

COMUNICACIÓN CORTA

Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos

J.A. González Santos^I, J.C. Tadeo Rosas^I, C. Ortega Camarillo^{II}, A. Toledano Olivares^I,
M. Vergara Onofre^I, A. Ávalos Rodríguez^I

^ILaboratorio Bioquímica de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, D.F. Correo electrónico: enkhel@hotmail.com; ^{II}Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la calidad de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de caninos, antes y después de ser criopreservados, a 3, 24, 48 y 72 horas postmortem, se obtuvieron los mismos, mediante orquiectomía de caninos sacrificados, a los cuales se les realizó la disección del epidídimo y mediante flujo retrogrado con el diluyente Andersen se recolectaron los espermatozoides. A las muestras obtenidas se les evaluó la movilidad progresiva, viabilidad e integridad acrosomal antes y después de ser criopreservadas a -196°C en nitrógeno líquido. Los resultados muestran que el promedio de espermatozoides con movilidad progresiva va decreciendo significativamente ($p<0.05$) después de las 48 horas donde se obtiene un 70.45 ± 5.88 , 25.85 ± 4.04 postmortem y postdescongelado, respectivamente. Para los espermatozoides vivos también va disminuyendo de manera significativa ($p<0.05$) obteniendo un porcentaje de 92.35 ± 1.78 a las 3 horas, a las 24 horas de 79.95 ± 3.48 ; a las 48 horas de 60.75 ± 6.73 y a las 72 horas de 58.45 ± 3.37 . Asimismo el promedio de espermatozoides vivos al descongelar fue disminuyendo de manera significativa ($p<0.05$), a las 3 horas 73.30 ± 4.64 de espermatozoides vivos, a las 24 horas 61.75 ± 5.46 , a las 48 horas 48.95 ± 5.15 y a las 72 horas 29.75 ± 5.8 . Por último la integridad acrosomal obtuvo una disminución con diferencia significativa ($p<0.05$) encontrando los mejores resultados postmortem y postdescongelado hasta las 24 horas 78.05 ± 4.57 , 61.95 ± 4.55 . Se concluye que la técnica de extracción con el diluyente utilizado, así como la congelación son favorables para la recuperación de espermatozoides de cola de epidídimo de perros postmortem.

Palabras clave: espermatozoides caninos, cola de epidídimo, postmortem, criopreservación, movilidad progresiva, viabilidad e integridad acrosomal.

Epididymal sperm cryopreservation at different postmortem times in canine

ABSTRACT: The quality of the spermatozoa obtained from canine epididymis tail before and after being cryopreserved at 3, 24, 48 and 72 hours postmortem was evaluated. The sperm was obtained by orchietomy of sacrificed canines, which after dissection of the epididymis, the sperm was collected by retrograde flow with the diluent Andersen. The progressive motility, viability and acrosomal integrity were evaluated in the samples obtained before and after being cryopreserved at -196°C in liquid nitrogen. The results showed that the average number of spermatozoa with progressive motility decreased significantly ($p<0.05$) after 48 hours, when values of 70.45 ± 5.88 and 25.85 ± 4.04 , postmortem and post-thawed respectively, were obtained. The live spermatozoa also decreased significantly ($p<0.05$) to obtain percentages of 92.35 ± 1.78 at 3 hours, to of 79.95 ± 3.48 at 24 hours, to 60.75 ± 6.73 at 48 hours and 58.45 ± 3.37 at 72 hours. Likewise, the averages of live spermatozoa at thawing decreased significantly ($p<0.05$), where the the percentages of live spermatozoa were 73.30 ± 4.64 at 3hours, 61.75 ± 5.46 at 24 hours, 48.95 ± 5.15 at 48 hours and 29.75 ± 5.8 at 72 hours. Finally, the acrosomal integrity was significantly reduced ($p<0.05$) with the best results observed until the 24 hours, 78.05 ± 4.57 and 61.95 ± 4.55 for post-thawing and postmortem, respectively. It was concluded that the extraction technique with the diluent used and freezing allows a favorable postmortem recovery of sperm from epididymis tail of dogs.

Key words: canine spermatozoa, epididymal tail, postmortem, cryopreservation, progressive motility, viability and acrosomal integrity.

El avance de la biotecnología ha demostrado que los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales (EE) en especies domésticas pueden ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizado en animales silvestres en vías de extinción. De esta manera resulta importante aumentar las posibilidades de su preservación, sumándose al esfuerzo mundial para evitar la pérdida de estas especies (1).

Desde que Walton (2) recuperó espermatozoides vivos del conducto deferente de conejos, se han realizado estudios acerca de la preservación de material genético en diversas especies postmortem y post-orquiectomía en ratones (3), ciervos (4), ovinos (5), gatos (6), perros (7), equinos (8), e incluso en panda gigante (9). Díaz y Ojeda (1), mencionan que los avances en la Biotecnología, aplicados en la reproducción animal, han demostrado que la recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimarios en especies domésticas puede ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizado en animales silvestres en vías de extinción.

