



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE VARIANTES APLICADAS A LOS
PROCEDIMIENTOS TECNOLÓGICOS EN LA
CONSERVACION SEMINAL DE LA ESPECIE CANINA**



MELANIA SANTANA CRUZ
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
2011

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA. UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD,
DOCTOR EN VETERINARIA Y ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE
PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE
GRAN CANARIA

INFORMA:

Que D^a MELANIA MARÍA SANTANA CRUZ, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo titulado "Efecto de variantes aplicadas a los procedimientos tecnológicos en la conservación seminal de la especie canina" y considero que reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

La Doctoranda

El Director



Fdo. Melania María Santana Cruz

Fdo. Miguel Batista Arteaga

Las Palmas de Gran Canaria, a 10 de Octubre de 2011

Algunos resultados del presente trabajo han sido aceptados para publicación o se encuentran en fase de revisión en las siguientes revistas:

- Santana M, Batista M, Alamo D, Cabrera F, González F, Gracia A. Influence of sexual stimulation and the administration of hCG on plasma testosterone levels in dogs (in press). *Reproduction in Domestic Animals*.
- Batista M, Santana M, Niño T, Alamo D, Cabrera F, González F, Gracia A. Sperm viability of canine and caprine semen samples preserved in a dry shipper (major revision). *Animal Reproduction Science*.
- Santana M, Batista M, Niño T, Alamo D, Cabrera F, González F, Gracia A. Influence of the preservation temperature over the seminal quality in fresh and frozen-thawed canine semen samples (major revision). *Reproduction in Domestic Animals*.

*A los maravillosos seres de mi vida.....
a mis padres y a mis animales,
ambos ejemplos de amor incondicional
porque les debo lo que soy,
y siempre formarán parte de mí*

AGRADECIMIENTOS

Érase una vez “una niña que no quería ser Veterinaria”.....

Cuando analizo como he llegado hasta aquí, simplemente sé que no lo sé. Son muchas las cosas que deben haber pasado en mi vida para que, teniendo la certeza de que no podía ser veterinaria, hoy esté intentando luchar por ser Doctora Veterinaria. El destino y nuestro esfuerzo se alían para ser quién eres y, en mi caso, sólo sé que sin darme cuenta hoy estoy dónde quiero estar. A continuación me espera un futuro incierto, pero a día de hoy estoy segura que, pase lo que pase, el camino ha merecido la pena.

En ese camino me han acompañado muchas vivencias y muchos seres importantes que las han hecho posible, y es a ellos a los que quiero agradecer y dedicar este trabajo.

A mi director de Tesis, Dr. Miguel Batista, por qué él ha sido el primer eslabón de toda esta cadena. Sin sus interesantes propuestas e ideas de trabajo, su constancia, su confianza en mis posibilidades y sus consejos, nada de esto hubiese sido una realidad. A él le debo una tesis, una formación profesional y una gratitud infinita por permitirme haber aprendido de los mejores.

A los componentes de la Unidad de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria, Anselmo Gracia, Fernando González y Fernando Cabrera, por poner a mi disposición sus instalaciones y hacerme sentir como una más dentro de la Unidad, proporcionándome en ocasiones sus interesantes puntos de vista sobre el trabajo realizado. Sin todo ello, este trabajo nunca hubiese podido llevarse a cabo a este nivel.

Mil gracias a los propietarios que han cedido sus mascotas al servicio de la ciencia, colaborando con este trabajo y permitiendo que hiciésemos cuanto era necesario a sus animales por el simple hecho de confiar en lo que hacíamos, en nuestros propósitos y en lo que este estudio podía aportar al mundo científico. El creer en los demás es una virtud, y ellos han dado ejemplo de ello.

A mis “grandes maestros” fuera de mi Universidad. A la Dra. Xiomara Lucas y al Dr. Alain Fontbonne, por mostrarme todo cuánto sabían simplemente por el placer de enseñar. Pero no sólo por permitirme acceder a sus increíbles conocimientos como profesionales, sino por demostrarme que, en este difícil mundo de la clínica e investigación en la especialidad veterinaria, “los grandes genios también son grandes personas”. Y por supuesto, a todos los que con ellos trabajaban (a Marta, a Fernando, a Manu, a Florannce,...), haciéndome llegar su sabiduría con paciencia, cercanía y gran amistad, pero también por transmitirme esas ganas de seguir luchando y aprendiendo.

A mis incomparables compañeros de laboratorio. A ti, Desi, mi mentora, por poner a mi disposición cuánto tenías (tu tiempo, tus conocimientos y tus Beaguelitos); me enseñaste todo lo que sabías y me introdujiste en este mundo de la tecnología seminal con una estupenda formación y, ahora, eres la única que queda para rememorar nuestras “batallas”. A Tara, mi amiga-compañera caprina, aunque ya lejos, gracias por todo ese trabajo en grupo, esa gran capacidad de organización, por esas horas de incertidumbre en compañía y tantos recuerdos. A Robert, dicen que la vivencias cortas son intensas, cómo tú; te dejaste ver tarde y demasiado rápido, pero tu aportación valió por años. Y por supuesto a los numerosas alumnas que han

pasado por nuestra unidad (Carla, Dácil, etc.), estado siempre ahí para colaborar con una inmensa fuerza de voluntad y entusiasmo.

A todos mis compañeros de la Universidad. Al Dr. Tacho Argüello y la Dra. Noemí Castro, por permitirme desenvolverme en la granja con total comodidad, aportando siempre todo lo que hiciese falta y tratándome como una más de sus becarios, incluyendo grandes consejos y por ayudarme con partes tan imprescindibles de esta Tesis como la estadística. A mis niños de la granja, incondicionales apoyos en el terreno laboral y en grandes etapas de mi vida en lo personal...el tiempo avanza y la gente se separa, pero lo vivido a vuestro lado fue de lo mejor y siempre estará conmigo. A todo el personal laboral de la granja por su colaboración en este trabajo.

Y por supuesto a aquellas personas que han estado ahí indirectamente y que, aun estando detrás de toda la parte profesional, me han apoyado y sigue apoyando a nivel personal porque, un gran profesional no es nada si no tiene a quién querer...

A mis increíbles padres, que han estado ahí desde el primer momento cuando, siendo niña, nadie entendía de dónde me venía esa “extraña pasión por los seres de 4 patas”. Ellos han sido testigos de mis dudas, de mis logros y de mis fracasos, pero siempre han estado ahí sin cuestionar si lo que estaba haciendo estaba bien o mal, sólo creyendo en mí. Puede que esa sea la función de los padres, pero yo les agradezco el saber haberlo hecho tan bien. Es un orgullo ser vuestra hija.

A los numerosos amigos que me han acompañado en todos estos años (a Mine, Cris, Vane, M^a José y todos lo que sin nombrar saben que son especiales para mí) y los que siguen llegando.....todos ellos forman parte de mi y de lo que soy, y aunque no siempre que queremos podemos estar juntos, hacen que nunca me sienta sola en este camino. Todos para uno y uno para todos!

Y por supuesto, los protagonistas de esta historia, “mis animales”. Ellos han dado a mi vida el sentido que tiene. Mis dulces compañeros de andaduras....mis mascotas (las que siguen ahí y las que ya se han ido), haciéndome compañía durante mi tiempo de transformación para ser una veterinaria, a mis pies en las horas de estudio y, recordándome cada día que por mucho que los conozca, “nunca dejarán de sorprenderme”. Y a todos los animalitos que han tenido que sufrir “mi maldades” en mi lucha por hacerme una profesional, saludándome con un alegre movimiento de cola independientemente de si les esperaba una caricia o una manipulación clínica. Ellos siempre serán especiales para mí...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Anatomía del aparato genital del macho	7
2.1.1. Testículos	7
2.1.2. Escroto	8
2.1.3. Epidídimo	9
2.1.4. Cordón espermático	9
2.1.5. Pene y prepucio	10
2.1.6. Próstata	11
2.2. Fisiología, gametogénesis y endocrinología del macho	12
2.2.1. Endocrinología del sistema reproductor del perro	12
2.2.2. La gametogénesis en el perro	13
2.2.3. Espermatogénesis	14
2.2.4. Esteroidogénesis en el perro	15
2.2.5. Concentraciones plasmáticas de testosterona en la especie canina	16
2.2.5.1. Concentraciones plasmáticas de testosterona en perros sanos	16
2.2.5.2. Relación entre hormonas exógenas y las concentraciones de testosterona	17
2.2.5.3. Técnicas de medición hormonal de testosterona	18
2.3. Recogida y contrastación seminal	19
2.3.1. La eyaculación y el semen	19
2.3.1.1. Mecanismo de la eyaculación	19
2.3.1.2. El semen	20
2.3.2. Extracción seminal	21
2.3.2.1. Estimulación manual	22
2.3.2.2. Cono o capuchón de látex	24
2.3.2.3. Vagina artificial	24
2.3.2.4. Electroeyaculación	25
2.3.2.5. Farmacología	26
2.3.2.6. Punción epididimaria	26
2.3.3. Factores que determinan la eyaculación y la calidad del semen	27
2.3.3.1. Factores que pueden influir sobre el mecanismo de la eyaculación	27
2.3.3.2. Factores que afectan a la calidad del semen	27
2.4. Valoración seminal	30
2.4.1. Estudio macroscópico	30
2.4.1.1. Color	30
2.4.1.2. Volumen	30
2.4.2. Estudio microscópico	31
2.4.2.1. Motilidad espermática	31
2.4.2.2. Concentración espermática	34
2.4.2.3. Morfología espermática	36
2.4.2.4. Vitalidad espermática	38
2.4.2.5. Acrosomías	39
2.4.2.6. Pruebas de viabilidad espermática	40
2.4.2.7. Otros aspectos a valorar del semen	41
2.4.3. Estudio bioquímico	41

