



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Reproducción Animal  
Manual Virtual de Reproducción animal en perros y gatos  
M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez  
MVZ Francisco Javier Carbajal Merchant  
MVZ Demmy Grisha De Los Santos Castro

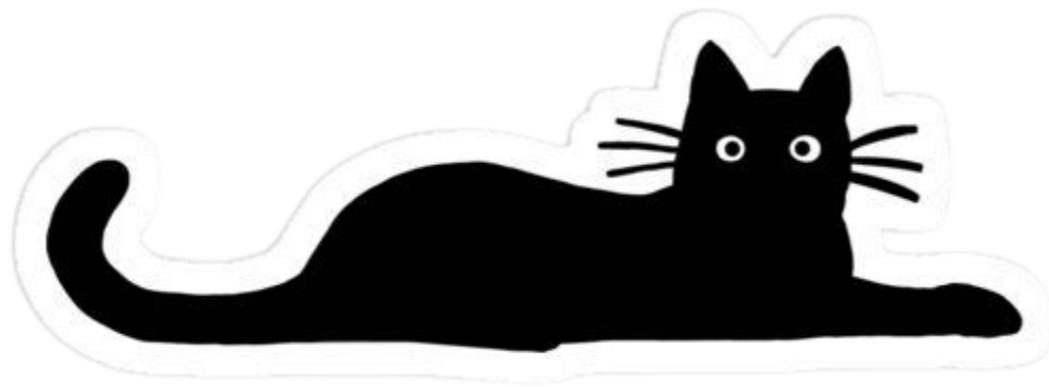
# Conservación de semen

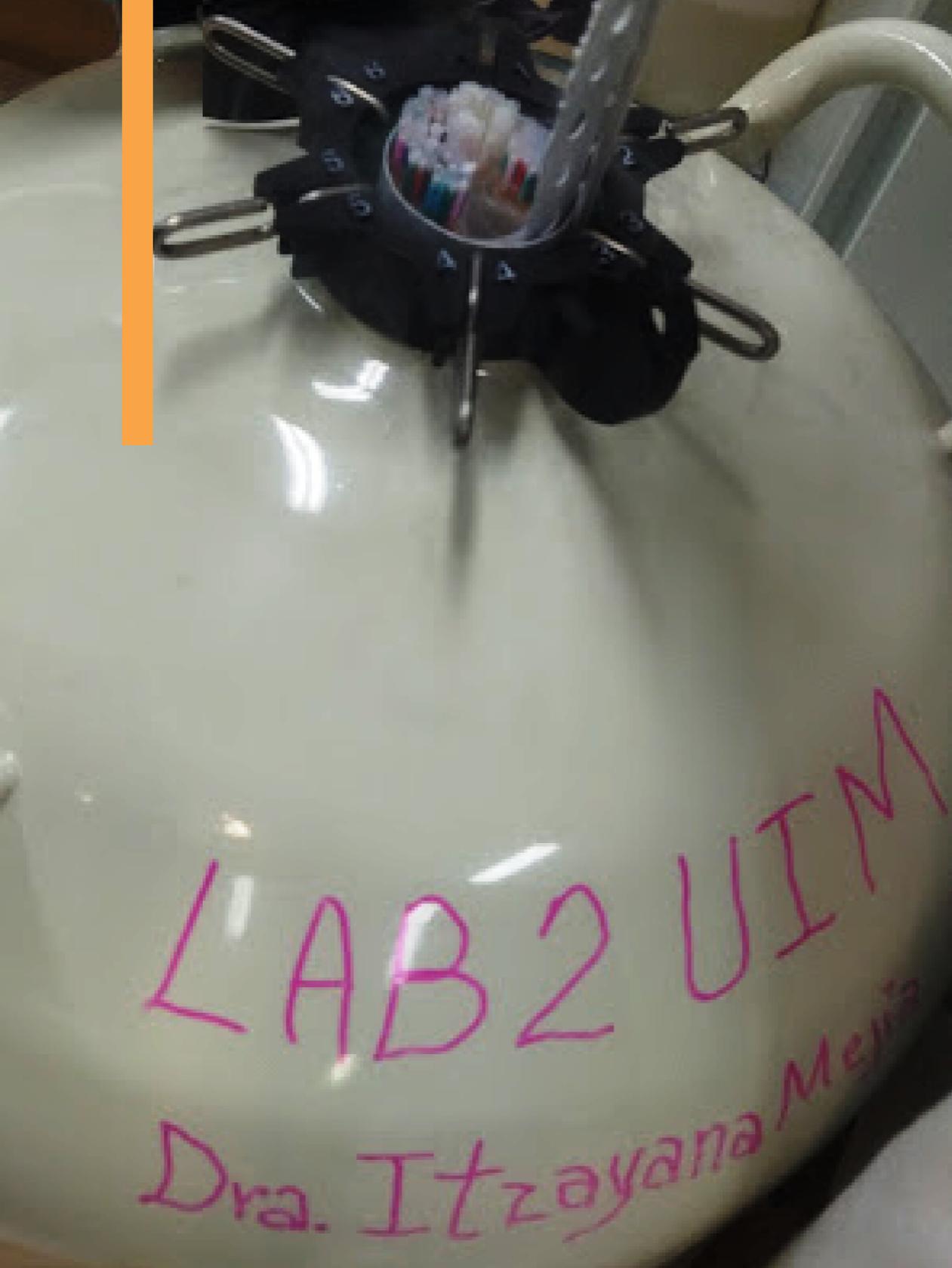


Consiste en técnicas dirigidas a mantener por un tiempo prolongado la viabilidad del material genético del macho canino (semen) que en condiciones normales sería imposible (13).

Imagen 9.1. Realización de tinción Eosina- Nigrosina. Fotografía tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal UIM, FESC, UNAM, México.

La conservación de gametos de caninos genéticamente valiosos es uno de los puntos importantes en biotecnología animal (15). Por esto el desarrollo de técnicas de criopreservación espermática exitosas se convierten en un aspecto crucial para investigaciones en reproducción de pequeñas especies. Durante los procesos de congelación y descongelación del semen, las células se exponen