

Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales?

Batista, M.; Santana, M.; Álamo, D.; Cabrera, F.; González, F.; Gracia, A.

Grupo de Reproducción Animal, Instituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

RESUMEN: Este artículo pretende evaluar si los principales procedimientos de la preservación seminal (refrigeración y congelación) pueden ser complementarios y mostrar un cierto grado de adición. Para tal fin, se planificó una experiencia donde partiendo de 18 eyaculados de 6 perros, el semen refrigerado durante diferentes periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas), era posteriormente congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente, muestras de los distintos grupos experimentales eran descongeladas y la calidad seminal post-descongelación fue definida. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre las muestras congeladas por un procedimiento convencional (nitrógeno líquido) y las muestras congeladas tras diferentes periodos de refrigeración, para ninguno de los parámetros seminales evaluados (motilidad espermática, porcentaje de acrosomías y porcentaje de morfoanomalías). En consecuencia, este estudio permite concluir que la refrigeración del semen hasta 48 horas antes de la criopreservación no produce una disminución de la calidad seminal comparado con el semen criopreservado por el procedimiento tradicional; por tanto, las limitaciones asociadas con el transporte de semen congelado (nitrógeno líquido) podrían superarse por el uso de semen refrigerado, que podría posteriormente ser congelado en destino.

Introducción

La refrigeración y la congelación del semen reducen la actividad metabólica de los espermatozoides y, consecuentemente, preserva la viabilidad espermática (Meyers 2006). Sin embargo, ambos procedimientos muestran ventajas y limitaciones. El semen canino es altamente estable durante el proceso de refrigeración, permitiendo el mantenimiento de niveles aceptables de calidad seminal a corto plazo (Verstegen y cols. 2005; Ponglowhapan y cols. 2004). Diferentes estudios han confirmado que el semen canino puede ser preservado a 4 °C durante 5-7 días en un diluyente a base de Tris-glucosahuevo (Verstegen y cols. 2005; Nizanski y cols. 2009), y tras este periodo de tiempo, la calidad seminal disminuye. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, el semen refrigerado debería utilizarse en las primeras 48 horas (Peña y cols. 2006), y numerosos estudios han confirmado que el periodo de conservación y el tipo de recipiente que con-

tiene el semen influyen marcadamente sobre la viabilidad del semen refrigerado (Pinto y cols. 1999; Lopes y cols. 2009). Por otro lado, la congelación seminal es más compleja que la refrigeración y genera una marcada degradación de la calidad seminal tras la congelación-descongelación (Peña y cols. 2006). No obstante, la congelación del semen representa una herramienta básica en las técnicas de reproducción asistida (ART), permitiendo el almacenamiento de muestras biológicas de alto valor genético durante un periodo indefinido de tiempo.

En las últimas décadas, el transporte de material biológico (entre territorios cercanos y lejanos) se ha vuelto un procedimiento común dentro de la ART (Hendricks y cols. 2010). En las Islas Canarias, el envío de muestras de semen hacia otros países, que se encuentran geográficamente alejados de las islas, ocurre cada vez con mayor frecuencia. La mayor parte de las veces, estas muestras son enviadas como semen refrigerado, y el transporte de semen tarde entre 12 y

48 horas, por lo que esas muestras se utilizan habitualmente para perras que se encuentran en celo y requieren una inseminación inmediata. Por el contrario, el transporte de semen congelado, especialmente si se tratan de envíos internacionales, siempre requiere el uso de nitrógeno líquido (Peña y cols. 2006; Hendricks y cols. 2010). En el momento actual, el transporte aéreo de muestras seminales en nitrógeno líquido se encuentra sujeto a regulación como material peligroso y, en consecuencia, el transporte de muestras congeladas de semen resulta muy complejo y difícil de realizar (Bielanski 2005). Tales restricciones tienden a desaparecer cuando el semen es remitido como semen refrigerado (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006). Por tanto, sería muy interesante valorar la posibilidad de remitir muestras refrigeradas y una vez llegada a destino, congelar esas muestras para su almacenamiento a largo plazo para un uso posterior.