2.5. Diluyentes seminales	42
2.5.1. Componentes básicos de un diluyente	42
2.5.1.1. Fuentes de energía	42
2.5.1.2. Soluciones tampones y electrolitos	43
2.5.1.3. Estabilizadores de membrana	43
2.5.1.2. Antibióticos	43
2.5.1.3. Otros componentes	44
2.5.2. Efecto de los diluyentes sobre las propiedades de los espermatozoides	44
2.5.3. Clasificación de los diluyentes	45
2.5.3.1. Diluyentes naturales	46
2.5.3.2. Diluyentes sintéticos	46
2.6. Conservación del semen canino	46
2.6.1. Semen fresco	46
2.6.2. Semen refrigerado	47
2.6.2.1. Dilución de eyaculados y principales diluyentes utilizados en refrigeración seminal en el perro	48
2.6.2.2. Proceso y tasa de dilución	50
2.6.2.3. Conservación del semen refrigerado	50
2.6.2.4. Transporte de semen refrigerado	51
2.6.3. Semen congelado	51
2.6.3.1. Criobiología espermática	51
2.6.3.2. Contrastación de las muestras seminales previo al proceso de congelación	52
2.6.3.3. Dilución de eyaculados, proceso y tasa de dilución	53
2.6.3.4. Principales diluyentes utilizados en congelación seminal en el perro	54
2.6.3.5. Periodo de equilibrado y envasado del semen	56
2.6.3.6. Congelación en nitrógeno líquido	58
2.6.3.7. Congelación en ultracongeladores	59
2.6.3.8. Transporte del semen congelado	60
2.7. Descongelación y contrastación seminal post-congelación	61
2.7.1. Procedimiento de descongelación	61
2.7.2. Dilución y longevidad del semen descongelado	63
2.7.3. Contrastación del semen congelado-descongelado	65
2.7.4. Estimulación de la motilidad espermática post-congelación	66
3. MATERIAL Y MÉTODOS	67
3.1. Experiencia 1: Características seminales post-descongelación en muestras conservadas en diferentes protocolos de criopreservación	68
3.1.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento	68
3.1.2. Diseño experimental	69
3.1.3. Recogida de semen	72
3.1.4. Estudio y contrastación seminal	72
3.1.4.1. Estudio macroscópico	72
3.1.4.2. Estudio microscópico	73
3.1.5. Dilución y congelación seminal	76
3.1.5.1. Procedimiento de dilución seminal	76
3.1.5.2. Procedimiento de congelación seminal	79

3.1.6. Descongelación del semen y valoración del semen congelado-descongelado.....	80
3.1.7. Análisis estadístico.....	82
3.2. Experiencia 2: Características del semen conservado a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.....	82
3.2.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento.....	82
3.2.2. Diseño experimental.....	83
3.2.3. Recogida y contrastación del semen.....	83
3.2.4. Diluyo-conservación del semen.....	84
3.2.5. Conservación en distintas temperaturas y congelación seminal.....	84
3.2.6. Valoración de la calidad seminal en los diferentes protocolos de conservación.....	85
3.2.7. Análisis estadístico.....	86
3.3. Experiencia 3: Viabilidad del semen congelado-descongelado conservado a diferentes temperaturas tras su descongelación.....	88
3.3.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento.....	88
3.3.2. Diseño experimental.....	88
3.3.3. Recogida y contrastación del semen.....	89
3.3.4. Dilución y congelación seminal.....	89
3.3.5. Descongelación del semen y conservación en distintas temperaturas.....	90
3.3.6. Valoración de la calidad seminal posterior a los diferentes tiempos.....	90
3.3.7. Análisis estadístico.....	91
3.4. Experiencia 4: Influencia del tiempo de refrigeración previo a la congelación sobre la calidad del semen.....	93
3.4.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento.....	93
3.4.2. Diseño experimental.....	93
3.4.3. Recogida y contrastación del semen.....	94
3.4.4. Dilución y refrigeración a distintos tiempos.....	94
3.4.5. Congelación seminal.....	96
3.4.6. Descongelación del semen y valoración de la calidad seminal.....	96
3.4.7. Análisis estadístico.....	96
3.5. Experiencia 5: Características del semen tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido.....	98
3.5.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento.....	98
3.5.2. Diseño experimental.....	98
3.5.3. Recogida y contrastación del semen.....	99
3.5.4. Dilución y distintos tiempos de equilibrado.....	99
3.5.5. Congelación seminal a diferentes tiempos en vapores de nitrógeno líquido.....	100
3.5.6. Descongelación del semen y valoración de la calidad seminal.....	101
3.5.7. Análisis estadístico.....	101
3.6. Experiencia 6: Características del semen congelado y almacenado en nitrógeno líquido vs nitrógeno seco.....	103
3.6.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento.....	103
3.6.2. Diseño experimental.....	103
3.6.3. Recogida, contrastación, dilución y congelación seminal.....	103
3.6.4. Descongelación y valoración seminal post-descongelación.....	105
3.6.5. Análisis estadístico.....	105

3.7. Experiencia 7: Niveles plasmáticos de testosterona en función de la estimulación sexual	107
3.7.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento	107
3.7.2. Diseño experimental	107
3.7.3. Extracción de sangre	108
3.7.4. Métodos de estimulación: recogida seminal y hCG	108
3.7.5. Determinación de los niveles plasmáticos testosterona	109
3.7.6. Análisis estadístico	110
 4. RESULTADOS	 112
4.1. Experimento 1: Características seminales post-descongelación en muestras conservadas en diferentes protocolos de criopreservación	113
4.1.1. Características del semen fresco	113
4.1.2. Evolución de la motilidad total post-descongelación en los diferentes protocolos de congelación	115
4.1.3. Evolución de la motilidad progresiva post-descongelación en los diferentes protocolos de congelación	119
4.1.4. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en los diferentes protocolos de criopreservación	124
4.1.5. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en los diferentes protocolos de criopreservación	130
 4.2. Experimento 2: Características del semen conservado a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo	 132
4.2.1. Motilidad espermática del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación	132
4.2.2. Morfoanomalías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación	142
4.2.3. Porcentaje de acrosomías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación	147
 4.3. Experimento 3: Viabilidad del semen congelado-descongelado conservado a diferentes temperaturas tras su descongelación	 148
 4.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de refrigeración previo a la congelación sobre la calidad del semen	 152
 4.5. Experimento 5: Características del semen tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido	 156
 4.6. Experimento 6: Características del semen congelado y almacenado en nitrógeno líquido vs nitrógeno seco	 163
 4.7. Experiencia 7: Niveles plasmáticos de testosterona en función de la estimulación sexual	 166

5. DISCUSIÓN	170
5.1. Experimento 1: Características seminales post-descongelación en muestras conservadas en diferentes protocolos de criopreservación	171
5.1.1. Características del semen fresco	171
5.1.2. Características seminales del semen congelado y descongelado en NL y UF	173
5.1.2.1. Motilidad espermática tras descongelación	173
5.1.2.2. Porcentaje de morfoanomalías en el semen congelado-descongelado	178
5.1.2.3. Porcentaje de acrosomías en el semen congelado-descongelado	180
5.2. Experimento 2: Características del semen conservado a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo	181
5.2.1. Semen en fresco	181
5.2.2. Motilidad espermática del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación	182
5.2.3. Morfoanomalías y acrosomías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación	187
5.3. Experimento 3: Viabilidad del semen congelado-descongelado conservado a diferentes temperaturas tras su descongelación	189
5.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de refrigeración previo a la congelación sobre la calidad del semen	194
5.5. Experimento 5: Características del semen tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido	198
5.6. Experimento 6: Características del semen congelado y almacenado en nitrógeno líquido vs nitrógeno seco	203
5.7. Experiencia 7: Niveles plasmáticos de testosterona en función de la estimulación sexual	206
6. CONCLUSIONES	212
7. RESUMEN	216
8. SUMMARY	221
9. BIBLIOGRAFÍA	226

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El perro doméstico (*Canis familiaris*) es considerado el primer animal doméstico, siendo originario de Europa, Asia y Norteamérica. Sin embargo, los perros actuales tienen su origen hace 2 millones de años, descendiendo de los primeros mamíferos carnívoros pertenecientes a la familia *Canidae* (coyotes, chacales y lobos), como resultado de las relaciones establecidas con el ser humano en la que ambos se beneficiaban mutuamente (Alderton, 1994; Fogle, 1996). A partir de ahí, se inició una intensa relación entre el hombre y el perro, relación que ha evolucionado hasta nuestros días. De hecho, en la actualidad se encuentra ampliamente aceptado que “la grandeza de una nación y su progreso moral puede ser juzgado por la forma en que sus animales son tratados” (Mahatma Gandhi) y, de entre ellos, el perro es considerado “el mejor amigo del hombre”.

El papel del perro en la vida del hombre actual tiene múltiples variantes. Ejemplos son los canes utilizados en actividades específicas, entre los que destacan los perros policías, los animales de apoyo a los discapacitados y los deportistas de alta élite para competición. No obstante, en nuestros días, el 72% de los perros adquiridos en países desarrollados desempeña la función de “animales de compañía”. Como resultado de esta intensa relación entre el hombre y el perro y las funciones que se les asignan, se ha hecho necesario realizar una cría selectiva de aquellos ejemplares más válidos, lo que ha permitido que durante bastantes generaciones se haya incrementado la diversidad de razas caninas hasta dar lugar a las que conocemos en la actualidad, si bien su distribución varía según el área geográfica y las características del lugar donde los canes evolucionen (Fogle, 1996; Pozuelos, 2009).

En el caso concreto de las Islas Canarias, esta comunidad autónoma cuenta con una gran diversidad de razas caninas como el Dogo Canario, el Podenco Canario, el Pastor Garafiano y el Perro Majorero. Entre ellas, el Dogo Canario es considerado el Gran Can del archipiélago canario. Esta raza tiene sus primeras referencias a finales del siglo XVI y durante el XVII, cuando se describen numerosas alusiones y citas en torno al “Presa Canario” como perro existente en el archipiélago. Durante el siglo XVIII, este magnífico ejemplar tuvo mucho auge en las islas pero, posteriormente, se produjo una marcada disminución de su cría que le condujo a situarse cerca de la extinción. La recuperación de esta raza se produce gracias a que, en el año 1982, se crea el “Club Español del perro de Presa Canario”, reconociendo y fijando las líneas de

la raza, la cría y la selección; en 2011 pierde su nombre original para pasarse a denominarse “Dogo Canario” (www.wikipedia.org; www.elmundodelperro.net, 2008).

Por otra parte, la expansión y el movimiento de animales entre diferentes puntos del planeta es una realidad, de forma que es prácticamente inexistente la exclusividad de las razas asociadas a determinados lugares. Asimismo, el transporte de ejemplares entre áreas geográficas con fines reproductivos es cada vez menos frecuente, puesto que el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida en la especie canina ha permitido la cría sin necesidad de la presencia de ambos reproductores. La reproducción asistida tiene sus inicios en el siglo XVIII, cuando Spallanzani describe la primera inseminación artificial y nacimiento de 3 cachorros en Italia (Fastad, 2000). A partir de ese momento, la tecnología reproductiva comenzó a experimentar un intenso auge, realizándose numerosos estudios destinados a determinar y mejorar los procesos relacionados con la evaluación del semen en fresco, su conservación mediante refrigeración y congelación seminal, y su posterior aplicación mediante protocolos de inseminación artificial (Farstad y Andersen-Berg, 1989; Rijsselaere y cols., 2005; Peña y cols., 2006; Thomassen y Farstad, 2008). Por tanto, en los últimos 30 años, se han desarrollado numerosas investigaciones al respecto, así como han surgido servicios veterinarios especializados en la reproducción de pequeños animales.