a un medio hiperosmótico lo que genera cambios morfológicos en éstas. Al exponerse las células a este medio hiperosmótico se genera una contracción celular inicial; la cual puede revertirse al añadir crioprotectores que ingresan o recubren las células favoreciendo la protección de las mismas (3).





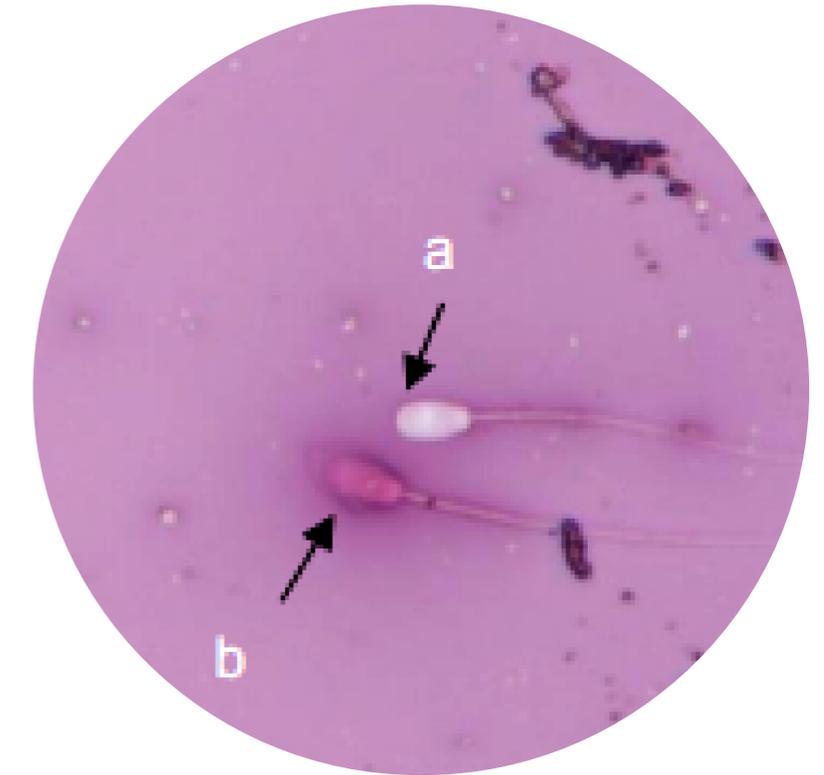
En las razas caninas la criopreservación de semen es utilizada básicamente para la inseminación artificial (IA) y para el almacenamiento de muestras de perros de alto valor genético (15), y se considera una opción económica para el criador ya que se optimiza la accesibilidad de semen a largo plazo (3). En el proceso de la criopreservación hay un gran número de factores que pueden afectar la capacidad fertilizante del semen canino. En dicho proceso, las células están expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores que evitan la formación de hielo intracelular y el daño en la membrana celular (4), sin embargo los crioprotectores pueden igualmente tener efectos adversos sobre los espermatozoides, lo cual limita su función (28).

