

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN CANINO CON DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS DEL FLUIDO SEMINAL

Cryopreservation of Canine Semen with Different Protein Fractions of Seminal Fluid

Jennie Risopatrón, Mariela Muñoz, Raúl Sánchez y Néstor Sepúlveda*

Universidad de La Frontera, Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR- BIOREN),
Av. Fco. Salazar 01145, Temuco, Chile. *E-mail: nestor@ufro.cl

RESUMEN

La congelación de semen produce efectos negativos sobre el espermatozoide afectando su viabilidad, motilidad, morfología y capacidad fecundante. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto protector de la adición de diferentes fracciones proteicas del fluido seminal (FS) al medio de congelación sobre la capacidad funcional de los espermatozoides caninos post descongelación. Se utilizaron eyaculados de 3 perros de raza Golden Retriever clínicamente sanos. En cada ensayo experimental (n=12), se utilizó un pool de espermatozoides que fue dividido en 4 grupos y diluidos en medio de congelación (fructosa, ácido cítrico, glicerol, yema de huevo). El medio control (C) fue suplementado con Equex STM y los grupos I, II y III, suplementados con diferentes fracciones proteicas del FS: Grupo I (<10kDa), Grupo II (<30kDa) y Grupo III (<100kDa). Los espermatozoides de los diferentes grupos fueron congelados y evaluados postdescongelación analizándose los siguientes parámetros: motilidad, viabilidad con Ioduro de Propidio (PI) e integridad de la membrana plasmática con SYBR-14/PI, externalización de la FTS con Annexin-V/PI, estado del acrosoma con CTC-PI. Se observaron diferencias entre los grupos solo para motilidad (P<0,05). Esta fue más alta en el Control y Grupo III (44,8 y 40,6%) que en los grupos I, y II (27,6 y 16,3%). Las fracciones proteicas del FS agregadas al medio de congelación utilizadas en este estudio no mejoraron sustancialmente la calidad de los espermatozoides caninos postdescongelación.

Palabras clave: Espermatozoides caninos, citometria flujo, congelación de semen.

ABSTRACT

Cryopreservation induces detrimental effects on spermatozoa affecting their longevity and fertilization capacity. The aim of this study was to evaluate the potential cryoprotective effect on the post-thaw canine sperm quality of different protein fractions from seminal fluid (FS) added to freezing medium. Ejaculates collected from 3 Golden Retriever dogs. In each experimental trial (n= 12) was used a sperm pool which was divided into 4 groups and diluted in a freezing extender (fructose, citric acid, glycerol, egg yolk). Control medium (C) was supplemented with Equex STM and three groups supplemented with different SP protein fractions: Group I (<10kDa), Group II (<30kDa) and Group III (<100kDa). Post-thaw sperm quality was evaluated according to: motility with propidium Ioduro, viability (PI), plasmatic membrane integrity with SYBR-14/PI, externalization of phosphatidylserine with Annexin-V and acrosome status with CTC-PI. Differences among groups were just evident only for motility (P<0.05). It was higher in Control and Group III (44.8 and 40.6%) than groups I and II (27.6 and 16.3%). The SP-protein fractions added to freezing extender did not improve substantially the post-thaw sperm quality of frozen-thawed dog semen.

Key words: Canine spermatozoa, flow cytometry, freezing semen.

INTRODUCCIÓN

Veterinarios y criadores de perro (*Canis familiaris domesticus*) han mostrado un interés cada vez mayor por preservar líneas genéticas importantes, ya sea por su gran valor económico o por ser razas caninas en peligro de extinción. En este contexto, la criopreservación de semen canino es una herramienta valiosa de preservación de material seminal [43],

más aún desde que se logró el primer nacimiento de progenie viva con semen de perro congelado-descongelado [44].

Los procedimientos de criopreservación generalmente usados son conocidos por inducir una serie de efectos de estrés osmótico a las células espermáticas, afectando la longevidad y la capacidad fecundante [50], manifestada en la disminución en las tasas de preñez [12, 22].

El mecanismo fundamental en la disminución de la capacidad fecundante en los espermatozoides congelados no es conocido con exactitud. Actualmente existe interés en conocer el rol que cumplirían los cambios apoptóticos, los que se manifiestan en la célula espermática a través la externalización de la fosfatidilserina (FTS) [5, 8]. En las primeras fases apoptóticas se evidencia una asimetría en los fosfolípidos de la membrana plasmática (MP) del espermatozoide, posteriormente se altera su función y comienza a ocurrir el daño progresivo de la MP [24]. Por lo tanto, la translocación de la FTS es útil para detectar el daño temprano de la MP y para evaluar los parámetros espermáticos convencionales [25].

