

## COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES SOBRE LA FERTILIDAD POTENCIAL DE SEMEN CANINO REFRIGERADO

Alfonso Sánchez R.<sup>1</sup>, Arlette Cartagena P.<sup>2</sup> y Marco Berland O.<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Twenty canine ejaculates (2<sup>nd</sup> fraction) were obtained by digital manipulation with the purpose of evaluating the effect of two extenders on the preservation of canine spermatozoa stored at 4 °C. Each ejaculate was evaluated through a spermogram and the hypo-osmotic swelling test (HOST). The ejaculates were fractioned and diluted in a rate of 1:3 using egg yolk + TRIS + glucose + antibiotic (EYT) (365 mOsm/kg, pH 6.8) and skimmed milk (0.5% fat, UHT-treated) + antibiotic (SM) (272 mOsm/kg, pH 6.8). Progressive motility (PM) was  $95.7 \pm 3.6\%$  and the HOST response was  $79.8 \pm 6.6\%$  in fresh semen. In order to compare the effect of the two extenders on the preservation of the potential fertility, the PM and HOST were evaluated after 24, 48, 72, and 96 hours of storage at 4 °C. The values of PM and HOST for EYT were significantly higher compared to SM at all times ( $p < 0.05$ ). Nevertheless, the PM ( $>70\%$ ) and HOST ( $>60\%$ ) observed in all evaluation periods, independently of the type of extenders, surpassed the minimum values established as appropriate for the use of refrigerated canine semen for artificial insemination. In conclusion, the skimmed milk extender proved to be an efficient, practical, and economical method for preserving semen over a period of 3 to 4 days.

**Key words:** canine, spermatozoa, extender, chilled semen

### RESUMEN

Con el propósito de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales sobre la fertilidad potencial de espermatozoides caninos conservados a 4 °C, se obtuvieron 20 eyaculados mediante manipulación digital. Cada eyaculado fue evaluado a través de espermiograma y de la prueba hipoosmótica (HOST), para luego ser fraccionado y diluido en relación 1:3 con uno de los siguientes diluyentes: yema de huevo + TRIS (EYT) (365 mOsm/kg, pH 6.8) y leche descremada fluida UHT (LD) (272 mOsm/kg, pH 6.8). En el semen fresco, la motilidad progresiva (MP) fue  $95.7 \pm 3.6\%$  y la respuesta a HOST de  $79.8 \pm 6.6\%$ . Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de MP e integridad de membrana con HOST a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen, observándose mayores valores de MP y de espermatozoides dilatados en el diluyente EYT en todos los tiempos ( $p < 0.05$ ). No obstante, los valores de MP ( $>70\%$ ) y HOST ( $>60\%$ ) observados en cada uno de los tiempos de evaluación, independiente del tipo de diluyente, superaron los valores mínimos establecidos como

<sup>1</sup> Escuela de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Viña del Mar, Chile. E-mail: asanchez@uvm.cl

<sup>2</sup> Práctica privada

<sup>3</sup> Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Chile

adecuados para uso del semen canino refrigerado en inseminación artificial. En conclusión, el diluyente en base a leche descremada UHT, de fácil preparación y bajo costo, resulta una alternativa de uso en la clínica de pequeños animales.

**Palabras clave:** canino, espermatozoide, diluyente, semen refrigerado

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la crianza de perros es una afición de distribución mundial; consecuentemente, la conservación de semen y la inseminación artificial se han constituido en temas de alta relevancia en la actividad médica veterinaria. Si bien la inseminación artificial en las especies de interés zootécnico representa un instrumento fundamental para la mejora genética, en la especie canina presenta, además, aplicaciones clínicas para solucionar problemas de apareamiento; por lo que la adecuada preservación, con la consiguiente posibilidad de transportar el semen, resultan de gran utilidad (Linde-Forsberg, 1995).

La refrigeración del semen a temperaturas que fluctúan entre los 4 y 6 °C (Goodman y Cain, 1993) es una alternativa simple para la conservación de espermatozoides caninos con adecuada capacidad fecundante. La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática (plasmalema) al daño causado por los cambios de temperatura (shock térmico) (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Los diluyentes seminales tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Los diluyentes proveen de sustratos energéticos y permiten la mantención de condiciones es-

tables de pH y osmolaridad en el medio extracelular (Batellier *et al.*, 2001).

