

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Efecto del momento de adición del glicerol durante la  
curva de enfriamiento sobre la calidad espermática  
durante el proceso de criopreservación de semen canino**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Gino Rogelio Carlotto Rondona

Lima-Perú

2009

## ÍNDICE

Contenido	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN LITERARIA</b>	<b>3</b>
2.1 Características del semen canino	3
2.1.1 Plasma Seminal	4
2.1.2 El espermatozoide canino	5
2.2 Fisiología del espermatozoide	6
2.2.1 Procesos metabólicos del espermatozoide	6
2.2.2 Procesos fisiológicos del espermatozoide	8
2.2.2.1 Proceso de espermatogénesis	8
2.2.2.2 Activación de la motilidad espermática	9
2.3 Criopreservación de semen canino	10
2.3.1 Principios básicos de la criopreservación	11
2.3.2 Susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico	12
2.3.3 Métodos de criopreservación	16
2.3.4 Protocolos de criopreservación de semen canino	17
2.3.4.1 Dilución del semen y empleo de crioprotectores	19
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 Procedimiento experimental	
3.1.1. Lugar y materiales de estudio	26
3.1.2. Tratamientos	27
3.2. Procedimiento metodológico	28

3.2.1. Evaluación de las muestras de semen	28
3.2.1.1. Motilidad progresiva	29
3.2.1.2. Volumen	29
3.2.1.3. Concentración espermática	29
3.2.1.4. Integridad funcional de membrana	29
3.2.2. Criopreservación del semen	30
3.2.3. Evaluación post-descongelamiento	31
3.3 Análisis estadístico	31
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>42</b>

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática del semen canino. Para esto se utilizaron 15 eyaculados de 4 perros adultos. Se evaluó la motilidad, volumen, concentración espermática e integridad funcional de membrana de cada eyaculado. Cada muestra de semen fue sometida a 3 métodos de adición del glicerol (Tratamiento 1, Tratamiento 2 y Tratamiento 3) los cuales se diferenciaron por la concentración de glicerol presente en el dilutor durante la curva de enfriamiento. En el Tratamiento 1 el total del glicerol se adicionó al inicio de la curva de enfriamiento, en el Tratamiento 2 se adicionó una fracción del glicerol total al inicio de la curva de enfriamiento y la fracción restante al final de la curva, finalmente en el Tratamiento 3 el glicerol se añadió al final de la curva de enfriamiento. Finalizada la curva de enfriamiento el semen se envaso en pajillas de 0.5 mL para proceder al congelamiento en nitrógeno líquido. La motilidad progresiva y la integridad funcional de membrana fueron los parámetros utilizados para evaluar la calidad seminal al descongelamiento. No se encontró diferencia estadística entre ninguno de los 3 métodos de adición del glicerol, a pesar de esto el Tratamiento 1 mantenía ligeramente mejor la motilidad y la integridad funcional de membrana (44% y 46%) en comparación con el Tratamiento 2 (37% y 36%) y el Tratamiento 3 (38% y 37%). Esto nos demuestra que el momento de adición del glicerol no influye de manera diferencial sobre la motilidad progresiva y la integridad funcional de membrana pudiéndose gracias a esto simplificar el proceso de criopreservación al añadir el glicerol al inicio de la curva de enfriamiento pues ya no se manipularía el semen hasta el envasado.

**Palabras clave:** semen, canino, criopreservación, glicerol

## ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the effect of the moment of addition of the glycerol during the curve of cooling on the spermatic quality of the canine semen. For this there were used 15 ejaculated of 4 adult dogs. There was evaluated the motility, volume, spermatic concentration and functional integrity of membrane of every ejaculated. Every sample of semen was submitted to 3 methods of addition of the glycerol (Treatment 1, Treatment 2 and Treatment 3) which differentiated for the concentration of glycerol present in the dilutor during the curve of cooling. In the Treatment 1 the whole of the glycerol was added to the beginning of the curve of cooling, in the Treatment 2 added to himself a fraction of the entire glycerol to the beginning of the curve of cooling and the remaining fraction at the end of the curve, finally in the Treatment 3 the glycerol was added at the end of the curve of cooling. Finished the curve of cooling the semen was packed in straw hats of 0.5 ml to proceed to the freezing in liquid nitrogen. The progressive motility and the functional integrity of membrane were the parameters used to evaluate the seminal quality to the post-thawing. There was not statistical difference between any of 3 methods of addition of the glycerol, in spite of this the Treatment 1 was keeping lightly better the motility and the functional integrity of membrane (44 % and 46 %) compared to the Treatment 2 (37 % and 36 %) and the Treatment 3 (38 % and 37 %). This demonstrates us that the moment of addition of the glycerol does not influence in a distinguishing way the progressive motility and the functional integrity of membrane being able thanks to this to simplify the process of criopreservación after the glycerol to add to the beginning of the curve of cooling since the semen would not be already manipulated up to the stiff one.

**Key words:** canine, semen, criopreservation, glycerol

## LISTA DE CUADROS

<b>Nº</b>	<b>TITULO</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1.	Características del semen canino.	4
Cuadro 2.	Metodología de dilución de las muestras al inicio y al final de la curva de enfriamiento para los 3 grupos.	28
Cuadro 3.	Características iniciales de las muestras de semen canino utilizadas durante el estudio.	32
Cuadro 4.	Efecto de los tratamientos sobre la motilidad espermática luego del proceso de congelamiento/descongelamiento.	33
Cuadro 5.	Efecto de los tratamientos sobre la integridad funcional de membrana (HOS) luego del proceso de congelamiento/descongelamiento.	34
Cuadro 6.	Resumen de los resultados obtenidos en el estudio.	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Nº</b>	<b>TITULO</b>	<b>Pág.</b>
Fig. 1	Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y sus alteraciones consecuencia del choque térmico.	16
Fig. 2	Diferentes grados de reacción en espermatozoides expuestos al test hipoosmotico.	31

## **I. INTRODUCCIÓN**

La crianza de perros de raza pura es una afición que está en constante crecimiento a nivel internacional y local, el producto de esta crianza son caninos para exhibición, concursos, mascotas de compañía, o perros para trabajo de distinto tipo (ganadería, policial, rescate, etc). Dentro de este escenario la criopreservación de semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas que brindan grandes ventajas, pues permite conseguir un rápido progreso en el mejoramiento genético de las diferentes razas caninas y aparear animales ubicados geográficamente distantes. Adicionalmente la criopreservación del semen canino permite mantener reservas genéticas de animales de gran valor y de caninos silvestres que se encuentran en situación vulnerable o en peligro de extinción; ayudando de esta forma a su conservación.

Actualmente en nuestro país, la criopreservación de semen canino es de uso limitado o nulo, debido a que la congelación de semen canino es una técnica que resulta ser muy poco aplicable en la práctica veterinaria diaria, pues requiere de equipos especiales y de personal especializado para su realización. Dichos inconvenientes retrasan la implementación y difusión de esta técnica en el medio local.



En este contexto es necesario buscar una alternativa para simplificar la técnica de criopreservación de semen canino y de esta manera facilitar y extender su uso en nuestro país.

El nivel de dificultad de la técnica de criopreservación de semen es uno de los factores que impide su difusión, además de hacerla más susceptible a posibles errores de ejecución por parte del personal que la realiza. Esto podría reducirse simplificando algunas etapas dentro del proceso de congelación tales como la adición del crioprotector durante la curva de enfriamiento.

En la criopreservación de semen canino, distintos investigadores han evaluado diferentes métodos de adición de crioprotector durante la curva de enfriamiento, promediando resultados estadísticamente similares. Esto nos indicaría que el método de criopreservación podría ser simplificado en ésta parte del proceso, pudiéndose obtener resultados satisfactorios al descongelamiento.

## **II. REVISIÓN LITERARIA**

### **2.1. Características del semen canino**

El eyaculado canino presenta oscilaciones significativas de volumen y concentración espermática debido, principalmente, a las grandes variaciones de tamaño entre los animales y entre las diferentes razas (Cunha, 1997).

El semen canino esta constituido por dos componentes, uno celular conformado por los espermatozoides y uno líquido o plasma seminal constituido principalmente por la secreción prostática (única glándula sexual accesoria en el perro). El semen es eyaculado en tres fracciones (Bartlett 1958 y Heidrich, 1977).

La primera fracción o fracción preespermática presenta un aspecto acuoso, cuyo pH varia de 6,2 a 6,5 y un volumen entre 0.5 a 5 ml (Johnston, 1991; Silva y col., 1996; Peña, 1997).

La segunda fracción o fracción espermática presenta un aspecto ligeramente más viscoso que la primera fracción y su coloración varía de blanquecino a marfil, el pH se sitúa entre 6.3 y 6.6, el volumen medio varía de 1 a 4 ml (Günzel-Apel, 1994).

La tercera y última fracción del eyaculado es de origen prostático y presenta un aspecto acuoso, su pH oscila entre 6.5 y 7. El volumen es directamente proporcional a la actividad secretoria de la glándula prostática y está entre 1 y 80 ml (Morton e Bruce, 1989; Aguiar y col., 1994).

Los espermatozoides son secretados principalmente en la segunda fracción o fracción espermática, sin embargo también es posible encontrar espermatozoides en la primera o en la tercera fracción aunque en reducidas cantidades.

**Cuadro 1. Características del semen canino**

	<b>Fracción 1</b>	<b>Fracción 2</b>	<b>Fracción 3</b>	<b>Total Eyaculado</b>
Volumen (ml)	0.5 – 5	1 – 4	1 – 80	2.5 - >80
Color	claro	blanquecino	claro	blanquecino
Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	-	4 – 400	-	4 – 400
Motilidad progresiva (%)	-	>70%	-	>70%
Morfología Normal (%)	-	>80%	-	>80%
pH	6.2 – 6.5	6.3 – 6.6	6.5 – 7	6.3 – 6.7

### 2.1.1. Plasma seminal

El plasma seminal es el resultado, principalmente, de la mezcla de las secreciones prostáticas, y en menor proporción del testículo y epidídimo, tiene como función el aporte de nutrientes y de mantener a los espermatozoides en un medio tamponado (Bearden y col. 1980); en el caso del perro tiene una consistencia líquida y color traslúcido, su volumen varía con la raza y tamaño del perro desde 1 ml hasta 80 ml y el pH de 6.5 a 7 (Feldman y col. 1996). Es una combinación compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y distintas clases de enzimas; otros elementos importantes son: la fructosa, pues constituye una fuente importante de energía para los espermatozoides; el ácido cítrico, la ergotioneína (base reductora necesaria para el mantenimiento de la motilidad); la fosforilcolina y glicerosforilcolina, componentes que representan prácticamente el contenido total de fósforo y colina conjugados en el plasma seminal proviniendo principalmente de la secreción del epidídimo (Derivaux, 1982).

