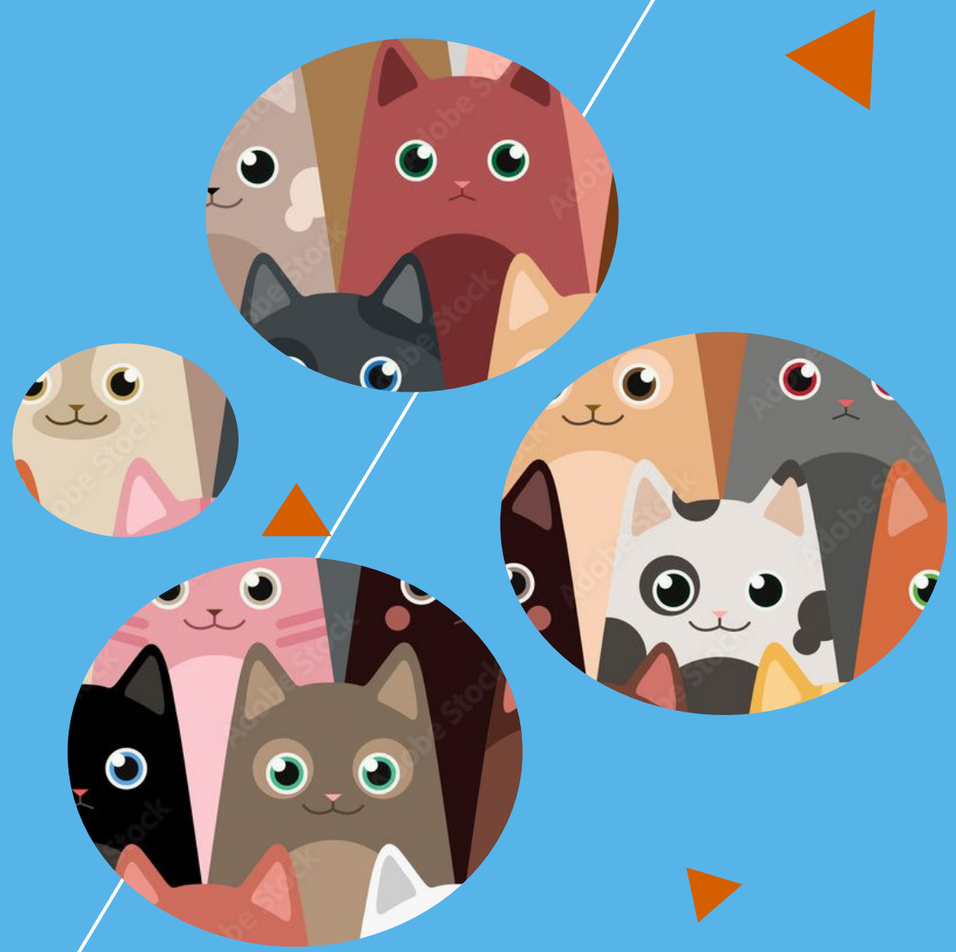
Congelación de semen

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia
Reprodución 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

La Inseminación Artificial (IA) en caninos ha tenido un auge principalmente en los últimos años, dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de interés mundial y representa distintas ventajas para la mejora genética y para la salud de los ejemplares. Por lo cual, la preservación de semen canino se ha constituido en una actividad importante para veterinarios y criadores (10).

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ha causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado (10).



Mediante la congelación es posible el uso del semen de un macho cuando éste ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios. Así mismo un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la cinofilia y la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro (9).

La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopía o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 % (11, 12).

Imagen 10.1 Perro adulto. Fotografía tomada por Hugo Olguín en Tula, México

Constantemente se modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Para lograr estos objetivos es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales (10).

Imagen 10.2. Pajillas de semen almacenadas en nitrogeno líquido. Fotografía tomada en Laboratorio 2, UIM. FESC- UNAM. México

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 (9, 27)

Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (14). En investigaciones se observó que los espermatozoides descongelados mótiles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con los cambios semejantes a la criocapacitación, inducidos por los procesos de congelación en la célula espermática. Durante la congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que causan reducción de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco (15). Esta reducción de la fertilidad se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan el daño del proceso de congelación y descongelación, como con la disfunción no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente (13).

Imagen 10.3. Gato adulto. Fotografía tomada por Grisha De los santos en Clínica Veterinaria Tepotzotlán, Estado de México, México.