La congelación como método de criopreservación, tiene la ventaja que las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente y usadas cuando se requieran [38], el transporte de semen resulta ser más económico y menos estresante que transportar al macho o a la hembra para que se apareen, permite a los propietarios de perros preservar la genética de los machos y lograr reproducirlo, incluso después de que el macho ya no es fértil o haya fallecido.

En teoría, para la congelación se debe optimizar la técnica de congelación y procesamiento del semen, logrando reducir el daño a la célula además de asegurar una adecuada longevidad *in vitro*, con el fin de proveer un sistema de almacenamiento de semen a largo plazo para la inseminación artificial [13].

Las aplicaciones de técnicas de biotecnología reproductiva como la criopreservación, inseminación artificial y fecundación *in vitro*, requieren del manejo de los espermatozoides en medios óptimos, que deben proporcionarle un ambiente similar a las condiciones en las que se encuentran *in vivo*. Todas las observaciones indican que los espermatozoides tienen un sistema fisiológico muy eficiente para mantener sus funciones. Es así como ha sido estudiado por algunos autores el efecto benéfico del FS [38, 41], como elemento crioprotector de espermatozoides en la especie canina.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto protector de diferentes fracciones proteicas del FS de perro, sobre la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana celular, estado de capacitación y reacción de acrosoma en espermatozoides de perro sometidos a un proceso de crioconservación.

Se postuló que, la adición de fracciones proteicas del FS al medio de congelación tendría un efecto protector sobre el daño producido por la congelación, ayudando a mantener los parámetros funcionales de los espermatozoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 3 perros adultos clínicamente sanos de raza Golden Retriever con edades entre 2 a 4 años. Los animales permanecieron en el bioterio de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, controlados periódicamente por un Médico Veterinario y mantenidos con una dieta balanceada, ejercicio diario y libre acceso al agua. Estos animales fueron previamente entrenados como donantes de semen.

Obtención de los eyaculados

El semen fue colectado por manipulación manual después de un período de abstinencia mínimo de tres días [36], se colectaron las tres fracciones en envases separados, estériles. En una primera etapa fue recolectado el FS para la obtención de las diferentes fracciones proteicas. Posteriormente y en forma separada se obtuvieron los eyaculados que conformaron los pools de semen (n= 12) para la obtención de los espermatozoides.

Medios de congelación

Se utilizó el medio Uppsala, descrito por Peña y Lindforsberg [32] el cual fue modificado para la obtención de los seis diferentes medios utilizados en este trabajo, tal como se describen en la TABLA I. Se utilizaron cuatro medios de congelación; el medio Control que contenía Equex STM Paste (medio Uppsala Equex) y los medios en los cuales el Equex STM Paste fue reemplazado por las diferentes fracciones proteicas del FS. El componente activo de Equex STM Paste es el sodium dodecil sulfato (SDS), que corresponde a un detergente aniónico soluble y que ejerce su acción reduciendo la fase de transición lipídica y/o protegiendo la función de la membrana controlando el flujo de Ca²⁺ [33, 47]. Los medios de incubación y descongelación diferían de los anteriores al no tener entre sus componentes Equex STM Paste y la presencia o ausencia de glicerol y yema de huevo (TABLA I).

Obtención de las diferentes fracciones proteicas del fluido seminal

Se realizó un pool de las segundas fracciones de los eyaculados, se centrifugó a 720g x 5 min a 4°C (EC Centra, Mod. EC4R, EUA), se separó el sobrenadante del precipitado de espermatozoides, obteniéndose un concentrado de fluidos seminales para su posterior filtración. Para la obtención de las diferentes fracciones proteicas se utilizaron filtros Ultrafree-Mc (Millipore, EUA), con membrana Biomax. Por centrifugación a 5000g por 60 min a 4°C (Heal Force, Mod Neofuge 15R, EUA) fueron separadas proteínas con peso molecular (PM) <10 Kda; <30 KDa y <100Kda. El filtrado de cada fracción se almacenó a -20°C, para ser utilizado posteriormente.

TABLA I
MEDIOS DE INCUBACIÓN, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE SEMEN CANINO.