El objetivo del presente estudio era determinar la calidad seminal de muestras congeladas-descongeladas,

tras haber sido previamente refrigeradas (a 4 °C) hasta 48 horas en un diluyente a base de Tris-glucosa-yema y comparar la viabilidad espermática con aquella observada en muestras congeladas siguiendo un protocolo tradicional.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron 6 perros adultos, entre 2 y 5 años de edad y pesando entre 12 y 30 kg, cedidos por sus propietarios para el estudio. Los animales se alimentaban a base de pienso comercial, disponían siempre de agua y se encontraban con un plan sanitario adecuado. Todo el trabajo experimental se realizó de acuerdo a la normativa europea para experimentación animal.

Diseño experimental

Tres eyaculados de cada uno de los 6 perros, se recogió y tras su valoración individual, se mezcló en un pool, para posteriormente dividir las muestras resultantes en 6 alícuotas. La primera alícuota (alícuota C, control) se diluyó con un primer diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 3% glicerol) y después de 1 hora de equilibrado a 4 °C, se añadió un 2º diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 7% glicerol), para alcanzar una concentración final de 100 x 10⁶ espermatozoides/ml, 20% de yema de huevo y 5% glicerol. Las restantes 5 alícuotas (R1, R6, R12, R24, R48) se diluyeron con un diluyente de refrigeración (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 0% glicerol) y se enfriaron a 4 °C durante diferentes periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas, respectivamente); tras el periodo de refrigeración, se añadió un segundo diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 10% glicerol). Finalmente, las muestras seminales (alícuotas C, R1, R6, R12, R24 y R48) se envasaron en pajuelas (0.5 mL) y congelaron en nitrógeno líquido. Tras la descongelación, la calidad seminal se

valoró, en un total de 30 dosis para cada uno de los grupos experimentales.

Recogida y valoración seminal

Los eyaculados se recogieron por estimulación manual, intentando obtener exclusivamente la 2ª fracción del eyaculado que se deposita en un tubo graduado. Inmediatamente tras la recogida, el volumen, concentración espermática, motilidad individual y porcentajes de morfoanomalías y acrosomías espermáticas fueron definidas en cada una de las muestras seminales.

El volumen se determinaba por lectura directa sobre el tubo graduado, mientras la concentración espermática se valoró utilizando un espectofotómetro (Spermacue®, Minitube GmbH) calibrado para semen canino. El porcentaje de espermatozoides móviles (motilidad total, motilidad individual) se determinó utilizando un sistema de automático de análisis computerizado (CASA system, Sperm Vision Lite®, Minitube Ibérica) sobre un mínimo de 1000 células espermáticas/muestra. Finalmente, los porcentajes de espermatozoides con acrosoma alterado y morfología anormal (cabeza, pieza intermedia y cola) se determinaron mediante la técnica de tinción Spermac®, valorando un mínimo de 100 células espermáticas por preparación, mediante un microscopio de contraste de fases a 1000X de magnificación (Peña, 2004).

Procesado seminal, refrigeración y congelación seminal

Tras la evaluación individual, los eyaculados se mezclaron y el pool resultante se dividía en 6 alícuotas (1-2 ml/alícuota). Una alícuota (alícuota control, C), representando 1/6 parte del total del volumen del pool, se procesó siguiendo el método tradicional (primera dilución, 1 hora de equilibrado a 4 °C, segunda dilución), para finalmente envasarse en pajuelas de 0.5 mL y congelarse en nitrógeno

líquido. Las restantes muestras seminales (5/6 de las alícuotas) se dispusieron en un tubo calibrado (a temperatura ambiente) y se adicionó un diluyente de refrigeración (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 0% glicerol), para obtener una concentración final de 200 x 10⁶ espermatozoides/ml; estas 5 alícuotas fueron enfriadas durante diferentes periodos de tiempo: R1 (1 hora), R6 (6 horas), R12 (12 horas), R24 (24 horas) y R48 (48 horas), para posteriormente añadirle un diluyente de congelación (similar composición al de refrigeración, pero con un 10% de glicerol), alcanzando una composición final similar a la obtenida en la alícuota C. Finalmente, las muestras seminales fueron envasadas (0.5 mL) y congeladas en nitrógeno líquido.

