

Criopreservación de Espermatozoides Caninos a -80°C

Cryopreservation of Canine Spermatozoa at -80°C

Paulo Salinas^{**}; Raúl Sánchez^{****} & Jennie Risopatrón^{****}

SALINAS, P.; SÁNCHEZ, R. & RISOPATRÓN, J. Criopreservación de espermatozoides caninos a -80°C. *Int. J. Morphol.*, 31(1):217-224, 2013.

RESUMEN. La congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (N₂L) es la técnica más utilizada para preservar el semen de canino y de otras especies domésticas durante largos períodos de tiempo. Este estudio fue diseñado para validar el uso del ultracongelador de -80°C para congelar y almacenar semen canino en pajuelas. Tres protocolos fueron ensayados (n=10): Control: semen congelado y almacenado en N₂L; Exp. 1: semen congelado y almacenado -80°C, y Exp.2: semen congelado a -80°C y almacenado en N₂L. Postdescongelación se evaluó por citometría de flujo la viabilidad e integridad de membrana plasmática (SYBR-14/PI), potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m; JC-1), integridad de la membrana del acrosoma (PSA/FITC-PI), translocación de fosfatidilserina (Annexin-V-FITC/PI) y fragmentación del ADN (TUNEL). No se observaron diferencias significativas (P<0,05) entre los grupos Control, Exp.1 y Exp.2 respecto a: integridad de membrana plasmática intacta (42,2 ± 5,3; 35,57 ± 10,3 y 40,76 ± 12,1; respectivamente), $\Delta\Psi$ m normal (54,7 ± 20,6; 44,4 ± 15,8 y 43,4 ± 15,3 respectivamente), membrana acrosomal intacta (42,9 ± 11,1; 53,2 ± 15,8 y 48,7 ± 20,1 respectivamente) y ADN fragmentado (0,87 ± 0,41; 0,75 ± 0,16; 0,79 ± 0,27 respectivamente). Sin embargo, el promedio de la motilidad progresiva postdescongelación de los grupos E1 y E2 (37,0 ± 4,4%; 36,8 ± 4,1% respectivamente) demostraron diferencias (P<0,05) respecto al grupo Control (55,9 ± 8,7%). Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la utilización del ultracongelador de -80°C para congelar y almacenar espermatozoides caninos tiene un uso potencial en medicina veterinaria como alternativa a la utilización del N₂L.

PALABRAS CLAVE: Canino; Espermatozoide; Congelación; Ultracongelador de -80°C.

INTRODUCCIÓN

En caninos, la congelación y conservación de espermatozoides por periodos prolongados de tiempo se realiza en nitrógeno líquido (N₂L) (Alamo *et al.*, 2005). Además, han sido utilizadas técnicas alternativas para el procedimiento de congelación como el hielo seco y ultra-congeladores programables para conservar muestras de semen, sin embargo el almacenamiento es en N₂L (Olar *et al.*, 1989; Hay *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1993).

Ha sido determinada la función espermática en ultracongeladores de -152°C utilizando parámetros como la motilidad, reacción del acrosoma y morfoanomalías (Álamo *et al.*; Batista *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen antecedentes de la utilización del ultracongelador de -80°C, para congelar semen canino en pajuelas convencionales por periodos cortos como alternativa a la técnica convencional de congelación en N₂L. En este estudio se evalúa el efecto

de la temperatura de congelación y almacenamiento a -80°C, en comparación al método convencional de congelación y almacenamiento en N₂L, sobre parámetros esenciales de la función del espermatozoide de canino, tales como motilidad progresiva, funcionalidad de membranas (plasmática, acrosomal y mitocondrial) y fragmentación del ADN.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales. Se utilizaron tres machos caninos clínicamente sanos (1 Labrador Retriever, 1 Golden Retriever y 1 mestizo) de 20 – 25 kg, con edades que fluctuaron entre los 3 y 5 años, pertenecientes al Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Los caninos fueron manteni-

* Centro de Biotecnología en Reproducción (BIOREN-CEBIOR), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

** Laboratorio de Anatomía Veterinaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Temuco, Chile.

*** Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

**** Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

dos con una dieta balanceada y agua *ad-libitum*. La condición sanitaria fue evaluada periódicamente por un médico veterinario. Los animales fueron entrenados previamente como donantes y utilizados rutinariamente como donantes de semen. Para colectar los eyaculados, los caninos permanecieron un período mínimo de abstinencia de 3 días (Linde-Forsberg, 1995).