De entre ellas, cabe destacar la importancia que presenta la preservación del semen, de forma que aún se continua investigando y comparando los protocolos de refrigeración y de congelación con el objeto de mejorar la supervivencia de los espermatozoides post-procesado. Se trata de un camino lento que comenzó con la aceptación de la utilización del semen canino congelado por parte del American Kennel Club en 1981 y, que no se tradujo en una normativa legal en España hasta el año 2002, momento en el que la Real Sociedad Canina de España regularizó este tipo de actividades en el territorio nacional (Andrade, 2005).

Siguiendo estas premisas, nuestro trabajo de investigación ha pretendido profundizar en el conocimiento de aquellas técnicas de preservación seminal canina más utilizadas, intentando explorar diferentes variantes para determinar aquellos protocolos más efectivos a la hora de mantener la calidad del semen en el perro. Para comenzar este estudio se desarrolló una experiencia destinada a evaluar diferentes métodos de congelación (nitrógeno líquido y ultracongeladores de -152°C) en el Dogo Canario; esta parte experimental estaba basada en un trabajo previo llevado a cabo por Batista y cols. (2006) y Álamo (2007) sobre el uso de

ultracongelador de -152°C como método alternativo de congelación en la especie canina. Asimismo, se pusieron en práctica dos experiencias con el objeto de determinar la temperatura de almacenamiento idónea para preservar el semen fresco (37°C , 25°C , 4°C) y el semen congelado-descongelado (37°C , 25°C , 15°C y 4°C), evaluando su longevidad. Otro de los ensayos pretendía analizar la viabilidad del semen congelado tras haber sido refrigerado durante distintos periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas), determinando si el envío de semen refrigerado y, su posterior congelación, podría ser una opción válida. Además, profundizando en el proceso de criopreservación con nitrógeno líquido, se evaluó el resultado de realizar diferentes combinaciones en dos fases cruciales del protocolo de congelación: el tiempo de equilibrado y el periodo de exposición a vapores de nitrógeno líquido. Asimismo, se pretendía definir si las muestras de semen preservados en criocontenedores de nitrógeno seco (utilizados para el transporte de semen congelado), modificaban sus características en función del tiempo de almacenamiento en este tipo de dispositivos.

Finalmente, durante la realización de todas las experiencias descritas, se observaba que los perros donantes modificaban su comportamiento (mayor libido, mejor predisposición) como resultado de las numerosas recogidas seminales a las que se iban sometiendo a lo largo del estudio experimental. De esta forma y en base a las premisas obtenidas en un trabajo preliminar que evaluaba la influencia de la estimulación sexual en los niveles plasmáticos de testosterona en perros mestizos (Santana, 2007), una parte del presente estudio ha pretendido contrastar si la estimulación sexual asociada a la recogida seminal, mostraba influencia notoria sobre la concentración de testosterona en perros de la raza Beagle.

En conjunto, el presente trabajo de tesis doctoral ha pretendido realizar un amplio recorrido por diversas técnicas de preservación seminal canina (a corto y largo plazo) y el mecanismo hormonal en torno a la estimulación sexual, con el fin de profundizar en el conocimiento de estos procesos, así como realizar aportaciones útiles y aplicables al desarrollo de los procesos tecnológicos seminales en la especie canina.

De esta forma, los objetivos de la presente tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Evaluar la calidad del semen de Dogo Canario criopreservado en nitrógeno líquido y en ultracongeladores de -152°C , valorando la influencia del tiempo de preservación sobre la calidad seminal y el efecto de diferentes concentraciones de Equex.
2. Valorar la capacidad de supervivencia y la calidad del semen canino fresco, conservado a distintas temperaturas (37°C , 25°C y 4°C) a lo largo del tiempo.
3. Estimar la capacidad de supervivencia y la calidad del semen congelado-descongelado conservado a distintas temperaturas (37°C , 25°C , 15°C y 4°C) tras su descongelación.
4. Establecer las características del semen congelado-descongelado tras haber sido sometido a diferentes periodos de refrigeración (1, 6, 12, 24 y 48 horas) previos a la congelación.
5. Determinar las características del semen canino criopreservado cuando se combinan diferentes periodos de tiempo de equilibrado (30, 60, 90 y 120 minutos) y de exposición a vapores de nitrógeno líquido (5, 10 y 15 minutos).
6. Valorar la calidad y longevidad del semen canino conservado en contenedores de nitrógeno seco.
7. Evaluar la influencia de la estimulación sexual asociada a la recogida seminal sobre los niveles plasmáticos de testosterona en perros de raza Beagle.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMÍA DEL APARATO GENITAL DEL MACHO

En la especie canina, el aparato reproductor del macho ha sido estudiado al detalle, por lo que las características estructurales y funcionales del mismo se encuentran perfectamente descritas. Los órganos genitales del macho constan de dos testículos envueltos por el escroto, los epidídimos, los conductos deferentes, el pene, la glándula prostática y la uretra (Evans, 1993).

2.1.1. Testículos

Las gónadas masculinas están representadas por los testículos, cuya función principal es la producción de espermatozoides y de hormonas esteroideas como los andrógenos (Hewitt, 2000). En el feto, independientemente de la especie animal y sexo final del embrión, las gónadas primitivas se desplazan hasta quedar localizadas a nivel renal, siendo imposible distinguir, en esta fase, un testículo de un ovario (Hewitt, 2000). Asimismo, a diferencia de otras especies animales, los testículos de los perros no están localizados en el escroto en el momento del nacimiento. De hecho, el descenso testicular y la definitiva disposición de los testículos a nivel escrotal es un proceso complejo que sucede en las primeras etapas de vida del perro (Colin, 2004).

Las gónadas masculinas, localizadas en el interior del escroto, se caracterizan por presentar forma oval y superficie lisa (Evans, 1993). En posición normal, los testículos del perro se sitúan en posición longitudinal con respecto al eje mayor (Allen, 1992), de forma que se observan más gruesos dorsoventral que latero-medialmente (Feldman y Nelson, 2007), mientras el testículo izquierdo queda ligeramente caudal respecto al derecho (Feldman y Nelson, 2007).

Los testículos están formados por el parénquima testicular, estructura que se distribuye de forma compartimentada mediante septos de tejido conectivo procedentes de la túnica albugínea, lo que permite que el testículo se organice en espacios interseptales (Sandoval, 2000; Bacha y Bacha, 2001). Más detalladamente, la distribución interior de los testículos se caracteriza por presentar una compartición parcial o completa del parénquima testicular que, a su vez, se encuentra estructurado en lobulillos testiculares que contienen los túbulos seminíferos. El conjunto de túbulos seminíferos desembocan a nivel del mediastino, en la zona central del testículo, compuesto por tejido conectivo laxo procedente de la fusión de los septos conocidos como *rete testis*, responsable de la recolección de los espermatozoides formados a

nivel de los túbulos seminíferos. Esta región se continúa con los conductos colectores, denominados vasos eferentes, que presentan una conexión directa con el epidídimo (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Sandoval, 2000; Bacha y Bacha, 2001; Johnston y cols., 2001).

Con respecto al tamaño testicular, se trata de un parámetro relacionado directamente con las distintas conformaciones raciales, guardando una estrecha relación con el tamaño y/o masa corporal del animal (Hewitt, 2000; Feldman y Nelson, 2007). De hecho, se ha descrito una correlación positiva del peso corporal con el peso y volumen testicular, masa epididimaria total y anchura escrotal (Johnston y cols., 2001), habiéndose estimado que para un perro de unos 11 kg de peso, la longitud media de los testículos es de 3 cm y la anchura de 2 cm (Evans, 1993). No obstante, de forma general se ha establecido como referencia que el rango estimado de tamaño para los testículos caninos debe ser de 1 a 5 cm de longitud por 1 a 3 cm de diámetro, aproximadamente (Feldman y Nelson, 2007), mientras que otros autores proponen medidas de 3 x 2 x 1.5 cm para los testículos caninos (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001).

2.1.2. Escroto

En la especie canina, el escroto es una bolsa de piel pigmentada y delgada, que se encuentra dividida internamente en dos cavidades por un septo escrotal, cada una ocupada por un testículo, su epidídimo y la parte distal del cordón espermático (Evans, 1993; Anderson, 1994; Johnston y cols., 2001). Además, presenta una cobertura pilosa dispersa, con una textura relativamente lisa, blanda y uniforme al tacto, de forma que la piel pueda desplazarse libremente sobre los testículos (Feldman y Nelson, 2007). En el perro, el escroto se caracteriza por presentar forma pendular, donde los testículos se sitúan de forma ligeramente horizontal (Hewitt, 2000) u oblicuos al mismo (Johnston y cols., 2001).

Debido a la función de producción y almacenaje de espermatozoides que poseen los testículos, la temperatura a la que se encuentren se presenta como un factor decisivo a la hora de determinar la calidad del semen. A este nivel, el escroto se presenta como una estructura que actúa a modo de eficaz sistema de termorregulación para los testículos y epidídimos, ya que además de sus peculiares características (delgada piel con presencia de glándulas sudoríparas, presencia de glándulas sebáceas bien desarrolladas y la inexistencia de grasa cutánea) que le permiten el enfriamiento de la sangre arterial, cuenta con un mecanismo de contracción y relajación desarrollado por el músculo cremaster que permite el desplazamiento testicular hacia el interior del escroto o del cuerpo del animal para controlar su temperatura (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Álamo, 2007).

2.1.3. Epidídimo

El epidídimo es el lugar donde los espermatozoides quedan almacenados antes de la eyaculación (Evans, 1993) y se presenta como una estructura tubular que aparece situado junto al testículo (Álamo, 2007). El tamaño epididimario debe ser proporcional al tamaño testicular (Root, 2005a), pero es comparativamente largo en la especie canina (Evans, 1993). Anatómicamente se puede dividir en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo (Hewitt, 2000), situándose de forma que queda adherido a la superficie dorsoventral de los testículos con la cola localizada en el extremo caudal del testículo y la cabeza en la extremo craneal del mismo (Evans, 1993; Feldman y Nelson, 2007)

La cabeza comienza sobre la superficie medial del testículo pero inmediatamente gira alrededor del extremo craneal para fijarse a nivel lateral; ésta se continua con el cuerpo que se dispone a lo largo de la superficie dorsolateral del órgano hasta transformarse en la cola (Evans, 1993). La cola del epidídimo se mantiene unida a la porción caudal del testículo a través del ligamento propio del testículo (Johnston y cols., 2001), donde desempeña la función de almacenamiento y maduración de los espermatozoides (Ruberte y Sautet, 1998), continuándose craneodorsalmente con el cordón espermático a través del conducto deferente (Evans, 1993).