Valoración de la calidad seminal post-descongelación

Aproximadamente 1 mes tras la congelación, las pajuelas se descongelaron en baño María (70 °C, 8 segundos) y se disponían en un tubo con 0.5 mL de un tampón Tris precalentado a 37 °C. Tras un calentamiento (37 °C) durante 5 minutos, la calidad seminal (motilidad espermática, porcentajes de acrosomías y morfoanomalías espermáticas) se valoraba, utilizando las mismas técnicas y procedimientos que los descritos para el semen fresco.

Análisis espermático

Los resultados se presentan como media (± error estándar de la media). Los datos de motilidad espermática, porcentajes de morfoanomalías y porcentajes de acrosomías se analizaron utilizando un análisis repetido de varianza (ANOVA) mediante SAS software (SAS Institute, NC, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se comparaban utilizando el test de Tukey. Los valores se consideraban significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Resultados

Las características seminales del semen en fresco (una vez mezclado) se presentan en la Tabla 1. Los valores fueron bastantes uniformes entre los machos, no existiendo diferencias significativas entre ninguno de los eyaculados seleccionados.

Respecto al porcentaje de motilidad espermática, antes de la congelación, los valores fueron muy similares entre los grupos experimentales (70-80%), sin detectarse diferencias significativas. En la Tabla 2, se reflejan los porcentajes de espermatozoides con motilidad total y con motilidad progresiva, en las muestras congeladas-descongeladas. Tras la descongelación, las muestras previamente refrigeradas durante 1 y 6 horas (R1 y R6) mostraban los valores más elevados de motilidad espermática, detectándose diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a las muestras R12, R24 y R48. Al compararse el grupo control (C) con las muestras refrigeradas antes de la congelación (R1, R6, R12, R24, R48), no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides móviles totales.

Los porcentajes de espermatozoides con morfología anormal se muestran en la Tabla 3, observándose que no existen diferencias significativas entre los grupos, con valores muy homogéneos entre un 15 y un 20%. La mayor proporción de anomalías espermáticas se observaron a nivel de la cola espermática, siendo esta distribución muy uniforme en todos los grupos experimentales. Finalmente, la Tabla 4 registra los valores de acrosomas alterados; de manera similar a la morfología espermática, los valores medios de acrosomas alterados (rango: 7-10%) no mostraba cambios significativos entre las muestras refrigeradas antes de congelarse (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control.

Discusión

Los resultados del presente estudio claramente demostraron que la cali-

Tabla 1. Características (media \pm dem) del semen fresco una vez mezclado (*pool*)

Concentración espermática ($\times 10^6$ células/mL)	Motilidad espermática total (%)	Motilidad progresiva (%)	Espermatozoides anormales (%)	Acrosomas no alterados (%)
201.33 \pm 20.9	93.42 \pm 2.2	86.26 \pm 2.7	19.67 \pm 1.7	96.67 \pm 2.4

Tabla 2. Porcentajes (media \pm dem) de espermatozoides móviles totales y con motilidad progresiva en muestras congeladas-descongeladas.

