XVIII Congreso de Especialidades Veterinarias
26-27 de Abril de 2019 - Palacio de Congresos - ZARAGOZA

CONGELACIÓN DE SEMEN CANINO

Dra. María del Carmen de Alba Romero
Minitub Ibérica SL
Pol. Ind. La Drecera, C/ Metalurgia 1. 43470 Las Selva del Camp. Tarragona

INTRODUCCION

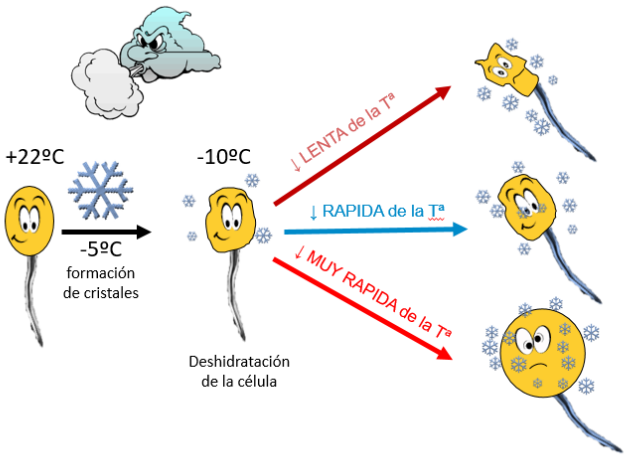
La crioconservación o congelación de semen es un método para preservar el material genético y mantener la diversidad genética de las especies, incluidos los perros. Esto prolonga el tiempo de almacenamiento y facilita el transporte de semen a distancia. En la actualidad, la inseminación artificial (IA) y la congelación del semen empieza a formar parte de los servicios disponibles en las clínicas de pequeños animales y la demanda para congelar el semen está aumentando.
Con la crioconservación las células espermáticas se enfrían a temperaturas por debajo de cero (-196ºC). El proceso generalmente implica agregar crioprotectores, enfriamiento, congelación, almacenamiento y descongelación del semen. Actualmente, la demanda del semen crioconservado está creciendo, pero hay varios puntos importantes para que la técnica tenga éxito:

- Nº limitado de espermatozoides que sobreviven al proceso de congelación
- Valores post-descongelación variables entre individuos
- Supervivencia espermática baja después de la congelación/descongelación
- Transporte: el semen congelado deben ser enviado siempre como mercancías frágiles (contenedor de N2L seco).
- Identificar el momento óptimo para IA
- Realizar la IA transcervical

PROCESO DE CONGELACIÓN DEL SEMEN CANINO

Durante la crioconservación disminuye la capacidad de los espermatozoides para la fecundación, lo que reduce el equilibrio de las enzimas antioxidantes de los espermatozoides y sus propiedades. Desde la introducción del glicerol como agente crioprotector por Polge y col. (1949) y el descubrimiento de dimetilsulfóxido (DMSO), la técnica de crioconservación se ha desarrollado dando lugar a diferentes protocolos y metodologías.
Sin embargo, la crioconservación tiene efectos negativos sobre la viabilidad de los espermatozoides. Este daño está relacionado con alteraciones de la membrana plasmática, asociadas a la formación de cristales de hielo intracelular, disminuyendo así la capacidad de fertilización de los espermatozoides. Durante la congelación hay una mayor peroxidación de los lípidos de la membrana de la célula espermática posiblemente causada por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el semen (Alvarez y Storey, 1992). La membrana espermática contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que hace que los espermatozoides sean altamente susceptibles a la peroxidación de lípidos (Aitken y col., 1996). Los principales factores que influyen en la supervivencia de los espermatozoides crioconservados son la presión osmótica, la curva de enfriamiento-calentamiento y la formación de cristales de hielo intracelular.