Diferentes tipos de diluyentes seminales, comerciales o preparados en el laboratorio, han sido evaluados en su capacidad de mantener el potencial fecundante de semen canino refrigerado. La composición de dichos diluyentes incluye sustancias como citrato, hidroximetil-aminometano (Tris), N-Tris 2-hidroximetil-2-ácido sulfónico aminometano, fosfato, glicina, leche descremada en polvo reconstituida y calentada a 92 °C, leche descremada fluida UHT, crema esterilizada, fructosa, glucosa, yema de huevo y antibióticos (Bouchard *et al.*, 1990; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Province *et al.*, 1984; Rota *et al.*, 1995; Sánchez y Rubilar, 2001).

El diluyente más empleado para conservar semen canino refrigerado es el elaborado en base a yema de huevo y Tris-citrato (EYT) (Linde-Forsberg, 2001); con el cual, además, se describen las mayores tasas de preñez (Linde-Forsberg, 1995). Sin embargo, al considerar las necesidades clínicas en términos de un diluyente seminal de fácil preparación y bajo costo, que permita conservar semen refrigerado por algunos días, resulta interesante considerar el uso de leche descremada fluida UHT (ultra high temperature), tal como ha sido descrito por Sánchez y Rubilar (2001).

En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el efecto de dos diluyentes seminales de diferente complejidad, sobre la integridad de la membrana plasmática y la motilidad progresiva de espermatozoides caninos refrigerados a 4 °C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de semen

Se obtuvieron 20 eyaculados mediante el método de manipulación digital, colectando únicamente la fracción espermática de cada eyaculado. Los donantes de semen fueron 5 perros: 3 Ovejero Alemán (5, 4 y 4 eyaculados), 1 Bóxer (5 eyaculados) y 1 Labrador Retriever (2 eyaculados), sexualmente maduros, con un peso promedio de  $36.8 \pm 1.6$  kg y una edad promedio de  $3.9 \pm 2.0$  años.

### Espermiograma

Las muestras de semen fresco fueron evaluadas de acuerdo con el método descrito por England y Allen (1989), registrándose volumen, color, olor, motilidad progresiva (MP) con microscopio de contraste de fase (100x y 400x) y platina temperada a 37 °C, porcentaje de espermatozoides vivos con tinción eosinonigrosina, morfología espermática mediante Spermac Stain® evaluada mediante microscopía de campo claro, y concentración espermática mediante el recuento en cámara de Neubauer y dilución 1:10 con agua destilada.

### Prueba hipoosmótica (HOS-test)

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Sánchez *et al.* (2002), estimándose como respuesta positiva de la integridad de membrana, diferentes grados de dilatación de los espermatozoides.

### Diluyentes seminales

Se utilizó el diluyente en base a yema de huevo (EYT), el cual contenía: TRIS (3.025 g), ácido cítrico (1.7 g), glucosa (1.25 g), penicilina benzatínica (100 mg), sulfato de estreptomycin (100 mg), yema de huevo (20%) y agua destilada (100 ml). El pH y la osmolaridad fueron de 6.8 y 366 mOsm/kg, respectivamente. El diluyente fue congelado a -20 °C y antes de usar fue descongelado y entibiado a 37 °C.

El segundo diluyente fue a base de leche descremada (LD), el cual contenía leche descremada fluida UHT (0.5% materia grasa) adicionada con sulfato de estreptomycin (50 mg/100ml) y penicilina benzatínica (50 mg/100ml). El pH y la osmolaridad fueron de 6.8 y 272 mOsm/kg, respectivamente. Se preparó el día de la recolección de semen y fue entibiado a 37 °C antes del uso.

### Evaluaciones y análisis estadístico

Al término de la dilución y antes de la refrigeración (0 horas) se evaluó MP e integridad de membrana. Además, a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración se tomó una muestra del semen diluido, que fue temperada a Baño María 35 °C, donde se evaluaron los mismos parámetros de calidad espermática.

Para el análisis estadístico, las variables dependientes motilidad progresiva (%) e integridad de membrana (%) fueron transformadas según la fórmula angular del arcoseno, a fin de realizar un análisis unilaterial de la varianza. Las diferencias se estimaron a través de la prueba de hipótesis específica de Tukey. Para determinar la relación entre motilidad progresiva y funcionalidad de membrana se realizó un análisis de correlación de Pearson. Se utilizaron los programas Excel-Software® y Prisma®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cinco perros utilizados como donantes respondieron satisfactoriamente al método de obtención de semen por manipulación digital, sin necesidad de perra en celo. Las características seminales de los eyaculados se indican en el Cuadro 1 y pueden ser consideradas como normales para la especie (England y Allen, 1989). Cabe resaltar que solo se utilizó la segunda fracción de los eyaculados, dado que se ha descrito un efecto

Cuadro 1. Características de semen fresco (n=20 eyaculados) obtenido de cinco perros sexualmente maduros, de razas Ovejero Alemán, Bóxer y Labrador Retriever

