000. Cubrición e inseminación artificial en el perro. Páginas 125-138 In *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Simpson, G., G. England and M. Harvey, ed. Harcourt, España.
- Feldman, E. and R. Nelson. 1996. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. Pages 673-690 in *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd ed. Feldman, E. and R. Nelson, ed. Saunders, U.S.A.
- Gutiérrez, S. 1988. Evaluación andrológica y congelamiento de semen canino. Tesis, Universidad Nacional, Costa Rica.
- Hay, M., A. King, C. Gartley, S. Leibo, and K. Goodrowe. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 51)*: 99-108.
- Johnston, S., V. Root Kustritz, and P. Olson. 2001. *Canine and feline theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia.
- Keenan, L. 2000. Infertilidad en el macho. Páginas 109-124 In *Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales*. Simpson, G., G. England and M. Harvey, ed. Harcourt, España.
- Linde-Forsberg, C. 2002. Hints on dog semen freezing, cryoextenders and frozen semen. Pages 303-320 in *Proceedings for the Annual Meeting of the Society for Theriogenology*. Society for Theriogenology. Colorado Springs.
- Linde-Forsberg, C. 2001. Inseminación intrauterina en el perro usando el catéter transcervical escandinavo y comparándolo con otros métodos. Consultado Enero 18, 2004. <http://www.ivis.org>.
- Linde-Forsberg, C. and M. Forsberg. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 39)*: 299-310.
- Linde-Forsberg, C., B. Ström and G. Govette. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*. 52: 11-23.
- Morton, D. and S. Bruce. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors

- relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 39)*: 311-316.
- Nizanski, W., A. Dubiel, W. Bielas, and G. Dejneka. 2001. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 57)*: 365-369.
- Nöthling, J., C. Gerstenberg, and D. Volkmann. 1997. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 51)*: 109-116.
- Olar, T., R.A. Bowen, and B.W. Pickett. 1989. Influence of extender, criopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*. 31: 451-461.
- Peña, A., F. Barrio, L.A. Quintela, and P.G. Herradón. 1998a. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*. 50: 571-579.
- Peña, A., L.A. Quintela, and P.G. Herradón. 1998b. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*. 50: 1211-1220.
- Peña, A., L.A. Quintela and P.G. Herradón. 1999. Flow cytometry assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 495-502.
- Rijsselaere, T., A. Van Soom, D. Maes, and A. de Kruif. 2002. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 57: 1669-1681.
- Rodríguez-Martínez, H., H. Ekwál, and C. Linde-Forsberg. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 47)*: 279-285.
- Rota, A., C. Linde-Forsberg, J. Vannozzi, S. Romagnoli, and H. Rodríguez-Martínez. 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 355-361.
- Silva, A., R. Cardoso, D. Uchoa, and L. Silva. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59: 821-829.
- Silva, L., K. Onclin, F. Snaps, and J. Verstegen. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*. 43: 615-123.
- Silva, L. and J. Verstegen. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 571-579.
- Stornelli, M.A., M.C. Stornelli, M.S. Arauz, and L. De La Sota. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado: aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*. 21: 58-66.
- Ström Holst, B., A. Rota, K. Andersen Berg, C. Linde-Forsberg, and H. Rodríguez-Martínez. (1998). Canine sperm head

E. Herrera et al.

damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 77-82.

Ström, B., A. Rota and C. Linde-Forsberg. 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected two methods of

cryopreservation. *Theriogenology.* 48: 247-256.

Tomassen, R., W. Farstad, A. Krogenaes, J. Fougner, and K. Andersen Berg. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil. (Suppl. 57):* 341-346.