Imagen 9.2. Tanque para crio-conservación en Nitrógeno líquido. Fotografía tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal UIM, FESC, UNAM, México.

# EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO

## Evaluación macroscópica (13)

- ✓ **Volumen, Color y olor**
- ✓ **Factores que afectan las características del semen**  
Pubertad, frecuencia de eyaculación, tamaño testicular



## Evaluación microscópica y química (13)

- ✓ **Morfología**
- ✓ **pH**
- ✓ **Motilidad**
- ✓ **Concentración**
- ✓ **Integridad y funcionalidad de membrana**
- ✓ **Alteraciones espermáticas**

Imagen 9.3. a) Espermatozoide vivo. b) Espermatozoide muerto con daño en el acrosoma. Eosina nigrosina. 60x. Imagen adquirida de: Stornelli (2017). Atlas de reproducción de animales de producción y compañía. Universidad Nacional de la Plata, Argentina

(Para más información revisar práctica XVIII Evaluación de semen).

Diversas técnicas son empleadas para evaluar y predecir la capacidad fecundante del semen canino, mediante la determinación de parámetros espermáticos como: la integridad de la membrana plasmática, la reacción acrosómica, la morfología espermática, y la movilidad de los espermatozoides; siendo dichos factores igualmente utilizados para establecer los efectos de la criopreservación sobre el semen canino (4, 18).

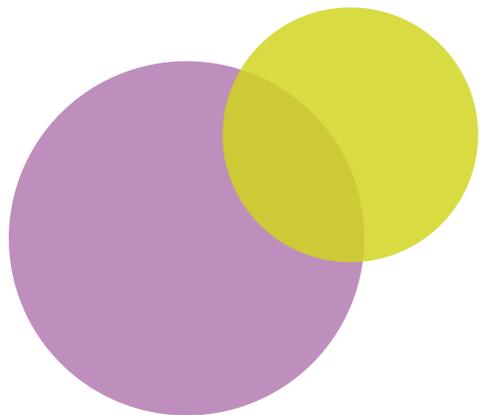


Imagen 9.4. Realización de prueba de motilidad en semen canino. Fotografía tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal UIM, FESC, UNAM, México.