Medio Incubación	Medios congelación					Medio descongelación
	Control	I <10KDa	II <30KDa	III <100KDa		
Tris	3,025g	3,025g	3,025g	3,025g	3,025g	3,025g
Acido Citrico	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Streptomycina	0,1g	0,1g	0,1g	0,1g	0,1g	0,1g
Agua destilada	a 77 mL	a 72 mL	a 72 mL	a 72 mL	a 72 mL	Hasta 100 mL
Bensil penicilina	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Glicerol	3 mL	7 mL	7mL	7mL	7mL	–
EQUEX STM Paste	–	1 mL	–	–	–	–
Yema de huevo	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	–
Proteínas <10Kda	–	–	100 mL	–	–	–
Proteínas <30Kda	–	–	–	100 mL	–	–
Proteínas <100Kda	–	–	–	–	100 mL	–
pH	6,72	6,74	6,74	6,74	6,74	6,76
Osmolaridad	865 mOsm	1495 mOsm	1495 mOsm	1495 mOsm	1495 mOsm	324mOsm

Evaluación de los eyaculados y preparación de los espermatozoides

Se realizó el examen físico microscópico inmediato, recuento espermático (hemocitómetro de Neubauer), porcentaje de motilidad progresiva, viabilidad y morfología [36] fueron evaluados en un microscopio de luz (Olympus, BX41, Japón). Se utilizaron aquellos eyaculados que cumplieron con las siguientes características: volumen de la segunda fracción del eyaculado > a 1,5 mL, concentración > a 200×10^6 espermatozoides/mL, morfología normal $\geq 80\%$, y acrosoma intacto $\geq 80\%$.

Después de la evaluación espermática de cada una de las segundas fracciones del eyaculado se tomaron alícuotas similares en concentración espermática y se mezclaron para obtener un pool de semen con el propósito de aumentar el volumen y eliminar la variabilidad entre las muestras evaluadas [48].

Congelación de espermatozoides con las diferentes fracciones proteicas del fluido seminal

Fueron realizados 12 ensayos experimentales, en cada uno el pool de semen fue centrifugado a 720g por 3 min, posteriormente el pellet fue resuspendido en buffer TRIS [35], la suspensión espermática obtenida (400×10^6 espermatozoides/mL) fue dividida en 4 alícuotas similares y colocadas en diferentes tubos y centrifugadas (720g por 3 min), los pellets resultantes fueron diluidos en medio de incubación (MI) y equilibrados a 4°C por 1 hora. Después de este periodo fueron rediluidos (1:1 v/v) con los diferentes medios de congelación: Grupo control; Grupo I (< 10 Kda); Grupo II (< 30 Kda); Grupo III (< 100 Kda). Las suspensiones espermáticas fueron coloca-

das en pajuelas de 0,5 mL y posteriormente sobre (4 cm) vapores de N₂L por 10 min y posteriormente sumergidas directamente en Nitrógeno Líquido N₂L. Las pajuelas de cada grupo fueron descongeladas en baño María a 38°C x 1 min (Arquimed, Mod ICW-01, Chile) y diluidas en medio de descongelación (TABLA I).

Evaluación espermática

Motilidad. Fue estimada subjetivamente por observación visual en un microscopio óptico con contraste de fase (Olympus, Mod BX41, Japón) y platina temperada a 37°C con aumento 400x. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, considerando los grados 3 y 4 de una escala de 0 a 4 (0: sin movimiento, 1: movimiento sin avance, 2: movimiento en círculo, 3: movimiento progresivo rectilíneo suave, 4: movimiento rectilíneo rápido), fue determinado por observación en un mínimo de 300 células, en seis campos diferentes [21, 36]. El promedio de las seis sucesivas estimaciones fue registrado como porcentaje de motilidad.

Viabilidad e integridad de la membrana plasmática: Los espermatozoides vivos con MP intacta fueron evaluados utilizando SYBR14/PI (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los espermatozoides fueron analizados en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, Mod. FACSCalibur, CA, EUA) y clasificados como: vivos con MP intacta (SYBR-14 positivo/PI negativo), muertos (SYBR-14 negativo /PI positivo) y moribundos (SYBR-14 positivo /PI positivo). El análisis de cada ensayo se repitió tres veces.

Translocación de fosfatidilserina (FTS): Para determinar la translocación de FTS en la membrana espermática se utilizó el kit comercial de detección de apoptosis Annexin-V-FITC/ PI (Apoptest™-Fits; Nexins Research, Hoeven, Holanda). El procedimiento fue aplicado según las instrucciones de fabricante. Los espermatozoides fueron analizados en un citómetro de flujo y clasificados como: vivos anexina negativos (AN-/PI-); vivos con FS translocada (AN+/PI-); muertos con FS translocada (AN+/PI+); y muertos anexina negativos (AN-/PI+). El análisis de cada ensayo se repitió tres veces.