Obtención de los eyaculados. Para cada ensayo experimental (n=10), el semen fue colectado una vez por semana por manipulación digital en tubos graduados previamente temperados. Solo se colectó la segunda fracción del eyaculado rica en espermatozoides (Kutzler, 2005). Inmediatamente después de la colecta, se realizó la evaluación espermática de la motilidad, concentración por microscopía óptica y funcionabilidad de las membranas espermáticas por citometría de flujo, para asegurar una adecuada calidad seminal (Cheuquemán *et al.*, 2012) como se describe más adelante en el texto (evaluación espermática). Solo eyaculados que presentaron un volumen de segunda fracción > a 1,5 ml, motilidad progresiva >70%, una concentración > a 200×10^6 espermatozoides/ml y viabilidad >80% fueron incluidos en este estudio. Alícuotas de similar concentración fueron mezcladas para obtener un pool de semen (n=10) con el propósito de aumentar el volumen y eliminar la variabilidad entre las muestras (Rijsselaere *et al.*, 2002; Versteegen *et al.*, 2005).

Dilución y congelación del semen. En cada ensayo experimental, el pool de semen fue centrifugado a 300 x g por 5 min, el plasma seminal eliminado y el pellet diluido en el medio Tris (Tris buffer-glucosa; Peña *et al.*, 2001) y nuevamente centrifugado en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante fue descartado y el pellet diluido en Extender 1 (Shäffer-Somi *et al.*, 2006; Medio Tris suplementado con 20% [v/v] de yema de huevo y 3% [v/v], glicerol en medio Tris [pH 6.53, 740 mOsm]) para obtener una concentración ajustada de 200×10^6 espermatozoides/ml a temperatura ambiente. El semen diluido fue equilibrado a 4°C durante 1 h. Después de este periodo, el semen fue rediluido (1:1, v/v) en Extender 2 (Shäffer-Somi *et al.*; Medio Tris suplementado con 20% [v/v] yema de huevo, 5% [v/v] glicerol y 0,5% [v/v] de Equex STM paste [Nova Chemical Sales, Scituate, MA, USA] [pH 6.4; 1370 mOsm])obteniéndose una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente, la suspensión espermática fue envasada en pajuelas de 0,5 ml y mantenidas a 4°C. El tiempo estimado desde la colecta de semen hasta el paso previo a la congelación fue 80 min aproximados. Tres diferentes protocolos de congelación y almacenamiento fueron aplicados: Control: Las pajuelas fueron congeladas y almacenadas en N₂L (Kim *et al.*, 2010). Exp. 1: Las pajuelas fueron congeladas y almacenadas en el ultracongelador de -80°C. Exp. 2: Las pajuelas fueron congeladas en el

ultracongelador de -80°C y almacenadas en N₂L. Posterior a 30 d las pajuelas fueron descongeladas (Kim *et al.*) y ajustadas a una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml para la evaluación de parámetros funcionales.

Evaluación de la función espermática. La función espermática fue analizada en el semen fresco y post descongelación en cada uno de los grupos. Para lo cual se tomaron alícuotas de las diferentes muestras espermáticas las que fueron lavadas (300 x g por 5 min) en medio Tris. Las suspensiones espermáticas (semen fresco y de cada grupo) fueron ajustadas con medio Tris a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Posteriormente, se prepararon alícuotas para las diferentes técnicas de evaluación espermática, que a continuación se detallan.

Motilidad (MOP). La valoración de la motilidad progresiva en los espermatozoides se realizó siempre por el mismo evaluador. El número de campos valorados fue un mínimo de diez, siempre en el centro de la muestra, para obtener valores objetivos. Se determinó la motilidad progresiva post descongelación utilizando 10 µl de suspensión espermática en un portaobjeto bajo microscopio óptico (Axiolab drd, KT 450905, Zeiss), con platina temperada (37°C) y condensador de contraste de fases a 400x. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se determinó considerando los grados 3 y 4 dentro de una escala de 0 a 4 (Risopatrón *et al.*, 2002; 2012; Kim *et al.*). El promedio de las diez sucesivas estimaciones fue registrado como porcentaje de motilidad progresiva.

Viabilidad e integridad de la membrana plasmática. La viabilidad fue considerada como el porcentaje de espermatozoides vivos con membrana plasmática íntegra. Se utilizó el kit comercial SYBR-14/PI (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit; Molecular Probes n° catálogo L7011 Eugene, OR, USA) (Rijsselaere *et al.*, 2004). A 250 µl de suspensión espermática ($2,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml) se le adicionó 2,5 ml de SYBR-14 (10 µM en DMSO), se incubaron durante 7 min a 38°C, posteriormente se adicionó 1 µl de Ioduro de Propidio (PI 250 µg/ml) incubando 7 min adicionales a 38°C. Los espermatozoides fueron lavados con Sp-TALP (Parrish *et al.*, 1988), centrifugados a 300 g por 5 min y el pellet resuspendido en 400 µl del mismo medio de lavado, para ser analizados por citometría de flujo. Los espermatozoides analizados se clasificaron como: vivos con membrana plasmática intacta (SYBR-14 +/PI -), muertos (SYBR-14 - /PI +) y moribundos (SYBR-14 + /PI +). En cada ensayo el análisis fue repetido tres veces.