Refrigeración antes de la congelación	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)
	Tras descongelación	Tras descongelación
Control ¹	63.21 \pm 1.21 ^{ab}	39.94 \pm 2.03 ^a
1 h	67.03 \pm 1.79 ^{ab}	49.10 \pm 2.86 ^b
6 h	69.54 \pm 1.56 ^a	52.23 \pm 2.42 ^b
12 h	60.90 \pm 1.45 ^b	36.33 \pm 2.19 ^a
24 h	61.22 \pm 1.62 ^b	36.05 \pm 2.88 ^a
48 h	60.71 \pm 1.87 ^b	33.46 \pm 2.52 ^a

1: semen congelado siguiendo un método tradicional

ab: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Porcentajes (media \pm dem) de espermatozoides con morfología anormal en muestras congeladas-descongeladas

Anomalías espermáticas	Control ¹	Tiempo de refrigeración previo a la congelación				
		1 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Cabeza	1.33 \pm 0.3 (0.0-4.0)	1.20 \pm 0.3 (0.0-3.0)	1.27 \pm 0.3 (0.00-3.00)	1.33 \pm 0.2 (0.00-3.00)	1.07 \pm 0.4 (0.00-6.00)	2.13 \pm 0.3 (0.00-4.00)
Pieza intermedia	3.20 \pm 0.5 (1.0-8.0)	2.80 \pm 0.42 (0.0-6.0)	2.93 \pm 0.4 (1.00-6.00)	4.07 \pm 0.7 (0.00-9.00)	3.73 \pm 0.5 (1.00-7.00)	3.87 \pm 0.4 (2.00-7.00)
Cola	13.93 \pm 1.1 (7.0-21.0)	13.60 \pm 1.3 (5.0-20.0)	12.87 \pm 0.9 (7.0-20.0)	13.20 \pm 1.1 (5.0-21.0)	13.67 \pm 1.1 (5.0-20.0)	12.80 \pm 1.0 (7.0-20.0)
Total	18.47 \pm 1.4 (12.0-29.0)	17.60 \pm 1.3 (9.0-24.0)	17.07 \pm 1.0 (13.0-26.0)	18.60 \pm 1.3 (9.0-26.0)	18.47 \pm 1.5 (9.0-27.0)	18.80 \pm 1.1 (11.0-27.0)

1: semen congelado mediante un protocolo tradicional

Tabla 4. Porcentajes (media \pm dem) de acrosomas dañados en muestras congeladas-descongeladas.

Control ¹	Tiempo de refrigeración previo a la congelación				
	1 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
7.00 \pm 1.04 (1.0-19.0)	8.00 \pm 0.93 (4.0-13.0)	7.13 \pm 0.98 (3.0-14.0)	7.47 \pm 1.13 (2.0-16.0)	8.53 \pm 1.09 (3.0-16.0)	10.47 \pm 1.1 (3.0-17.0)

1: semen congelado mediante un protocolo tradicional

dad seminal post-descongelación de muestras caninas refrigeradas hasta 48 horas era comparable a la observada en muestras congeladas siguiendo un protocolo tradicional.

Una gran mayoría de estudios han confirmado que la motilidad espermática no se modifica marcadamente

durante las primeras 48 horas de conservación a 4 °C, con valores medios entre 60 y 80% (Rota y cols. 1995, England y Ponzio 1996, Iguer-Ouada y Verstegen 2001a, Ponglowhapan y cols. 2004, Shahiduzzaman y Linde-Forsberg 2007, Nizánsky y cols. 2009). Sin embargo, otros autores (Hermansson y Linde-Forsberg 2006,