Capacitación espermática: Para la detección del estado del acrosoma de espermatozoides postdescongelados se utilizó el antibiótico clortetraciclina fluorescente (CTC), combinado con la tinción vital de Ioduro de propidio (PI) [27, 40]. La CTC se une al Ca²⁺ iónico intracelular formando un complejo CTC- Ca²⁺, que aumenta la emisión de fluorescencia produciendo un patrón característico de fluorescencia que permite evaluar el estado acrosomal de espermatozoides vivos según los siguientes patrones: espermatozoides patrón F (no capacitado, acrosoma intacto), patrón B (espermatozoides capacitados, acrosoma intacto) y patrón AR (espermatozoides con acrosoma reaccionado) [37]. La tinción con PI permite excluir de la evaluación los espermatozoides muertos. La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiolab, Mod KT 450905, Alemania). Se observaron 100 espermatozoides por placa. Se analizaron cuatro placas por grupo en cada ensayo.

Análisis estadístico: Los datos, para los diferentes parámetros funcionales evaluados por citometría de flujo fueron analizados con el Software Cell-Quest Pro (Becton Dickinson, CA, EUA) y presentados como media \pm desviación estándar (DE). Para diferencias entre dos grupos se aplicó el test t-Students. El análisis estadístico entre los grupos se realizó con el test de varianza (ANOVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis y fue aplicado un Test de comparación múltiple de Dunn's para comparar todos los pares de valores y las diferencias entre los grupos [52]. Las diferencias fueron consideradas significativas para un $P < 0,05$. El análisis fue realizado en semen fresco recién obtenido y en semen postdescongelado. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism®, versión 5. (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Motilidad: El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, usualmente se correlaciona positivamente con la integridad de la MP, debido a que solo los espermatozoides viables mantienen la integridad de su MP [37]. Existen antecedentes respecto a que espermatozoides no móviles, pero potencialmente viables, pueden llegar a ser móviles y fecundar, cuando son depositados en el tracto genital de la hembra por inseminación artificial [42]. Esto podría explicar, la aparente contradicción encontrada en la literatura, concerniente a la asociación clásica y convencional de correlacionar motilidad y capacidad fecundante.

En el presente estudio, la motilidad total y progresiva de los espermatozoides de los eyaculados recién obtenidos alcanzó un valor promedio de $93,5 \pm 3,0\%$. Estos valores fueron similares a los descritos por England y Allen [9] y superiores a los reportados por otros autores, quienes señalan porcentajes de entre 70 y 90% [17,18].

El promedio en la motilidad espermática disminuyó significativamente luego de enfriar hasta 4°C ($88,7 \pm 3,8\%$). Rota y col. [38] publicaron una motilidad de 77,3% al enfriar con yema de huevo y TRIS (YHT) comparada con 67,1% al enfriar con FS.

Se han reportado valores de motilidad espermática en espermatozoides caninos post descongelación entre un 38% al congelar con Equex [1], 34,7% en muestras diluidas en FS y 28,6% en muestras que utilizan TRIS [41]. La TABLA II muestra los resultados obtenidos en este estudio, se observan valores similares en las muestras conservadas con medio de congelación suplementados con proteínas del FS <100kDa y con medio de congelación suplementados con Equex STM Paste (40,6 y 44,0%). Estos valores son superiores ($P < 0,05$) al de los grupos donde el semen fue diluido en medio de congelación suplementado con fracciones proteicas del FS <10kDa y <30kDa.

Para asegurar una buena tasa de concepción con el uso de semen congelado en la inseminación artificial de perras, el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles en semen congelado-descongelado debería exceder el 40% [14].

Viabilidad: Uno de los principales problemas cuando se congela y descongela semen de perro es la pérdida de viabili-

TABLA II
MOTILIDAD, VIABILIDAD E INTEGRIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y TRANSLOCACIÓN EN SEMEN CANINO POSTDESCOGEACIÓN SUPLEMENTADOS CON DIFERENTES FRACCIONES DEL FLUIDO SEMINAL.

Tratamientos	Motilidad Progresiva (%)	Viabilidad e integridad de la membrana (%)	Translocación (%)
Control	44,8 ^a	41,0	0,3
I (<10KDa)	27,6 ^b	41,1	0,1
II (<30KDa)	16,3 ^b	37,4	0,06
III (<100KDa)	40,6 ^a	40,8	0,03

(a,b) letras diferentes en la misma columna implican diferencias significativas ($P < 0,05$).

TABLA III

ESTADO DE CAPACITACIÓN Y REACCIÓN DE ACROSOMA EN ESPERMATOZOIDES CANINOS POSTDESCONGELACIÓN SUPLEMENTADOS CON DIFERENTES FRACCIONES DEL FLUIDO SEMINAL.