### **2.1.2. El espermatozoide canino**

Los espermatozoides maduros son células alargadas cuya anatomía estructuralmente puede ser dividida en cabeza y cola. La cabeza tiene forma piriforme y sus componentes principales incluyen el núcleo que contiene el código genético y el acrosoma que contiene las enzimas necesarias para penetrar la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación. La cola o flagelo se puede dividir en tres partes: pieza media, pieza principal y pieza final. La pieza media es considerada como el centro cinético del espermatozoide y constituye la parte más gruesa de la cola. La pieza principal es la porción más larga de la cola, mientras que la pieza final es la porción más corta de la cola y está desprovisto de vaina y fibrillas periféricas (Derivaux, 1982; Garner y Háfes, 2000). La función principal del espermatozoide maduro es la fecundación y ésta depende entre muchos factores de la disposición estructural de la cabeza y del flagelo (Feldman y col. 1996; Johnston, y col, 2001).

El espermatozoide canino así como todas las demás células están rodeadas por una membrana plasmática, que define la delimitación de la célula, separando el contenido del entorno externo. Del mismo modo, como las membranas biológicas de otras células, las membranas de los espermatozoides son extremadamente especializadas en las funciones que se le atribuyen, además en el caso del espermatozoide la composición lipídica de la membrana es notablemente diferente a la de las demás células somáticas (Watson, 1995).

La membrana plasmática del espermatozoide está conformada principalmente por lípidos donde se incluyen los fosfolípidos, glicolípidos y esteroides los cuales son responsables de la fluidez de las membranas; las proteínas y carbohidratos son los que conforman la parte estructural de la membrana plasmática dando el soporte necesario para el citoesqueleto. (Singer y Nicolson, 1972; Parks y Graham, 1992 y Watson, 1995).

El estudio detallado de la estructura y función de ésta membrana plasmática es muy necesario cuando queremos emplear con éxito biotecnologías de conservación espermática. En los espermatozoides la membrana plasmática tiene un papel activo en la capacidad fecundante, recibiendo señales que modificarán a la célula a lo largo del proceso de espermatogénesis así como en el tránsito y almacenamiento en el epidídimo, finalmente en la capacitación y la penetración del ovocito (O’Rand, 1982; Holt, 1984; Watson, 1995; Lenzi y col. 1996).

La membrana plasmática del espermatozoide está altamente compartimentada, y en cada compartimiento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Holt, 1984; Hammerstedt y col., 1990). La conservación de dichos compartimentos resulta crítica para las funciones del espermatozoide, ya que cada uno asume una función muy específica en la fecundación. Estos compartimentos son principalmente: *la red* mitocondrio-flagelar (importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide), el núcleo (necesario para el almacenamiento estable del ADN), la cabeza (de cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica) y el segmento posterior (imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito).

Factores externos a los espermatozoides, tales como cambios en el pH, la temperatura y la osmolaridad del medio ambiente circundante puede causar cambios irreversibles en la membrana plasmática que limitarían la función fecundante de los espermatozoides (Gennis, 1989; Watson, 2000).

## **2.2. Fisiología del espermatozoide**

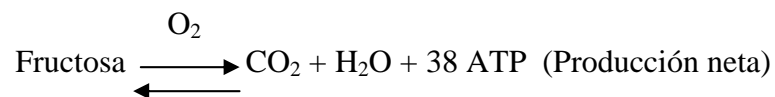
### **2.2.1. Procesos metabólicos del espermatozoide.**

Los espermatozoides encuentran su principal fuente de energía en el metabolismo de los hidratos de carbono. Como disponen de una escasa reserva intracelular, éstos dependerán de una fuente extracelular de hidratos

de carbono que la encontrarán en la fructosa del plasma seminal (Mann, 1975). De existir ausencia de sustratos exógenos para generar energía, los espermatozoides hacen uso de sus reservas intracelulares de plasmalógeno para dicho fin, pero siendo útil solo a corto plazo (White, 1980).

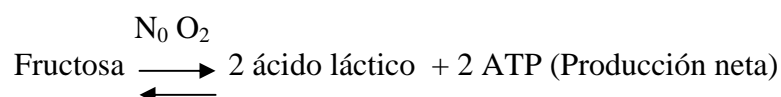
Aunque los espermatozoides carecen de muchas de las organelas, poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas como la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de electrones. Parte de la energía requerida para la motilidad proviene de reservas intracelulares de ATP cuyo empleo está regulado por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), compuesto que también interviene directamente sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973).

En condiciones aerobias, el metabolismo de la fructosa es 19 veces más eficiente en términos de energía producida frente a condiciones anaerobias. Cuando hay suficiente oxígeno, la molécula de fructosa es metabolizada completamente en dióxido de carbono y agua, produciéndose esto principalmente en el tracto femenino (Bearden, 1980).



Esta vía oxidativa, se realiza en las mitocondrias, la mayor parte del ATP que es producido se emplea como fuente de energía para la motilidad espermática; el ATP restante es destinado al mantenimiento de la integridad de los procesos que intervienen en el transporte activo que se dan a nivel de las membranas del espermatozoide, procesos de transporte activo cuya función es la de mantener la concentración de los componentes iónicos vitales para la célula espermática (Mann, 1975).

Los espermatozoides también degradan azúcares como glucosa, manosa y principalmente fructosa a ácido láctico bajo condiciones anaerobias.



Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, dado que la fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en condiciones anaerobias, característica que es importante de considerar durante el almacenamiento de espermatozoides para fines de inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

## **2.2.2. Procesos fisiológicos del espermatozoide**

### **2.2.2.1 Proceso de espermatogénesis**

El proceso mediante el cual se forman los espermatozoides se denomina espermatogénesis, este se realiza en el epitelio que reviste los túbulos seminíferos de los testículos y esta regulado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo-gónada. Las células germinales llamadas espermatogonias, se dividen mitóticamente varias veces antes de formar espermatocitos, luego éstos experimentan dos divisiones meióticas consecutivas que reduce su contenido de DNA a la mitad; estas divisiones celulares incluyendo la proliferación de las espermatogonias y las divisiones meióticas se denomina espermacitogénesis. Las células haploides que resultan de este proceso son las espermátidas, las cuales pasan por una serie de cambios estructurales y morfológicos para formar los espermatozoides, estos cambios metamórficos corresponden a una segunda fase de desarrollo espermático denominado espermiogénesis (Coy, 1995; Feldman y col., 1996; Garner y Háfiez, 2000).

Durante la espermiogénesis, se produce la condensación de la cromatina nuclear, la formación de la cola o aparato flagelar de los espermatozoides y desarrollo del acrosoma. Estos cambios se dan en una serie secuencial de cuatro fases de transformaciones morfológicas: a) Fase de Golgi, se caracteriza por la formación de gránulos proacrosómicos dentro del aparato de Golgi, la coalescencia de los gránulos en uno solo, la adhesión del

granulo acrosómico resultante a la envoltura nuclear, y las etapas tempranas de formación de la cola en el polo opuesto de la adhesión del gránulo acrosómico; Los centríolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo, se cree que ahí forma una base para la unión de la cola con la cabeza. b) Fase de capuchón, el gránulo acrosómico sobre la superficie del núcleo de la espermátide se dispersa, hasta aproximadamente dos tercios de la porción anterior del núcleo, cubriendo por un delgado saco membranoso de doble capa que se adhiere a la envoltura nuclear. c) Fase acrosomal y d) Fase de maduración; generándose como producto final al espermatozoide propiamente dicho. Posterior a esto, se produce la liberación de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos, etapa en la cual se le denomina con el nombre de “espermiación” (Garner y Hafez, 2000).

#### **2.2.2.2 Activación de la motilidad espermática**

A su salida de los tubos seminíferos los espermatozoides emigran hacia el epidídimo por el efecto de empuje que les proporciona su producción continua y de los movimientos ciliares de las células de los conductos aferentes; en el epidídimo sufrirán procesos de maduración que les proporcionarán motilidad y capacidad fecundante. La motilidad es muy escasa a nivel epididimario pero mejora ostensiblemente cuando los espermatozoides se mezclan con el plasma seminal durante la eyaculación, éste proceso es conocido como activación espermática (Derivaux, 1982). Una vez activado el espermatozoide el movimiento del flagelo es característico y consiste en un bateo simétrico de la cola que hace que el espermatozoide se desplace de manera progresiva. En el tracto femenino el espermatozoide pierde sus factores decapacitantes como mucoproteínas y proteínas que habían aportado las glándulas anexas; este es el comienzo del proceso conocido como capacitación, potencial que adquiere el espermatozoide para hiperactivarse y lograr la reacción acrosomal y poder penetrar el ovocito (Olivera y col. 2006).



### **2.3. Criopreservación de semen canino**

La conservación de los espermatozoides y de su capacidad fecundante por un periodo prolongado requiere la reducción o interrupción del metabolismo celular. Éste objetivo se puede conseguir por medio de la refrigeración, aunque principalmente mediante la criopreservación siendo necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros y col., 2002), esta técnica permite el almacenamiento de semen por periodos muy prolongados (De los Reyes, 2004), brindando muchos beneficios entre los cuales se encuentran: facilitar las posibilidades de reproducción de diversos individuos, salvaguardar las características genéticas beneficiosas encaminadas a las mejoras de las especies, y para la conservación de especies silvestres y razas caninas que están en extinción o cuentan con pocos ejemplares (De los Reyes, 2004 y Eilts, 2005).

El proceso de criopreservación produce daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn y col., 1969). Consecuentemente es de esperar que al realizar la inseminación artificial con semen congelado la fecundidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

La criopreservación de semen se inicio gracias a los descubrimientos de Polge (1949) cuando descubrió las propiedades del glicerol como agente crioprotector. Este descubrimiento fue un gran impulso para el desarrollo de la criopreservación de semen en distintas especies, entre ellas la especie canina (Stornelli y col. 2006). En 1954 Rowson notifica la primera congelación exitosa de semen en caninos y más tarde en 1969 Seager obtiene la primera preñez con semen congelado de perro. Tras la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores en la inseminación artificial y la criopreservación de semen se viene incrementando estimulado por la gran demanda de cachorros de raza (Stornelli y col. 2001; Hermansson y col. 2006).

### 2.3.1. Principios básicos de criopreservación

La reducción de la temperatura por debajo de los 5°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide, donde el mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido dado que a -196°C no se producen reacciones químicas, físicas ni biológicas; sino mantener la viabilidad durante los procesos de congelación y descongelación, específicamente entre los -15 a -60 °C, ya que varios autores han demostrado que estos son los rangos críticos de temperatura (Mazur, 1984; Vila, 1984; Amann y Pickett, 1987).