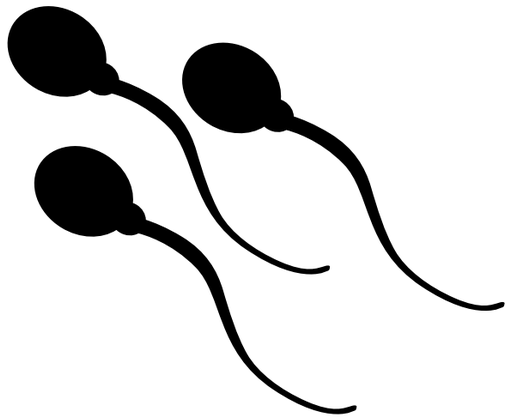
CRIOPROTECTORES

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 (16). 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 (16, 17) este es el más utilizado en la congelación de semen canino, ya que posee a 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 (18, 19). El crioprotector más utilizado para la peservación 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 (20).

Un aumento de las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y mejorando la calidad de los espermatozoides sobrevivientes (13). Diversos factores están implicados en las bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado. Múltiples factores afectan la sobrevida de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado (1).

Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la muestra se mezcla con un un diluyente el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol y posteriormente cuando la solución es congelada. Mas tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada (21).



Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar el daño a la que se ve sometida. Los cambios de volumen son solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación. Los diferentes factores de estrés están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores, la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular (21).

Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la viabilidad de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (14, 22). Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (14). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (22, 23). Para poder interactuar con el oocito, los espermatozoides deben estar vivos, mótiles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales (10).

Los parámetros seminales de movilidad del 70%, morfología del 70% de espermatozoides normales, y espermatozoides vivos 80% (10) deben tratar de conservarse lo mejor posible en el semen congelado, por tal motivo se utiliza glicerol en concentreaciones de entre 2-10% con el fin de preservar las características fecundantes de las muestras seminales sometidas a procesos de congelación y descongelación (2,3,6,7). Se ha reportado que las muestras sometidas a procesos de congelación con glicerol al 4% y 6% han mostrado mejores resultados (2).

Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30°C y 0°C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente (14). Este fenómeno es conocido como choque de frio y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie (1).

Imagen 10.4. Perro adulto. Fotografía tomada por Grisha De los santos en Clínica Veterinaria Tepotzotlán, Estado de México, México.

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0°C sin que la transición de fase de los lipidos de la membrana plasmática (de líquido-cristalino a gel) sea completo a 0°C, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5°C y 15°C (26). Se ha demostrado la importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en el mecanismo de injuria (29). El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el choque de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (24).

Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana. Este fenómeno se relacionaría en parte con el efecto crioprotector observado al agregar trealosa al diluyente utilizado para congelación, ya que la trealosa posee la propiedad de interaccionar con los lípidos de membrana (27) aumentando su estabilidad y limitando la transición de la fase (25), ejerciendo así un efecto estabilizador de la membrana, lo cual explicaría su acción crioprotectora (28).