Tratamientos	No capacitados (%)	Capacitados (%)	Acrosoma reaccionado (%)
Control	32,9	27	46,8
I (<10kDa)	34,2	38,2	27,7
II (<30kDa)	29,0	41,5	28,9
III (<100kDa)	32,7	42,9	22,7

dad [32,39]. En este estudio, el porcentaje de espermatozoides vivos en eyaculados frescos, alcanzó un valor promedio de 93,2% el cual fue debido a los procesos de enfriamiento, en cambio la congelación disminuyó a valores cercanos al 40%.

Estudios previos han demostrado que, al ensayar distintos medios para congelar espermatozoides caninos, el medio más óptimo fue aquel que contenía Equex STM Paste [26,39]. El efecto de estabilización sobre la integridad de la MP, de las fracciones proteicas del FS (<10; <30; <100kDa), adicionadas al medio para congelar, provocó un efecto similar al reportado cuando se utiliza Equex STM Paste [32, 33, 39, 43], quienes lo recomiendan para congelar espermatozoides caninos, ya que incrementa la longevidad postdescongelación. Probablemente Equex STM Paste tiene un efecto estabilizante sobre los lípidos de la MP de los espermatozoides [33], protegiendo la integridad de la MP y por lo tanto la viabilidad espermática.

Existen publicaciones que señalan que, el FS disminuye la longevidad de espermatozoides de perro [10, 14, 45]. Resultados publicados sobre espermatozoides evaluados postdescongelación, reportan una viabilidad de 26% [11] y 35% [1]; en contraste, los resultados del presente estudio muestran una viabilidad aproximada de un 40% postdescongelación, se deduce entonces que, sería otro el factor que afectaría la longevidad y no el FS por sí mismo. Por lo tanto, suplementar los medios de congelación con FS constituye una alternativa interesante a considerar en los protocolos de criopreservación de espermatozoides caninos, tal como lo establecen otros autores que reportan efectos positivos sobre la longevidad de espermatozoides postdescongelación [16, 30].

La adición al medio de congelación de proteínas del FS (<10kDa, <30kDa y <100kDa) tuvieron un efecto similar sobre la viabilidad que la adición del Equex STM Paste, lo que contrasta con los porcentajes de motilidad reportados en este estudio, en donde los grupos con Equex STM Paste y con proteínas del FS <100 kDa mostraron mayor motilidad. Sin embargo no siempre es posible encontrar una correlación directa entre motilidad y viabilidad ya que podrían presentarse espermatozoides inmóviles pero vivos [34, 46].

La integridad de la MP de la célula espermática es esencial para determinar la viabilidad celular. Una MP que garantiza la permeabilidad selectiva, mantenga las actividades metabólicas intracelulares, pH, y composición iónica [46], es un pre-

requisito para mantener el potencial de la MP, por esta razón se buscan crioprotectores que estabilicen la membrana celular durante los procesos de congelación-descongelación.

Existe escasa información en semen canino sobre evaluación de la MP del espermatozoide usando SYBR-14, pero se han publicado trabajos en otras especies utilizando el test hipoosmótico (HOST), las tinciones dual de diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA), PI y con SYBR-14 [35, 38]. En este estudio, luego de enfriar los eyaculados por 75 minutos a 4°C antes de proceder a su congelación, la integridad de la MP evaluada por la tinción SYBR-14/PI, resultó en un promedio de 93,1% (DE \pm 3,5). Rota y col. [38] utilizando la tinción C-FDA/PI para evaluar integridad de la MP, publicaron que, en espermatozoides caninos enfriados con YHT versus FS dió como resultado valores promedios de 86,9 v/s 71,6% y con el test HOST 91,2 v/s 93,6%. Ponglowhapan y Chatdarong [35] usando también tinción C-FDA/PI reportaron una integridad de la MP al enfriar espermatozoide epididimarios de 78,8%.

En el mismo estudio, la evaluación realizada sobre la integridad de la MP para espermatozoides congelados con Equex alcanzó valores de 44,8% levemente superior a los valores mostrados en este estudio (40%). Oliveira y col. [31] evaluó la efectividad de tres medios para congelar espermatozoides caninos inmediatamente después de descongelar. Al usar C-FDA/PI la integridad de la MP alcanzó un promedio de 49,7% y al HOST lograron un 55,5%, ambos resultados para el medio TRIS 5% etilenglicol (EG), valores ligeramente superiores a los reportados en el presente estudio (TABLA II).

Cuando la MP del espermatozoide pierde integridad el fosfolípido FTS es translocado desde la capa interna hacia la capa externa de la MP [11], esta primera señal de apoptosis puede ser monitoreada por la adhesión de la anexina-V dependiente de Ca²⁺, mostrando una tinción fosforescente verde. Ha sido demostrado que el proceso de congelación-descongelación en espermatozoides humanos [19] y de toro [2], induce translocación de FTS de la MP del espermatozoide, lo que indica que la criopreservación es una causa de apoptosis [4].