2.1.4. Cordón espermático

El cordón espermático, que comienza en la región profunda del anillo inguinal, está conformado por la asociación del conducto deferente con su arteria y vena, los vasos sanguíneos como la arteria espermática y el plexo venoso pampiniforme, el músculo cremáster, vasos linfáticos y nervios. Estas estructuras quedan englobadas dentro del proceso vaginal y permiten que el cordón espermático adquiera una apariencia tubular, localizado entre el testículo y la pared abdominal del macho (Evans, 1993; Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Medial y dorsal a cada testículo se localizan los conductos deferentes, estructuras que representan la continuación de la cola del epidídimo y que se despliegan a través del anillo inguinal interno para introducirse en la cavidad abdominal adyacente al cordón espermático (Álamo, 2007; Feldman y Nelson, 2007). Los conductos deferentes discurren por el interior del saco vaginal hasta la uretra, donde desembocan en la región de la próstata craneal, antes de abrirse en la uretra prostática (Hewitt, 2000).

2.1.5. Pene y prepucio

El prepucio es una prolongación de la mucosa peneana que se continúa como mucosa prepucial en forma de estructura cutánea que cubre por completo la porción libre del pene, para protegerlo en ausencia de erección. Consta de una lámina externa, constituida por la porción de piel exterior que se continúa con la lámina interna observable durante la erección (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001; Álamo, 2007).

El pene es un órgano localizado bajo la pelvis. Su tamaño no erecto depende de la raza del perro; sin embargo, se ha establecido que el rango de longitud se sitúa entre los 6.5 y los 24 cm (Evans, 1993). No obstante, en la especie canina se caracteriza por alcanzar un gran volumen gracias a la gran cantidad de tejido eréctil de tipo cavernoso y esponjoso que contiene. El pene se encuentra dividido en tres partes: la raíz, el cuerpo y el glande del pene (Evans, 1993; Sandoval, 2000).

En la región proximal del pene se encuentra localizada la raíz de este órgano. La raíz del pene queda conformada por los pilares y el bulbo del pene, quedando constituida principalmente por los cuerpos cavernosos, envueltos por una densa túnica albugínea fibroelástica, de la que emerge un septo que actúa separando ambos cuerpos cavernosos en toda su longitud; en su interior existe una entramada red de trabéculas que, al quedar entrelazadas con el tejido de la zona, permite la existencia de cavernas que actúan como lugares de retención sanguínea en esta región, permitiendo el crecimiento y consistencia adecuada en el momento de la erección (Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001). A este nivel también se observa el denominado bulbo del pene, una estructura que corresponde a una formación bilobulada y esponjiforme, que aparece como continuación de los cuerpos esponjosos alrededor de la uretra peneana y, que actúa a modo de saco donde se acumula la sangre (Evans, 1994).

Por otro lado, el cuerpo del pene presenta un aspecto corto, cilíndrico y poco aparente, que se caracteriza por presentar un escaso desarrollo de los cuerpos cavernosos que se prolongan indistintamente desde la raíz del pene hasta el cuerpo (Evans, 1994; Sandoval, 2000).

El glande del pene corresponde a la porción más visible, que en estado no eréctil queda localizada en el interior del prepucio. Se corresponde con la distensión del cuerpo esponjoso a continuación del bulbo del pene; tiene su origen alrededor de la uretra a nivel del bulbo peneano, y se prolonga a través del glande hasta su terminación en el conducto uretral e inicio con la

mucosa prepucial. A su vez, consta de dos partes bien diferenciadas; por un lado, el bulbo del glande, que es una expansión en forma de barril de los cuerpos esponjosos situada en la base o extremo proximal del glande que rodea la uretra y el hueso peneano y que, en erección, permite la sujeción temporal del pene en la vagina durante el coito. Por otro lado, la porción larga del glande o *pars longa* del glande sólo contiene tejido eréctil en la zona dorsal y longitudinal al hueso peneano y la uretra. Esta zona del glande presenta una morfología cilíndrica en todo su trayecto para cambiar drásticamente en su porción distal, momento en el que se aplanan considerablemente (corona del glande) quedando el proceso uretral localizado centralmente. De este modo, la apertura de la uretra durante la eyaculación se desplaza de la superficie ventral a dorsal con el objeto de direccionar el eyaculado (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Sandoval, 2000).

Por otro lado, los cánidos se caracterizan por presentar a nivel del pene una estructura ósea no existente en el resto de las especies domésticas. Se trata del hueso peneano, estructura rígida que confiere al glande la consistencia suficiente para penetrar en la hembra antes de conseguir una erección completa. Este hueso peneano presenta, en su superficie ventral, un profundo canal a través del que transcurre la porción de uretra peneana, que permite el tránsito de la orina o el semen a lo largo del pene hasta el orificio externo de la uretra (Allen, 1992; Anderson y Anderson, 1994; Sandoval, 2000).

2.1.6. Próstata

La próstata es una glándula andrógeno-dependiente de estructura semioval, bilobulada y simétrica, donde la simetría viene determinada por la división de la misma en dos lóbulos del mismo tamaño, firmes y lisos, como consecuencia de la presencia de un tabique en su región medial (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). El tamaño y peso de la próstata pueden variar dependiendo de factores como la edad, raza y peso corporal del perro. A diferencia del resto de especies, se caracteriza por ser la única glándula sexual accesoria en la especie canina. Su función básica es la de generar un volumen de secreciones apropiado al eyaculado mediante la aportación de un medio compuesto por citrato, lactato, colesterol y numerosas enzimas que otorga a los espermatozoides las propiedades necesarias para ejecutar su función correctamente (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001).

La glándula prostática se caracteriza por envolver a la uretra en su región proximal, a nivel del cuello de la vejiga urinaria donde, a su vez, se encuentran la porción terminal de los conductos deferentes que se insertan en la superficie craneodorsal de la próstata. Asimismo, las estructuras encargadas de transportar y depositar los fluidos producidos a nivel prostático reciben el nombre de colículos seminales, y se sitúan a nivel de la zona de apertura de los conductos deferentes en la uretra prostática (Evans, 1993; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001).

2.2. FISIOLÓGÍA, GAMETOGENÉISIS Y ENDOCRINOLOGÍA DEL MACHO

El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se encarga de controlar, mediante interacciones hormonales, los procesos de espermatogénesis y la esteroidogénesis (producción de espermatozoides y hormonas, respectivamente), ambos desarrollados en áreas del testículo bien diferenciadas (Knol y cols., 1993). Para ello, el testículo presenta una compartimentación funcional, donde se puede diferenciar el compartimento intersticial en el que se encuentran las células de Leydig productoras de testosterona, el compartimento basal donde se encuentran las células de Sertoli y espermatogénicas y el compartimento adluminal donde finaliza el proceso de producción de espermatozoides (Hewitt, 2000; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

2.2.1. Endocrinología del sistema reproductor del perro

La hormona liberadora de gonadotropina o GnRH es producida en el hipotálamo a nivel de la base del encéfalo. Su secreción se lleva a cabo de forma episódica en pulsos cada 1.5 horas, aproximadamente. Esta hormona es transportada mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos hasta la hipófisis anterior, donde se une a receptores específicos localizados en las membranas plasmáticas de las células gonadotropas. Bajo su estimulación, estas células se encargan de la secreción de las hormonas responsables del control de la reproducción en el perro a nivel central:

- La hormona FSH: hormona folículo-estimulante
- La hormona LH: hormona luteinizante

Ambas hormonas son liberadas al sistema circulatorio, siendo transportadas hasta las gónadas. Una vez localizadas a nivel testicular, ejercen su acción sobre las células de Leydig que comienzan a sintetizar y secretar testosterona (Hewitt, 2000; Hill y cols., 2006). A su vez, la testosterona producida por las células de Leydig es capaz de actuar, de forma conjunta con la FSH procedente de la hipófisis, a nivel de las células de Sertoli presentes en los testículos. El

resultado de esta interacción permite que se incremente la producción de sustancias paracrinas necesarias para la re-activación de la espermatogénesis (Hill y cols., 2006).

Sin embargo, junto a la testosterona son múltiples las hormonas encargadas de controlar los procesos relacionados con la reproducción en los machos de la especie canina. Mediante su acción conjunta, se desencadenan una serie de interacciones denominadas “feed-back” cuya función es la regulación de la secreción de las mismas. Así, bajo influencia de la gonadotropinas se desarrolla un proceso de feed-back positivo o negativo para aumentar o disminuir la producción de testosterona y espermatozoides. De esta forma, mediante control hormonal, se mantiene activo un complejo sistema que permite la interacción entre dichos órganos. Las principales hormonas encargadas (Hewitt, 2000; Feldman y Nelson, 2007) de dicha regulación son:

- La testosterona, tras ser sintetizada por las células de Leydig, es liberada al torrente circulatorio, terminando por alcanzar el cerebro donde actúa a nivel de la hipófisis y el hipotálamo. Una vez allí, es responsable de ejercer un efecto de retroalimentación negativa sobre el eje hipotalámico-hipofisario con el objeto de limitar la secreción de gonadotropinas.
- La inhibina, sintetizada por las células de Sertoli, se encarga de disminuir la liberación de gonadotropinas mediante acción directa sobre la hipófisis.
- La activina, tras ser secretada por las células de Sertoli, se encarga de producir el efecto contrario a la inhibina, es decir, estimular la producción de gonadotropinas.