Cuando el enfriamiento de la suspensión espermática alcanza temperaturas por debajo de los 0°C, se producen una serie de procesos nocivos para la célula que comienzan con la formación de núcleos de hielo que se distribuyen de forma aleatoria en el compartimento extra-celular. La membrana plasmática del espermatozoide actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intra-celular (Watson, 1979; Vila y García, 1983; Holt, 2000<sup>b</sup>). La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro; las sales no forman parte de los cristales de hielo dejando los solutos progresivamente más concentrados en la porción remanente del agua no-congelada, este proceso recibe el nombre de crioconcentración y continúa hasta alcanzar el punto eutéctico (punto donde se alcanza la máxima concentración de solutos antes del congelamiento total), (Vila y Carretero, 1985; Grossmann y Santaló, 1991). El aumento de la concentración de solutos en el medio extracelular conforme se acerca el punto eutéctico provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extracelular, buscando lograr el equilibrio osmótico. Esto causa deshidratación de la célula y pérdida de selectividad de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987; Boiso, 2001).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua

intracelular hacia el medio externo, es decir, se equilibran por deshidratación. Sin embargo, si la velocidad de congelamiento es demasiado lenta se produce una deshidratación severa produciendo la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular pudiendo llegar al colapso irreversible de la membrana plasmática (Boiso, 2001 y Mazur, 1984); pero si son congeladas muy rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente, consecuentemente se produce una inadecuada deshidratación congelándose el agua que aún se encuentra en el espacio intracelular formando cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1970). Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intra-celular. El ritmo de la curva de enfriamiento, es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el periodo donde ocurre la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular, por tanto, debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lento para permitir que ocurra la deshidratación celular (Amann y Pickett, 1987; Kumar y col., 2003).

El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso de descongelación. Las células que contienen micro-cristales de hielo intra-celulares deben ser recalentadas muy rápidamente a fin de evitar la re-cristalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

### **2.3.2 Susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico**

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides sufren una pérdida de viabilidad que se debe a alteraciones producto del choque térmico, evento que ocurre al momento de descender rápidamente la temperatura hasta los 0°C produciendo cambios en la función y estructura celular del

espermatozoide, y cuya señal inequívoca es la pérdida de motilidad total o movimientos circulares con pérdida precoz de la motilidad al momento del descongelamiento (Quinn y White, 1966). La disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana son también otras lesiones causadas por el choque térmico (Watson, 1981<sup>a</sup>). Debido a este problema, la curva de enfriamiento previa a la congelación se realiza, habitualmente, con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realice lentamente, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000).

Según White (1993) el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico durante su maduración en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto, durante el proceso de maduración el espermatozoide adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico. La susceptibilidad al choque térmico es variable con respecto a las especies, los espermatozoides de toro, carnero y de cerdo están considerados entre los más sensibles, pues presentan marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y pérdidas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  al ser expuestos al choque térmico. Los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo por el contrario no evidencian alteraciones tan marcadas (Quinn y White, 1966). Además en los espermatozoides de toro y cerdo se ha detectado acumulación de  $\text{Na}^+$  (De Leeuw y col., 1990).

Algunos componentes de la membrana espermática son muy relevantes en lo concerniente al grado de susceptibilidad de los espermatozoides, estos son, los fosfolípidos y los ácidos grasos (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974). En el caso de espermatozoides de toro, cerdo y carnero, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada proporción entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, dicha proporción tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973). En

el caso del perro y gallo, especies donde es conocida su resistencia al choque térmico, la composición en aldehídos y la proporción de ácidos grasos poliinsaturados/saturados son semejantes en ambas especies, de aproximadamente 1-1 (Darin-Bennett y col., 1974). La proporción de colesterol/fosfolípidos también está correlacionado con la resistencia al choque térmico; el colesterol brinda estabilidad e impermeabilidad a la membrana plasmática, además influye en el control de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. El colesterol presente en el espermatozoide de toro y carnero es aproximadamente la mitad al encontrado en conejo y hombre (Darin-Bennett y White, 1977), esto reflejaría la influencia que tiene este elemento sobre la resistencia al choque térmico.

Según Cross (1996) el colesterol actúa como inhibidor en la desestabilización del acrosoma, además se identifica al colesterol como el agente del plasma seminal que decapacita los espermatozoides. En el espermatozoide humano se observó contenido particularmente elevado en colesterol de su membrana, característica que se correlaciona con una menor pérdida de K<sup>+</sup> durante el choque térmico, así como un menor descenso de la motilidad, señal característica de las lesiones causadas por el choque térmico (Drobnis y col., 1993).

Las lesiones irreversibles asociadas al choque térmico resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis y col., 1993). A temperatura fisiológicamente normal, los fosfolípidos de la membrana plasmática están en un estado de fluidez y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990), cuando la temperatura de la membrana plasmática disminuye los fosfolípidos individuales que la componen sufren una transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a agregarse (Quinn, 1989), en consecuencia las cadenas de ácidos grasos se tornan rígidas y frágiles; y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en las áreas fluidas,

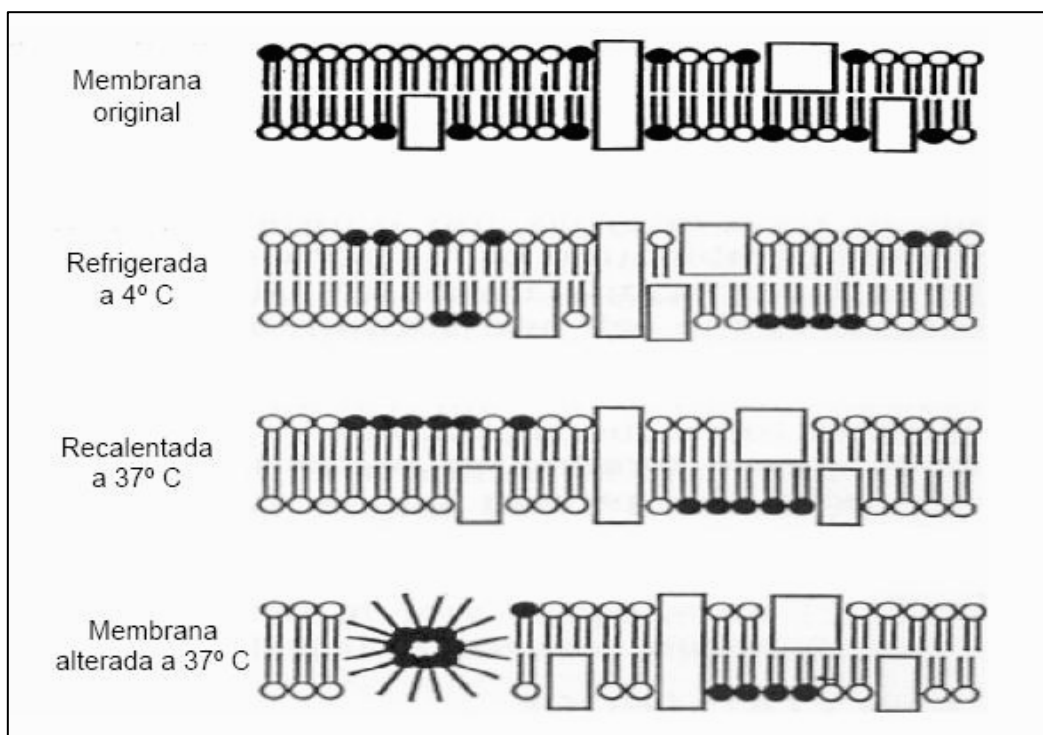
afectándose sus funciones, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000; De Leeuw y col., 1990).

Los lípidos no-bicapa son los que sufren en primer lugar la fase de transición, agregándose en micro-dominios de gel bi-capa, que tras la refrigeración y principalmente tras el calentamiento, los micro-dominios de lípidos bi-capa no restablecen las asociaciones con los demás componentes de la membrana plasmática pudiendo potencialmente desestabilizar la membrana (Quinn, 1989). Esta re-organización de los lípidos altera principalmente las asociaciones normales lípido-lípido y lípido-proteína que son imprescindibles para un normal funcionamiento de la membrana, esta disposición anormal de los fosfolípidos puede permitir la rápida entrada de moléculas que en situaciones normales atravesarían la membrana lentamente (Amann y Pickett, 1987; Parks y Graham, 1992)

Tras la descongelación, también podrían verse alteradas la capacidad de fusión y las respuestas de la membrana a las señales de transducción, lo que conduciría a la capacitación precoz y, consecuentemente, a la reducción de la longevidad del espermatozoide tras la descongelación (Watson, 1995; Cormier y col., 1997), Además de estos cambios se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante estos procesos de congelación y descongelación (Ollero y col., 1998).

El proceso de criopreservación es una técnica que puede conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide. Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos organelas del espermatozoide son a causa de los dos principales motivos de estrés de la criopreservación: las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo (Watson, 1995), y además también están implicadas las alteraciones osmóticas, que evidentemente conducen al daño celular (Hofmo y Berg, 1989). En consecuencia, la motilidad y la integridad celular disminuyen de modo significativo, tras la congelación y la descongelación.

Durante la curva de enfriamiento las principales lesiones incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la curva de enfriamiento) debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos (Grossmann y Santaló, 1991), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw y col., 1990). La pérdida de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso (Quinn y col., 1980), y que, está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico (Watson, 1981<sup>a</sup>; 1995; Drobnis y col., 1993). La figura 1 muestra la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y las alteraciones que sufre por el choque térmico (Serres, 2003).



**Fig. 1 Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y sus alteraciones consecuencia del choque térmico.**

### 2.3.3. Métodos de criopreservación de semen

Según la velocidad de la curva de enfriamiento y descongelamiento las técnicas de criopreservación pueden clasificarse en protocolos de congelación

lenta con descongelación rápida, congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultra rápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En el caso de la congelación lenta el descenso de la temperatura (curva de enfriamiento) se realiza lentamente, en un congelador programable y además la adición de crioprotector suele hacerse por pasos. La descongelación lenta también se lleva a cabo mediante el uso de un congelador programable; la descongelación rápida se realiza a temperatura ambiente o mediante el uso de un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización del agua (Boiso, 2001).

La congelación ultra rápida se describió originalmente para su uso en embriones (Trousou, 1986). Se basa en la rápida deshidratación celular mediante la utilización de altas concentraciones de crioprotector, seguido de la inmersión en nitrógeno líquido.

La vitrificación esta basado en la congelación ultra rápida pero utiliza una combinación de crioprotectores (solución vitrificante) que al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, sin formación de hielo y tomando de ahí su nombre (Fahy y col., 1984; Rall y Fahy, 1985).

#### **2.3.4. Protocolos de criopreservación de semen canino**

En la especie canina se han realizado diversas investigaciones con el objetivo de mejorar la viabilidad y la motilidad del semen preservado y, consecuentemente, la fecundidad. Para ello, los protocolos de refrigeración y congelación han sido objeto de distintos estudios sobre el uso de distintos dilutores, diferentes proporciones de crioprotectores, ritmos de refrigeración, equilibrio y protocolos de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995<sup>b</sup>; Farstad, 1996).