Variable Seminal	Promedio $\pm$ d.e.
Volumen (ml)	1.7 $\pm$ 0.5
Concentración ( $\times 10^6$ /ml)	260.4 $\pm$ 72.9
Espermatozoides totales ( $\times 10^6$ )	414.9 $\pm$ 178.3
Motilidad progresiva (%)	95.7 $\pm$ 3.6
Espermatozoides vivos (%)	86.5 $\pm$ 4.5
Espermatozoides normales (%)	87.7 $\pm$ 6.9

Cuadro 2. Motilidad progresiva (%) en semen refrigerado (4 °C) de 20 eyaculados obtenidos de cinco caninos sexualmente maduros

Diluyente <sup>1</sup>	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	24	48	72	96
EYT (n=20)	95.7 $\pm$ 3.6	93.0 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	91.0 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	89.0 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	85.0 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>
LD (n=20)	95.7 $\pm$ 3.6	88.0 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>	85.0 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>	82.0 $\pm$ 8.6 <sup>b</sup>	75.0 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> EYT: Yema de huevo y Tris; LD: Leche descremada

<sup>a, b</sup> Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

negativo del fluido prostático en la motilidad progresiva del semen canino refrigerado, tanto a 4 °C (Rota *et al.*, 1995) como a 5 °C (Günzel-Apel y Ekrod, 1991).

Al evaluar la integridad de membrana plasmática en semen fresco, se observó un 79.8  $\pm$  6.6% de espermatozoides dilatados, valores semejantes a los descritos en la literatura para espermatozoides caninos (England y Plummer, 1993; Kumi-Diaka, 1993; Rodríguez-Gil *et al.* 1994; Rota *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2002). Además, la correlación entre esta variable y la motilidad progresiva fue positiva y significativa ( $r = 0.4$ ;  $p < 0.05$ ), confirmando lo observado en otros estudios (England y Plummer, 1993; Kumi-Diaka, 1993; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994;

Sánchez *et al.*, 2002). La valoración de la integridad de membrana plasmática podría ser incorporada a la evaluación de rutina del semen canino, por cuanto se ha descrito que en todos los animales con fertilidad probada, los valores de dilatación espermática superan el 60%, además de ser una técnica sencilla de realizar (England y Plummer, 1993).

En el Cuadro 2 se puede apreciar una tendencia prácticamente lineal en la disminución de la motilidad progresiva en el semen refrigerado, lo cual concuerda con lo observado en estudios de refrigeración de semen con distintos diluyentes en caninos (Goodman y Cain, 1993; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001; Province *et al.*, 1984; Rota *et al.*, 1995), ovinos (Watson, 1981), equinos (Sánchez *et*

Cuadro 3. Integridad de membrana espermática (%) en semen canino refrigerado a 4 °C

Diluyente	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	24	48	72	96
EYT (n=20)	79.8 ± 6.6	75.4 ± 10.0 <sup>a</sup>	74.4 ± 7.1 <sup>a</sup>	73.2 ± 8.5 <sup>a</sup>	73.2 ± 8.6 <sup>a</sup>
LD (n = 20)	79.8 ± 6.6	66.8 ± 11.2 <sup>b</sup>	64.8 ± 9.8 <sup>b</sup>	64.9 ± 10.6 <sup>b</sup>	64.8 ± 9.0 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ )

*al.*, 1995; Varner *et al.*, 1989) y felinos (Sánchez y Tsutsui, 2002). Estas observaciones podrían explicarse por un efecto acumulativo del shock térmico sobre las células espermáticas a través del tiempo (Batellier *et al.*, 2001). Respecto a la comparación entre diluyentes en los diferentes tiempos de evaluación, se pudo comprobar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a partir de las 24 horas de refrigeración; sin embargo, cabe destacar que la motilidad progresiva alcanzó valores sobre 75% hasta las 96 horas; valores que pueden ser considerados como excelentes en cuanto a las exigencias para uso de semen canino en inseminación artificial (Linde-Forsberg, 2001).

La ocurrencia de mayores valores de motilidad progresiva con el diluyente EYT, entre las 24 y las 96 horas de refrigeración, podría explicarse por su compleja composición, la cual incluye sustancias buffer y azúcares, además de moléculas como lipoproteínas y fosfolípidos de la yema de huevo, que poseen la capacidad de estabilizar la membrana espermática en condiciones de shock térmico al interactuar con la estructura lipídica del plasmalema (Cookson *et al.*, 1984; Watson, 1981). No obstante la motilidad progresiva con el diluyente LD puede ser igualmente calificada como muy buena en todos los tiempos de evaluación, efecto que podría ser atribuido a las proteínas de la leche que

protegen la membrana plasmática del espermatozoide del shock térmico (Batellier *et al.*, 2001; Watson, 1990).