Integridad de la membrana acrosomal. Se utilizó la técnica de tinción fluorescente FITC-conjugada con Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) (Kit FITC-PSA/PI; Sigma

St. Louis MO, USA) (Peña *et al.*, 1999). A 250 μ l de suspensión espermática ($2,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml) se adicionó 2,5 μ l PSA-FITC (2μ M de solución stock/PBS) y 5 μ l de PI (250 μ g/ml). La suspensión espermática fue incubada durante 15 min a 38°C en oscuridad, luego se centrifugó a 300 g por 5 min, y el pellet fue re-suspendido en 400 μ l de Sp-TALP para su análisis en citómetro de flujo. Los espermatozoides fueron clasificados como: vivos con acrosoma intacto (FITC-PSA- /PI-) y vivos con acrosoma dañado (FITC-PSA+/PI-). En cada ensayo el análisis fue repetido tres veces.

Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ M). Se utilizó el kit comercial Mit-E- Ψ Mitochondrial Permeability Detection Kit (BIOMOL® Research Laboratories, AK-116). Un volumen de 250 μ l de suspensión espermática ($2,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml) fue centrifugado a 300 g por 5 min y descartado el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 250 μ l de solución de trabajo (1 μ l JC-1 en 500 μ l TRIS), luego se incubó durante 15 min a 38 °C protegido de la luz. Posteriormente, se centrifugó a 300 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet de espermatozoides fue re-suspendido en 400 μ l de Sp-TALP para ser analizados por citometría de flujo. Los espermatozoides con fluorescencia roja fueron considerados como población de células con normal $\Delta\Psi$ M, y los de coloración verde con un $\Delta\Psi$ M alterado. En cada ensayo el análisis fue repetido tres veces.

Integridad del ADN. Se evaluó utilizando el ensayo TUNEL (*In situ* Cell Death Detection Kit with fluorescein, Roche®, Mannheim, BW, Germany) descrito por Lopes *et al.* (1998). La integridad del ADN espermático fue evaluado por citometría de flujo al cuantificar la incorporación de dUTP marcado en los sitios de fragmentación del ADN (Cordelli *et al.*, 2005). La suspensión espermática (3×10^6 espermatozoides/ml) fue fijada en formaldehído al 4% y permeabilizados en 0,1% Triton X-100 en 0,1% de citrato de sodio. Se agregó 50 μ l de enzima TdT y dUTP conjugado con FITC y se incubó durante una hora a 37°C en oscuridad. Posteriormente, se adicionó PI (3,5 μ g/ml), se homogenizó suavemente y se analizó en citómetro de flujo. Se consideraron los espermatozoides viables con ADN íntegro (TUNEL -) y fragmentado (TUNEL +). En cada ensayo el análisis fue repetido tres veces.

Ultracongelador. El ultracongelador utilizado en este estudio fue un Thermo® modelo Revco ULT1386-5V. El equipo consta de un microprocesador de control de temperatura que mantiene la temperatura interna a -80°C (temperatura ambiente 22°C aprox.). El rango de temperatura oscila entre -40°C y -86°C, velocidades programables de congelación no disponible. Previo al comienzo del estudio, se determi-

nó la curva de descenso de temperatura mediante una termocupla Digi-Sense® Type-K con una sonda termosensible introducida en el ultracongelador a la altura de las pajuelas. Se pudo comprobar una velocidad de descenso de temperatura de -10°C/min desde 4°C a -70°C y de -0,26°C/min desde los -70 °C a -80°C.

Citometría de Flujo. Todas las evaluaciones se realizaron mediante un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Las células fueron excitadas por un láser de argón de 488 nm. Cada análisis consistió en la adquisición de un mínimo de 10.000 espermatozoides teñidos, los cuales fueron cuantificados simultáneamente para fluorescencia verde y roja. Se evaluaron 600-1000 células/s a través del láser. De acuerdo a parámetros de granularidad relativa (Sidescatter-SSC) y tamaño relativo (Forwardscatter- FSC) las células fueron separadas, de manera que sólo las que poseían características de dispersión de luz típicas de espermatozoides de canino fueron analizadas para fluorescencias. Además, para ajustar correctamente la región sobre los espermatozoides a evaluar y evitar los desechos o debrís celulares se utilizó la combinación de tinciones fluorescentes para identificar las células muertas, las células vivas o células con membranas dañadas. Los datos para los canales de fluorescencia verde y roja fueron obtenidos por escala logarítmica y analizados por medio de un Software Cell-Quest Pro (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Análisis estadístico. Los resultados fueron expresados como promedio \pm DE. Se utilizó el Test de D'Agostino para detectar normalidad en los datos. El análisis estadístico entre los grupos se realizó mediante el Test de Varianza Paramétrico ANOVA de medidas repetidas. Para detectar diferencias significativas entre grupos se aplicó el Test Paramétrico de Comparación Múltiple de Tuckey. La significancia estadística para todas las pruebas fue establecida para un $P < 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el software GraphPad Prism® versión 5.0 para MAC OS X (GraphPad Software, San Diego CA).