La criopreservación de semen canino se ha realizado mediante diferentes protocolos, la mayoría han sido empíricos comprobando la eficacia



de los distintos protocolos a través de pruebas de supervivencia *in vitro* (Watson y col., 1992). La eficacia de un protocolo de criopreservación depende de una serie de factores como la composición del diluyente, la concentración y método de adición del crioprotector, el ritmo de la curva de enfriamiento y de congelación, y el ritmo de descongelación (Mazur, 1984). El control y cuidado de estos factores debería reducir al mínimo los daños celulares, asegurar una adecuada longevidad y mantener la capacidad fecundante *in vivo* e *in vitro* (Farstad, 1996). Sin embargo y a pesar de los progresos en los protocolos de criopreservación, los datos de motilidad y de integridad funcional de membrana, indican que, solo cerca del 50% de las células sobreviven al proceso de congelación (Curry, 2000).

Adicionalmente, los espermatozoides supervivientes presentan características diferentes a las que tenían antes de la congelación; los espermatozoides criopreservados proporcionan niveles de fecundidad más reducidos que el semen fresco, debido a lesiones producidas por el choque térmico (Jasko, 1994 y Watson, 1996). Además, la motilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen fresco. Esto permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación altera las membranas (Parks y Graham, 1992).

El proceso de criopreservación de semen incluye las siguientes etapas: dilución, curva de enfriamiento, congelación y descongelación. Mientras que algunas etapas son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la curva de enfriamiento y la congelación (Watson, 1995; Kirk, 2001). Cada etapa del protocolo utilizado ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt y col., 1990); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Gennis, 1989; Jasko, 1994; Watson, 1995; Zúccari, 1998).

#### **2.3.4.1. Dilución del semen y empleo de crioprotectores:**

Inmediatamente después de colectado el semen, el primer paso en el proceso es su dilución en un medio que lo proteja adecuadamente durante el proceso de criopreservación, a este medio se le denominara dilutor. Los dilutores deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del semen y fundamentalmente debe aportar una fuente de energía; finalmente debe proteger el semen de cualquier efecto nocivo causado por la congelación y la descongelación (Province y col., 1984; Bouchard y col., 1990; England, 1993).

Los avances en las técnicas de evaluación del semen, así como también en los equipos utilizados, han posibilitado analizar y conocer más ampliamente el impacto de los dilutores en la longevidad, motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la refrigeración (Rota y col., 1995; England y Ponzio, 1996; Pinto y col., 1999; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001) y la congelación (Silva y Verstegen, 1995; Rota y col., 1997; 2001; Szász y col., 2000).

Los primeros estudios sobre refrigeración de semen canino datan de 1952 (Brochart y Coulomb, 1952); mientras que en 1954 se registra la primera inseminación artificial con semen diluido y refrigerado (Harrop, 1954); en estos estudios se utilizaron dilutores que contenían yema de huevo con solución de citrato de sodio o fructosa (Brochart y Coulomb, 1952), o en el caso de Harrop se uso leche pasteurizada. En 1975, Andersen adaptó al semen canino el diluyente TRIS-Fructosa-Ácido cítrico con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%. En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche (Province y col., 1984; Bouchard y col., 1990). Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas minimizando los efectos nocivos del frío durante la curva de enfriamiento (Pickett y Komarek, 1966; Graham y Foote, 1987; Parks y Graham, 1992).

Actualmente, el dilutor de semen canino más utilizado en situaciones prácticas y experimentales sigue siendo el TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico, con 20% de yema de huevo y glicerol como agente crioprotector (Bateman, 2001; Silva y col., 2002 y Hermansson, 2006).

**a) TRIS:**

El compuesto TRIS (hidroximetil-aminometano) es una sustancia orgánica que posee la particularidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrogeno, el cual protege a los espermatozoides de los cambios de pH; por este motivo para ser utilizado en la criopreservación de semen requiere estar asociado con el ácido cítrico (Anduaga, 1980).

El TRIS es utilizado en la criopreservación de semen por su capacidad amortiguadora de pH, osmótica y ser muy poco toxico aún en altas concentraciones; además neutraliza los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides y particularmente al ácido láctico (Salamon y Maxwell, 1995<sup>a</sup>)

Para proveer de energía al espermatozoide, los dilutores deben contener azucares del tipo monosacáridos. La principal fuente de energía para los espermatozoides es la fructosa, sin embargo, este también es capaz de metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Garner y Hafez, 2000); las células glucolizan mejor la fructosa que la glucosa, esto se debe a que la fructosa no requiere el paso en el metabolismo de glucosa catalizado por la fosfofructoquinasa (Mayes, 1997).

**b) Yema de huevo:**

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío son conocidas desde los trabajos de Phillips y Lardy (1940). Debido a la compleja naturaleza de la yema, los investigadores se

encontraron con dificultades para determinar los factores específicos responsables de los efectos beneficiosos y de su modo de actuación. Kampschmidt y col. (1953) precisó que la porción lipídica de la yema constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico, hecho confirmado por Blackshaw (1954), quien también precisó que la lecitina era el principal fosfolípidos protector pues impide el flujo y la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide de toro y carnero.

Algunos trabajos atribuyen la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con la membrana plasmática (Watson, 1975), mas concretamente, a la débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (Quinn y col., 1980). Además de Graham y Foote (1987) han sustentado que las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico, previniendo el daño peroxidativo (Jones y Mann, 1977) y preservando la integridad de la membrana (Pace y Graham, 1974; Foulkes, 1977; Watson, 1981<sup>b</sup>).

Las investigaciones posteriores sobre la naturaleza de esta protección han revelado que la fracción catiónica e hidrosoluble de la yema, debido a su carga, compite con los péptidos catiónicos del plasma seminal en la unión a la membrana del espermatozoide, evitando los efectos negativos de los péptidos (Vishwanath y col., 1992). Otro trabajo reciente se refiere nuevamente a las lipoproteínas de baja densidad, esta vez, como responsables del secuestro de las proteínas del plasma seminal en el semen de toro (Manjunath y col., 2002).

### **c) Agentes Crioprotectores:**

La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de congelación (Gao y col., 1995). El papel de los crioprotectores es fundamental en el proceso de congelación y descongelación de células vivas

pues proporciona protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras intra-celulares, extra-celulares y en la composición química (Fahy y col., 1990). Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico del semen diluido (García y Vila, 1984). El descenso del punto eutéctico implica que el espermatozoide alcanzara la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, permitiendo que el espermatozoide se deshidrate y sufra un menor estrés osmótico (Boiso, 2001). La mayor deshidratación celular sufrida en el espermatozoide gracias al empleo de crioprotectores previene la formación de hielo intracelular, disminuyendo las lesiones en la membrana por el proceso de criopreservación, al mismo tiempo se evita los efectos adversos de la deshidratación excesiva por que el crioprotector ingresa al medio intracelular del espermatozoide evitando el colapso celular (Medeiros y col., 2002).

Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en penetrantes como glicerol, DMSO, etilenglicol, y en no-penetrantes incluyendo determinados azúcares como la trehalosa, sacarosa y lactosa (Hammerstedt y col., 1990; Boiso, 2001); actualmente el mas usado en la criopreservación de semen canino es el glicerol (Bateman, 2001; Silva y col., 2002 y Hermansson, 2006).

### **Glicerol:**

El glicerol es el crioprotector mas utilizado en los protocolos de congelación del semen de perro, y prácticamente en todas las especies domésticas (Maxwell y Watson, 1996; Curry, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Vidament y col., 2000; Gil y col., 2003; Bittencourt y col., 2004). Su descubrimiento como agente crioprotector se debe a Polge y col. (1949) y ha marcado un avance notable en la preservación del semen, por medio de la congelación. Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula mediante los canales aquaporin 7 (Ishibashi y col., 1997) y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento, esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta reduce la formación de cristales de hielo

intracelulares (Salamon y Maxell, 2000). Según Amann y Pickett (1987) así como Almlid y Johnson (1988), el glicerol también tiene un rol crioprotector en el medio extracelular, su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extra-celular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrólitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución” (Mazur, 1984); además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intra-celular disponible para congelarse y formar cristales (Medeiros y col., 2002).

Las consecuencias del choque térmico y de la congelación en el espermatozoide producen drásticos cambios en las concentraciones de cationes, una de las funciones crioprotectoras del glicerol parece ser precisamente impedir la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide, sobre todo cuando se asocia glicerol con yema de huevo, citrato sódico y fructosa, protege al espermatozoide contra el influjo de  $\text{Na}^+$  y el aflujo de  $\text{K}^+$ . (Quinn y White, 1966).

Sin embargo a pesar de sus propiedades crioprotectoras el glicerol también tiene un efecto toxico a nivel de la membrana plasmática (Fahy y col., 1990; Hammerstedt y col., 1990); Es probable que el glicerol influya en la reorganización de los fosfolípidos y de las proteínas de la membrana plasmática y, de este modo, afecte al potencial de fusión de la membrana disminuyendo su capacidad fecundante (Amann y Pickett, 1987); el glicerol también afecta a otras estructuras del espermatozoide, principalmente la membrana mitocondrial y acrosomal (Garner y col., 1999).

La sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol varía considerablemente con la especie; la concentración óptima de glicerol para una determinada especie tiene que ser un compromiso entre los efectos protectores y los efectos tóxicos (Watson, 1979). La tolerancia osmótica relativa del espermatozoide parece diferir entre especies, dado que la capacidad relativa del espermatozoide para sobrevivir al estrés osmótico está relacionada, en parte

con la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a la criopreservación (Wessel y Ball, 2004)

La supervivencia del espermatozoide descongelado puede estar influenciada por el modo en que el glicerol es adicionado antes de la congelación (Fiser y Fairfull, 1989) y por como es eliminado tras la descongelación, ya que ambas operaciones pueden crear un considerable estrés osmótico, resultando en daños celulares (Gao y col., 1995). Este estrés osmótico esta relacionado con las diferencias en la permeabilidad relativa del glicerol y el agua de la membrana plasmática. El estrés osmótico parece afectar de manera distinta la motilidad y la integridad funcional de membrana; la motilidad parece ser mucho mas sensible a las condiciones aniso-osmóticas, principalmente y concentraciones hipoosmóticas que en hipertónicas (Gao y col., 1995). Después de la exposición del espermatozoide al estrés osmótico la pérdida de motilidad, no podra ser revertida cambiando al espermatozoide a un medio iso-osmótico, pues a motilidad no mejora después del restablecimiento de la osmolaridad normal ya que el estrés osmótico también ah afectado el potencial de membrana de las mitocondrias (Ball y Vo, 2001).