No hay estudios publicados sobre ensayos en perros utilizando anexina V, que permitan discutir los resultados obtenidos de manera idónea, lo que obliga a comparar los resultados obtenidos con aquellos resultados publicados en otras especies. Maxwell y Johnson [28], y Maxwell y col. [29] publicaron

que producto de los procesos de criopreservación, la desestabilización de la MP de espermatozoides de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) pudo ser contrarrestada por la adición de al menos 10% de FS en el medio de congelación. Peña y col. [34] identificaron por citometría de flujo un 5% de espermatozoides vivos tempranamente apoptóticos (A+/PI-) en semen fresco de verraco. Una vez congelados/descongelados se incrementó a 5,7% con un porcentaje de espermatozoides vivos con integridad de la MP (A-/PI-) de 37,3%.

En el presente estudio (TABLA II), la integridad de la MP fue de un 0% anexina +, en espermatozoides frescos de canino, esto es, no existe translocación de FTS, lo que permite inferir que la MP, está estructuralmente intacta. La evaluación realizada postdescongelación no mostró diferencias significativas entre los grupos concluyendo que las diferentes fracciones de FS protegen la integridad de la membrana al igual que la adición de Equex STM Paste. Se puede señalar, por lo tanto, que espermatozoides vivos postdescongelados (PI-/A-), evidentemente no fueron afectados por la criopreservación.

Yu y col. [51] describen la motilidad como el indicador más sensible del daño celular debido a la congelación, incluso más que la integridad de la membrana plasmática, efecto que también ha sido observado en espermatozoides de carnero [7] y búfalo (*Bubalus bubalis*) [20]. Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con lo sugerido por Yu y col. [51], quienes reportaron porcentajes de motilidad progresiva más bajos que los porcentajes con membrana plasmática íntegra, atribuyendo esta diferencia a cambios en el transporte activo y la permeabilidad en la membrana plasmática de la región de la cola. Estudios previos señalan que, al realizar inmediatamente la evaluación espermática post descongelación, se observan espermatozoides inmóviles los que, después de un periodo corto de tiempo a temperaturas de 37°C recuperan su motilidad [7, 51]. En este estudio la motilidad fue evaluada inmediatamente post descongelación y de forma subjetiva, lo que posiblemente podría explicar los bajos porcentajes.

Se ha propuesto que los espermatozoides criopreservados presentan una reacción similar a la membrana de los espermatozoides capacitados que ha sido denominada como simil-capacitación [33].

En el presente trabajo ha sido demostrado que el antibiótico clortetraciclina fluorescente (CTC), constituye una tinción útil para detectar no solamente el estado del acrosoma, sino que además el progreso del estado de capacitación en espermatozoides de varias especies de mamíferos [40, 49].

Se ha reportado que la maduración espermática durante el tránsito por el epididimo se incorporan varios cientos de proteínas. Estas proteínas pueden estar directa o indirectamente unidas a la MP y contribuyen a la preservación de la integridad del espermatozoide e inducen la maduración de éste [6, 15, 23]. La próstata también produce glicoproteína y existen antecedentes que algunas de ellas actúan como factores decapacitantes [3].

La adición de fracciones proteicas del FS al medio de congelación, mantuvo el porcentaje de espermatozoides no capacitados (patrón F) postdescongelación sobre un 30%, evaluado con la técnica CTC/PI. Rota y col. [40], publicaron porcentajes similares al congelar espermatozoides caninos en el medio YHT evaluados inmediatamente postdescongelación.

El porcentaje de espermatozoides exhibiendo el patrón F (no capacitados) postdescongelación (TABLA III), fue similar, en los grupos con medio de congelación suplementado con FS conteniendo proteínas <10, <30, <100 kDa, como en el grupo control suplementado con Equex STM Paste. Los resultados demuestran el efecto protector que tiene el FS, como medio fisiológico natural sobre el acrosoma que previenen o retrasan el progreso de los cambios de la simil-capacitación inducidos por la congelación los que desencadenan la llamada falsa reacción de acrosoma y la muerte celular post descongelación [50].

