

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES SEMINALES PARA LA PRESERVACIÓN REFRIGERADA DE ESPERMATOZOIDES DE GATO (*Felis catus*). NOTA TÉCNICA

Evaluation of two seminal extenders for the refrigerated preservation of cat spermatozoa (*Felis catus*). Technical Note

Alfonso Sánchez¹ y Toshihiko Tsutsui²

¹ Becario Conicyt, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. ² Department of Reproduction, Nippon Veterinary and Animal Science University, 1-7, Kyonan-Cho 1-Chome, Musashino-Shi, Tokyo 180, Japan.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales en la preservación a 4°C de espermatozoides de gato, 10 eyaculados fueron obtenidos mediante vagina artificial. Aleatoriamente se asignaron 5 eyaculados por cada diluyente en estudio. El semen se evaluó inmediatamente y se diluyó en relación 1:5 con diluyente EYT (a base de yema huevo y buffer Tris: 510 mOsm/L y pH 7,5) o diluyente TEST (a base de yema de huevo y buffer Tris y Tes: 555 mOsm/L y pH 7,7). A continuación se evaluó la motilidad progresiva (MP) y vitalidad espermática (VE). Cada eyaculado una vez diluido, fue mantenido por 30 minutos a 25°C y luego enfriado a una tasa de 0,33°C/minuto hasta alcanzar 5°C y entonces almacenado en refrigerador a 4°C. Las evaluaciones de MP y VE se realizaron a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de refrigeración. La MP fue superior ($P<0,05$) en el diluyente EYT a partir de las 24 horas de evaluación, alcanzando valores sobre 50 % a las 72 horas de refrigeración. La VE no presentó diferencias significativas al comparar los diluyentes en los diferentes tiempos, sin embargo se observó un descenso lineal a través del tiempo. Considerando que ambos diluyentes contenían yema de huevo y que la principal diferencia en composición entre ambos radicó en el tipo de buffer; las diferencias observadas en la motilidad progresiva, podrían ser atribuidas principalmente a las propiedades físicas de los diluyentes en estudio. En conclusión, es posible preservar espermatozoides de gato, refrigerados a 4°C, por períodos de hasta 72 horas, con un diluyente a base de yema de huevo y Tris.

Palabras clave: Gato, semen, espermatozoides, reproducción.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of two seminal extenders in the preservation of cat spermatozoa at 4°C, ten ejaculates were obtained through an artificial vagina. Five ejaculates were randomly assigned to each extender under study. The seminal volume was evaluated immediately and the semen was diluted in a 1:5 relation with EYT extender (based on egg yolk and buffer Tris: 510 mOsm/L and 7,5 pH) or Test extender (based on egg yolk and buffer Tris and Tes: 555 mOsm/L and 7,7 pH). The progressive motility (PM) and live sperms (LS) were evaluated. Each ejaculate, once diluted, was maintained for 30 minutes at 25°C and then cooled at a rate of 0,33°C per minute until it reached 5°C. Then each was stored in a refrigerator at 4°C. The evaluation of PM and LS was done at 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours after refrigeration. The PM was higher ($P<0.05$) in the EYT extender at 24 hours, reaching values over 50 % at 72 hours from its refrigeration. The LS did not show significant differences when comparing the extenders at different times, however, a linear descent was observed through time was observed. Considering that both extenders contain egg yolk and the main differences in composition between them was in the kind of buffer, the observed differences in the PM, could be attributed mainly to the physical properties of the extenders under study. In conclusion, it is possible to preserve cat spermatozoa, refrigerated at 4°C for periods of up to 72 hours with an extender based on egg yolk and Tris.

Key words: Cat, semen, spermatozoa, reproduction.

INTRODUCCIÓN

El creciente interés en el gato doméstico (*Felis catus*), tanto como especie de compañía, así como modelo para el estudio de los felinos silvestres, ha determinado un importante aumento en la investigación sobre la biología reproductiva de esta especie [8, 9]. Uno de los focos de interés ha sido la preservación de gametos para uso en inseminación artificial o fecundación *in vitro* [5, 13].

Para la obtención de semen de gato los métodos más utilizados son la vagina artificial [18, 19] y la electroeyaculación [4]. Los eyaculados obtenidos con vagina artificial generalmente presentan menor volumen y mayor concentración espermática que aquellos obtenidos mediante electroeyaculación [17].

Si bien para inseminación artificial se ha descrito el uso de semen fresco diluido con solución salina (0,9% NaCl) [18], también se han preservado eyaculados diluidos con medio para cultivo de embriones [12]. Un desafío importante en reproducción felina es preservar espermatozoides que conserven una adecuada fertilidad potencial por períodos prolongados [9,12].