La adición de glicerol tiene efectos sobre el volumen de los espermatozoides, pues durante la congelación la pérdida intracelular de agua reduce a casi la mitad el volumen del espermatozoide; mientras que durante la descongelación, cuando se suspende en una solución isotónica, la célula expande 2 veces su volumen (Parks y Graham, 1992).

Otro importante aspecto en el proceso de criopreservación es la temperatura elegida para la adición de glicerol: a 37°C, a temperatura ambiente (22-25°C), o a 4-5°C (Hammerstedt y col., 1990); este parámetro es también variable entre especies, por ejemplo en el caso del cerdo la adición de glicerol a los 5°C permitió una mayor supervivencia post descongelamiento que adicionándolo a 30°C, independientemente si la adición del glicerol fue en uno o dos pasos (Fiser y Fairfull, 1989).

En los protocolos de criopreservación de semen canino, generalmente el glicerol se agrega al semen junto con el dilutor en dos pasos, es decir se utiliza dos fracciones de dilutor, que se diferencian básicamente por que la primera fracción tiene poco o nada del glicerol y la segunda fracción tiene la mayor concentración de glicerol. Esto se realiza pues Foote (1982), McLaughlin y col. (1992), Curry (2000) y Holt (2000<sup>b</sup>) describieron que el glicerol puede tener un efecto nocivo sobre la calidad espermática cuando es agregado a temperaturas entre 30°C - 37°C; sin embargo para la especie canina esta información es escasa y controversial, pues algunos autores adicionan una fracción del glicerol (3%) a temperaturas por encima de los 30°C y el resto a los 5 °C (Peña y col., 1998; Yildiz y col., 2000; Nothling y Shutteworth, 2005; y Silva y col., 2006); mientras que en otros trabajos se adiciona todo el glicerol en la segunda fracción del dilutor a los 5 °C (Linde-Forsberg, 1995; Petrunkina y col., 2004 y Hermansson 2006). Esto significa que en todos estos trabajos descritos se utiliza el método de congelamiento en 2 pasos. No obstante esta técnica de congelamiento (agregando el glicerol en 2 pasos) acarrea el riesgo de contaminación del semen por el mayor grado de manipulación que sufre, además de exponerlo a posibles cambios bruscos de temperatura que podrían influir de manera negativa sobre la calidad espermática al descongelamiento. Últimamente, Silva y col. (2003) han sugerido un método de criopreservación de semen en 1 paso (agregando todo el glicerol en la fase inicial de la curva de enfriamiento), no presenta diferencia en comparación con 2 pasos (glicerol al inicio y/o al final del enfriamiento). Sin embargo en dicho trabajo no se ha evaluado el efecto del momento de adición del glicerol sobre la integridad funcional de membrana.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática, durante el proceso de criopreservación del semen canino.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Procedimiento experimental**

##### **3.1.1. Lugar y materiales de estudio**

El estudio se realizó entre los meses de febrero y noviembre del año 2008, en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se utilizaron 25 eyaculados provenientes de la colección de semen de 4 perros mestizos machos de entre 1 a 2.5 años de edad, que fueron alojados en caniles destinados para dicho fin y mantenidos con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*.

El semen fue colectado 2 veces por semana, mediante la técnica de manipulación digital (Kutzler, 2005). Este método que consiste en la aplicación de masajes vigorosos en el bulbo del glande sobre el prepucio, hasta conseguir la erección del pene. Momento en el cual se retrae manualmente el prepucio a fin de exponer completamente del pene y bulbos del pene. Posteriormente se presiona y se relaja secuencialmente en la zona del bulbo hasta conseguir la eyaculación.

Para la dilución de los eyaculados se utilizó el dilutor descrito por (Bateman, 2001 y Hermansson, 2006). Este dilutor consiste en 3.0250 g de TRIS (Amresco 0826), 1.4409 g de Ácido cítrico anhydrous (Sigma C-0759) y

1.1260 g de Fructosa (Mallinckridt 7756), disuelto en 100 ml de agua destilada; 20% de esta solución es reemplazada por yema de huevo (v/v).

### **3.1.2. Tratamientos**

En el estudio se evaluaron tres protocolos de adición de glicerol durante la curva de enfriamiento, donde tres mililitros (ml) de cada eyaculado fueron divididos en 3 partes iguales para formar los siguientes grupos:

**Tratamiento 1 (Adición del glicerol solo al inicio de la curva de enfriamiento):** El semen fresco se diluyó en proporción 1:3 con el dilutor (glicerol 6.66%), para llegar a una concentración final de glicerol del 5%.

**Tratamiento 2 (Adición del glicerol al inicio y al final de la curva de enfriamiento):** El semen fresco se diluyó en proporción 1:1 con el dilutor (glicerol 6%) para llegar a una concentración de 3% de glicerol. Al final de la curva de enfriamiento se volvió a diluir agregando 2 ml de dilutor (glicerol 7%), para llegar a una concentración final de glicerol del 5%.

**Tratamiento 3 (Adición del glicerol solo al final de la curva de enfriamiento):** El semen fresco se diluyó en proporción 1:1 con el dilutor (glicerol 0%) al inicio de la curva de enfriamiento. Al final de la curva de enfriamiento se volvió a diluir agregando 2 ml de dilutor (glicerol 10%), para llegar a una concentración final de glicerol del 5%.

Cuadro 2. Metodología de dilución de las muestras al inicio y al final de la curva de enfriamiento para los 3 grupos

<b>Inicio de Curva de Enfriamiento</b>			
	Forma de Dilución	Volumen	Concentración
			Glicerol
	1ml de semen fresco + 3 ml de dilutor (6.66%		
T 1	glicerol)	4ml	5%
	1ml de semen fresco + 1 ml de dilutor (6.00%		
T 2	glicerol)	2ml	3%
	1ml de semen fresco + 1 ml de dilutor (0.00%		
T 3	glicerol)	2ml	0%
<b>Final de Curva de Enfriamiento</b>			
	Forma de Dilución	Volumen	Concentración
			Glicerol
T 1	4ml de semen enfriado (5% glicerol) + 0 ml de dilutor	4ml	5%
	2ml de semen enfriado (3% glicerol) + 2 ml de dilutor		
T 2	(7% glicerol)	4ml	5%
	2ml de semen enfriado (0% glicerol) + 2 ml de dilutor		
T 3	(10% glicerol)	4ml	5%

### 3.2. Procedimiento metodológico

#### 3.2.1. Evaluación de las muestras de semen

En cada ensayo, se trabajo solo con un eyaculado por vez, el cual fue colectado en el laboratorio donde se procesaron las muestras. Inmediatamente después de colectado el semen se evaluaron los siguientes parámetros: motilidad progresiva, volumen, concentración espermática e integridad

funcional de membrana. Se procesó únicamente aquellas muestras con un volumen mínimo de 3ml y motilidad progresiva  $\geq 85\%$ .

#### **3.2.1.1. Motilidad progresiva**

La motilidad progresiva fue evaluada colocando 20  $\mu\text{l}$  de semen en una lámina portaobjetos y se observarán 10 campos mediante microscopía óptica a 400X, dando como resultado el porcentaje promedio de los 10 campos observados. Se consideraron como espermatozoides con motilidad progresiva aquellos que presentan un desplazamiento continuo hacia delante. Los resultados serán expresados como porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

#### **3.2.1.2. Volumen**

El volumen de semen se midió con un tubo graduado inmediatamente después de su colección. La evaluación de la motilidad progresiva se realizó mediante la observación directa de una gota (20  $\mu\text{l}$ ) de semen fresco en un microscopio óptico a 400x.

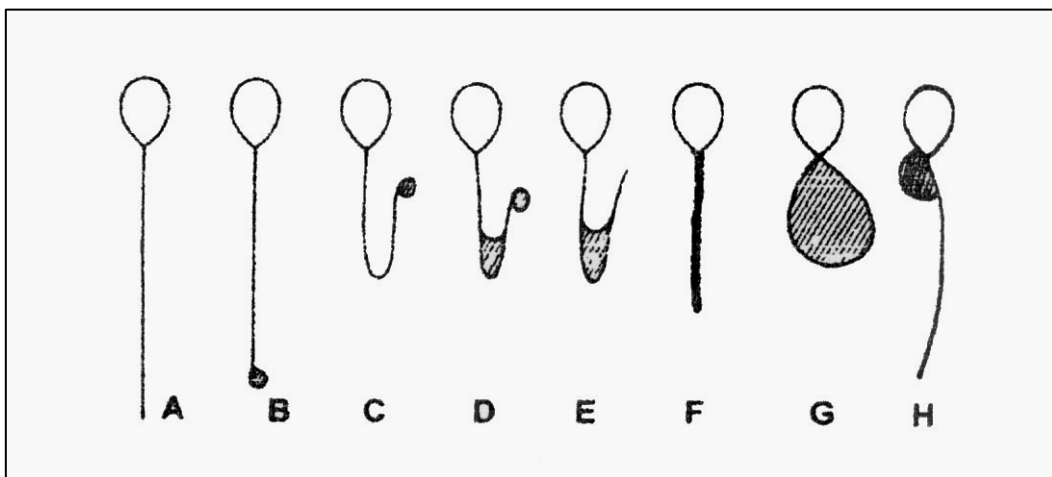
#### **3.2.1.3. Concentración espermática**

La concentración espermática fue medida mediante el uso de una cámara de Neubauer en la que se colocó 10  $\mu\text{l}$  de semen fresco diluido en proporción 1:50 para facilitar el conteo que se realizó con un microscopio óptico a 400x. El resultado se expresó en millones de espermatozoides/mL (Ax y col. 2000).

#### **3.2.1.4. Integridad funcional de membrana**

La integridad funcional de membrana fue evaluada mediante el test hiposmótico (HOS) descrito por Jeyendran y col. (1984) y modificado por Sánchez et al. (2002) para espermatozoides caninos (2002). Esta prueba

consistió en incubar 50  $\mu$ l de semen a 37 °C durante 60 minutos en 500  $\mu$ l del medio hipoosmótico (0.735 g de citrato de sodio dihidratado + 1.351 g de fructosa disuelto en 100 ml de agua destilada). Posteriormente una gota de dicha solución fue puesta y extendida sobre una lámina portaobjetos. Para la lectura se utilizó un microscopio óptico a un nivel de ampliación de 400x y se contabilizó un mínimo de 200 espermatozoides por lámina, donde se calculó el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y funcional. Los espermatozoides sin reacción en la cola fueron considerados HOS No reaccionantes, mientras que aquellos espermatozoides que presentaron la cola hinchada en respuesta a la gradiente osmótica se consideraron que mantienen la funcionalidad de la membrana plasmática se consideraron HOS reaccionantes (Fig. 2). Los resultados son expresados como porcentajes de espermatozoides HOS reaccionantes.