RESULTADOS

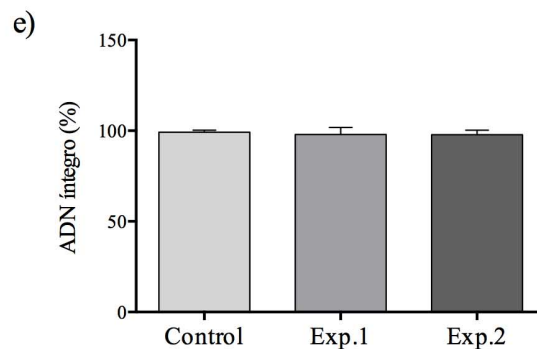
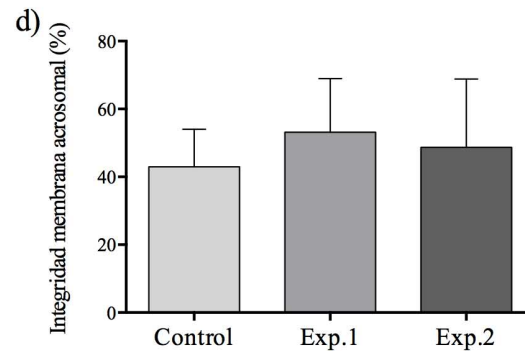
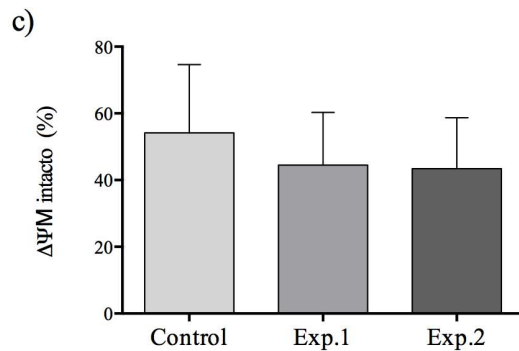
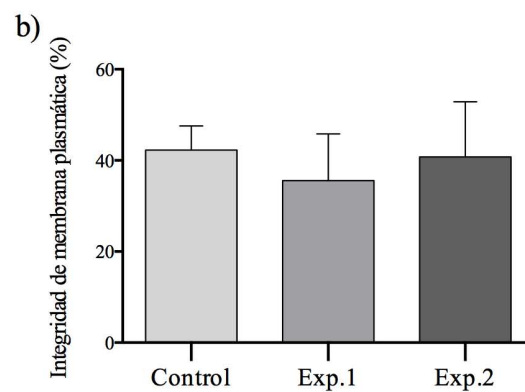
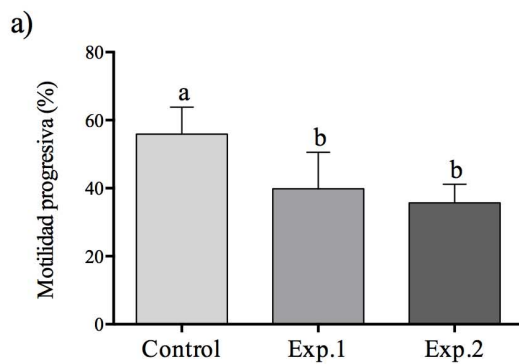
Pool de semen fresco. Presentaron las siguientes características (Promedio \pm DE). La concentración espermática fue $972 \times 10^6 \pm 192 \times 10^6$ espermatozoides/ml. El porcentaje de MOP progresiva fue $89,0 \pm 2,5$. El porcentaje de espermatozoides viables con membrana plasmática intacta fue de $83,31 \pm 7,67$. De los espermatozoides viables, un $85,57 \pm 6,2$ % presentó $\Delta\Psi$ M intacto, un $99,6 \pm 0,04$ % ADN íntegro y un $78,6 \pm 5,6$ % membrana acrosomal intacta.

Motilidad. La MOP en los grupos Exp. 1 y Exp. 2 ($37,0 \pm 4,4\%$ y $36,8 \pm 4,1\%$) fueron significativamente menores ($P < 0,0001$) respecto al Control (método convencional; $55,9 \pm 8,7\%$), Fig. 1a).

Evaluación de membranas espermáticas. El análisis por citometría de flujo en espermatozoides caninos congelados demostró que no hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos respecto a: espermatozoides viables con membrana plasmática intacta (Control: $42,27 \pm 5,29$; Exp.1: $35,57 \pm 10,25$ y Exp.2: $40,76 \pm 12,11$; $P: 0,2303$; Fig. 1b),

DYM intacto (Control: $54,66 \pm 20,6$; Exp.1: $44,4 \pm 15,8$ y Exp.2: $43,4 \pm 15,33$; $P: 0,2844$, Fig. 1c), espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta (Control: $42,95 \pm 11,1$; Exp. 1: $53,2 \pm 15,8$ y Exp.2: $48,7 \pm 20,1$; $P: 0,1991$, Fig. 1d).