2.2.2. La gametogénesis en el perro

Como se ha citado con anterioridad, son las gonadotropinas y la testosterona las hormonas responsables del control de la espermatogénesis y esteroidogénesis (Hill y cols., 2006). De hecho, ambos procesos comienzan cuando la GnRH se sintetiza a nivel hipotalámico, actuando sobre la hipófisis para activar la liberación de la FSH y LH. La secreción de la FSH, consecuente a la liberación de la GnRH, se caracteriza por realizarse de forma pulsátil, siendo más gradual y lenta que la de LH. A su vez, ésta última (LH), se encarga de producir el incremento en la secreción de testosterona. Durante la espermatogénesis, la FSH y la testosterona, actúan directamente sobre las células de Sertoli estimulándolas para que las células germinales se diferencien a nivel de los túbulos seminíferos. Para que este proceso se lleve a cabo es necesario que las células de Sertoli reciban la señal por parte de la FSH, siendo las únicas células que presentan receptores para esta hormona (Hewitt, 2000). Asimismo, para que la espermatogénesis se desarrolle correctamente y en un medio adecuado, los niveles de

testosterona alcanzados en los túbulos seminíferos deben superar las concentraciones plasmáticas (Hewitt, 2000). Por otro lado, se ha observado como la testosterona actúa a otros niveles como son los conductos eferentes, el epidídimo y los conductos deferentes con el objeto de incrementar sus actividades secretorias y de absorción (Feldman y Nelson, 2007). Un ejemplo de ello sería la influencia que tiene esta hormona en el mecanismo de la eyaculación, actuando como estimulador de las contracciones a nivel del epidídimo (Hess, 2002).

2.2.3. Espermatogénesis

Las células primordiales que se encuentran a nivel del epitelio germinal de los túbulos seminíferos sufren una serie de divisiones y cambios madurativos hasta dar origen a los espermatozoides en un proceso denominado espermatogénesis. El tiempo que tarda en llevarse a cabo la espermatogénesis en el perro es de aproximadamente unos 62 días. Este proceso consta de diferentes etapas que, mientras se van sucediendo, se acompañan de la migración por parte de los gametos en desarrollo desde la membrana basal de dichos túbulos hacia el lumen (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Fahrig, 2003). Las fases involucradas se citan a continuación:

I. Espermatocitogénesis

El proceso comienza con la diferenciación de las espermatogonias, que son las células menos diferenciadas o células madres. Mediante mitosis, se consigue la multiplicación de este tipo celular, con el objeto de incrementar el número de espermatozoides finales a partir de un número reducido de espermatogonias iniciales. De esta división celular surgen las espermatogonias tipo A y B; tras ello, la división mitótica hace que aparezcan los espermatocitos primarios, que después de una primera división meiótica darán lugar a los espermatocitos secundarios. A continuación, una segunda meiosis se encarga de producir una reducción de la dotación cromosómica a la mitad, originando las denominadas espermátidas haploides (Allen, 1992; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Fahrig, 2003).

II. Espermiogénesis

Como continuación del proceso de espermatocitogénesis, las espermátidas esféricas resultantes del mismo se transforman en espermátidas maduras, en la última fase de diferenciación conocida como espermiogénesis (Hewitt, 2000). Para que esto se haga efectivo, a nivel celular se desarrolla un complejo proceso que comprende una serie cambios a nivel de la membrana, citoplasma y núcleo de la célula, que le otorga a la célula forma de espermatozoides (Allen,

1992; Fahrig, 2003). Una vez adquirida esta morfología, estos tipos celulares están listos para ser liberados al lumen del túbulo en forma de espermatozoides (Hewitt, 2000).

III. Espermiación

En esta última fase de la espermatogénesis, tras haberse completado los procesos de espermatocitogénesis y espermiogénesis, se hace efectiva la liberación de los espermatozoides al lumen de los túbulos; este proceso se conoce como espermiación (Hewitt, 2000).

2.2.4. Esteroidogénesis en el perro

Las células de Leydig, relacionadas íntimamente con la circulación sanguínea y periférica a nivel del tejido intersticial del testículo, son las responsables de la síntesis de esteroides o esteroidogénesis. Este tipo celular se caracteriza por ser el único que presenta en su membrana celular receptores para la LH y, bajo la influencia de esta hormona, se encarga de la producción de esteroides (Hewitt, 2000). Entre ellos, los principales andrógenos masculinos son la testosterona y la dihidrotestosterona. Mediante la acción de una enzima denominada 5α -reductasa, la testosterona duplica su efecto al transformarse en dihidrotestosterona, ya que esta última posee una mayor afinidad por los receptores androgénicos y un mayor tiempo de disociación (Feldman y Nelson, 2007).

El proceso de la esteroidogénesis se inicia con la liberación de GnRH hipotalámica, que de manera inmediata va a generar la secreción hipofisaria de LH; esta hormona tiene la peculiaridad de incrementar sus niveles de forma momentánea, si bien también desciende muy rápidamente, impidiendo que se pueda describir un patrón de secreción concreto, de manera que en un día se registran entre 5 y 20 picos de LH. Consecuente con la secreción momentánea de LH, se desencadena a nivel de las células de Leydig un incremento en la secreción de testosterona que, en un periodo medio de 50 minutos tras el pico de LH, queda reflejado tanto a nivel local como en circulación general (DePalatist y cols., 1978; Hewitt, 2000). Si a ello añadimos, que la liberación de GnRH también se produce en pulsos y, por tanto, la secreción de LH y de testosterona responde a ese patrón, nos encontramos con que las concentraciones séricas de estas hormonas quedan caracterizadas por ser manifiestamente variables (Feldman y Nelson, 2007). De hecho, se ha descrito que para que la producción de espermatozoides sea normal, la secreción de testosterona debe ser pulsátil (Root, 2005b).

No obstante, existen ciertos mecanismos que permiten regular las concentraciones locales de testosterona. Entre ellos, a nivel testicular, las células de Sertoli producen una proteína denominada proteína fijadora de andrógenos que se unen a la testosterona para mantener una concentración elevada en la luz tubular (Hewitt, 2000; Hill y cols., 2006). Del mismo modo, las células de Leydig presentan otro tipo de receptores, receptores para la prolactina, que ejerce una acción sinérgica junto a la LH para aumentar la producción de testosterona (Hewitt, 2000).

2.2.5. Concentraciones plasmáticas de testosterona en la especie canina

El trabajo en la clínica de pequeños animales se sirve cada vez más de la determinación de los niveles hormonales como herramienta básica para el estudio de numerosas patologías, si bien resulta especialmente útil en la disciplina de la reproducción. En base a estas premisas, son numerosos los estudios que se han puesto en práctica donde la medición y aplicación hormonal relacionadas con las concentraciones de gonadotropinas y de testosterona sanguíneas se han utilizado como instrumento clave para realizar una valoración del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Feldman y Nelson, 2007).

2.2.5.1. Concentraciones plasmáticas de testosterona en perros sanos

Las concentraciones basales de testosterona en plasma pueden ser variables dependiendo de su liberación pulsátil y de factores como los cambios estacionales por los que se encuentran influenciados (Hewitt, 2000). Es por ello, que a la hora de establecer un nivel concreto lo más correcto sería asumir como resultado el valor obtenido de tomar de 3 a 6 muestras con intervalos de 20 minutos entre ellas (Feldman y Nelson, 2007). De esta forma, diferentes autores (Tsutsui y cols. 1987; Hewitt, 2000) han determinado que los valores de testosterona basales en suero se sitúan en torno a 1.7-5.2 mmol/l (0.5-1.5 ng/ml), alcanzando en los picos, concentraciones que rondan los 12.1-20.8 mmol/l (3.5-6.0 ng/ml). Sin embargo, otros autores consideran que los valores normales de testosterona deben oscilar entre los 0.4 y los 10 ng/ml, estando habitualmente entre los 1 y 5 ng/ml (Feldman y Nelson, 2007).

Entre los factores capaces de modificar las concentraciones de testosterona, se pueden indicar la edad del animal y la influencia de las horas de luz. Así, Fukuda y cols. (1988) confirmaron que los perros pre-puberales y los perros viejos (> 12 años) presentaban concentraciones plasmáticas de testosterona más bajas que los observados en perros adultos. Del mismo modo, se han detectado fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas de

testosterona entre estaciones y a lo largo del día, registrándose los niveles más elevados en verano e inicios de otoño (Taha y Noakes, 1982) y entre las 6 pm y las 6 am (Fukuda y cols., 1982).

2.2.5.2. Relación entre hormonas exógenas y las concentraciones de testosterona

En perros sanos, numerosos estudios han valorado los efectos de hormonas exógenas sobre las concentraciones plasmáticas de testosterona, así como sobre la espermatogénesis. Entre ellos, Knol y cols. (1993) demostraron que la administración intravenosa de GnRH es capaz de aumentar inmediatamente las concentraciones plasmáticas de LH y, posteriormente, producir un pico en los niveles séricos de testosterona 10 minutos tras la inyección intravenosa de GnRH, manteniendo una relación directa entre la dosis aplicada y el incremento observado. Otros estudios realizados en perros sanos confirmaron que la concentración plasmática de testosterona, tras aplicar de 1 a 2.2 μ /kg de GnRH debe situarse por encima de los 3 ng/ml, debiendo tomarse muestras antes del tratamiento y hasta 1 hora después de su administración (Feldman y Nelson, 2007). Del mismo modo, Purswell y Wilcke (1993) detallan como, en perros intactos, la GnRH inyectada intramuscularmente produce un pico de LH alrededor de 15 minutos tras su administración y, en consecuencia, un pico de testosterona alrededor de 1 hora después de la misma. Por otro lado, otros estudios señalan como suprimiendo el aporte de testosterona por castración, el feed-back negativo que éste aporta a nivel hipotalámico e hipofisario se ve anulado, y por tanto la secreción de GnRH, FSH y LH aumentan (Hewitt, 2000).

Del mismo modo, Taha y cols. (1981) estudiaron el efecto a corto tiempo que el tratamiento con hormonas exógenas como la hCG y la testosterona podía tener sobre las características seminales, la libido y las concentraciones plasmáticas de testosterona en machos de la raza Beagle. Así, pudieron determinar como la aplicación de hCG tenía un efecto estimulatorio sobre la producción de testosterona por parte de los testículos y como la administración exógena de testosterona producía un incremento en la 3ª fracción del eyaculado y ligero aumento en la concentración espermática.

Con respecto a la aplicación de hormonas como posible tratamiento a patologías de índole reproductiva en perros, se ha comprobado como la aplicación de GnRH y su consecuente aumento en los niveles de testosterona se puede utilizar como solución al problema de falta de libido (Hess, 2002). Numerosos trabajos están basados en la aplicación de GnRH exógena y su efecto sobre el aumento que ocasiona en las concentraciones de testosterona plasmáticas, como

indicador de que la cascada hormonal funciona correctamente (Hewitt, 2000). En perros con falta de libido o con alteraciones en su capacidad de aparearse, la testosteronemia suele ser inferior a 0.4 ng/ml (Feldman y Nelson, 2007), siendo superiores a las observadas en perros castrados (valores inferiores a 20 pg/ml).