En los caninos la obtención y conservación postmortem de espermatozoides viables de cola de epidídimo, se ha considerado como una técnica de gran importancia para la preservación de animales con alto valor genético (10).

Actualmente, la recuperación de EE potencialmente fértiles almacenados en la cola del epidídimo es de suma importancia, en especial por la dificultad que implica la recolección de estos en animales silvestres (11). Esto ha inducido a diseñar diversas metodologías que permitan preservar la viabilidad de los espermatozoides caninos, pero existen diversos factores que determinan la viabilidad de estos, como el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los espermatozoides, el manejo y la temperatura del epidídimo durante ese tiempo, estos son factores condicionantes para la supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides (10).

Dichos factores pueden causar cambios que alteren la viabilidad de las células espermáticas, los cuales deben tenerse en cuenta ya que ante la muerte repentina de un animal, la única opción para salvar las células reproductivas es el transporte de los testículos para la recuperación y criopreservación espermática (11). Por ello, en esta investigación se evaluaron espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de caninos postmortem antes y después de ser criopreservados.

La recolección de las muestras se realizó por la técnica de orquiectomía a caninos criollos menores de

seis años de edad después de haber sido sacrificados en un centro de control canino de la ciudad de México según la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 (12). Los testículos se mantuvieron con solución salina a una temperatura de 4°C, para ser trasladados al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, para posteriormente obtener los espermatozoides dependiendo del tiempo postmortem (3, 24, 48 y 72 horas).

Se localizó la cola del epidídimo y el conducto deferente de los testículos, y en la porción media de la cola del epidídimo se realizó un corte transversal para obtener la mayor cantidad de espermatozoides maduros; esto se efectuó en cada tiempo postmortem. La porción de la cola del epidídimo se colocó dentro de un tubo, dejando fuera el conducto deferente y se le realizó el lavado con 3 ml de diluyente Andersen, utilizado para congelar semen de caninos (13). El diluyente contiene Tris (hidroximetil-metilamina) (2.9 g), Fructuosa (1.25 g), Acido Cítrico (1.32 g), Glicerol 6% (v/v), y yema de huevo 20% (v/v), estreptomycin (1 mg/ml), penicilina (100 UI/ml), diluidos en 100 ml de agua bidestilada.

De los 3 ml de muestra obtenida se tomó una alícuota de 10µl para evaluar su movilidad progresiva en el microscopio óptico a 10X. La viabilidad se evaluó mediante la técnica de tinción supravital eosina-nigrosina (14), colocándose 4µl de la muestra, 2µl de eosina y 4µl de nigrosina en un portaobjetos para la realización de un frotis y su posterior observación al microscopio a 40X contándose 200 células.

La evaluación de la integridad acrosomal se realizó por medio de la tinción de Azul de Coomassie (15), colocando 4µl de muestra en un portaobjetos con aplicación previa de polilisina para la realización de un frotis y posteriormente sumergirlo en Azul de Coomassie y observarlo al microscopio a 40X, 24 horas después, contando 200 células.

Los 2 ml restantes de muestra con diluyente se mantuvieron a 4°C por 1 hora, posteriormente se realizó el embasado en pajillas francesas con capacidad de 0.5 ml (16).

Las pajillas llenas y selladas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido a una altura de 8 cm sobre el nivel del mismo por 10 minutos (17), para posteriormente sumergirlas en un termo criogénico a -196°C.

Las muestras fueron descongeladas en un recipiente con agua a temperatura de 38°C por 37 segundos y posteriormente se volvió a evaluar la movilidad progresiva, la viabilidad y la integridad acrosomal.

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico Statistical Analysis System (18). Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías y posteriormente se realizó prueba de Tukey al haber encontrado diferencias en al menos dos grupos.

La movilidad progresiva a diferentes tiempos postmortem y post-descongelación disminuyó significativamente ($p < 0.05$) después de las 72 horas (Tabla 1).

En la Tabla 2 se observan los resultados de espermatozoides vivos con la tinción supravital, obtenidos de la cola del epidídimo a diferentes tiempos postmortem (Figura 1); el porcentaje de espermatozoides vivos va disminuyendo de manera significativa, después de la 72 horas así como el porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos post-descongelamiento ($p < 0.05$).

En la Tabla 3 se observa la disminución significativa del porcentaje de integridad acrosomal conforme al aumento de horas postmortem, encontrándose diferencias estadísticas ($p < 0.05$). En la Figura 2, se observan espermatozoides con daño en el acrosoma.