En el presente estudio, Equex STM Paste no mostró tener un efecto superior a las proteínas del FS utilizadas. Estos resultados no concuerdan con los comunicados por Peña y col. [32], quienes reportaron una alta incidencia de acrosomas intactos en los espermatozoides de perro diluidos en la presencia de Equex, pero no mencionan el porcentaje de espermatozoides reaccionados, que es el primer efecto descrito y discutido sobre un estado simil de criocapacitación. Peña y Linde-Forsberg [32,33], señalan que los efectos beneficiosos del Equex resultan de la reducción de las fases de transición lipídica y de la protección de las bombas iónicas de MP. En el estudio, Equex STM Paste no mostró tener un efecto superior a las proteínas del FS, sobre la simil-capacitación de los espermatozoides (Patrón F y B) y reacción de acrosoma (Patrón AR). Posiblemente, las proteínas del FS ejercen un efecto similar al descrito para el Equex STM Paste, el cual ha sido descrito que podría ser debido a algún mecanismo de estabilización de las membranas de los espermatozoides que previenen o retrasan el progreso de los cambios de la simil-capacitación [33]. Sin embargo, los espermatozoides viables tienen un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular lo que significa que estarían más avanzados en el estado de simil-capacitación, lo que podría indicar que a pesar de sobrevivir más tiempo *in vitro*, pueden ser de corta duración *in vivo* [33]. Se sugieren mayores estudios que permitan conocer la concentración de Ca²⁺ intracelular de los espermatozoides congelados con medio suplementados con FS e incubados *in vitro* para relacionarlo con su longevidad postsecongelación.

CONCLUSIONES

Los análisis *in vitro* sobre la integridad de la MP, así como la motilidad y viabilidad de espermatozoides criopreservados con fracciones proteicas del FS v/s Equex STM Paste, permiten asegurar que existen proteínas en el FS, que protegen al espermatozoide de los daños deletéreos descritos por el proceso de enfriamiento, congelación, y descongelación.

Por lo tanto, espermatozoides caninos pueden ser congelados en medio de congelación suplementado con fracciones proteicas del FS sin sufrir un deterioro significativo en la motilidad post-descongelación, ni en la integridad de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial.

Es evidente que el FS, tiene un rol en tecnologías reproductivas, como la criopreservación y aunque se han realizado algunos progresos con respecto a identificar componentes de FS, responsable de su efecto protector, es poco lo que se conoce en algunas especies acerca de cómo los factores externos pueden influir en sus niveles, y por lo tanto, modificar los efectos observados. Además es reconocido que la acción del FS y sus componentes es dependiente de los factores relacionados con el espermatozoide, en particular el tipo de procesamiento, al cual son expuestos.

Basados en los resultados del presente estudio se concluye que, la adición de FS con proteínas de distintos peso molecular, al medio de congelación añadido antes de la criopreservación, protege a los espermatozoides y mantiene los parámetros funcionales dentro del mismo rango que el Equex STM Paste, reportado desde hace más de una década, como el mejor componente en la estabilización de membranas, dejando de manifiesto que el medio de congelación con proteínas del FS tiene la ventaja del bajo costo, no ser tóxico y ser el medio fisiológico natural de los espermatozoides.

AGRADECIMIENTO

Proyecto Fondecyt Nº 1070594 y Direcciones de Investigación y Cooperación Internacional de la Universidad de La Frontera Proyecto Nº DI10-2019.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Anim. Reprod. Sci.** 110: 147-161. 2009.
- [2] ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol. Reprod.** 66: 354-360. 2002.
- [3] AUDHYA, T.; REDDY, J.; ZANEVELD, J.D. Purification and partial characterization of a glycoprotein with antifertility activity from human seminal fluid. **Biol. Reprod.** 36:511-521. 1987.
- [4] BAUST, J.M. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. **Cell. Preserv. Technol.** 1:17-31. 2002.
- [5] BRATTON, D.L.; FADOK, V.A.; RICHTER, D.A.; KAILLEY, 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.
- [6] DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Micros. Res. Tech.** 61:7-17. 2003.
- [7] 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. Anim.** 45(6):260-268. 2011.
- [8] DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 10:369-377. 2000.
- [9] ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Crystallization patterns in anterior vaginal fluid from bitches in oestrus. **J. Reprod. Fert.** 86: 335-339. 1989.
- [10] ENGLAND, C.G.W.; ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal fluid and blood. **Theriogenol.** 37: 373-381. 1992.
- [11] ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. - Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenol.** 46: 165-171. 1996.
- [12] FARSTAD, W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. **J. Small Anim. Prac.** 25: 561-565. 1984.
- [13] FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Anim. Reprod. Sci.** 42: 251-260. 1996.
- [14] GÜNZEL-APEL, A.R.; TERHAER, P.; WABERSKI, D. Hodendimensionen and Ejakulat-beschaffenheit fertiler Rueden unterschiedlicher Körpergewichte. **Kleintierpraxis.** 39:483-486. 1994.
- [15] HARAYAMA, H.; WATANABE, S.; MASUDA, H.; KANANAN, Y.; MIYAKE, M.; KATO, S. Lectin-binding characteristics of extracts from epididymal boar spermatozoa. **J. Reprod. Dev.** 44: 21-27. 1998.
- [16] HORI, T.; HAGIUDA, K.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. **Theriogenol.** 63:1573-83. 2005.
- [17] IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenol.** 55: 671-84. 2001.
- [18] JOHNSTON, S.D.; ROOT, K.; OLSON, P.N.S. Breeding Management and Artificial Insemination of the Bitch. In: **Canine and Feline Theriogenology.** W.B. Saunders Company, Philadelphia. Pp 287-306. 2001.