**Fig 2** Diferentes grados de reacción en espermatozoides expuestos al test hipoosmótico  
(A: No reaccionante, B, C, D, E, F, G y H: Reaccionantes)

### 3.2.2. Criopreservación del semen

La criopreservación del semen se inicio inmediatamente después de diluir el semen colectado con los tres tratamientos evaluados y se realizó en el siguiente orden: curva de enfriamiento, estabilización y finalmente congelación. La curva de enfriamiento se realizó colocando los tubos de los tres tratamientos

en un biker de 500 ml con agua a 35°C, dicho biker fue colocado en refrigeración por 60 minutos para conseguir un descenso gradual de la temperatura de 35°C a 5°C. Al final de la curva de enfriamiento, se adicionó la segunda fracción de dilutor (temperada a 5°C) a los grupos 2 y 3. Los 3 grupos fueron mantenidos durante 15 minutos a 5°C para la estabilización de los espermatozoides con el glicerol. Inmediatamente después se envasaron 2 pajillas de 0.5 ml por cada tratamiento. Finalmente se inicio el congelamiento de las pajillas mediante la exposición de éstas a vapores de nitrógeno por un periodo de 15 minutos hasta alcanzar la temperatura de -20°C momento en el que finalmente se sumergieron en nitrógeno liquido para su almacenamiento.

### **3.2.3. Evaluación post-descongelamiento**

Las variables estudiadas en el estudio fueron la motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática. Dichas variables se evaluaron 24 horas después de haberse finalizado el proceso de criopreservación. El descongelamiento se realizó sumergiendo a las pajillas en un recipiente con agua temperada a 40°C por 40 segundos.

### **3.3. Análisis Estadístico**

Para el análisis de datos se empleo el programa estadístico Prism® versión 3.0. El efecto de los tratamientos (momento de adición del glicerol) sobre los porcentajes de motilidad progresiva y porcentajes de integridad funcional de membrana fueron evaluados mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), y la prueba de Tukey para determinar entre que tratamientos hubo diferencias estadísticas significativas entre las medidas de los tratamientos evaluados.

Previamente, todos los porcentajes fueron transformados a valores angulares (ángulo =  $\sqrt{x}$ ) para acercar los datos a la distribución normal (Zar,

1999). Con la finalidad de uniformizar la condición inicial del semen fresco, los resultados fueron ajustados de la siguiente manera (Aisen y col., 2000, 2002):

$$x = \frac{\text{Valor al descongelamiento}}{\text{Valor de semen fresco}} \times 100$$

#### IV. RESULTADOS

Los resultados de la evaluación seminal de las 15 muestras analizadas se exponen en el cuadro 3, estas fueron evaluadas inmediatamente después de ser colectadas; se evaluó volumen eyaculado, concentración espermática, motilidad e integridad funcional de membrana, estos valores actuaron como referente en el análisis estadístico posterior.

**Cuadro 3. Características iniciales de las muestras de semen canino utilizadas durante el estudio**

MUESTRA	DONANTE	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN (esp x10 <sup>6</sup> /ml)	MOTILIDAD (%)	HOS (%)
Nro 01	Coqui	3.0	22	98	95
Nro 02	Tony	3.0	180	95	76
Nro 03	Coqui	3.0	23	92	65
Nro 04	Coqui	4.0	21	95	62
Nro 05	Coqui	4.0	195	95	60
Nro 06	Oso	4.0	145	98	81
Nro 07	Coqui	3.0	105	96	45
Nro 08	Oso	3.8	170	95	50
Nro 09	Tony	3.0	90	85	45
Nro 10	Oso	4.0	125	95	78
Nro 11	Oso	3.0	185	98	95
Nro 12	Benjy	3.0	30	100	91
Nro 13	Tony	3.5	65	90	79
Nro 14	Oso	3.5	270	96	76
Nro 15	Coqui	4.0	130	95	90
Prom ± DS		3,5 ± 0.5	117,1 ± 75.6	94,8 ± 3.7	72,5 ± 17.3

El efecto de los tratamientos sobre la motilidad espermática de las muestras evaluadas después del proceso de congelamiento/descongelamiento puede observarse en el cuadro 4. En dicho cuadro se ha incluido los valores



ajustados para cada uno de los resultados obtenidos los cuales nos permitirán comparar los resultados entre sí. Después de analizar los tratamientos no se encontraron diferencias entre ninguno de los 3 grupos evaluados ( $p > 0.05$ ). No obstante, el tratamiento 1 ( $44,36 \pm 7.15\%$ ) presentó un rendimiento ligeramente superior a los tratamientos 2 ( $37,09 \pm 11.95\%$ ) y 3 ( $38,41 \pm 8.58\%$ ); mientras entre los tratamientos 2 y 3 los resultados fueron mucho más próximos entre sí.

Cuadro 4. Efecto de los tratamientos sobre la motilidad espermática luego del proceso de congelamiento/descongelamiento

MUESTRA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	Original	Ajustado	Original	Ajustado	Original	Ajustado
Nro 01	45	45,92	45	45,92	50	51,02
Nro 02	35	36,84	38	40,00	29	30,53
Nro 03	30	32,61	22	23,91	25	27,17
Nro 04	38	40,00	45	47,37	25	26,32
Nro 05	40	42,11	8	8,42	43	45,26
Nro 06	43	43,88	45	45,92	40	40,82
Nro 07	48	50,00	55	57,29	35	36,46
Nro 08	60	63,16	35	36,84	55	57,89
Nro 09	35	41,18	28	32,94	30	35,29
Nro 10	45	47,37	40	42,11	30	31,58
Nro 11	45	45,92	42	42,86	40	40,82
Nro 12	40	40,00	35	35,00	38	38,00
Nro 13	38	42,22	25	27,78	30	33,33
Nro 14	50	52,08	42	43,75	40	41,67
Nro 15	40	42,11	25	26,32	38	40,00
Prom $\pm$ DS	42,13 $\pm$ 7.26	44,36 $\pm$ 7.15	35,33 $\pm$ 11.88	37,09 $\pm$ 11.95	36,53 $\pm$ 8.69	38,41 $\pm$ 8.58

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

La evaluación de la integridad funcional de membrana se realizó mediante la prueba de estrés hipoosmótico (HOS), considerando que los espermatozoides que reaccionaron a esta prueba (espermatozoides HOS+) presentaban la membrana funcionalmente intacta. En el cuadro 5 se observa el efecto de los tratamientos evaluados sobre la integridad funcional de membrana (HOS), donde los porcentajes de espermatozoides con integridad funcional de membrana son similares para los tres tratamientos evaluados ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, el tratamiento 1 ( $46,53 \pm 23.55\%$ ) tuvo un porcentaje ligeramente mayor de espermatozoides con membrana funcional intacta

(HOS+) comparado con los tratamientos 2 y 3 ( $36,39 \pm 20,08\%$  y  $37,91 \pm 16,64\%$  respectivamente).

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos sobre la integridad funcional de membrana (HOS) luego del proceso de congelamiento/descongelamiento

MUESTRA	TRATAMIENTO 1		TRATAMIENTO 2		TRATAMIENTO 3	
	Original	Ajustado	Original	Ajustado	Original	Ajustado
Nro 01	26	27,37	12	12,63	18	18,95
Nro 02	14	18,42	15	19,74	12	15,79
Nro 03	27	41,54	24	36,92	30	46,15
Nro 04	30	48,39	22	35,48	10	16,13
Nro 05	30	50,00	22	36,67	28	46,67
Nro 06	22	27,16	20	24,69	41	50,62
Nro 07	45	100,00	38	84,44	20	44,44
Nro 08	45	90,00	35	70,00	39	78,00
Nro 09	15	33,33	12	26,67	13	28,89
Nro 10	52	66,67	42	53,85	36	46,15
Nro 11	25	26,32	18	18,95	20	21,05
Nro 12	40	43,96	38	41,76	42	46,15
Nro 13	33	41,77	29	36,71	33	41,77
Nro 14	42	55,26	25	32,89	22	28,95
Nro 15	25	27,78	13	14,44	35	38,89
Prom $\pm$ DS	$31,40 \pm 11,27$	$46,53 \pm 23,55$	$24,33 \pm 10,04$	$36,39 \pm 20,08$	$26,60 \pm 10,91$	$37,91 \pm 16,64$

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Finalmente en el cuadro 6 se resumen los resultados obtenidos para motilidad espermática y HOS. Se puede apreciar la ligera tendencia que favorece al tratamiento 1 (adición del glicerol en un solo paso). Estos resultados indicarían que la utilización de cualquiera de estos 3 tratamientos evaluados en el presente estudio proporcionaría resultados muy similares para la criopreservación del semen canino.

Cuadro 6. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio

	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3
MOTILIDAD	$44,36 \pm 7,15$	$37,09 \pm 11,95$	$38,41 \pm 8,58$
HOS	$46,53 \pm 23,55$	$36,39 \pm 20,08$	$37,91 \pm 16,64$

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio evalúa por primera vez el efecto de tres protocolos de adición de glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la motilidad espermática y la integridad funcional de membrana. Los protocolos de adición de glicerol fueron: Tratamiento 1, donde el glicerol se adicionó únicamente en la fase inicial de la curva de enfriamiento (método de congelamiento de 1 paso); Tratamiento 2, donde el glicerol se adicionó al inicio y al final de la curva de enfriamiento (método de congelamiento de 2 pasos); y Tratamiento 3, en donde el glicerol se adicionó únicamente al final de la curva de enfriamiento (método de congelamiento de 2 pasos).

Diversos estudios realizados en otras especies (Foote, 1982; McLaughlin y col., 1992; Curry 2000; Holt, 2000<sup>b</sup>) han descrito que el glicerol tiene un efecto nocivo sobre la calidad espermática cuando es añadido al inicio de la curva de enfriamiento. En porcinos Fiser y col (1989) mencionan una disminución de la motilidad espermática al descongelamiento cuando el glicerol es añadido al principio de la curva de enfriamiento. Por lo tanto dichos autores recomendaron la adición de glicerol al final de la curva de enfriamiento, en un sistema denominado congelamiento en 2 pasos; en donde en el primer paso el semen es mezclado con la primera fracción del dilutor (sin glicerol) y luego de terminada la curva de enfriamiento, la dilución anterior es mezclada con la segunda fracción del dilutor (con glicerol). Este proceso de congelamiento en 2 pasos con adición del glicerol en la segunda fracción del diluyente ha venido

siendo utilizado en forma sistemática desde hace décadas para las principales especies domésticas (Vidament y col. 2000; Foote y col. 2002; Gil y col. 2003).