Ponglowhapan y cols. 2006) afirman que la motilidad espermática canina disminuye tras sólo 48 horas de refrigeración. En nuestro estudio, la motilidad espermática permaneció prácticamente inalterada en el semen refrigerado, con porcentajes medios superiores al 70% durante las 48 horas; asimismo, no se detectaron diferencias entre las muestras refrigeradas (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control. Por tanto, podría asumirse que la motilidad espermática de los diferentes grupos experimentales antes de la congelación era prácticamente similar. Tras la congelación-descongelación, la motilidad espermática total de las muestras refrigeradas hasta 48 horas no mostraba diferencias con las muestras conservadas de un modo convencional (C). Estos resultados son comparables a los descritos por la mayoría de los autores que utilizan un sistema convencional (sin refrigeración previa) para la criopreservación del semen, con valores de motilidad post-descongelación que oscilan entre un 45-70% (Hay y cols. 1997, Ström y cols. 1997, Rota y cols. 1999, Yildiz y cols. 2000, Iguer-Ouada y Verstegen 2001b, Martins-Bessa y cols. 2006, Bencharif y cols. 2010). Por lo tanto, los resultados de motilidad espermática pueden indicar que la refrigeración del semen a 4°C hasta durante 48 horas antes de su congelación no muestran desventajas respecto al método directo de criopreservación.

Por otro lado, la motilidad espermática post-descongelación en las muestras refrigeradas antes de congelarse, mostraba diferencias significativas en función del periodo de almacenamiento a 4°C. De hecho, las alícuotas R1 y R6 presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva que las alícuotas R12, R24 y R48. Esta perfectamente asumido que los espermatozoides del perro son muy estables cuando se refrigeran, y que la motilidad espermática puede permanecer elevada durante un elevado periodo de tiempo (Verstegen y cols. 2005, Shahiduz-

zaman y Linde-Forsberg 2007), y no se detectan cambios en la capacidad funcional del espermatozoide (Kumi-Diaka y Badtrama 1994). Del mismo modo, la criopreservación del semen canino produce una degradación evidente de las células espermáticas, resultando en una obvia reducción de la motilidad espermática (Farstad 1996, Peña y cols. 2006). En nuestro estudio, la motilidad espermática antes de la congelación no se modificó por el tiempo de refrigeración; sin embargo, el descenso detectado en la motilidad post-descongelación de las muestras pertenecientes a las alícuotas R12, R24 y R48 puede ser resultado de una reducción en la capacidad de los espermatozoides para soportar el proceso de criopreservación, como consecuencia del incremento del periodo de refrigeración. En cualquier caso, no hay que descartar que las diferencias en la motilidad espermática post-descongelación pueden ser debidas a la refrigeración o la congelación, y por las interacciones entre ambos procesos.

Respecto al porcentaje de anomalías espermáticas, los resultados mostraron que la refrigeración del semen hasta 48 horas antes de congelarse no generaba un mayor desarrollo de morfoanomalías espermáticas, con una distribución muy uniforme entre los grupos experimentales. Nuestros resultados fueron similares a los descritos por otros autores, tanto en semen refrigerado a 4 °C (Farstad 1996, Peña y cols. 2006) como en muestras congeladas-descongeladas (Silva y Verstegen 1995, Silva y cols. 1996, Álamo y cols. 2005, Batista y cols. 2006) en diferentes razas caninas. De manera paralela a las anomalías morfológicas, los porcentajes de acrosomas alterados mostraron valores (7-10%) compatibles con los descritos para muestras refrigeradas y tras su descongelación (5-22%; Hay y cols. 1997; Álamo y cols. 2005, Batista y cols. 2006). En espermatozoides procedentes del epidídimo, la refrigeración del semen (hasta 4 días) antes de

la congelación no generaba modificaciones en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado (12-20%; Ponglowhapan y cols. 2006). Por el contrario, Hermansson y Linde-Forsberg (2006) detectaron un progresivo incremento en el porcentaje de acrosomas dañados post-descongelación, conforme se incrementaba el periodo de refrigeración previo a la congelación (de un 20 a un 38%), si bien no encontraron diferencias significativas, probablemente como consecuencia del bajo número de pajuelas que evaluaron en dicho estudio. En nuestro estudio, la falta de diferencias en los porcentajes de anomalías morfológicas y acrosomías post-descongelación entre los diferentes grupos experimentales resulta consistente con el análisis de motilidad espermática, puesto que la motilidad espermática no se modifica sustancialmente en las muestras congeladas tras un periodo previo de refrigeración y las muestras congeladas tras un protocolo convencional. En este sentido, la refrigeración del semen (hasta 48 horas) antes de congelarse y la crio-preservación directa podrán considerarse procesos igualmente válidos.