Determinación de la integridad del ADN. El análisis por citometría de flujo en espermatozoides caninos congelados demostró que no hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos respecto a la integridad del ADN (Control: $99,13 \pm 1,2$; Exp.1: $98,0 \pm 3,4$; Exp. 2: $97,83 \pm 2,5$; $P: 0,6579$, Fig. 1e).



DISCUSIÓN

El efecto beneficioso de la utilización de metodologías alternativas al N₂L para criopreservar células espermáticas ha sido reportado previamente (Salamon, 1971; Medrano *et al.*, 2002; Alamo *et al.*; Batista *et al.*), sin embargo, el uso de ultracongeladores no programables para congelar/almacenar semen ha sido de uso limitado (Alamo *et al.*; Batista *et al.*). No existen antecedentes previos de la utilización del ultracongelador de -80°C como técnica para conservar y almacenar espermatozoides caninos, siendo este el primer estudio que evalúa esta posibilidad, analizando por citometría de flujo la función espermática.

El parámetro más elemental que determina el efecto de la congelación sobre la función espermática es la motilidad progresiva, en nuestro estudio las motilidades progresivas en el control y grupos experimentales fueron superiores a las reportadas previamente para espermatozoides congelados/descongelados de canino, utilizando el método convencional (Rota *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). La motilidad fue el único parámetro espermático en el cual se presentaron diferencias significativas entre la técnica convencional y los experimentales.

La congelación provoca una disminución drástica de la motilidad progresiva, como consecuencia de los procedimientos de congelación/descongelación (Watson, 2000; Benson *et al.*, 2012). Entre las variables que influyen en la sobrevivencia de los espermatozoides criopreservados de animales domésticos en ultracongeladores, se encuentra la velocidad de congelación (Yu *et al.*, 2002; Benson *et al.*). En este estudio la motilidad progresiva post descongelación con la técnica convencional, fue mayor que las obtenidas en el ultracongelador a -80°C a velocidades lentas (10°C/min desde 4°C a -70°C y -0,26°C/min a -80°C). No obstante, estas últimas fueron similares a las descritas por Yu *et al.* en un ultracongelador programable a una velocidad similar a nuestro estudio, determinando que la velocidad de congelación de -30°C/min, que es la usual en la congelación con N₂L, es la óptima para el semen de canino, y que velocidades más rápidas o lentas de congelación, como es el caso del ultracongelador de -80°C (-10°C/min) reduciría la motilidad e incrementaría el daño acrosomal (Hay *et al.*, 1997; Watson, 1995; Peña & Linde-Forsberg, 2000). En cambio, en nuestros resultados, el daño acrosomal no fue significativamente diferente entre las técnicas de congelación evaluadas, en concordancia con Rota *et al.* (2005), que igualmente, no detectaron diferencias en el estado acrosomal al utilizar velocidades de enfriamiento rápidas (-50°C/min) o lentas (-10°C/min). Además, los espermatozoides congelados en el ultracongelador de -80°C y conservados en N₂L (Exp. 2) pre-

sentaron resultados similares de motilidad a los descritos por Hori *et al.* (2005), quienes congelaron los espermatozoides a una velocidad de -10°C/min por exposición directa al vapor de N₂L hasta alcanzar una temperatura de -70°C, y posteriormente fueron almacenados en N₂L (-196°C), observando una pérdida adicional de la motilidad post descongelación al congelar los espermatozoides a esta velocidad. Durante la congelación la formación de hielo intracelular no ocurre a -10°C/min, y el porcentaje de viabilidad y MOP aumenta o se mantiene constante entre -10°C/min y 0,5°C/min (refleja el “efecto solución” como mecanismo dominante de injuria y no la formación de hielo intracelular) (Thirumala *et al.*, 2003), esto concuerda con la “hipótesis de los dos factores” descrita por Mazur *et al.* (1972; 1984) y Benson *et al.*

La motilidad es el indicador más sensible del daño celular debido a la congelación, incluso más que la integridad de la membrana plasmática (Yu *et al.*), efecto que también ha sido observado en espermatozoides de carnero (Del Valle *et al.*, 2010) y búfalo (Khan *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con lo sugerido por Yu *et al.*, quien obtuvo porcentajes de MOP más bajos que los porcentajes con membrana plasmática íntegra, atribuyendo esta diferencia a cambios en el transporte activo y a la permeabilidad en la membrana plasmática de la región de la cola. Al realizar inmediatamente la evaluación espermática post descongelación, se observan espermatozoides inmóviles que después de un periodo corto de tiempo a temperaturas de 37°C recuperan su motilidad (Yu *et al.*; Del Valle *et al.*). En el presente estudio la motilidad fue evaluada inmediatamente post descongelación y de forma subjetiva, lo que posiblemente podría explicar los bajos porcentajes.