En caninos, el sistema de congelamiento en 2 pasos también ha venido siendo utilizado en forma generalizada, en donde todo el glicerol es añadido junto con la segunda fracción del dilutor, cuando el semen alcanza los 5 °C (Linde-Forsberg, 1995; Petrunkina y col., 2004 y Hermansson 2006). Sin embargo, el efecto del glicerol a temperaturas entre 30 y 35°C para espermatozoides caninos no sería tan marcado, debido a que otros autores describen métodos de congelamiento en 2 pasos, pero adicionando una fracción del glicerol a temperaturas por encima de los 30°C (primera fracción del dilutor) y el resto a los 5 °C en la segunda fracción del dilutor (Peña y col., 1998; Yildtz y col., 2000; Nothling y Shutteworth, 2005; y Silva y col., 2006). En conclusión, en todos estos estudios se han usado dos fracciones de dilutor (método de 2 pasos) principalmente para prevenir o reducir el estrés osmótico que se produciría al exponer el espermatozoide al glicerol en temperaturas mayores a 30°C (método de congelamiento de un solo paso). No obstante, existen indicios razonables para suponer que en caninos es posible adicionar el glicerol, aunque sea en pequeñas concentraciones, al inicio de la curva de enfriamiento sin causar daño espermático (Peña y col., 1998; Yildtz y col., 2000; Nothling y Shutteworth, 2005; y Silva y col., 2006).

Los efectos tóxicos del glicerol afectarían de distinta manera a la motilidad espermática y a la integridad funcional de membrana siendo la motilidad mucho más sensible a las condiciones anisoosmóticas que la integridad de membrana especialmente en condiciones hipotónicas frente a hipertónicas (Mazur, 1984; Gao y col., 1995). Una vez que el espermatozoide ha sido expuesto a condiciones hipoosmóticas (principalmente durante la descongelación) la motilidad mermada no será restablecida aunque sea expuesto posteriormente a condiciones isoosmóticas pues el potencial de membrana de las mitocondrias estará ya afectado por el estrés osmótico. Este efecto se correlacionaría con los resultados obtenidos para motilidad espermática cuya similitud podría

deberse a que los tres tratamientos fueron expuestos a las mismas condiciones hipoosmóticas durante el descongelamiento.

Los resultados obtenidos al evaluar la motilidad espermática concuerdan con los obtenidos por Silva y col. (2003) donde evaluaron el efecto de añadir el semen en un paso en comparación con dos pasos sobre la motilidad espermática, pero adicionalmente en el presente trabajo además de evaluar la motilidad espermática también se evaluó la integridad funcional de membrana, parámetro que no fue evaluado por dicho equipo de investigación y que también es afectado por el proceso de congelación/descongelación. Existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación también tiene cierto efecto tóxico sobre ellas (Fahy y col., 1990) pues es probable que el glicerol influya en la reorganización de los fosfolípidos y de las proteínas de la membrana plasmática afectando así al potencial de fusión de la membrana (Amann y Pickett, 1987; Hammerstedt y col., 1990). Las alteraciones resultantes de este efecto tóxico pueden mermar la fecundidad del espermatozoide pues aunque este tenga motilidad tras la descongelación y una adecuada producción de energía podrían estar ya afectados otros aspectos importantes como la capacidad de adhesión al ovocito (Watson, 1979; Amann y Pickett, 1987). Sin embargo la toxicidad del glicerol afecta en distintos grados a las membranas del espermatozoide pareciendo que las membranas de las mitocondrias son más afectadas que las membranas acrosomales y plasmática (Garner y col., 1999).

En relación a nuestros resultados de integridad funcional de membrana (38 – 46%), estos fueron inferiores comparados con los obtenidos por Sánchez y col. 2002 ( $53.7 \pm 13 \%$ ), esto se podría explicar por las diferencias en las concentraciones de los reactivos utilizados al preparar el medio hipoosmótico. Sin embargo el tratamiento 1 fue el que más se acercó a este resultado ( $46,53 \pm 23.55\%$ ) indicándonos que este método de criopreservación es ligeramente mejor que sus contrapartes.

En el caso de nuestro estudio, los resultados muestran valores similares ( $p > 0.05$ ) para los parámetros de motilidad e integridad funcional de membrana luego del proceso de descongelamiento en cada uno de los tres tratamientos, indicando que la adición del glicerol al inicio de la curva de enfriamiento ( $35^{\circ}\text{C}$ ) no afectó los parámetros de función espermática. La similitud en los resultados obtenidos entre los tres tratamientos puede deberse a la mayor resistencia del espermatozoide canino frente a otras especies con respecto al estrés osmótico y toxicidad ocasionada por el glicerol al ser añadido al inicio de la curva de enfriamiento. Estos resultados son similares a los descritos para espermatozoides caninos por Silva y col. (2003), quienes evaluando únicamente motilidad espermática concluyeron que la adición del total de glicerol al inicio de la curva de enfriamiento (sistema de congelamiento en un paso) no tenía diferencias con la adición de glicerol en otros momentos. Asimismo, en espermatozoides humanos también se describe el uso de métodos de congelación de un solo paso (Centola y col. 1992). En resumen, la utilización de un sistema de congelamiento en 1 paso podría ser utilizada para criopreservar espermatozoides caninos sin afectar su calidad espermática.

Concannon y col. (1989) sugieren 30-50% de motilidad espermática en semen descongelado como aceptable y adecuado para ser usado en inseminación artificial en caninos; por consiguiente en el presente estudio los resultados obtenidos al descongelamiento de los tres tratamientos evaluados podrían ser utilizados para IA, pero adicionalmente el tratamiento 1 (método de un solo paso) reveló ser ligeramente superior (aunque sin diferencia estadística) a sus homólogos.

Este hecho resulta de gran importancia en el proceso de criopreservación de semen canino, debido a que el método de congelación de un paso tiene ventajas prácticas en su realización pues al minimizar el manejo de la muestra eliminando un paso durante el proceso de criopreservación, se reducen las posibilidades de contaminación del semen por el mayor grado de manipulación. Es decir, el hecho de adicionar una segunda fracción del dilutor

al final de la curva de enfriamiento, implica la posibilidad de que pequeñas cantidades de agua utilizada para enfriar la muestra pudieran entrar en contacto con los espermatozoides causando su muerte inmediata. Además el hecho de retirar la muestra del sistema de refrigeración también implica cambios bruscos en la temperatura del semen. Adicionalmente, algún error humano bajo el sistema de congelamiento en 2 pasos podría influir de manera negativa en la calidad espermática al descongelamiento. En conclusión no se justifica el sistema de congelamiento en 2 pasos para semen canino porque nuestros resultados indicarían que el glicerol no afecta la calidad espermática cuando entra en contacto con los espermatozoides a los 35°C.

## **VI. CONCLUSIONES**

- El momento de adición de glicerol durante la curva de enfriamiento de semen canino no influye sobre la motilidad espermática e integridad funcional de membrana luego del proceso de congelamiento/descongelamiento.
- La adición del glicerol únicamente al inicio de la curva de enfriamiento (método de congelamiento en 1 paso) simplifica la técnica de criopreservación congelación.



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen, E.; Medina, V. y Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801 – 1808.
- Aisen, E.; Alvarez, H.; Venturino, A. y Garde, J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53: 1053 – 1061.
- Aguiar, P.; Costa, M.; Abreu, J.; Abreu, C. 1994. Coleta e avaliação de sêmen canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 46: 537- 44.
- Amann, R.P.; Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
- Andersen, K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*. 10: 1-4.
- Anduaga, J. 1980. Estudio comparativo de la congelación de semen bovino con el dilutor TRIS (hidroximetil-aminometano). Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 50 p.
- Almlid, T. y Johnson, L.A. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci*. 66: 2899-2905.
- Ax, R.L.; Dally, M.; Didion, B.A.; Lenz, R.W.; Love, C.C.; Varner, D.D.; Háfiez, B. y Bellin, M.E. 2000. Semen evaluation. En Háfiez, E.S.E. and

Háfez, B. (eds). Reproduction in farm animals. 7° Ed. Lippincott Williams & Wilkins Company. p 365-375.

- Ball, B.A.; Vo, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potencial. *J Androl.* 22: 1061-1069.
- Bateman, H. 2001. Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival. Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias. Universidad de Guelph, Ottawa, Canadá. 102 p.
- Bartlett, D. J. 1958. Biochemical Characteristics of Dog Semen. *Nature* 182: 1605 – 1606.
- Bearden, J.; Fuquay, J. 1980. *Applied Animal Reproduction.* 448 p.
- Bittencourt, R.; Ribeiro, A.; Santos, A.; Fürst, R.; Texeira, R. y Chalhoub, M. 2004. Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15<sup>th</sup> Internacional Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro, Brasil. 487 p.
- Blackshaw, A.W. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci.* 7: 573-582.
- Boiso, I. 2001. Principios básicos criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18: 127 – 131.
- Bouchard, G.F.; Morris, J.K.; Sikes, J.D.; Yongquist, R.S. 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology.* 34: 147-157.
- Brochart, M.; Coulomb, J. 1952. Recherches sur la dilution et la conservation du sperm de chien. *Bull Acad Vet de France.* 25: 59-62.
- Centola, G.; Raubertas, R.; Mattox, J. 1992. Cryopreservation of human semen comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *Journal of Andrology.* 13: 283 – 288.
- Concannon, P.W.; Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In Kirk, R.W. editor. *Current veterinary therapy X: small animal practice.* 1421 p.

- Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.* 18: 461-468.
- Coy, F. p. 1995. Reproducción en ovejas y cabras. En García S. A.; Castejón M. F. de la Cruz P. L.; Gonzáles G.; Murillo L. y M.; Salido R. G. (eds). *Fisiología Veterinaria*. Mc Graw-Hill- Interamericana, Madrid. 1074 p.
- Cunha, I. 1997. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicinagema. *Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.* 124 p.
- Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction.* 5: 46-52.
- Cross, N.L. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod.* 54: 138-145.
- Darin-Bennett, A.; Poulos, A.; White, I.G. 1974. The phospholipids and phospholipidbound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert.* 41: 471-474.
- Darin-Bennett, A.; White, I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 14: 466-470.
- Derivaux, J. 1982. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Editorial Acribia. 2º Ed. 486 p.
- De Leeuw, F.E.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. 1990. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl.* 1: 95-104.
- De los Reyes, M. 2004. Congelación de semen. En: *Temas de reproducción en Caninos y Felinos por autores latinoamericanos*. Gobello, C. 248 p.
- Drobnis, E.Z.; Crowe, L.M.; Berger, T.; Anchordoguy, T.J.; Overstreet, J.W. y Crowe, J.H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase

transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* 265: 432-437.