Se ha descrito la criopreservación exitosa de espermatozoides de gato empleando un diluyente a base de lactosa, yema de huevo y glicerol [10]. Además usando un diluyente a base de Tes, Tris y yema de huevo, se estudió el efecto del método de envasado del semen (pellet vs. pajueta) y el efecto de la temperatura de almacenamiento (4°C vs -196°C) por 24 horas, y se observó que la pajueta entregaba mejores resultados que el pellet y que el almacenamiento de semen de gato a 4°C constituía una buena alternativa de preservación [12].

Debido a la escasa información existente en el área de la preservación de semen de gato, el objetivo del presente estudio fue evaluar dos diluyentes seminales para alcanzar un mayor tiempo de almacenamiento de espermatozoides a temperatura de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente estudio se obtuvo 10 eyaculados provenientes de 3 gatos mestizos, adultos, con una edad promedio de $5,3 \pm 1,5$ años, peso promedio $4,2 \pm 0,2$ Kg, clínicamente sanos y de fertilidad probada; pertenecientes a la colonia felina de la Nippon Veterinary and Animal Sciences University.

Para la colección de semen se empleó vagina artificial y gata en celo. Inmediatamente después de la colección se evaluó el volumen de los eyaculados y se procedió a su dilución en relación 1:5 (semen: diluyente), empleando uno de los diluyentes en estudio (TABLA I). La asignación de los eyaculados a cada uno de los diluyentes fue al azar.

A continuación se realizó la evaluación de la motilidad progresiva con microscopio de contraste de fases (x1000) y

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LOS DILUYENTES SEMINALES

TEST		EYT	
Tes*	4,9 g	Citrato de Sodio	1,3 g
Tris*	2,3 g	dihidratado	2,4 g
Fructosa	1,0 g	Tris	1,0 g
Yema de Huevo	20 mL	Fructosa	20 mL
Penicilina – B	1.000 U.I./mL	Yema de Huevo	1.000 U.I./mL
Estreptomina	1 mg/mL	Penicilina – B	1 mg/mL
Agua bidestilada	80 mL	Estreptomina	80 mL
Osmolaridad	555 /L	Agua bidestilada	510 mOsm/L
pH	7,7mOsm	Osmolaridad	7,5
		pH	

*Tris: hidroximetil aminometano; Tes: N – Tris (hidroximetil) metil 2 – ácido sulfónico aminometano

platina temperada y de la concentración espermática mediante cámara de Neubauer. Además se hicieron frotis para evaluar morfología, vitalidad espermática y presencia de gota citoplasmática (espermatozoides inmaduros) mediante tinción con eosina Y, usando microscopía de campo claro (x1000). Cabe señalar que la evaluación seminal se realizó después de la dilución de los eyaculados, ya que el bajo volumen seminal de esta especie dificulta su manipulación [1].

Para el enfriamiento, los eyaculados procesados fueron conservados en tubos plásticos de 1,5 mL. Cada muestra rotulada, fue mantenida por 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y luego se procedió a una refrigeración programada, llevando el semen diluido desde 25°C a 5°C, con una tasa de enfriamiento de 0,33°C por minuto. Luego las muestras fueron almacenada en un refrigerador a 4°C. La evaluación del efecto de los diluyentes seminales se realizó midiendo motilidad progresiva y vitalidad espermática en diferentes tiempos de refrigeración: 24, 48, 72, 96 y 144 horas.

Para el análisis estadístico las variables porcentuales fueron transformadas según la fórmula angular del coseno a fin de hacer análisis de la varianza. Las diferencias se estimaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis, estableciendo como nivel de significancia un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

En la TABLA II se muestra el volumen inicial y final de los 10 eyaculados usados en el estudio, así como las concentraciones espermáticas a las cuales se realizó la refrigeración de los espermatozoides. También se indica el diluyente empleado para cada eyaculado. El volumen final de los eyaculados diluidos con TEST fue de $383 \pm 32,9$ μ L y para aquellos diluidos con EYT fue $444 \pm 156,5$ μ L.