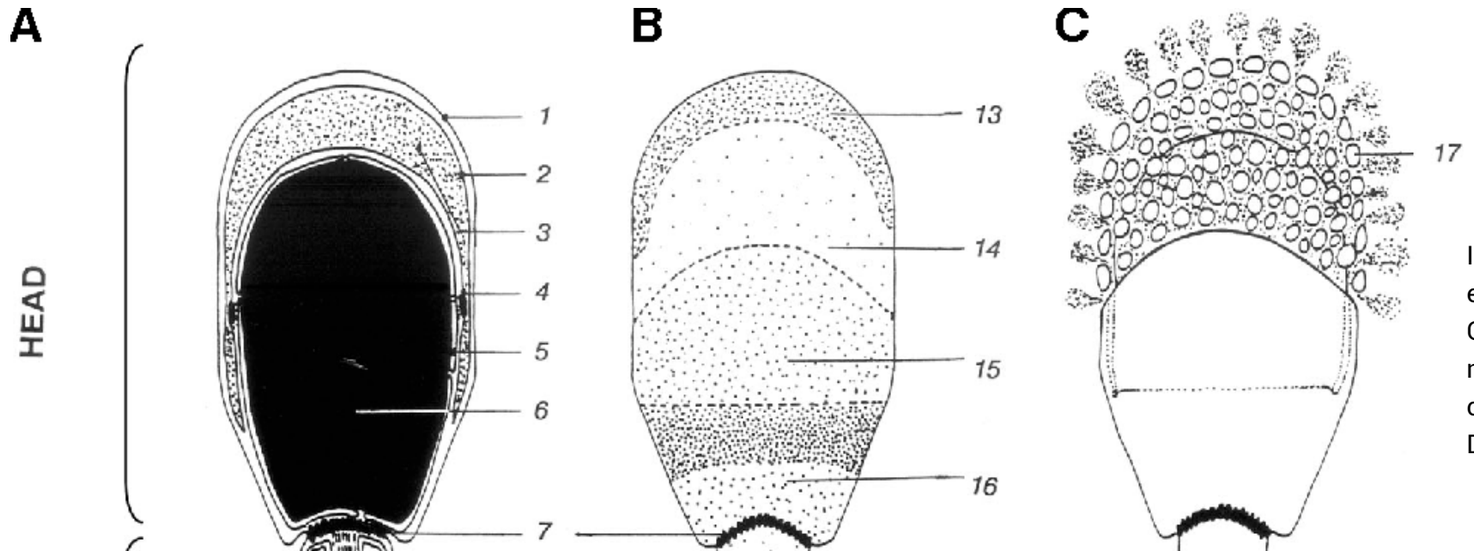


Imagen 10.5. Estructura del espermatozoide. Imagen adquirida de: Gadella et al. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. The International Journal of Developmental Biology, 52:473-80.

El choque de frío es visto como el estado extremo de un estrés continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia (24). El choque de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana (26). Así mismo en otra investigación se obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de criodaño observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre 5° y –20°C) y posterior calentamiento hasta 30 °C. En este experimento se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el proceso de calentamiento luego de la descongelación (30).

Imagen 10.6 Tanque de nitrogeno líquido para almacenación de pajillas de semen. Fotografía tomada en Laboratorio 2 de UIM, FESC - UNAM, México.

La tasa de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos, que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en el misma (31).

Cada tipo de almacenamiento (pastillas, pajuelas) requiere diferentes condiciones de descongelado. Las pastillas se descongelan a 37 ºC utilizando usualmente solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0,5 ml se descongelan en baño térmico a 37 ºC durante 1 minuto o a 75 ºC durante 6 segundos, mientras que las minipajuelas (0,25 ml) deben descongelarse a 75ºC durante 5 segundos (32, 33).

Estrés osmótico

Cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Sí la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (34). El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la facción no congelada (35). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la temperatura y el volumen de la fracción no congelada (10).

Imagen 10.7 Perros adultos en jardín. Fotografía tomada por Eréndira Cólin en Estado de México, México.

Un factor importante a considerar es la diferente sensibilidad a los procesos de congelación que poseen los espermatozoides de diferentes machos (36). Muchos estudios experimentales se han realizado utilizando un pool de semen de varios machos, en estos trabajos quedan enmascaradas las diferencias individuales entre machos (37). Estas diferencias son un factor importante en la selección del protocolo de congelación seleccionado para obtener buenos resultados a la descongelación. La optimización del protocolo de congelación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población (10).

Bibliografía

1. Restrepo B.G., Vásquez A., Garcia 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

2. Valderrama U.R., Rodríguez A.M.E., Álvarez R.L., Naranjo A.C.M. (2011). Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES Medellín 6(1):21-30. Colombia

3. Eilts B. (2005a). Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. Theriogenology 64(3):692–697. Estados Unidos.

4. Eilts B. (2005b). Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology 64(3):685–691. Estados Unidos.

5. Sánchez R., Cartagena P., Berland O. (2006). Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la Fertilidad potencial de semen canino refrigerado. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 17(1):1-7. Perú.

6. 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.

7. Meynard F.C.M., Torrez C.I.F. (2022). Manual de manejo, preservación y crio-conservación del semen canino. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua

8. Stornelli M.A., De la Sota R. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Analecta Veterinaria 25(2):29–38. Argentina.

9. Stornelli M.A., Stornelli M.C., Arauz M.S., De La Sota R.L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. Analecta Veterinaria 21(1):58–66. Argentina.thaw motility, viability and morphology of coyote (Canis latrans) spermatozoa. Theriogenology 64(9):1898-1912. Estados Unidos.