- Eilts, B. E. 2005. Theoretical Aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology* 64: 692 – 697.
- England G.C.; Plummer J.M. 1993. Hypoosmotic swelling of dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl.* 47: 261-270.
- England, G.C.; Ponzio, P. 1996. Comparasion of the quality of frozen-thawed and cooledrewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165-171
- Fahy, G.; Mac Farlene, D.; Angell, C.; Meryman, H. 1984. Vitrification as an approach to cryoconservation. *Cryobiology.* 21: 407-426.
- Fahy, G.M.; Lilley, T.H; Linsdell, H.; Meryman, H.T. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology.* 27: 247-268.
- Farstad, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci.* 42: 251-260.
- Feldman, E. C.; Nelson, R. W. 1996. *Endocrinología y Reproducción en perros y gatos.* Editorial Interamericana. 866 p.
- Fiser, P.S.; Fairfull, R.W. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on postthaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 26: 64-69.
- Fiser, P.S.; Fairfull, R.W.; Hansen, C.; Panich, P.L.; Shrestha, J.N.B.; Underhill, L. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol Reprod Dev* 34: 190-195.
- Foote, R. 1982. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. *J. Androl.* 3: 85-100.
- Foote, R.; Kaproth, M. 2002. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *J. Dairy Sci.* 85: 453–456.
- Foulkes, J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fert.* 49: 277-284.

- Gao, D.Y.; Liu, J.; Liu, C.; McGann, L.E.; Watson, P.F.; Kleinhans, F.W.; Mazur, P.; Critser, E.S.; Critser, J.K. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod.* 10: 1109-1122.
- Garcia, J. y Vila, L. 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica.* 6: 219-225.
- Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Gravance, C.G. 1999. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 34: 399-404.
- Garner, D.L. y Háfiez, E.S. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfiez, E. S. E. and Háfiez. B (eds). *Reproduction in farm animals*, 7<sup>o</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins Company. 509 p.
- Gennis R. B. 1989. *Biomembranes: molecular structure and function.* New York: Springer. 533 p.
- Gil, J.; Lundeheim, N.; Soderquist, L.; Rodríguez-Martínez, H. 2003. Influence of extender, temperatura and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology.* 59: 1241-1255.
- Graham, J.K.; Foote, R.H. 1987. Effects of several lipids, fatty acil chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology.* 24: 42-52.
- Grossmann, M. y Santaló, J. 1991. Aspectes teòrics de la congelacio de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol.* 42: 87 – 108.
- Günzel-Apel, A.R. 1994. *Fertilitatskontrolle und samenubertragung beim hund.* Hannover: Gustav Fischer Verlag Jena. p. 20-84.
- Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 11: 73 – 88.
- Harrop, A.E. 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Brit Vet J.* 110: 424-425.
- Heidrich, S. 1977. Ein beitrag zur tiefgefrierung von rudensperma. Berlin. Disertación (Doctor Medicinae Veterinarie) - Klinik fur Klauentierkrankheiten und Fortpflanzungskunde der Freien Universitat. 110 p.

- Hermansson, U.; Forsberg, C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 65: 584-593.
- Hofmo, P.O.; Berg, K.A. 1989. Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology*. 26: 124-131.
- Holt, W. V. 1984. Membrane heterogeneity in mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology*. 87: 159-94.
- Holt, W.V. 2000<sup>a</sup>. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 62: 3 – 22.
- Holt, W.V. 2000<sup>b</sup>. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47 – 58.
- Hoskins, D. y Casillas, E. 1973. Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: *HandBook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System*. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds). Washington D.C., American Physiological Society. 1757 p.
- Ishibashi, K.; Kuwanhara, M.; Gu, Y.; Kageyama, Y.; Tohsaka, A.; Suzuki, F.; Marumo, F. y Sasaki, S. 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 20782-20786.
- Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J.P. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 55: 671-684.
- Jasko, D.J. 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet*.10: 156-65.
- Johnston, S. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract*. 21: 545-51.
- Johnston, S.; Root, M.; Olson, P. 2001. Canine and Feline *Theriogenology*. 592 p.

- Jones, R. y Mann, T. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil.* 50: 261-268.
- Kampschmidt, R.F.; Mayer, D.T.; Herman, H.A. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci.* 36: 733-742.
- Kirk, E.S. 2001. Flow cytometric evaluation of stallion sperm. Fort Collins-CO. Thesis (Master of Science) – Colorado State University. 131 p.
- Kutzler, M. 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology.* 64: 747-754.
- Kumar, S.; Millar, J.D. y Watson, P.F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 46: 246 – 253.
- Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Dondero, F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update.* 2: 246-56.
- Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Sem. Vet. Med. Surg. (Small Animal).* 10: 48-58.
- Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A.; Ménard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 67: 1250-1258.
- Mann, T. 1975. Biochemistry of semen. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive system.* R.O. Greep y E.B. Astwood (eds). Washington, DC, American Physiological Society. 491 p.
- McLaughlin, E.; Ford, W.; Hull, M. 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg-yolk-citrato cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 95: 749-754.
- Maxwell, W. y Watson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 42: 55-65.

- Mayes, P. 1997. Vía de la pentosa fosfato y otras vías del metabolismo de hexosas. En: Murray, R.; Granner, D.; Mayes, P. y Rodwell, V. (eds). Bioquímica de Harper, 24º Edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. 1021 p.
- Mazur, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125 - 142.
- Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T. y Rodrigues, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology.* 57: 327 – 344.
- Morton, D.; Bruce, S. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement.* 39: 311- 316.
- Nothling, J.; Shuttleworth, R. 2005. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology.* 63: 1469-1480.
- Olivera, M., T. Ruiz, A. Tarazona, C. Giraldo. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fecundación. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 19: 426 – 436.
- Ollero, M.; Bescós, O.; Cebrian-Peréz, J.A.; Muiño-Blanco, T. 1998. Loss of membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology.* 49: 547-555.
- O’Rand, M. G. 1982. Modification of sperm membrane during capacitation. *New York Academy of Sciences.* 383: 392-404.
- Pace, M.M.; Graham, E.F. 1974. Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci.* 39: 1144-1149.
- Parks, E. J.; Graham, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38: 209-222.
- Peña, A.I. 1997. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación - descongelación. Lugo. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela. 40 p.



- Peña, A.; Barrio, F.; Quintela, L.; Herradón, P. 1998. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 50: 163-174.
- Petrunkina, A.; Gröpper, B.; Günzel-Apel, A. 2004. Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction Research*. 128: 829-842.
- Phillips, P.H.; Lardy, H.A. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Science*. 23: 399-404.
- Pickett, B.W.; Komareck, R.J. 1966. Effect of cold shock and freezing on lost of lipids from spermatozoa. *J. Dairy Sci*. 50: 753-757.
- Pinto, C.R.; Paccamonti, D.L.; Eilts, B.E. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609-616.
- Polge, C.; Smith, A.; Parks, A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Poulos, A.; Darin-Bennett, A.; White, I.G. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol*. 46B: 541-549.
- Province, C.A.; Amann, R.P.; Pickett, B.W.; Squires, E.L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*. 22: 409-415.
- Quinn, P.J.; White, I.G. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 12: 263-270.
- Quinn, P.J., White, I.G. y Cleland, R.W. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil*. 18: 209 – 220.
- Quinn, P.J.; Chow, P.Y.; White, I.G. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*. 60: 403-407.

- Quinn, P.J. 1989. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 21: 3-19.
- Rall, W. F.; Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313: 573- 575.
- Rowson, L. E. 1954. Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Vet. J.* 8: 216 – 221.
- Rota, A.; Ström, B.; Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.
- Rota, A.; Ström, B.; Linde-Forsberg, C.; Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*. 47: 1093-1101.
- Rota, A.; Frishling, A.; Vannozzi, I.; Camillo, F.; Romagnoli, S. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*. 57: 377-381.
- Salamon, S. y Maxwell, W.M. 1995<sup>a</sup>. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. 37: 185-249.
- Salamon, S. y Maxwell, W.M. 1995<sup>b</sup>. Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*. 38: 1-36.
- Salamon, S. y Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci*. 62: 77-111.
- Sanchez A.; Rubilar J. y Gatica R. 2002. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch. Med. Vet.* 34(1): 131-134.
- Seager, S.W. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* 17: 6 – 7.

- Serres, C. 2003. Evaluación y conservación del semen en el asno zamorano-leonés. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 28 p.
- Silva, L.D.; Verstegen, J.P. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 44: 571-579.
- Silva, L.D.; Onclin, K.; Lejeune, B.; Verstegen, J.P. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Veterinary Record*. 138: 154-157.
- Silva, A.; Cardoso, R.; Uchoa, D.; Silva, L. 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet. J.* 164: 244-246.
- Silva, A.; Cardoso, R.; Uchoa, D. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59: 821-829.
- Silva, A.; Cardoso, R.; Silva, L. 2006. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Dom Anim*. 41: 74-78.
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720-31.
- Stornelli, M. A.; Stornelli, M. C.; Arauz, M. S.; De la Sota, L. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado, aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria* .21: 58 – 66.
- Stornelli, M. A.; De la Sota R. L. 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino cropreservado. *Analecta veterinaria*. 25: 29 – 38.
- Szász, F.; Gábor, G.; Solti, L. 2000. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Veterinaria Hungarica*. 48: 325-333.
- Trouson, A. 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril*. 4: 1 – 12.
- Yildiz, C.; Kaya, A.; Aksoy, M.; Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579–585.

- Vidament, M.; Ecot, P.; Noue, P.; Bourgeois, G.; Magistrini, M.; Palmer, E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54: 907-919.
- Vila, L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol.* 6: 227 – 236.
- Vila, L. y Carrtero, F. 1985. Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol.* 7: 61 – 67.
- Vila, L.; García, T. 1983. Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol.* 5: 135 – 142.
- Vishwanath, R.; Shannon, P.; Curson, B. 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilisig ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci.* 29: 185-194.
- Watson, P.F. 1975. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J Reprod Fert.* 42: 105-111.
- Watson, P.F. 1979. The preservation of semen in mammals. En: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. Oxford University Press. 1496 p.
- Watson, P.F. 1981<sup>a</sup>. The effects of cold shock on sperm cell membranes. En: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, 432 p.
- Watson, P.F. 1981<sup>b</sup>. The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fert.* 62: 483-492.
- Watson, P.F.; Critser, J.K.; Mazur, P. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. En: *Infertility*. A.A.Templeton & J.O. Drife, eds. Springer-Verlag, London. 433 p.
- Watson, P. F. 1995. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. *Reproduction, Fertility and Development.* 7: 871-91.
- Watson, P.F. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31: 135-140.

- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Sciences*. 60: 481-92.
- Wessel, M.T.; Ball, B.A. 2004. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Animal Reprod Science*. 84: 147-156.
- White, L. 1980. Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals*. 4<sup>th</sup> ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger. 509 p.
- White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4<sup>th</sup>ed. Prentice Hall, New Jersey. 929 p.
- Zúccari, C. E.1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. Botucatu. Tesis (Doctorado) – Facultad de de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 121 p.