Las concentraciones espermáticas totales de los eyaculados diluidos fueron $83,1 \pm 38,6 \times 10^6$ y $41,4 \pm 15,8 \times 10^6$ para los diluyentes TEST y EYT respectivamente. Las concentraciones espermáticas finales a las cuales se preservaron los eyaculados una vez diluidos y refrigerados fluctuaron entre 3,7 y

TABLA II
DESCRIPCIÓN DE VOLUMEN SEMINAL Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA EN LOS EYACULADO DE GATO

Eyaculado N°	Volumen Semen (µL)	Volumen diluyente (µL)	Volumen final (µL)	Espermatozoides totales (x 10 ⁶)	Diluyente
1	60	300	360	135,0	TEST
2	60	300	360	82,8	TEST
3	70	350	420	105,3	TEST
4	100	500	600	22,0	EYT
5	40	200	240	55,2	EYT
6	100	500	600	43,2	EYT
7	60	300	360	41,8	TEST
8	70	350	420	57,9	EYT
9	70	350	420	50,4	TEST
10	60	300	360	28,8	EYT

Las características seminales de los eyaculados usados en el presente estudio se muestran en la TABLA III.

37,5 x 10⁶ espermatozoides por mL, con un promedio de 16,5 ± 10,4 x 10⁶ espermatozoides por mL.

Los resultados de motilidad progresiva a través de los diferentes tiempos de refrigeración se presentan en la TABLA IV. Cabe destacar que el diluyente EYT arrojó resultados significativamente superiores al diluyente TEST a partir de las 24 horas de evaluación (P<0,05).

Respecto a la vitalidad espermática, los resultados se muestran en la TABLA V, destacándose la ausencia de diferencias entre ambos diluyentes en cualquiera de los tiempos de evaluación. Las vitalidad espermática experimentó un descenso lineal a través del tiempo independiente del tipo de diluyente empleado.

DISCUSIÓN

En general la respuesta de los gatos a la recolección del semen con vagina artificial fue satisfactoria. Al respecto cabe señalar que los animales empleados en el presente estudio estaban habituados a este tipo de manejo reproductivo. Se ha estimado que sólo alrededor del 20% de los gatos pueden ser entrenados para eyacular en vagina artificial [17].

Los valores seminales promedio obtenidos en este estudio son similares a los descritos por otros autores que usaron VA para la colección de semen de gato [6, 7, 18, 19, 20].

Diversos trabajos describen la factibilidad de preservar espermatozoides de mamíferos en condiciones de refrigeración, a temperaturas entre 4 y 6°C [14, 15, 16], sin embargo para espermatozoides felinos la información disponible es escasa.

En el presente trabajo la comparación de diluyentes evidenció una clara superioridad del diluyente EYT sobre el diluyente TEST. Al respecto cabe destacar que los resultados de motilidad progresiva y vitalidad espermática alcanzados a las 72 horas de refrigeración con el diluyente EYT en el presente estudio, son superiores a los descritos en otros trabajos donde

TABLA III
CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE EYACULADOS DE GATO (N = 10)

Característica	Promedio ± Desviación Estándar
Volumen seminal (L)	69 ± 18,5
Concentración espermática total (x10 ⁶)	62,2 ± 35,4
Motilidad progresiva (%)	82,0 ± 7,2
Vitalidad espermática (%)	93,7 ± 2,9
Anormalidades espermáticas (%)	8,9 ± 6,1
Espermatozoides inmaduros (%)	3,5 ± 2,1

también se usaron diluyentes a base de yema de huevo con Tris y Tes [1, 6, 7].

Considerando que la osmolaridad de los diluyentes usados en este estudio fue superior a la osmolaridad del semen de gato, la cual fluctúa entre 320 y 345 mOsm/kg [6] llama la atención los resultados obtenidos con ambos diluyentes a las 24 horas de refrigeración y en particular los resultados a las 72 horas con el diluyente EYT. Esta característica de resistencia a condiciones hipertónicas fue observada en espermatozoides de gato, reportándose mejores valores de motilidad progresiva en diluyentes con osmolaridades superiores a 390 mOsm/kg comparado con diluyentes hipoosmóticos [6], característica que también ha sido observada en espermatozoides ovinos y humanos [3].

La mantención de buenos niveles de motilidad progresiva en el semen diluido y refrigerado (> 50%) se puede atribuir a las características protectoras de los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema del huevo, biomoléculas capaces de estabilizar y regular la integridad de la membrana espermática frente al shock térmico, dado este efecto por sus propiedades emulgentes y coligativas [2]. Si bien existe concordancia en los efectos positivos de la yema de huevo para la preservación de espermatozoides a bajas

TABLA IV
VALORES DE MOTILIDAD PROGRESIVA (%) EN ESPERMATOZOIDEOS FELINOS REFRIGERADOS A 4°C

Diluyente	Tiempo de Refrigeración (horas)						
	0	24	48	72	96	120	144
TEST (n=5)	82 ± 7,5 ^a	59 ± 12,4 ^a	48 ± 10,4 ^a	40 ± 12,2 ^a	26 ± 11,4 ^a	7 ± 8,4 ^a	5 ± 8,7 ^a
EYT (n=5)	89 ± 5,5 ^a	78 ± 8,4 ^b	74 ± 8,2 ^b	58 ± 19,2 ^b	42 ± 27,7 ^b	32 ± 25,8 ^b	20 ± 21,1 ^b