- [19] KEMAL D.N.; MORSHENDI, M.; SCHUFFER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation–thawing of fractionated human spermatozoa and fluid membrane translocation of phosphatidylserine. **Fertil. Steril.** 75:263-268. 2001.
- [20] KHAN, D.R.; AHMAD, N.; ANZAR, M.; CHANNA, A.A. Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. **Theriogenol.** 71:872-876. 2009.
- [21] KIM, S.; YU, D.; KIM, Y. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation intracellular hydrogen peroxide and DNA integrity in canine sperm. **Theriogenol.** 73:282-292. 2010.
- [22] LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. **J. Reprod. Fertil.** 47: 313-323. 1993.
- [23] MAGARGEE, S.F.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. **Biol. Reprod.** 38: 667-685. 1988.
- [24] MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of fluid membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over expression of Bcl-2 and Abl. **J. Exp. Med.** 182:1545-56. 1995.
- [25] MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. **Reprod. Dom. Anim.** 45:267-78. 2010.
- [26] MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenol.** 66: 2047-55. 2006.
- [27] MAXWELL, W.M.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, Cooling, or cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.** 46: 408-18. 1997.
- [28] MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal fluid. **Theriogenol.** 52:1353-1362. 1999.
- [29] MAXWELL, W.M.C.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal fluid. **Reprod. Fertil. Dev.** 10:440-444. 1998.
- [30] NÖTHLING, J.O.; VOLKMAN, D.H. Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed semen after intravaginal insemination. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47:329-333. 1993.
- [31] OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; MACEDO, L.M.; DELL' AQUA, J.A. JR.; PAPA, F.O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. In: Margaret J. Evans. (Ed). *Equine Reproduction IX.* **Anim. Reprod. Sci.** 94:82-84. 2006.
- [32] PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenol.** 54:859–875. 2000.
- [33] PEÑA, A.I.; LUGILDE, L.; BARRIO, M.; HERRADÓN, P.; QUINTELA, L. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. **Theriogenol.** 59 (8): 1725-1739. 2003.
- [34] PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: A new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenol.** 60:677-89. 2003.
- [35] PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. **Theriogenol.** 69: 666-672. 2008.
- [36] 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. Dom. Anim.** 37(6): 347-351. 2002.
- [37] RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenol.** 42:815-829. 1994.
- [38] ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal fluid and three extenders on canine semen stored at 4°C. **Theriogenol.** 44: 885-900. 1995.
- [39] ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenol.** 47: 1093-1101. 1997.
- [40] ROTA, A.; PEÑA, A.I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. **Anim. Reprod. Sci.** 57:199-215. 1999.
- [41] ROTA, A.; MILANI, C.; ROMAGNOLI, S. Effects of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. **Theriogenol.** 67: 520-525. 2007.
- [42] SÁNCHEZ- PARTIDA, L.G.; WINDSOR, D.P.; EP- PLESTON J.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M. Fertil-

- ity and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewe after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed rat semen. **J. Androl.** 20: 280-288. 1999.
- [43] SCHÄFER-SOMI, S.; KLUGER, S.; KNAPP, E.; KLEIN, D.; AURICH, C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. **Theriogenol.** 66: 173-182. 2006.
- [44] SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies using frozen semen in the dog. **A.A. Digest.** 12:6. 1969.
- [45] SIRIVAIDYAPONG, S.; URSEN, P.; BEVERS, M.M. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 57: 383-386. 2001.
- [46] STRÖM, B.; ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C. In Vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenol.** 48:247-256. 1997.
- [47] STROM-HOLST, B.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zone pellucida binding assay. **J. Reprod. Fertil.** 119: 201-206. 2000.
- [48] VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenol.** 64: 720-733. 2005.
- [49] WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; FRASER, L.R.; NIWA, K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. **J. Reprod. Fertil.** 104: 305-313. 1995.
- [50] WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.** 7: 871-891. 1995.
- [51] 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. **Cryobiol.** 44: 62-78. 2002.
- [52] ZAR, J.H. Two factor analysis of variance. In: **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, New Jersey, Pp 249-285. EUA.