En conclusión, nuestro estudio mostró que la refrigeración del semen (4°C) hasta 48 horas antes de la congelación no producía una disminución en la calidad del semen cuando se comparaba con muestras seminales congeladas de una manera tradicional. Por lo tanto, en la especie canina, la congelación del semen que haya sido previamente refrigerado hasta 2 días podría ser una alternativa tan efectiva como el método habitual de criopreservación seminal. Las limitaciones asociadas con el transporte de semen congelado podrían superarse con el uso del semen refrigerado. De esta forma, el semen refrigerado podría ser directamente crioconservado tras su envío, confirmando la complementariedad de ambas técnicas para la preservación de muestras seminales.

Bibliografía

- 1.- Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A, 2005: Cryopreservation of semen in the dog use of ultrafreezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63, 72-82.
- 2.- Batista M, Alamo D, González F, Cruz MG, Gracia A, 2006: Influence of freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Dom Anim* 41, 423-428.
- 3.- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D, 2010: Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci* 119, 305-313.
- 4.- Bielanski A, 2005: Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology* 63, 1946-1957.
- 5.- England GC, Ponzio R, 1996: Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46, 165-171.
- 6.- Farstad W, 1996: Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 42, 251-260.
- 7.- Farstad W, 2000: Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53, 175-186.
- 8.- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL, 1997: Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48, 1329-1342.
- 9.- Hendricks KE, Penfold LM, Evenson DP, Kaproth MT, Hansen PJ, 2010: Effects of air-transport careening X-irradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development. *Theriogenology* 73, 267-272.
- 10.-Hermansson U, Linde-Forsberg C, 2006: Freezing of stored, chilled dogs spermatozoa. *Theriogenology* 65, 584-593.
- 11.-Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001a: Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55, 671-684.
- 12.-Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001b: Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55, 1143-1158.
- 13.-Kumi-Diaka J, Badtrama G, 1994: Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41, 1355-1366.
- 14.-Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, Rocha A, 2009: Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim Reprod Sci* 112, 158-163.
- 15.-Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A, 2006: Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology* 66, 2047-2055.
- 16.-Meyers SA, 2006: Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 18, 1-5.
- 17.-Nizanski W, Klimowicz M, Partyka A, Savic M, Dubiel A, 2009: Effects of the inclusion of Equex STM into tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5°C. *Reprod Dom Anim* 44, 363-365.
- 18.-Peña A, Lugilde L, Barrio M, Herradón P, Quintela L, 2003: Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1725-1739.
- 19.-Peña A, 2004: Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 82, 209-224.
- 20.-Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM, 2006: Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod Dom Anim* 41, 21-29.
- 21.-Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE, 1999: Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52, 609-616.
- 22.-Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde-Forsberg C, 2004: Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62, 1498-1517.
- 23.-Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C, 2006: Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66, 1633-1636.
- 24.-Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, 2002: Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1669-1681.
- 25.-Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A, 2005: New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64, 706-719.
- 26.-Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, 1995: Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44, 885-900.
- 27.-Rota A, Peña A, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H, 1999: In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 57, 199-215.
- 28.-Rota A, Milani C, Cabianga G, Martini M, 2006: Comparison bet-

- ween glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1848-1858.
- 29.-Shahiduzzaman AK, Linde-Forsberg C, 2007: Induced immotility during long-term storage at +5°C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 68, 920-933.
- 30.-Silva LD, Verstegen JP, 1995: Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44, 571-579.
- 31.-Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP, 1996: Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec* 138, 154-157.
- 32.-Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C, 1997: In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.
- 33.-Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M, 2005: Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64, 720-733.
- 34.-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.
- 35.-Yu I, Leibo SP, 2002: Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179-1190.