Los promedios de movilidad progresiva postmortem obtenidos en esta investigación a las 3, 24 y 48 horas de refrigeración, fue similar con el obtenido a las 72 horas, reportado por Yu y Leibo (11). También los resultados obtenidos en esta investigación fueron mayores a los reportados por Hewitt *et al.* (19) con 31.25%

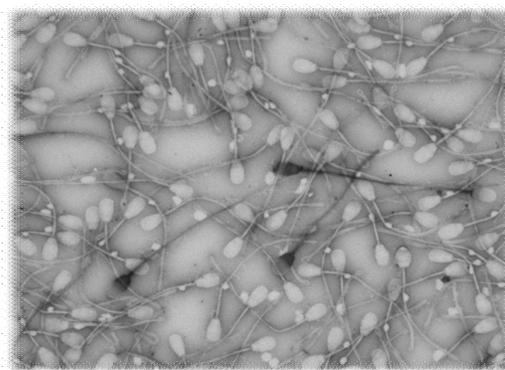


FIGURA 1. Viabilidad espermática (Los espermatozoides vivos color blanco y los muertos de color obscuro./ *Sperm Viability (White live spermatozoa and dark-colored dead spermatozoa).*)

y por Yu y Leibo (11) con 50% de movilidad progresiva en espermatozoides de cola de epidídimo de 32 perros de razas puras y criollos. Nuestros resultados pudieran estar determinados por el tipo de muestra, ya que en este trabajo fueron obtenidas de perros que no tenían entre 1 y 2 días de ser capturados y que sus condiciones eran aceptables. Además influyó positivamente el control estricto de las horas postmortem y de la temperatura, que se mantuvo a 4°C durante el transporte de los testículos, así también el tipo de diluyente para la criopreservación, tal como lo recomienda Savignone *et al.* (20) y Tittarelli *et al.* (21) quienes men-

TABLA 1. Promedio de movilidad progresiva de espermatozoides de cola de epidídimo a diferentes tiempos postmortem y post descongelación/ *Average of progressive motility of spermatozoa from epididymal tail at different postmortem and post-thaw times.*

	Horas			
	3	24	48	72
Pm	90.50±3.94 ^a	75.50±4.83 ^a	70.45±5.88 ^a	61.25±3.58 ^a
Pd	66.25±7.23 ^b	36.75±11.72 ^b	25.85±4.04 ^b	22.00±7.14 ^b

^{a,b}. Letras distintas dentro de la columna indican que existe diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.05$). Postmortem (Pm), Post descongelación (Pd).

TABLA 2. Promedio de viabilidad de espermatozoides de cola de epidídimo a diferentes tiempos postmortem y post descongelación/ *Average of viability of spermatozoa from epididymal tail tail at different postmortem and post-thaw times.*

	Horas			
	3	24	48	72
Pm	92.35±1.78 ^a	79.95±3.48 ^a	60.75±6.73 ^a	58.45±3.37 ^a
Pd	73.30±4.69 ^b	61.75±5.46 ^b	48.95±5.15 ^b	29.75±5.81 ^b

^{a,b}. Letras distintas dentro de la columna indican que existe diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.05$). Postmortem (Pm), Post descongelación (Pd).

TABLA 3. Promedio de integridad acrosomal a diferentes tiempos postmortem y post descongelación de espermatozoides de cola de epidídimo./ *Average of acrosomal integrity of spermatozoa from epididymal tail at different postmortem and post-thaw times.*

	Horas			
	3	24	48	72
Pm	88.10±3.44 ^a	78.05±4.57 ^a	50.65±4.42 ^a	41.15±4.39 ^a
Pd	75.85±3.11 ^b	61.95±4.55 ^b	49.75±5.53 ^a	26.05±4.38 ^b

^{a,b}. Letras distintas dentro de la columna indican que existe diferencia significativa entre tiempos ($p < 0.05$). Postmortem (Pm), Post descongelación (Pd).



FIGURA 2. Integridad Acrosomal (Azul de Coomassie) Las flechas indican espermatozoides con reacción acrosomal./ *Acrosomal Integrity (Blue of Coomassie) The arrows indicate sperms with acrosomal reaction.*

cionan que esta variable, junto a la temperatura, debe ser tomada en cuenta para salvar las células reproductivas ante la muerte repentina de un animal. Estos resultados fueron aceptables para el proceso de congelación, excepto el promedio a las 72 horas, ya que la mayoría de los autores refieren que solo se consideran aceptables los espermatozoides con una movilidad progresiva mayor o igual a 70% para este proceso (22).