La integridad de la membrana plasmática es un requisito para mantener la viabilidad espermática y crucial para la supervivencia del espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra y la mantención de la capacidad fecundante (Ôura & Toshimori, 1990). Este es el primer reporte de evaluación de la viabilidad e integridad de la membrana espermática por tinción fluorescente SYBR-14/PI en espermatozoides congelados y/o almacenamiento en un ultracongelador de -80°C, demostrando que no existen diferencias significativas entre los espermatozoides congelados en el ultracongelador (Exp. 1 y 2) y la congelación convencional (Control). Nuestros resultados concuerdan con Rota *et al.* (2005) quien evaluó la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides caninos congelados a velocidades lentas (utilizando un ultracongelador programado para descender a -0,5°C/min entre 5°C y 10°C, a -8°C/min

entre -10°C y -60°C y posterior almacenamiento en N₂L) y velocidades rápidas (N₂L) utilizando el test hiposmótico (HOS test), observando un alto porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática funcional en las muestras congeladas en ultracongelador, sin diferencias significativas comparadas con la congelación convencional. Esto sugiere que la congelación de espermatozoides caninos a velocidades lentas – tales como -10°C/min – disminuye el daño atribuido a la deshidratación celular o a la formación de hielo intracelular (Mazur, 1984). El porcentaje promedio de membrana íntegra evaluada por SYBR-14/PI en los espermatozoides congelados/descongelados por el método convencional (Control) fue superior a los grupos experimentales 1 y 2, y a lo reportado previamente por Kim *et al.* utilizando las tinciones 6-C-FDA/PI o HOS test. Respecto a los grupos experimentales, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Yu *et al.* y Rota *et al.* (2005) en estudios de congelación de espermatozoides en ultracongeladores programables.

Estudios previos han demostrado que la criopreservación afecta la función mitocondrial de los espermatozoides y que la diferencia de potencial de membrana mitocondrial es un indicador sensible del estado de la función de las mitocondrias (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008). Al respecto, el potencial de membrana mitocondrial es posible de evaluar en forma rápida utilizando la tinción JC-1 y la citometría de flujo, y existe una relación entre el estado mitocondrial y la motilidad espermática. En el presente estudio, el porcentaje promedio de espermatozoides vivos con potencial de membrana mitocondrial intacto (JC1-negativo) sometidos al ultracongelador de -80°C (Exp.1 y 2) fueron levemente inferiores a los obtenidos con el método convencional de congelación (Control), no observándose diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05). Concordando con Volpe *et al.* (2009), quien reportó poblaciones espermáticas caninas con motilidad baja que evidenciaron un potencial de membrana mitocondrial inalterado, sugiriendo que la respiración mitocondrial puede no ser suficiente para mantener la motilidad en la célula espermática, y que puede ser importante para la sobrevivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra. Consideramos que es importante investigar más profundamente en la especie canina la relación existente entre la motilidad y el estado mitocondrial para dilucidar la fuente energética para la motilidad espermática en esta especie.

Respecto a la integridad de la membrana acrosomal, los porcentajes promedios de los espermatozoides vivos con la membrana acrosomal intacta (FITC.PSA-/PI-) sometidos al ultracongelador de -80°C (Exp.1 y 2) fueron levemente superiores a los obtenidos con el método convencional (Control), sin embargo no fueron significativamente diferentes

(P<0,05). Los resultados sugieren que no existen diferencias en la mantención de la integridad de la membrana del acrosoma entre la congelación de espermatozoides mediante el método convencional y la utilización del ultracongelador de -80°C (Exp. 1 y 2); los resultados concuerdan con estudios previos en caninos utilizando ultracongeladores de -152°C con un promedio de 95% de espermatozoides con acrosoma íntegro sin diferencias significativas con el método convencional de congelación (Álamo *et al.*).

La congelación provoca daño en el ADN de espermatozoides de caninos (Rota *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). En este primer estudio que evalúa la integridad del ADN en espermatozoides congelados en un ultracongelador de -80°C a una velocidad de -10°C/min, no se encontró diferencias significativas entre los resultados de los tres protocolos ensayados. Esto sugiere, que nuestro protocolo experimental no afectó la integridad de ADN. Los porcentajes de integridad de ADN son mayores a los obtenidos por Rota *et al.* (2005) y Kim *et al.* quienes evaluaron la fragmentación de la cromatina utilizando como marcador nuclear la tinción naranja de acridina. Estudios previos en bovinos, equinos y cerdos han establecido un nivel máximo de denaturación del ADN (>30%) como indicador de incapacidad de fecundar (Evenson & Jost, 2000). Las diferencias entre especies, el procedimiento de criopreservación, la formulación de diluyentes y el tiempo de post descongelación, puede explicar las diferencias observadas entre los estudios.