En relación a las técnicas de control de la fertilidad, se trata de uno de los campos en los que la aplicación de hormonas ha supuesto una herramienta muy útil. Por ejemplo, la administración de agonistas de la GnRH (implantes de Deslorelina) se traduce, en escasas semanas, en un descenso de los niveles plasmáticos de testosterona que persiste durante varios meses. Este descenso de la concentración plasmática de testosterona se asocia con una disminución de la calidad del semen (reducción del volumen del eyaculado, motilidad y viabilidad espermática), lo que demuestra nuevamente como es necesario que los niveles de esta hormona se mantengan elevados para la espermatogénesis (Junaidi y cols., 2009).

2.2.5.3. Técnicas de medición hormonal de testosterona

En la actualidad, existen numerosos estudios destinados a desarrollar y perfeccionar las técnicas de medición hormonal para que sean más seguras y, mejorar su aplicabilidad diagnóstica e interpretación de los resultados (Money y Peterson, 2007). En cualquier caso, independientemente de las técnicas, resulta de vital importancia mantener la estabilidad de la muestra para contrarrestar las pérdidas de calidad tanto en la toma de las mismas como en el trato hasta su análisis (Money y Peterson, 2007).

Con respecto a las técnicas de medición hormonal, la mayor parte de las hormonas como la testosterona, pueden medirse de manera precisa en muestras de suero, existiendo ciertas excepciones en la que se requiere ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Por tanto, en general, las muestras para la medición hormonal se corresponden con alícuotas de suero o plasma heparinizados obtenidos a partir de extracción sanguínea. Las muestras presentan especial sensibilidad a las altas temperaturas, por lo que no deben ser sometidas a más de 20°C. Asimismo, cuando no vayan a ser determinadas inmediatamente y precisen un periodo de almacenamiento, deben ser congeladas a menos de 20°C (Kawakami y cols., 2005). En cuanto a las unidades de medidas habitualmente utilizadas en el trabajo hormonal, el ng/ml es la unidad convencional, si bien se utilizan los nmol/l para el Sistema Internacional (Money y Peterson, 2007).

Para evaluar las hormonas sexuales en la especie canina, son numerosos los métodos existentes a nuestra disposición. Una de las técnicas más sencillas y de bajo coste es la cuantificación de andrógenos mediante ELISA "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Este método está basado en la detección de un antígeno fijado a una fase sólida mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. El principal inconveniente es su menor sensibilidad cuando lo comparamos con técnicas como el radioinmunoensayo (Hegstad-Davies, 2006). Por esta razón, en la especie canina, la técnica más frecuentemente utilizada para determinar la concentración de testosterona es el radioinmunoensayo (RIA), que utiliza anticuerpos policlonales y monoclonales específicos a esta hormona (Lange y cols., 2001; Kawakami y cols., 2005; Feldman y Nelson, 2007; Money y Peterson, 2007).

2.3. RECOGIDA Y CONTRASTACIÓN SEMINAL

2.3.1. La eyaculación y el semen

A continuación se exponen los aspectos más relevantes sobre el mecanismo de eyaculación y las características del semen en la especie canina.

2.3.1.1. Mecanismo de la eyaculación

En el perro, la correcta estimulación peneana producida como resultado de la monta natural o durante la recogida seminal, hace que se desencadene el proceso de la eyaculación. En el caso de la monta natural, para que el coito se desarrolle de forma normal, es necesario que el animal presente niveles suficientes de estimulación o libido, muchas veces ocasionados por la presencia de una perra en celo.

En los machos, iniciado este proceso, tras subirse a la parte posterior de la hembra y sujetarla con sus extremidades anteriores a nivel de la pelvis con el fin de penetrarla, los individuos empiezan a realizar una serie de movimientos pélvicos de empuje orientando su pene hacia el orificio vulvar. Una vez situado el pene en el interior de la vulva y/o la vagina, los movimientos se intensifican para asegurar la máxima inserción del glande peneano en el interior de la hembra. En la fase inicial, la erección es escasa pero la penetración se hace posible gracias a la existencia del hueso peneano que otorga cierta rigidez al pene, suficiente para permitir su orientación e inclusión en la vulva de la perra; sin embargo, una vez en su interior se desencadenen los procesos necesarios para que tenga lugar la erección completa (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

Los mecanismos que producen la erección del pene se desencadenan bajo la influencia y estimulación de los nervios pélvicos y sacros, que originan la dilatación de las arterias pudendas externas e internas a nivel del cuerpo cavernoso del pene. Asimismo, la contracción de los músculos isquiocavernosos produce una restricción del retorno venoso de los cuerpos cavernosos y con ello, origina que la sangre quede retenida en el interior de este tejido causando un aumento de volumen del bulbo del pene y un alargamiento del glande del pene, desplazándolo hacia delante (Allen, 1992; Hewitt, 2000; Krutzler, 2005).

Una vez en el interior de la hembra, los músculos de la vagina en contracción como resultado de la presencia del pene, ejerce la presión necesaria sobre el bulbo del pene para que éste finalice su estimulación y por tanto, la erección completa. Alcanzado el máximo nivel de erección, el animal procede de forma instintiva a desmontar a la perra, quedando macho y hembra unidos por su región caudal durante el coito hasta que el pene vuelva a ponerse flácido tras la eyaculación. Mientras esto ocurre, el perro ha descendido de la hembra produciendo un giro del pene en el interior de la vagina de 180° por rotación de éste sobre su eje longitudinal justo detrás del bulbo, permitiendo que el hueso peneano evite la oclusión de la apertura de la uretra durante la erección y que los vasos sanguíneos de la región se encuentren colapsados para impedir la detumescencia del pene. Finalmente, se produce la eyaculación, es decir, la emisión o deposición de los espermatozoides y de los fluidos seminales en el interior de la vagina de la perra (Allen, 1992; Hewitt, 2000; Kutzler, 2005; Álamo, 2007). La eyaculación se genera tras la estimulación de los nervios simpáticos que generan contracciones peristálticas en los músculos bulbocavernosos e isquiocavernosos que rodean a la uretra a nivel bulbo del glande.

2.3.1.2. El semen

El semen es el conjunto de espermatozoides y el plasma seminal originado en las glándulas accesorias. En la especie canina, se caracteriza por ser un líquido ligeramente viscoso y de apariencia blanquecina que es expulsado a través del pene durante la eyaculación. Durante esta fase, los espermatozoides son desplazados desde la cola del epidídimo hacia el conducto deferente donde se entremezclan con las secreciones procedentes de la próstata para originar el semen. Estos movimientos son tan intensos que, durante la eyaculación se puede observar la existencia de contracciones rítmicas en la uretra perineal concurrentes con la visualización de contracciones anales (Allen, 1992; Peña, 1997; Ruberte y Sautet, 1998; Hewitt, 2000; Álamo, 2007).

En el perro, el semen no se elimina de forma conjunta durante la eyaculación sino que, por el contrario, ésta ocurre de forma progresiva, quedando el eyaculado fraccionado en 3 partes bien diferenciadas, separadas entre ellas por un periodo de latencia en caso de animales muy entrenados (Allen, 1992; Peña, 1997; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Álamo, 2007; Feldman y Nelson, 2007). Por ello, a la hora de proceder al estudio del eyaculado en el perro, debemos distinguir las siguientes fracciones:

- a) **Primera fracción:** también denominada fracción preespermática o uretral. Procedente de próstata, se caracteriza por presentar un número muy escaso de espermatozoides o bien ausencia completa de ellos, lo que le confiere un aspecto acuoso y transparente. Se elimina de forma muy rápida, oscilando el tiempo entre 30 segundos y 1 minuto, y su principal función es la de limpieza, eliminando de la uretra los posibles residuos de orina y contaminación a este nivel (Allen, 1992; Peña, 1997).
- b) **Segunda fracción:** conocida como fracción espermática, es la porción del eyaculado que contiene los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo y de los conductos deferentes. Presenta un aspecto más o menos denso de color blanco lechoso aunque, en función de la concentración, en ocasiones adquiere tonalidad blanco opalescente. Su tiempo de emisión oscila entre 1-2 minutos, siendo la fracción rica en espermatozoides (Allen, 1992; Peña, 1997).
- c) **Tercera fracción:** descrita como fracción prostática. Nuevamente procedente de la próstata, se trata de una fracción que prácticamente no contiene espermatozoides o están presentes en un bajo número ya que su función es la de proporcionar volumen al eyaculado y facilitar el ascenso de los espermatozoides en su camino al útero. Es por ello que presenta un aspecto acuoso, transparente o ligeramente amarillento. Su eliminación se prolonga en el tiempo entre 3-30 minutos (Allen, 1992; Peña, 1997).

2.3.2. Extracción seminal

El proceso para la recolección del semen varía mucho entre individuos aunque, se use el método que se use, nunca debería alterar la calidad de los espermatozoides (Kutzler, 2005). En cualquier caso, este tipo de práctica debe llevarse a cabo en un ambiente donde el animal se encuentre tranquilo y seguro (Hewitt, 2000).

La utilización de un reclamo sexual para incrementar la libido y estimulación del perro es un tema controvertido. Algunos autores afirman que para facilitar la estimulación y que la recogida seminal tenga más posibilidades de éxito, sería conveniente el uso de una perra en celo que permitiese observar la aptitud del macho con respecto a la monta y por tanto, su receptividad a la recogida, si bien esto no es necesario en todos los casos (Peña 1997; Hewitt, 2000). Sin embargo, otros autores describen innecesario el uso de una hembra en machos entrenados o habituados al procedimiento de obtención de semen (Allen, 1992; Kutzler, 2005; Álamo, 2007).

En cualquier caso, el reclamo sexual más habitualmente utilizado y el protocolo con el que se obtiene una mayor calidad del semen (principalmente en la concentración de espermatozoides), precisa de la participación de perras en celo. Para llevar a cabo correctamente la estimulación deseada, se hace necesario que la perra u otra montura (p.e., un macho castrado) se encuentre bien sujeta para permitir el acceso del perro a su parte trasera durante el olfateo e intento de monta; asimismo, en la mayoría de los casos, la perra se puede retirar en cuanto empiece la eyaculación (Peña 1997; Hewitt, 2000; Kutzler, 2005; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). No obstante, una alternativa al uso de monturas es la utilización de gasas impregnadas con secreciones vaginales. Habitualmente este tipo de reclamos se mantiene conservado en congelación (-20°C) y en el momento de la recogida seminal, tras su descongelación, deben situarse en la región vulvar de la montura (normalmente perras que no se encuentran en celo) o, permitir que el animal destinado a la recolección seminal, las olfatee directamente (Peña 1997; Hewitt, 2000; Root, 2005a). Otro tipo de estímulo sería el utilizar gasas bañadas en feromonas sintéticas de ácido metil éster p-hidroxibenzoico comerciales (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001; Kutzler, 2005); no obstante, este método sólo se recomienda en determinadas ocasiones para producir una mejoría en la libido del macho, aunque en general es menos efectivo que los anteriormente descritos (Feldman y Nelson, 2007).