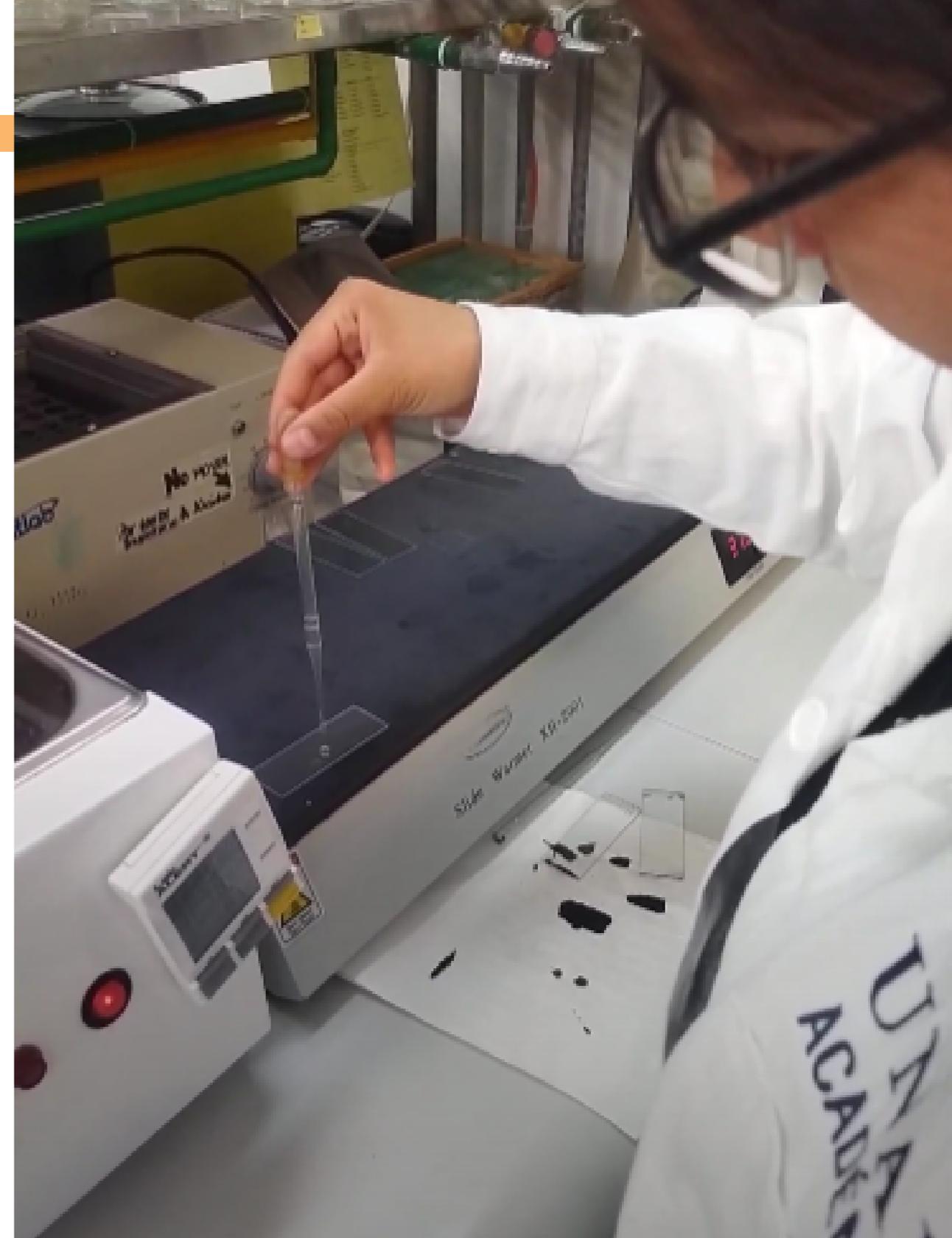




Imagen 9.5. Realización de tinción neosina-nigrosina en semen de perro. Fotografía tomada en Laboratorio 2 de Reproducción Animal UIM, FESC, UNAM, México.

## La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

Son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos con base a la permeabilidad de la membrana, al permitir el paso o no de los mismos (21).

Las células cuya membrana plasmática es funcional conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario, cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (21).

# CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son solutos que favorecen la protección celular contra el enfriamiento extremo, algunos penetran y otros no penetran a la célula y su citotoxicidad depende directamente de la temperatura y el tiempo de exposición de las células a ellos (20, 27). En el grupo de los crioprotectores penetrantes, se encuentra el glicerol, el cual es un alcohol con tres grupos hidroxilos ( $C_3H_8O_3$ ) de alta permeabilidad este es el más utilizado en la congelación de semen canino, ya que posee la capacidad de reemplazar osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento, disminuyendo el punto de congelación del agua lo cual combinado con una lenta tasa de enfriamiento, disminuye la formación de cristales de hielo (1, 18, 20) crioprotector más utilizado para la preservación de semen canino es el glicerol, el cual posee la limitante de su toxicidad parcial debida al estrés osmótico, ya que tiene una menor velocidad de difusión a través de la membrana, respecto a otros crioprotectores (11).

Las principales dificultades para la criopreservación eficiente de semen canino, están en que la técnica induce estrés osmótico, químico y mecánico a la célula, causando la muerte de algunos espermatozoides y un daño severo en los que sobreviven a la descongelación, reduciendo la capacidad fertilizante y cambios estructurales de los espermatozoides después de la descongelación. Tales como daño en el DNA, rompimiento de la membrana plasmática, por oxidación de lípidos de la membrana, daños acrosomales como es el hinchamiento del acrosoma, distribución del contenido acrosomal no uniforme, y vesiculación de la membrana externa acrosomal y de la membrana plasmática (13).



---

Imagen 9.6. Perro adulto. Fotografía tomada por Hugo Olguín en Tula, México

El semen que va a ser utilizado en fresco, es decir, inmediatamente se va a depositar en la vagina de la hembra, no requiere de ninguna otra manipulación a menos que se considere que el volumen sea muy pequeño (<1ml). En estos casos se puede utilizar un diluyente para aumentar su volumen (1-6 ml) (27).