Soler *et al.* (23) demostraron que la viabilidad espermática se mantiene sin ningún tipo de alteración hasta 4 días después de la muerte conservados a 5°C (7). En esta investigación se trabajó a 4°C todas las muestras y el diluyente utilizado, obteniendo buenos resultados antes y después de criopreservar, siendo mayores al promedio de viabilidad obtenido por Hori *et al.* (17). Estos investigadores criopreservaron espermatozoides de cola de epidídimo de 17 perros Beagle, obteniendo un promedio de viabilidad de 53.1±3.3% logrando una gestación de seis hembras inseminadas intrauterinamente.

Los resultados de la integridad acrosomal se muestran en la Tabla 3, donde se observan los promedios más altos post-mortem, siendo de 78.05±4.57 los re-

sultados a las 24 horas mayores al promedio obtenido por Tittarelli *et al.* (21) que fue de 73.9 ± 4.2 en recuperación a las 24 horas de espermatozoides de canino obtenidos de epidídimo y criopreservados inmediatamente después de la castración. Ponglowhapan y Chatdarong (7) criopreservaron muestras espermáticas obtenidas de cola de epidídimo de 13 perros después de quince minutos de su castración, reportando promedios de 45.5±2.2 de acrosomas intactos al descongelar, siendo este un porcentaje menor al obtenido en los resultados de esta investigación a las 3 y 24 horas.

En cuanto a las diferencias significativas a las 72 horas, se pudieran explicar por el tipo de procesamiento de la muestra, desde su extracción, el manejo de la temperatura, el diluyente utilizado y el método de criopreservación.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la metodología aplicada es favorable para recuperar espermatozoides viables de cola de epidídimo de perro, lo que resulta de gran importancia para la conservación de especies en peligro de extinción en nuestro país.

REFERENCIAS

1. Díaz GB, Ojeda RA. Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos 2000; pp 106. Mendoza, SAREM. Argentina.
2. Walton A. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *J Exp Biol.* 1930;7: 201-219.
3. Sato M, Ishikawa A. Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival. *Theriogenology.* 2004;61(7):1455-1469.
4. Hishinuma M, Susuki K, Sekine J. Recovery and cryopreservation of Sika Deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymes stored at 4°C. *Theriogenology.* 2003;59(3-4):813-820.

5. Kaabi M, Paz P, Álvarez M, Anel E, Boixo JC, Roussi H, et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*. 2003;60(7):1249-1259.
6. Filliers M, Rijsselaere T, De Causmaecker V, Bossaert P, Dewulf J, Pope CE, et al. Computerassisted semen analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cooled storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology*. 2008;70(9):1550-1559.
7. Ponglowhapan S, Chatdarong K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2008;69:666-672.
8. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Soto MYG, Verona JEH, García RAD. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim*. 2012;34(2):84-88.
9. Perez-Garnelo SS, Garde J, Pintado B, Borque C, Talavera C, Delclaux M. Characteristics and in vitro fertilizing ability of Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) frozen-thawed epididymal spermatozoa obtained 4 h postmortem: a case report. *Zoo Biol*. 2004;23:279-285.
10. Armas R, Fernández Sandra A, Vásquez VC, Santiani María, Alexei A. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Rev investig vet Perú*. 2011;22(3):199-205.
11. Yu I, Leibo SP. Recovery of motile membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*. 2002;57:1179-1190.
12. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. *Diario Oficial de la Federación* del 16 de Julio de 1995.
13. Andersen K. Fertility of frozen semen. *Acta Vet Scand*. 1972;13:128-130.
14. Swanson EW, Berden HJ. An eosin nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Animal Sci*. 1951;10:981-87.
15. Larson JL, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes from several species. *Mol Reprod Dev*. 1999;952:445-449.
16. Hernández, PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Juárez RE, Soto MYG, García RAD. Efecto de la criopreservación de semen de ovino en relación a su viabilidad y estado acrosomal. *Rev Salud Anim*. 2012;34(2):78-83.
17. Hori T, Hagiuda M, Kawakami E, Tsutsui T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology*. 2005; 63:1573-1583.
18. SAS. Statistical Analysis System SAS/STAT User's Guide (Release 6.03) 2001; SAS Inst. Inc. Cary, N.C. USA.
19. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*. 2001;67(1-2):101-111.
20. Savignone E, Stornelli C, Stornelli A, Arauz S, De la Sota L. Estudio de la supervivencia espermática del semen almacenado a 4°C y 15°C en MRA yema de huevo. Resúmenes del I congreso Nacional de la Asociación de veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina 2001; p 165.
21. Tittarelli C, Savignone C, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De la Sota R. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*. 2006;66(6-7):1637-1640.
22. Ivanova M, Mollova M, Ivanova-Kicheva M, Petrov M, Djarkova T, Somlev B. Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*. 1999;52:163-170.
23. Soler AJ, Perez-Guzman M, Garde JJ. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability and morphological integrity. *J Exp Zool*. 2003;295:188-99.

Recibido: 8-11-2012.

Aceptado: 11-3-2013.