Los métodos de recogida seminal más habitualmente utilizados en la especie canina se describen a continuación:

2.3.2.1. Estimulación manual

En la especie canina, la recogida seminal mediante estimulación manual es el método más utilizado en la mayoría de los estudios (England, 1991; England y Ponzio, 1996; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, b; Álamo y cols., 2005; Verstegen y cols., 2005). La técnica se basa en producir una estimulación directa del pene con la mano del técnico, centrando su acción a nivel

del bulbo del glande. Si la estimulación manual del técnico se realiza de forma correcta, se consigue generalmente una adecuada erección y eyaculación por parte del animal. Asimismo, el semen debe ser recogido en un embudo de vidrio o plástico colocado sobre un tubo colector como material de recolección, previamente atemperado (37°C), aunque algunos autores aconsejan el uso de un tubo de cristal acoplado a embudo de cristal como instrumental de recolección (Peña, 1997; Hewitt, 2000).

La recolección seminal por estimulación manual es uno de los métodos más sencillos y útiles, ya que permite aislar las 3 fracciones del eyaculado de forma muy sencilla (Allen, 1992; Kutzler, 2005; Álamo, 2007), si bien en circunstancias de sobreexcitación existen animales que suprimen la liberación de la primera fracción (Peña, 1997). La separación de las tres fracciones del eyaculado nos va a facilitar el manejo de ellas en función de las técnicas reproductivas que queramos aplicar o los procesos de tecnología seminal. Es el caso de la recogida seminal para realizar inseminación artificial o crioconservación, procedimientos donde tanto la primera fracción y como la tercera son innecesarias (Kutzler, 2005; Feldman y Nelson, 2007). Sin embargo, en ocasiones, puede ser necesario la recogida de una parte de la tercera fracción con el fin de diluir la segunda fracción; esto se realiza cuando el eyaculado se encuentra muy concentrado o para terminar de recolectar los espermatozoides procedentes de la segunda fracción que quedan retenidos a nivel uretral o adheridos a las paredes del embudo (Allen, 1992).

La utilización de otro tipo de materiales en el instrumental de recogida, así como el uso de lubricantes ha generado controversia. Diversos autores consideran que el látex resulta tóxico para los espermatozoides, ya que el flujo del eyaculado sobre el látex templado tiene un efecto negativo sobre los mismos (Arthur y cols., 1991; Allen, 1992; Feldman y Nelson, 2007); se ha comprobado que existe una marcada reducción de la motilidad de los espermatozoides, de 1 a 5 minutos después de haber estado en contacto el semen con guantes de látex durante 60 segundos, mientras el efecto fue mínimo al contacto del semen con guantes de vinilo o polvos de talco (Althouse, 1999). No obstante, Root (2005) se posicionó contraria a esta teoría defendiendo que la reducción en la motilidad espermática sólo se produce en aquellos casos donde el contacto del semen con el látex es superior a 20 minutos, periodo de tiempo muy superior al habitualmente empleado en los procedimientos de recogida.

Por otro lado, también existen discrepancias sobre el uso de lubricantes en el momento de la recogida seminal. Algunos autores proponen la utilización de lubricante hidrosoluble no

espermicida sobre la mucosa peneana para facilitar la retracción del prepucio; sin embargo, se debe evitar el contacto de este tipo de sustancias con el semen, ya que puede resultar perjudicial para los espermatozoides (Johnston y cols., 2001; Kutzler, 2005; Feldman y Nelson, 2007).

Finalmente, tras la eyaculación, y cuando la erección desaparece escasos minutos tras liberar el pene de la presión digital, debemos controlar que éste recupere la conformación que presentaba previa erección y que su posicionamiento en el interior del prepucio sea el correcto (Feldman y Nelson, 2007).

2.3.2.2. Cono o capuchón de látex

La recolección seminal mediante la utilización de un cono o capuchón de látex consiste en la colocación de este dispositivo, basado una banda de caucho en forma de embudo, directamente sobre el bulbo del glande. Este tipo de instrumental se sostiene con la mano, al mismo tiempo que se continua produciendo la estimulación del bulbo de forma que, cuando la eyaculación se produce, el semen liberado desciende por sus paredes hasta un tubo colector conectado en su extremo más agudo donde se deposita (Peña, 1997; Álamo, 2007).

Este sistema tiene la ventaja de ser más seguro que el uso de instrumental de recogida de cristal. Por ejemplo, cuando utilizamos embudos de cristal para la recolección en perros muy nerviosos que se muevan en exceso o aquellos que ejerzan intensos movimientos pélvicos durante la estimulación, este material debe mantenerse a cierta distancia del pene para evitar traumatismos (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001; Kutzler, 2005). Sin embargo, esta técnica presenta varios inconvenientes; entre ellos, se puede citar la necesaria y exhaustiva limpieza del material cuando se utiliza para diferentes machos debido a la imposibilidad de ser esterilizado (Johnston y cols., 2001; Kutzler, 2005), la dificultad de obtener muestras de semen estéril por el contacto que se produce con las paredes del cono contaminadas con la flora bacteriana normal de la mucosa peneana y la uretra distal (Johnston y cols., 2001) y, la problemática que conlleva para la separación de las tres fracciones del eyaculado (Arthur, 1991; Allen, 1992; Peña, 1997).

2.3.2.3. Vagina artificial

Este dispositivo permite la simulación de las condiciones de temperatura, presión y lubricación de la cópula natural para la correcta estimulación del perro. Se trata de una construcción sencilla, conformada principalmente por un cilindro de goma dura exterior que presenta un revestimiento interior de látex o camisa de caucho, que se reinvierte en sus extremos. Esto permite crear una

cavidad entre ambas donde se deposita agua caliente y aire insuflado a través de una válvula de tal forma que, en el interior de esta estructura, la zona en contacto directo con el pene adquiera temperaturas próximas a los 37°C y presión similar a la de la vagina (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Asimismo, en el extremo libre del cilindro, se acopla una extensión de látex cónica o embudo de caucho que lleva un tubo de vidrio graduado adaptado para la recolección del semen tras la eyaculación (Olar y cols., 1983; Peña, 1997; Johnston y cols., 2001). Con respecto al lubricante, éste debe aplicarse en la cara interna de la vagina y debe ser estéril.

Para su correcta utilización, el proceso comienza con la estimulación del perro, de forma que cuando la erección supere el 50% y el animal continúe con los movimientos coitales, el pene con el bulbo exteriorizado se redirige a la vagina artificial, permitiendo que el pene penetre en ella a modo de vagina natural (Álamo, 2007). Esto se debe realizar al tiempo que se mantiene una suave presión digital alrededor del bulbo para mantener la erección (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Aunque se considera un sistema de recogida eficaz, su empleo puede llegar a ser incómodo y complicado; además, presenta el inconveniente de que, como ocurría en el método anterior, no permite la separación de las fracciones eyaculatorias ni evita la contaminación del semen con los fluidos prepuciales (Peña, 1997).

2.3.2.4. Electroeyaculación

En perros domésticos, la estimulación eléctrica es uno de los métodos menos utilizados para la obtención de semen. De manera general, el equipo está constituido por un electrodo bipolar conectado a una fuente variable de corriente alterna. Su funcionamiento consiste en la introducción del mismo vía rectal hasta situarlo a nivel de la próstata. Una vez allí, se comienza la aplicación de descargas de diferentes intensidades y de forma alternativa, siendo el protocolo más utilizado el consistente en utilizar estímulos de 3 segundos para detenerse otros 3, aplicándose en sesiones de 3 series de 30 a 40 estímulos cada una. Estas descargas actúan sobre los nervios que controlan el sistema reproductivo, produciendo la eyaculación (Howard y cols., 1986).

Este método de recogida seminal se considera una técnica eficaz y normalmente utilizada para la obtención de semen en cánidos salvajes como el lobo o el zorro. Sin embargo,

en el perro, este sistema sólo es indicado en circunstancias muy específicas, como por ejemplo, en animales con daño medular (Howard y cols., 1986; Root, 2005a; Ohl y cols., 2010). Entre los inconvenientes de este procedimiento se citan la necesidad de someter al animal a una anestesia general (Feldman y Nelson, 2007) y una peor calidad seminal cuando se comparan con las muestras recogidas por estimulación manual (Ohl y cols., 1994).

2.3.2.5. Farmacología

Aunque no existen trabajos rigurosos que especifiquen con absoluta claridad como este método de recogida puede afectar a la calidad del semen (Kutzler, 2005), sí que se han realizado estudios preliminares para determinar si la eyaculación puede ser inducida por agentes farmacológicos. Como resultado de los mismos, se ha concluido que este tipo de estimulación podría ser utilizada en animales que no son capaces de eyacular mediante estimulación manual (casos en que el animal sufra dolor o temor), así como si tampoco la electroeyaculación fuera una posibilidad factible.

Entre los protocolos que se han testado, se ha descrito como la administración intravenosa de una dilución de hidroclicrato de pilocarpina se mostró efectiva para conseguir un incremento en el volumen del eyaculado (Juniewicz y cols., 1989). Otros autores, mediante la utilización farmacológica de xilacina e imipramina combinada (Kutzler, 2005a), han conseguido inducir la eyaculación, si bien ésta se encontraba asociada a un detrimento de la calidad del semen debido a que parte de los mismos se redirigieron hacia la vejiga. Finalmente, también se han testado otras sustancias farmacológicas como las prostaglandinas F2- α , GnRH, inhibidores de prolactina (cabergolina) y nutricéuticos como las glicosaminoglicanos y antioxidantes (Hess, 2006), para comprobar su influencia sobre la calidad seminal.

2.3.2.6. Punción epididimaria

Como se ha citado con anterioridad, la cola del epidídimo contiene la mayor parte de los espermatozoides maduros. De ahí, su interés como fuente de extracción de semen y que se hayan realizado estudios para valorar el volumen testicular, el área epididimaria y los parámetros seminales, con el fin de establecer la relación que entre ellos podría existir (England, 1991). Sin embargo, la obtención de semen directamente de la cola del epidídimo y conductos deferentes es uno de los métodos menos utilizados. Este procedimiento se lleva a cabo tras la orquidectomía o en perros vasectomizados (Hewitt, 2001).