Existe una variedad de investigaciones realizadas con el propósito de optimizar los procedimientos de congelación en N₂L. Por los resultados obtenidos en el presente estudio, consideramos que el uso del ultracongelador no programable de -80°C (-10°C/min) para congelar y almacenar espermatozoides caninos tiene un uso potencial en medicina veterinaria como alternativa al N₂L, lo que implica una importante reducción en el costo de almacenaje de las muestras en los bancos de semen de caninos. Este estudio, si bien, evalúa *in vitro* y a corto plazo la criopreservación de espermatozoides a -80°C, es de interés evaluar a largo plazo e *in vitro* la calidad seminal, distintas concentraciones de glicerol, y la variación individual entre machos, así como la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados en pruebas *in vitro* (penetración heteróloga) o in vivo (inseminación artificial).

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Fondecyt N° 1070594 y Direcciones de Investigación de la Universidad de La Frontera Proyectos N° DI10-2019 y DI12-0089.

SALINAS, P.; SÁNCHEZ, R. & RISOPATRÓN, J. Cryopreservation of canine spermatozoa at -80°C. *Int. J. Morphol.*, 31(1):217-224, 2013.

SUMMARY: The freezing and storage in liquid nitrogen (LN₂) is the technique used most for the preservation of canine and other domestic species semen, for long periods of time. This study was designed to validate the use of deep freezer at -80°C to freeze and store canine semen in straws. Three protocols were tested (n = 10): Control: sperm frozen in N₂L and stored; Exp 1: sperm frozen and stored -80°C, and Exp.2: semen frozen at -80 °C and stored in N₂L. Post-thawing was assessed by flow cytometry and the viability of plasma membrane integrity (SYBR-14/PI), mitochondrial membrane potential (ΨΔm, JC-1), acrosome membrane integrity (PSA / FITC-PI), translocation of phosphatidylserine (Annexin -V-FITC/PI) and DNA fragmentation (TUNEL). No significant differences (P <0.05) between the Control, Exp.2 and Exp.1 groups regarding: intact plasma membrane integrity (42.2 ± 5.3, 35.57 ± 10.3 and 40.76 ± 12.1, respectively), ΨΔm normal (54.7 ± 20.6, 44.4 ± 15.8 and 43.4 ± 15.3, respectively), intact acrosomal membrane integrity (42.9 ± 11.1, 53.2 ± 15.8 and 48.7 ± 20.1, respectively) and fragmented DNA (0.87 ± 0.41, 0.75 ± 0.16, 0.79 ± 0.27, respectively). However, the average motility of the post-thawing of Exp.1 and Exp.2 groups (37.0 ± 4.4% 36.8 ± 4.1% respectively) showed significant differences (P <0.05) than the Control group (55.9 ± 8.7%). The results obtained in this study showed that the use of deep freezer at -80°C for freezing and storing canine sperm has potential use in veterinary medicine as an alternative to the use of N₂L.

KEY WORDS: Canine; Sperm freezing; Ultrafreezer at -80°C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alamo, D.; Batista, M.; González, F.; Rodríguez, N.; Cruz, G.; Cabrera, F. & Gracia, A. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63:72-82, 2005.
- Batista, M.; Alamo, D.; González, F.; Cruz, M.G. & Gracia, A. Influence of freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod. Domest. Anim.*, 41:423-428, 2006.
- Benson, J. D.; Woods, E. J.; Walters, E. M. & Critser, J. K. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78:1682-99, 2012.
- Bratton, D. L.; Fadok, V. A.; Richter, D. A.; Kailey, J.M.; Guthrie, L. A. & Henson, P. M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.*, 272:26159-65, 1997.
- Cheuquemán, C.; Bravo, P.; Treulén, F.; Giogalas, L.C.; Villegas, J.; Sánchez, R. & Risopatrón, J. Sperm Membrane Functionality in the Dog Assessed by Flow Cytometry. *Reprod. Domest. Anim.*, 47(1):39-43, 2012.
- Cordelli, E.; Eleuteri, P.; Leter, G.; Rescia, M. & Spano, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72:273-9, 2005.
- Del Valle, I.; Mendoza, N.; Casao, A.; Cebrián-Pérez, J. A.; Pérez-Pé, R. & Muiño-Blanco, T. Significance of non-conventional parameters in the evaluation of cooling-induced damage to ram spermatozoa diluted in three different media. *Reprod. Dom. Animals*, 45(6):260-8, 2010.
- Evenson, D. P. & Jost, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.*, 22:169-89, 2010.
- Hay, M. A.; King, W. A.; Gartley, C. J.; Leibo, S. P. & Goodrowe, K.L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 51:99-108, 1997.
- Hori, T.; Hagiuda, K.; Kawakami, E. & Tsutsui, T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology*, 63:1573-83, 2005.
- Khan, D. R.; Ahmad, N.; Anzar, M. & Channa A.A. Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology*, 71:872-6, 2009.
- Kim, S.; Yu, D. & Kim, Y. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*, 73(3):282-392, 2010.
- Kutzler, M. A. Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64(3):747-54, 2005.
- Linde-Forsberg, C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surg.*, 10(1):48-58, 1995.
- Lopes, S.; Sun, J. G.; Juriscova, A.; Meriano, J. & Casper, R.F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in increased in poor-quality semen samples and correlated with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 69:528-32, 1998.
- Mazur, P.; Leibo, S.P. & Chu, E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell. Res.*, 71:345-355, 1972.
- Mazur, P.; Rall, W.F. & Leibo, S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. *Cell Biophys.*, 6:197-213, 1984.