Imagen 9.7. Colección de semen en perro raza Bulldog. Fotografía tomada en Laboratorio 2 UIM, FESC-UNAM. México.

# Semen diluido

En el caso de que el semen vaya a ser transportado, el semen debe ser diluido si no se va a utilizar en menos de una hora después de la colecta. La tasa de dilución no se ha establecido aun, pero se puede diluir desde 1:1 hasta 1:6 (semen: diluyente) (13).

Existen varios diluyentes en el mercado, pero el más económico es la leche descremada. El diluyente debe ser precalentado a 37 °C y mezclado con el semen lentamente. Para que la cantidad del semen obtenida para su conservación sea optima, se debe dejar descansar al perro 4 días tras la primera recogida y después efectuar una recogida cada 48 horas, recoger solamente la segunda fracción, diluir con tris-fructosa (pH 6.8) con el 8% de glicerina, 20% de yema de huevo y alcanzar una concentración final mínima de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml. morfológicamente normales (13, 20).

En los casos en que no es necesario el empleo inmediato del semen recolectado puede prolongarse su viabilidad en medios de dilución con antibióticos o sin ellos, el diluyente es el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la vitalidad espermática y este debe de (13):

- a) **Evitar el choque térmico:** la leche descremada y la yema de huevo protegen al espermatozoide contra las diferencias térmicas cuando se almacena refrigerado a 5°C. Cuando el semen va a ser congelado el elemento empleado como protector contra los cambios térmicos es el glicerol (13, 20, 27).
- b) **Contener sustancias nutritivas:** el espermatozoide es una célula viva y por esto necesita energía para sus funciones. El diluyente debe contener los elementos necesarios para aportar a los gametos masculinos la energía para mantener su viabilidad. La leche descremada, yema de huevo, agua de coco (2) la fructosa y la glucosa son elementos que pueden aportar esa energía pudiendo ser empleados como elemento tanto para la congelación y como para la refrigeración (13).
- c) **Contener elementos reguladores de pH:** El espermatozoide es muy sensible a los cambios de pH por lo cual es importante agregar elementos amortiguadores del mismo pH para evitar variaciones bruscas que alteran la viabilidad del semen. Los amortiguadores de pH más empleados son la yema de huevo, citrato de sodio, ácido cítrico, fosfatos y bicarbonatos (13, 20, 27).
- d) **Contener sustancias antibióticas** que inhiban el desarrollo de elementos contaminantes: el agregado de 500-1000 UI de penicilina y 1mg estreptomina por ml de diluyente previene la proliferación bacteriana (13).

## Conservación de semen canino

Se realiza con base al periodo en el cual será utilizado. La inseminación artificial (IA) en perros se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C a pesar de esto no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (20,27).

La refrigeración a 4°C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin embargo, la refrigeración de semen es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra (27).

La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura (13, 27).

La congelación por almacenaje en nitrógeno líquido, es considerada como la mejor técnica para preservar semen a través del tiempo, debido a que se obtiene un porcentaje de espermatozoides móviles descongelados entre el 60 y 70%, y una tasa de fertilidad del 60% en este método de congelación y el almacenaje con nitrógeno líquido (21).

Imagen 9.8. Tanque criogénicos de nitrógeno líquido. Fotografía tomada en Laboratorio 2 UIM, FESC-UNAM. México.