10. Stornelli M.A. (2016). Congelación De Semen E Inseminación Artificial. En: Stornelli M.A.; De la Sota R.L. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Editorial de la Universidad de Plata. Pp 221-234. Argentina
11. Linde-Forsberg C., Ström Holst B., Govette G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology 52(1):11–23. Suecia.
12. Silva L.D., Onclin K., Lejeune B., Verstegen J.P. (1996). Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. The Veterinary record 138(7):154–157. Bélgica.
13. Watson P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60-61:481–492. Reino Unido.
14. Watson P.F. (1995). Recent developments and concepts inthe cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Journal of Reproduction and Fertility 7(4):781- 791. Reino Unido.
15. Crister J.K., Huse-Benda A.R., Aaker D.D., Arneson B.W., Ball G.D. (1987). Criopreservation of human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Fertility and Sterility 47(6):980-984. Estados Unidos.
16. Silva A., Cardoso R., Silva L. (2005). Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 57(6):764–771. Brasileño.
17. Duty S.M., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L., Chen Z., Herrick R.F., Christiani D.C., Hauser R. (2003). Phthalate exposure and human semen parameters. Epidemiology 14(3):269-77. Estados Unidos.
18. Bohórquez C.R., De Ondiz A., Palomares R., Gallardo F. (2005). Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. Maracaibo 15(5):458-463. Venezuela.
19. Rodríguez A.S., Soares C.R., Da Silva M.L.D. (2002). Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. Revista Brasilera de Ciencia Veterinaria 9(1):25-28. Brasil.
20. Hori T., Odaka S., Oba H., Mizutani T., Kawakami E., Tsutsui T. (2006). Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. The Journal of Veterinary Medical Science 68(10):1055–1061. Japón.

21. Leivo S.P., Bradley L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. En: Gagnon C. The male gamete. McGill University 46:502-517. Argentina.
22. Mazur P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological system. Science 168(3934):939–949. Estados Unidos.
23. Mazur P., Leivo S.P., Chu E.H.Y. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Experimental cell research 71(2):345-355. Estados Unidos.
24. Butler W.J., Roberts T.K. (1975). Effects of some phosphatidyl compounds on board spermatozoa following cold shock or slow cooling. Journal of Reproduction and Fertility 43(1):183-187. Estados Unidos.
25. Chen T., Fowler A., Torner M. (2000). Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. Cryobiology 40(3):277-282. Estados Unidos.
26. Dobrins E.Z., Crowe L.M, Berger T., Anchordoguy T., Oversteet J.W., Crowe J.H., (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demostration using sperm as a model. The Journal of Experimental Zoology 265(4):432-437. Estados Unidos.
27. Crowe J., Carpenter J., Crowe L., Anchordoguy T.J. (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents, 26 th Annual meeting of the society for cryobiology. Pp. 219-224. Estados Unidos.
28. Bakás L.S., Disalvo E.A. (1991). Effect of Ca2+ on the cryoprotective actino of trehalose.Cryobiology 28(4):347-353. Argentina.
29. Pettit M.J., Bhur M.M. (1998). Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. Journal of andrology 19(6):736–746. Canada.
30. Holt W.V., North R.D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 91(2):451–461. Reino Unido.
31. Minter L.J., De Liberto T.J. (2005). Infuence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (Canis latrans) spermatozoa. Theriogenology 64(9):1898-1912. Estados Unidos.
32. Kirk R.W. (1989). Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice. Saunders. Pp. 1247- 1259. Estados Unidos.
33. Smith F.O. (1986). Update on freezing canine semen. En Kirk R.W. Current veterinary therapy. Philadelphia BW. Saunders. Pp: 1243-1248. Estados Unidos.
34. Foulkes J.A. (1977). The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 49(2):277-284. Reino Unido.
35. Watson P.F., Duncan A.E. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Cryobiology 25(2):131-142. Reino Unido.
36. Chen Y., Foote R.H., Tobback C., Zhang L., Hough S. (1993). Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk stenders. Jounal Dairy Science 76(4):1028-1034. Estados Unidos.
37. Blach E.L., Amann R.P., Bowen R.A., Frantz D. (1989). Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membranes integrity and motion characteristics. Theriogenology 31(2):283-298. Estados Unidos.
38. Gadella B., Pei-Shiue T., Boerke A., Brewis I. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. The International Journal of Developmental Biology, 52:473-480. Paises Bajos.