Al analizar la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides preservados se pudo observar que el porcentaje de espermatozoides dilatados no mostró un marcado patrón de disminución lineal, comparable al descrito para la motilidad progresiva (Cuadro 3). Esto permitiría sugerir que bajo condiciones de refrigeración y en presencia de moléculas estabilizadoras de membrana como fosfolípidos y proteínas, la funcionalidad de la membrana plasmática sería más estable que la capacidad metabólica de los espermatozoides para generar motilidad progresiva.

La proporción de espermatozoides dilatados en respuesta a la prueba hipoosmótica fue superior en EYT entre las 24 y las 96 horas de refrigeración ( $p < 0.05$ ); diferencias que podrían radicar en la distinta composición y osmolaridad de los diluyentes (Rota *et al.*, 1995). Así mismo, cabe destacar que los valores de respuesta a la prueba hipoosmótica en ambos diluyentes fueron superiores al 60% durante todo el periodo del ensayo. Estos valores podrían ser considerados como adecuados para la selección de semen canino en inseminación artificial (England y Plummer, 1993; Kumi-Diaka, 1993; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994; Rota *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2002).

## CONCLUSIÓN

El empleo de leche descremada fluida UHT (0.5% materia grasa), sin incorporación de sustancias buffer y azúcar, como diluyente para la conservación de semen canino a 4 °C, proporciona resultados de motilidad progresiva e integridad de membrana esper-mática que permitirían su utilización en inseminación artificial hasta por 96 horas de refrigeración, restando aún la realización de estudios de fertilidad real para semen canino conservado bajo estas condiciones.

## LITERATURA CITADA

1. **Batellier, F.; M., Vidament; J. Fauquant; G. Duchamp; G. Arnaud; J. Yvon; M. Magistrini. 2001.** Advances in cooled semen technology. *Animal Reprod. Sci.* 68: 181-190.
2. **Bouchard, G.; J. Morris; J. Sikes; R. Youngquist. 1990.** Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology* 34: 147-157.
3. **Cookson, A.; A. Thomas; J. Foulkes. 1984.** Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 70: 599-604.
4. **England, G.; W. Allen. 1989.** Seminal characteristics and fertility in the dog. *Vet. Rec.* 125: 399.
5. **England, G.; J. Plummer. 1993.** Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47: 261-270.
6. **Goodman, M.; J. Cain. 1993.** Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47: 554.
7. **Günzel-Apel, A.; B. Ekrod. 1991.** Influences of seminal plasma and extender on sperm motility, ATP-concentration, and the activity of acid and alkaline phosphatases of beagle dog semen. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 31-41.
8. **Hammerstedt, R.; J. Graham; J. Nolan. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
9. **Iguer-Ouada, M.; J. Versteegen. 2001.** Long term preservation of chilled canine semen: Effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
10. **Kumi-Diaka, J. 1993.** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
11. **Linde-Forsberg, C. 1995.** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Animal)* 10: 48-58.
12. **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.; G. England; J. Versteegen (eds.). Ithaca. International Veterinary Information Service. Disponible en: [www.ivia.org](http://www.ivia.org)
13. **Province, C.; R. Amann; B. Pickett; E. Squires. 1984.** Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. *Theriogenology* 22: 409-415.
14. **Rodrigues-Gil, J.; A. Monserrat; T. Rigaut. 1994.** Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42: 815-829.
15. **Rota, A.; B. Ström; C. Linde-Forsberg. 1995.** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44: 885-900.
16. **Sánchez, A.; W. von Frey; M. de Los Reyes. 1995.** Efecto de diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. *Vet. Arg.* 113: 172-178.
17. **Sánchez, A.; J. Rubilar. 2001.** Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. *Arch. Med. Vet.* 33: 105-110.
18. **Sánchez, A.; J. Rubilar.; R. Gatica. 2002.** Uso de la prueba hiposmótica en

- la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. Arch. Med. Vet. 34: 123-130.
- 19. Sánchez, A.; T. Tsutsui. 2002.** Evaluación de dos diluyentes seminales para la preservación refrigerada de espermatozoides de gato (*Felis catus*). Revista Científica, FCV-LUZ 12: 249-253.
- 20. Varner, D., T. Blanchard; P. Meyers; S. Meyers. 1989.** Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 °C. Theriogenology 32: 515-525.
- 21. Watson, P. 1981.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fert. 62: 483-492.
- 22. Watson, P. 1990.** Artificial insemination and the preservation of semen. En: Marshall's Physiology of Reproduction. 2<sup>nd</sup> ed. Lamming, G. (ed.). Churchill Livingstone. London.