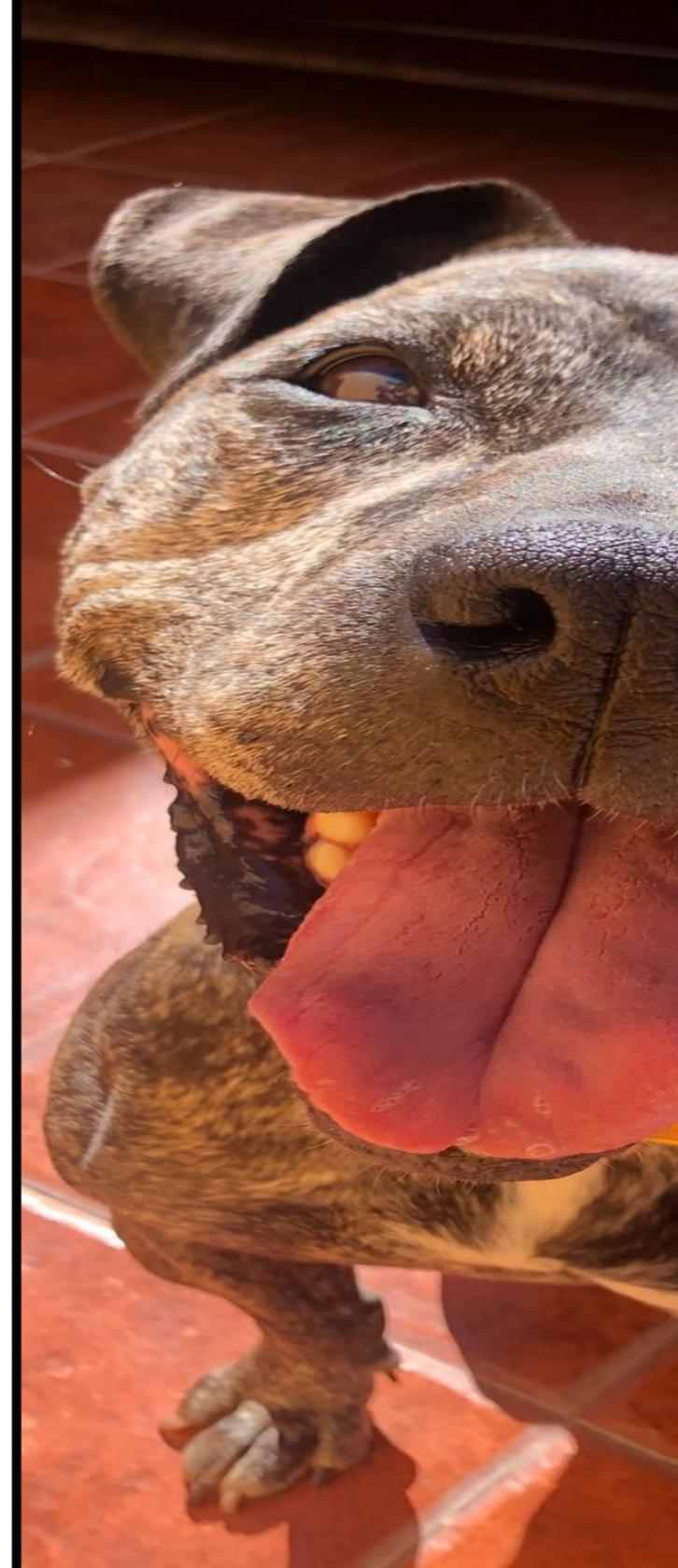


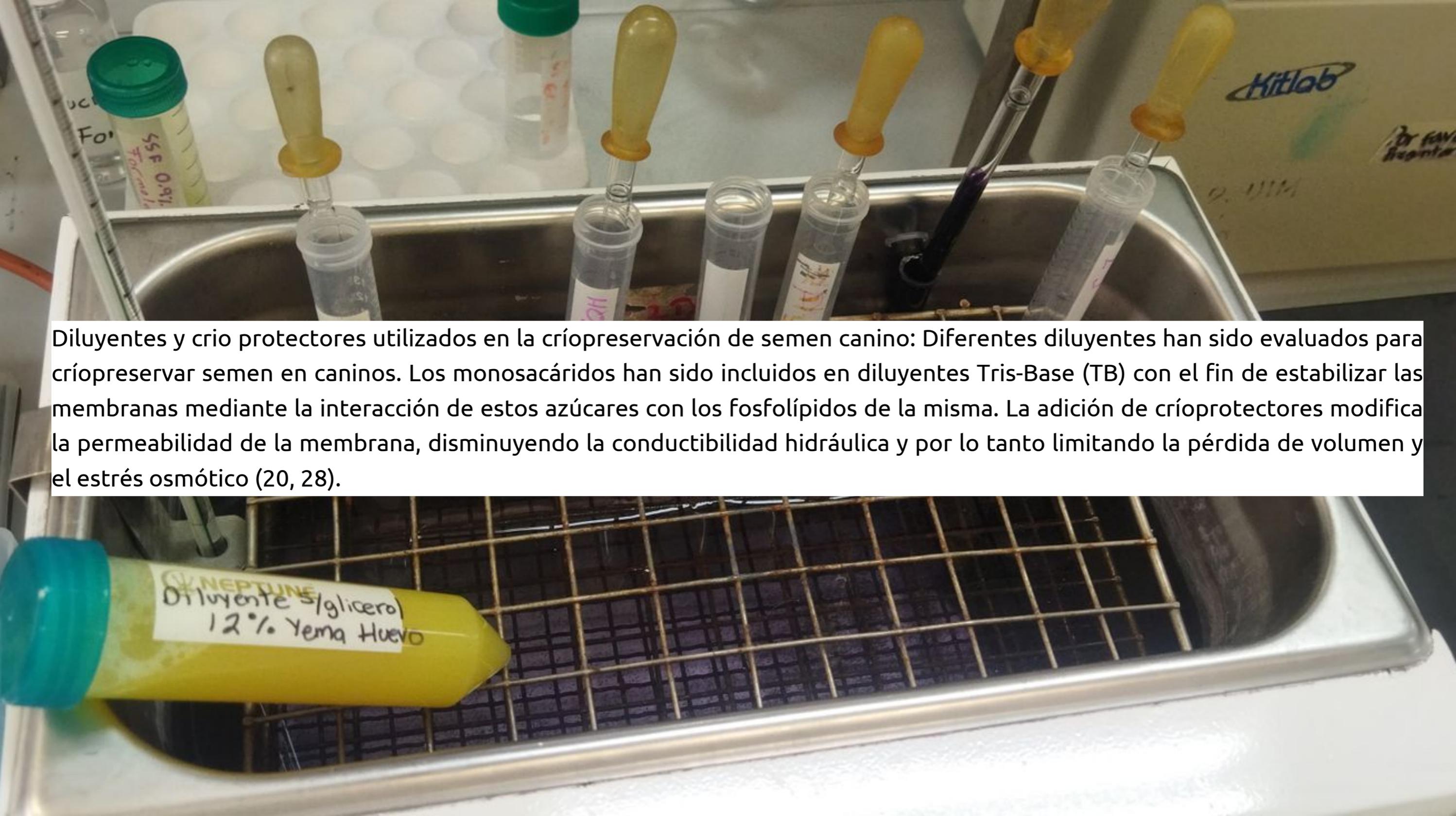


La congelación con exposición previa del semen empacado a vapores de nitrógeno antes de sumergirlo totalmente en nitrógeno líquido, se considera como congelación rápida. Algunos trabajos de congelación rápida han sido desarrollados utilizando semen canino. El semen canino puede congelarse en pastillas o pajillas de 0.5 ó 0.25 mL. Las pajillas son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en la descongelación (21).

Las pajillas se descongelan a 37°C, utilizando una solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0.5 mL se descongelan en baño térmico a 37°C, durante un minuto, o a 75°C durante 6 segundos, mientras que las mini pajillas (0.25 ml), deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos (21, 28)

Imagen 9.9. y 9.10 Perro adulto. Fotografía tomada por Paulina Villalvazo, Cuautitlán Izcalli. México.



A photograph of a laboratory workstation. In the foreground, a yellow pipette tip with a teal cap lies on a metal grid. The pipette has a white label that reads "NEPTUNE Diluyente 5/glicerol 12% Yema Huevo". In the background, several clear plastic microcentrifuge tubes are arranged in a metal tray. Some tubes have yellow pipette tips inserted into them. One tube on the right contains a dark purple liquid. To the left, a green-capped tube is labeled "55F 0.9% Formalin". The background also shows a white multi-well plate and a piece of equipment with the "Kitlab" logo.

Diluyentes y crio protectores utilizados en la criopreservación de semen canino: Diferentes diluyentes han sido evaluados para criopreservar semen en caninos. Los monosacáridos han sido incluidos en diluyentes Tris-Base (TB) con el fin de estabilizar las membranas mediante la interacción de estos azúcares con los fosfolípidos de la misma. La adición de crioprotectores modifica la permeabilidad de la membrana, disminuyendo la conductibilidad hidráulica y por lo tanto limitando la pérdida de volumen y el estrés osmótico (20, 28).