- Medrano, A.; Cabrera, F.; Gonzalez, F.; Batista, M. & Gracia, A. Is sperm cryopreservation at -150°C a feasible alternative?. *Cryoletters*, 23:167-72, 2002.
- Olar, T.T.; Bowen, R.A. & Pickett, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31:451-61, 1989.
- Oura, C. & Toshimori, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int. Rev. Cytol.*, 122:105-51, 1990.
- Ortega-Ferrusola, C.; Sotillo-Galán, Y.; Varela-Fernández, E.; Gallardo-Bolaños, J. M.; Muriel, A.; González-Fernández, L.; Tapia, J. A. & Peña, F.J. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J. Androl.*, 29(2):213-21, 2008.
- Peña, A. I.; Johannisson, A. & Linde-Forsberg, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52:965-80, 1999.
- Peña, A. & Linde-Forsberg, C. Effects of Equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54:859-75, 2000.
- Peña, A.I.; Johannisson, A. & Linde-Forsberg, C. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.*, 57:371-6, 2001.
- Parrish, J. J.; Susko-Parrish, J.; Winer, M. A. & First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38:1171-80, 1988.
- Rijsselaere, T.; Van Soom, A.; Maes, D.; Verberckmoes, S. & De Kruif, A. Effect of blood admixture on *in vitro* survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 61:1589-1602, 2004.
- Rijsselaere, T.; Van Soom, D. & Kruif, A. Effects of centrifugation on *in vitro* survival of fresh canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57:1669-81, 2002.
- Risopatrón, J.; Catalán, S.; Veuthey, C.; Miska, W.; Schill, W-B. & Sanchez, R. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on vitality, motility and acrosome integrity in canine spermatozoa incubated *in vitro*. *Reprod. Domest. Anim.*, 37:347-51, 2002.
- Risopatrón, J.; Muñoz, M.; Sánchez, R. & Sepúlveda, N. Criopreservación de semen canino con diferentes fracciones proteicas del fluido seminal. *Rev. Científica FCV-LUZ*, 22(2):145-53, 2012.
- Rota, A.; Rota, A.; Martini, M.; Milani, M.; Milani, C. & Romagnoli, S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45:29-37, 2005.
- Rota, A.; Milani, C.; Romagnoli, S.; Zucchini, P. & Mollo, A. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.*, 118(1):94-7, 2010.
- Salamon, S. Fertility of ram spermatozoa following pellet freezing on dry ice at -79 and -140°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 24:183-5, 1971.
- Schäfer-Somi, S.; Kluge, S.; Knapp, E.; Klein, D. & Aurich C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66(2):173-82, 2006.
- Thomas P. G. A.; Larsen, R. E.; Burns, J. M. & Hahn C.N. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40:1199-205, 1993.
- Thirumala, S.; Ferrer, M.S.; Al-Jarrah, A.; Eilts, B.E.; Packamonti, D.L. & Devirredy, R.V. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology*, 47:109-24, 2003.
- Verstegen, J.P.; Iguer-ouada, M.; Luz, M. & Onclin, K. Dog semen freezing after 1, 2 or 3 days chilling. *Theriogenology*, 64:815, 2005.
- Volpe, S.; Leoci, R.; Aiudi, G. & Lacalandra, G. M. Relationship Between Motility and Mitochondrial Functional Status in Canine Spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 44(2):275-8, 2009.
- Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. Dev.*, 7(4):871-91, 1995.
- Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2:60-1, 2000.
- Yu, I.; Songsasen, N.; Godke, R. A. & Leibo, S. P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, 44:62-78, 2002.

Dirección para correspondencia
Paulo Salinas Pérez
Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad Santo Tomas
Rodríguez 060, Temuco
CHILE

E-mail: psalinas@santotomas.cl

Recibido : 25-10-2012
Aceptado: 13-11-2012