Letras diferentes dentro de columnas indican P < 0,05

TABLA V
VALORES DE VITALIDAD ESPERMÁTICA (%) EN ESPERMATOZOIDEOS FELINOS REFRIGERADOS A 4°C

Diluyente	Tiempo de Refrigeración (horas)						
	0	24	48	72	96	120	144
TEST (n=5)	92,8 ± 3,5	86,4 ± 8,9	84,0 ± 3,1	78,1 ± 3,2	71,0 ± 8,7	67,2 ± 11	62,6 ± 10
EYT (n=5)	94,5 ± 2,3	89,6 ± 5,2	86,6 ± 6,7	83,3 ± 9,4	73,3 ± 7,6	71,8 ± 4,7	67,2 ± 11

temperaturas, existen antecedentes que señalan que los espermatozoides de gato son menos susceptibles al shock térmico y que por lo tanto los diluyentes seminales requerirían una menor proporción de lipoproteínas de la yema del huevo [7].

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que es posible preservar espermatozoides de gato a temperatura de refrigeración y que el empleo de un diluyente a base de yema de huevo y Tris permite mantener parámetros satisfactorios de fertilidad potencial hasta las 72 horas de refrigeración. Las concentraciones espermáticas finales, así como la motilidad progresiva observada a las 72 horas de refrigeración sugieren la factibilidad de usar semen de gato para inseminación artificial, siguiendo el protocolo de manejo del semen descrito en este trabajo.

AGRADECIMIENTO

A la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) y al Departamento de Reproducción de la Nippon Veterinary & Animal Science University, por el apoyo y financiamiento del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AXNER, E. Mating and artificial insemination in domestic cats. In: **Manual of small animal reproduction and neonatology**. British Small Animal Veterinary Association Simpson, G, G. England, M. Harvey. (eds.). Cheltenham. 1998.
- [2] COOKSON, A.; THOMAS, A.; FOULKES, J. Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** 70: 599-604. 1984.
- [3] CURRY, M.; WATSON. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**. 31: 39-46. 1994.
- [4] DOOLEY, M.; MURASE, K.; PINEDA M. An electroeyculator for the collection of semen from the domestic cat. **Theriogenology**. 20: 297-310. 1983.
- [5] FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61: 375-387. 2000.
- [6] GLOVER, T.; WATSON, P. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**. 24: 449-455. 1985.
- [7] GLOVER, T.; WATSON, P. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. **Anim. Reprod. Sci.** 13: 229-237. 1987.
- [8] GOODROWE, K. Feline reproduction and artificial technologies. **Anim. Reprod. Sci.** 28: 389-397. 1992.
- [9] LUVONI, G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. **Reprod. Nutr. Develop.** 40 (59): 505-512. 2000.
- [10] PLATZ, C.; WILDT, D.; SEAGER S. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** 52: 279-282. 1978.

- [11] POPE, C.; GELWICKS, E.; WACHS, K.; KELLER, G.; DRESSER, B. In vitro fertilization in the domestic cat (*Felis catus*). A comparison between freshly collected and cooled semen. **Theriogenology**. 31: 241. 1989.
- [12] POPE, C.; TURNER, J.; QUATMAN, S.; DRESSER, B. Semen storage in the domestic felid: A comparison of cryopreservation methods and storage temperatures. **Biol. Reprod. Suppl.** 1: 117. 1991.
- [13] POPE, C. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**. 53: 163-174. 2000.
- [14] PROVINCE, C.; AMANN, R.; PICKETT, B.; SQUIRES, L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**. 22: 409-415. 1984.
- [15] SÁNCHEZ, A.; W. ON FREY, V.; DE LOS REYES, M. Efecto de diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. **Vet. Arg.** 113: 172-178. 1995.
- [16] SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. **Arch. Med. Vet.** 33 (1): 105-110. 2001.
- [17] SHILLE, V.; SOJKA, N. 1995. Feline reproduction. In: **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Ettinger S, E Feldman (eds). W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- [18] SOJKA, N.; JENNINGS, L.; HAMMER, C. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). **Laboratory Animal Care**. 20: 198-204. 1970.
- [19] TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Artificial insemination using fresh semen in cats. **J. Vet. Med. Sci.** 62: 1163-167. 2000.
- [20] TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; HORI, T. Intratubal insemination with fresh semen in cats. **J. Reprod. Fertil., Suppl.** 57: 347-351. 2001.