NEPTUNE  
Diluyente 5/glicerol  
12% Yema Huevo

# Bibliografía

1. Alamo S.D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs. ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$  (Tesis doctoral). Universidad de las Palmas de Gran Canarias. España.
2. Cardoso R.C., Silva A.R., Uchoa D.C., da Silva L.D. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 59(3-4):743–751. Brasil.
3. Denis R., Milanes C. (1999). Tecnología para la inseminación artificial en la especie canina. *Revista Cubana de reproducción animal*; 25:1–14. Cuba
4. Eilts B. (2005a). Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*; 64(3):692–697. Estados Unidos.
5. Eilts B. (2005b). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*; 64(3):685–691. Estados Unidos.
6. Harrison R.A., Vickers S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 88(1):343-352. Reino Unido.
7. Hideki F., Masashi I., Takasashi K. (1993). Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests. *International Journal of Fertility* 38(5), 311–315. Japón.
8. Johnston S.D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 21:3:421 – 425. Estados Unidos.
9. Johnston S.D., Root K.M.V., Olson P.N.S. (2001). The Dog - Semen collection, evaluation, and preservation. En: Johnston S.D., Root K.M.V., Schultz O.P. *Canine and feline Theriogenology*, 1ra Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. Pp. 287-306. Estados Unidos.
10. Johnston S.D., Root K.M.V., Olson P.N.S. (2001). The Tom - Semen collection, evaluation, and preservation. En: Johnston S.D., Root K.M.V., Schultz O.P. *Canine and feline Theriogenology*, 1ra Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. Pp. 508-520. Estados Unidos.
11. Kawakami E., Vandevort C. A., Mahi-Brown C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W., (1993). Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *The Journal of Experimental zoology* 265(5):599–603. Estados Unidos.
12. Mendoza C., Carreras A., Moos J., Tsarik J. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *Journal of Reproduction and Fertility* 95(3):755-63. España.

13. Meynard F.C.M., Torrez C.I.F. (2022) Manual de manejo, preservación y crio-conservación del semen canino. Manual. Universidad Nacional Agraria, Managua (Nicaragua).
14. Nelson R.W., Couto C.G. (2005). Medicina interna de animales pequeños. 3ra Ed. Intermédica. Pp 960-964. Argentina
15. Olaya A, Muñoz S, Maldonado J. (2003). Evaluación de dos protocolos de inseminación artificial con semen congelado y uno de refrigeración en caninos de criaderos del departamento de Antioquia y comparación con la monta natural. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 16: 88 – 89. Colombia.
16. Olivera J., Gil J., Araujo A., Gamarra J., Teixeira V., Fierro S. (2005). Preservación seminal para la ia cervical en majadas del proyecto, merino fino: semen refrigerado (24 y 48 horas). Proyecto Merino Fino del Uruguay - Fase I sexta entrega de carneros del núcleo fundacional u.e. "glencoe". Uruguay.
17. Restrepo B.G., Vásquez A.N., García A.E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad CES Medellín 4(2):119-129. Colombia.
18. Rijsselaere T.V.A., Tanghe S.C.M., Maes D., Kuif A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. Theriogenology, 64(3):706–719. Bélgica.
19. Rodríguez-Gil J.E., Montserrat A., Rigau T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. Theriogenology 42(5):815–829. España.
20. Rondona C.R. (2009). Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino (tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de medicina veterinaria. Perú.
21. Salinas P., Sánchez R., Risopatrón J. (2013). Criopreservación de Espermatozoides Caninos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . International Journal of Morphology, 31(1):217-224. Chile
22. Santiani A., Perez-Rosales M., Challco C. (2020). Caracterización básica y funcional del semen del perro sin pelo del Perú. Revista de Investigación Veterinaria 31(4): e19251. Perú.
23. Simpson G.M., Harvey M.J. (2000). Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales. Harcourt. España.
24. Stornelli M.A, Stornelli M.C. (2002). Hiperplasia prostática benigna en caninos: opciones terapéuticas. Revista de Medicina Veterinaria 83(5):224-230. Argentina.
25. Stornelli M.A. (2007). Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. Revista Brasileña de Reproducción Animal, Belo Horizonte 31(1):71-76. Brasil.
26. Stornelli M.A., Arauz M., Baschard S., de la Sota R.L. (2003). Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency. Reproduction in Domestic Animals 38(1):1-4. Argentina.
27. Stornelli M.A., Stornelli, M.C., Rodríguez R., Brussa M., Barbeito C., Massone A., Arauz M.S. (2000). Quiste paraprostático en caninos. Descripción de un caso clínico. Revista de Medicina Veterinaria 81(6):452-454. Argentina.
28. Tittarelli C.M. (2016). Extracción y evaluación seminal en caninos. En: Stornelli M.A. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. Editorial de la universidad de Plata. Pp 159-173. Argentina