Figura 1. Cambios del espermatozoide durante el enfriamiento



Las diferentes técnicas de crioconservación del semen canino incluyen como primer paso la centrifugación de los espermatozoides. Los objetivos de la centrifugación son eliminar el exceso de líquido prostático, que tiene un efecto negativo en la motilidad y vitalidad de los espermatozoides congelados y descongelados, y estandarizar la dilución del semen a una concentración definida de espermatozoides. Las tasas de congelación deben ser lo suficientemente lentas para permitir que las células minimicen el potencial químico y los gradientes de osmolaridad a través de la membrana plasmática, pero lo suficientemente rápidos para deshidratar la célula. Por lo tanto, los procedimientos de congelación y descongelación deben garantizar el mantenimiento del pH, la osmolaridad, el suministro de energía y la prevención de lesiones criogénicas en el espermatozoide (figura 2).
El semen descongelado posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que durante el proceso de criopreservación se producen cambios en el espermatozoide que afectan a su supervivencia. Esta es una de las razones por las que el uso del semen descongelado en la especie canina requiere que la inseminación se realice bajo las premisas de determinación del momento óptimo para la fecundación y la deposición del semen en el útero. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse a través de la cateterización de cérvix o colocándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica.
La metodología utilizada para la crioconservación del semen canino consta de las siguientes etapas:

1. Colecta y evaluación del semen
2. Centrifugación de la fracción espermática a 700 rpm/ 5 – 10 minutos y eliminar el sobrenadante
3. Dilución a temperatura ambiente (20-22ºC) añadiendo el diluyente de congelación lentamente para evitar un choque térmico y moviendo el tubo para que la mezcla sea homogénea
4. Envasado en pajuelas en viales aptos para la congelación
5. Equilibrado a +5ºC / 90 minutos
6. Equilibrado en vapores de Nitrógeno Líquido durante 10-20 minutos
7. Sumergir las pajuelas en Nitrógeno Líquido
8. Descongelación del semen 38ºC/ 60 s o 70ºC /8 s

Figura 2. Principios de la crioconservación

- **DILUYENTES**
  - Protección contra el choque frío o cold-shock (glicerol y yema de huevo)
  - Capacidad tampón (fosfatos, yema de huevo)
  - Energía (azúcares)
  - Antibióticos (gentamicina)
- **FASES**
  1. ENFRIAMIENTO (de +37 ºC a +5 ºC): disminución del metabolismo celular
  2. CONGELACIÓN (de +5 ºC a -196 ºC): deshidratación de la célula
  3. DESCONGELACIÓN (-196 ºC a +37 ºC): rehidratación de la célula

CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DEL SEMEN CONGELADO

Es importante la correcta identificación de las pajuelas y llevar la trazabilidad de cada uno de los eyaculados almacenados en el tanque. El nivel de nitrógeno de los tanques de conservación se debe controlar al menos una vez a la semana. Los fabricantes indican la autonomía de los tanques en cada uno de los modelos. Por otro lado, los tanques tienen que estar en una habitación ventilada y con temperatura no superior a los 22ºC. Es importante proteger los tanques de golpes y corrosión.
El envío del semen canino congelado debe programarse de acuerdo a los requerimientos del cliente y de la distancia hasta el destino. Al igual que en el semen refrigerado, se identificará como material biológico y tiene que ir acompañado del correspondiente certificado sanitario del animal y un documento de no peligrosidad sobre la mercancía transportada. Además, en el caso de que el envío se haga vía aérea, el contenedor de transporte debe cumplir los requisitos establecidos por la IATA, y que conlleva el uso de un contenedor especial que mantenga las pajuelas en vapores de nitrógeno líquido.

Igualmente, las pajuelas deben estar acompañadas de su correspondiente espermiograma y donde se indicará el número de espermios viables por pajuela. No obstante, la documentación necesaria debe confirmarse con la compañía de transporte ya que puede variar entre empresas y destinos. Se recomienda la coordinación entre los profesionales veterinarios, esto es el responsable del envío del semen y el destinario del mismo. Una vez que llega el contenedor al destino y pasados los trámites aduaneros pertinentes, las pajuelas deben ser transferidas al contenedor de conservación definitivo hasta su uso. Antes de la inseminación se recomienda que el semen descongelado se compruebe la calidad del semen.

CONCLUSION

El éxito del semen congelado depende de la calidad del eyaculado inicial, el proceso de congelación utilizado, el almacenamiento del semen congelado, la descongelación del semen y la técnica de inseminación. El continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164 (4172), 666, 1949.
2. Alvarez JG and Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethalcryodamage to human sperm during cryopreservation.*J Androl,* 13: 232- 241,1992.
3. Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS. Superoxide dismutase in human sperm suspension: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free RadicBiol Med*, 21: 495-504,1996.
4. Batista M, Santana M, Niño T, Alamo D, Cabrera F, González F, &Gracia A. Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper. *Anim Rep Sci,* 130 (1-2),105-110, 2012.