2.3.3. Factores que determinan la eyaculación y la calidad del semen

La eyaculación y, por tanto, la calidad del semen secretado durante la misma, vienen determinados por múltiples aspectos que pueden influir sobre los mismos. A continuación, se describen brevemente los factores que pueden intervenir sobre los procesos relacionados con la eyaculación o/y modificar la calidad seminal.

2.3.3.1. Factores que pueden influir sobre el mecanismo de la eyaculación

El estado físico y psicológico del animal son aspectos de vital importancia a la hora de conseguir una adecuada eyaculación.

En primer lugar, a nivel físico, cualquier proceso que altere el equilibrio orgánico del perro podría traducirse en un descenso en la producción de testosterona y, con ello, una falta de libido y de estimulación. Ejemplos pueden ser situaciones de desnutrición, existencia de enfermedades sistémicas, aplicaciones de fármacos, etc. Por otro lado, la edad del animal es determinante en este proceso; así, perros muy jóvenes pueden presentar falta de libido consecuente a la inmadurez de su aparato reproductivo, mientras que en cánidos de avanzada edad, generalmente mayores de 8 años, puede existir una disminución de la excitación sexual (Hewitt, 2000).

Otros factores capaces de afectar la correcta erección y eyaculación en la especie canina son los relacionados con el estado psíquico del animal. De este modo, aspectos como el entorno en el que se encuentre el animal, su estado de ánimo y el manejo al que sea sometido, pueden influir de forma definitiva en los resultados obtenidos (Hewitt, 2000; Kutzler, 2005; Root, 2005b; Feldman y Nelson, 2007).

2.3.3.2. Factores que afectan a la calidad del semen

En la especie canina, la raza, el tamaño del ejemplar y, por tanto, el tamaño genital, son factores que influyen de forma concluyente en los parámetros seminales del individuo. Se han realizado numerosos estudios al respecto, pero en general se ha descrito como la producción espermática diaria y, por tanto, el número de espermatozoides en el eyaculado, se incrementa a medida que aumentan el peso y tamaño testicular (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Asimismo, existen algunos estudios que han establecido una aparente influencia de la raza con respecto a las características del eyaculado. Siguiendo esta línea, Olar y cols. (1983) intentaron determinar la relación existente entre el tamaño testicular, la producción diaria de espermatozoides, la cantidad de espermatozoides eyaculados y la reserva extragonadal de espermatozoides en la especie canina. De forma general se puede afirmar que canes de razas pequeñas producen un menor número de espermatozoides que los machos de razas grandes con testículos de mayor tamaño (Feldman y Nelson, 2007). Esta afirmación se encuentra relacionada con la mayor concentración espermática del eyaculado en perros de mayor talla ya que, se ha establecido que la producción espermática está directamente relacionada con los gramos de tejido testicular; de esta forma, aquellos ejemplares pertenecientes a razas pequeñas no son capaces de producir tantos espermatozoides como los de razas de mayor tamaño (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007; Santana, 2009).

Otro aspecto a tener en cuenta es la frecuencia de eyaculación o de la recogida seminal. Se ha demostrado que la frecuencia eyaculatoria posee un efecto directo sobre el volumen seminal y la concentración de espermatozoides, en cuanto a que produce una reducción en la cantidad que se encuentran almacenados en los epidídimos (Feldman y Nelson, 2007). De esta forma, se ha establecido que la cantidad de reserva espermática disminuye de forma drástica y rápida cuando la recogida seminal es diaria (Root, 2005a, b). De hecho, cuando se produce una segunda recogida seminal, en menos de dos horas después de la primera, el contenido de espermatozoides y el volumen eyaculado puede descender hasta un 50% con respecto a la primera (Root, 2005a), si bien los porcentajes de motilidad espermática, espermatozoides vivos y morfoanomalías no se ven afectadas en el eyaculado obtenido (England, 1999). En conclusión, la mayoría de los autores afirman que la calidad del semen no disminuye cuando se obtienen un máximo de dos eyaculados cada 2 días (England, 1999; Álamo, 2007).

Por otro lado, sería necesario valorar los periodos de abstinencia o reposo sexual y su influencia sobre la calidad espermática. En primer lugar, se ha descrito un detrimento de la calidad del semen tras periodos prolongados de inactividad sexual, consecuencia de la acumulación de espermatozoides envejecidos en los conductos deferentes, que pueden llegar a representar aproximadamente un 10% del total en el eyaculado. Para evitar este efecto, antes de proceder a la recogida seminal con fines reproductivos, se aconseja que se realice previamente alguna recogida seminal con el objetivo de descartar este tipo de tipo de eyaculados y renovar los espermatozoides epididimarios (Peña, 1997; Hewitt, 2000; Root, 2005a).

La edad es otro de los factores determinantes en la calidad del semen de forma que, tanto perros muy jóvenes como muy mayores, suelen presentar una pobre calidad del semen (Johnston y cols., 2001). En la especie canina, la pubertad y, por tanto, el momento en el cual se comienza a producir espermatozoides a pleno rendimiento, es a los 9 meses aproximadamente. Sin embargo, se ha confirmado que los primeros eyaculados en los machos caninos después de alcanzar la pubertad se caracterizan por presentar a menudo espermatozoides anormales y muertos (Johnston y cols., 2001). Por otro lado, se ha establecido que el perro mantiene su nivel reproductivo y/o nivel de fertilidad máxima hasta los 4-5 años de edad; a partir de este momento, la calidad del eyaculado sufre una disminución sobre todo en referencia a la concentración seminal (Peña, 1997; Hewitt, 2000, Álamo, 2007, Feldman y Nelson, 2007). Otros trabajos han descrito como en perros menores a 6 años de las razas Dálmata y Rottweiler, la calidad del semen era significativamente mejor en cuanto a motilidad y concentración, que en animales de edades superiores (Schubert y cols., 1991; Seager y Schubert, 1996). Sin embargo, otros trabajos concluyen que la espermatogénesis por sí sola no disminuye durante el envejecimiento del animal (Peters y cols., 2000).

Otros aspectos como el fotoperiodo y la temperatura ambiental, también ejercen su función sobre la calidad del eyaculado, habiéndose determinado que la estación reproductiva es determinante en parámetros como la concentración de espermatozoides. En este sentido, se ha descrito la existencia de valores máximos en primavera e inicios de verano y menores a final de verano y comienzo del otoño, aunque se asume que un perro sin alteraciones debe ser fértil durante todo el año (Feldman y Nelson, 2007). Esto puede estar relacionado con la influencia que las estaciones puede ejercer a nivel hormonal; por ejemplo, Mello y cols. (2006) citan como en perros localizados en zonas tropicales se ha observado una disminución de la concentración de testosterona durante el verano, lo que podría llegar a reflejarse en la calidad seminal. Sin embargo, se ha descrito que las variaciones estacionales producen sólo ligeros cambios a nivel reproductivo, concluyendo que en perros saludables, la producción de semen y fertilidad se mantiene constante a través de todo el año (Ortega-Pacheco y cols., 2006).

Finalmente, otros factores que pueden disminuir la producción de semen son la exposición a radiaciones, el contacto con productos tóxicos, el exceso de calor en el área reproductiva, la falta de vitamina A, etc... (Hewitt, 2000; Feldman y Nelson, 2007).

2.5. VALORACIÓN SEMINAL

La valoración seminal en la especie canina consiste en realizar un estudio de los parámetros que determinan las características del semen. Para realizar este tipo de análisis existen numerosos métodos, aunque se suele comenzar con la determinación de los aspectos observables macroscópicamente como son volumen, color y olor del eyaculado. A continuación se procede a realizar la valoración de los parámetros microscópicos como la motilidad espermática, la concentración, la vitalidad, el porcentaje de morfoanomalías y estado del acrosoma (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001).

2.4.1. Estudio macroscópico

Tras la recogida, el estudio del semen comienza con la evaluación de aquellos parámetros observables de forma directa a través del tubo colector graduado de cristal o plástico, habitualmente transparente (Peña, 1997).

2.4.1.1. Color

En la especie canina, el color normal es el blanco opalescente, si bien su intensidad puede modificarse cuando varía la concentración del eyaculado. En función de esto, cualquier diferencia de coloración se asume como una alteración en el eyaculado (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007). Las modificaciones más habituales son debidas a la presencia de sangre de origen prostático, testicular o peneano, que dota al semen de una tonalidad roja o marrónácea. Por otro lado, si la apariencia del eyaculado es de un color verdoso puede ser indicativo de exudado purulento procedente de una infección genital, mientras la presencia de coloraciones amarillentas pueden aparecer en el caso de contaminarse con orina o exudado inflamatorio (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007).

2.4.1.2. Volumen

El volumen del eyaculado es un parámetro de importancia a la hora de evaluar el semen (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Santana, 2009). Sin embargo, al tratarse de un parámetro variable en función de la edad y tamaño del ejemplar, la frecuencia de recogida y la cantidad de fracción prostática, suele ser muy inconstante y, por tanto, no es referente a la hora de determinar la calidad seminal (Feldman y Nelson, 2007).

Debido a esta variabilidad, es difícil establecer con claridad el volumen medio del eyaculado en la especie canina, siendo numerosos los autores que intentan definir este

parámetro. Así, para algunos autores el eyaculado debe presentar valores comprendidos entre los 4 y 25 ml (Peña, 1997), mientras que otros describen valores que alcanzan desde 1 ml hasta los 80 ml (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Por otro lado, además de tratarse de un parámetro modificable por la variabilidad individual de cada animal, se ha comprobado que factores externos como la estación del año también puede influir. No obstante, de forma general se puede establecer que los valores medios del eyaculado en el perro se presentan en los siguientes rangos dependiendo de la raza y el individuo (Johnston y cols., 2001; Álamo, 2007):

- Primera fracción: de 0.1-5 ml.
- Segunda fracción: 0.2-4 ml.
- Tercera fracción: 1-80 ml.

2.4.2. Estudio microscópico

Son diversos los parámetros seminales estudiados a nivel microscópico a la hora de determinar la calidad del semen en la especie canina. De igual forma, existen diferentes técnicas para llevar a cabo su evaluación; estos procedimientos se encuentran en continua evolución y perfeccionamiento, de forma que en las últimas décadas, novedosas técnicas *in vitro* han sido introducidas con el objetivo de aportar una evaluación más detallada de las características espermáticas (Rijsselaere y cols., 2005). Así, los métodos de microscopia convencional utilizados para la evaluación espermática combinados con sistemas más objetivos como la citometría de flujo y técnicas de asistencia computerizada aplicados a parámetros relacionados con el análisis de la motilidad y la morfología de los espermatozoides, han supuesto una evolución en la investigación de este terreno, permitiendo obtener información más precisa sobre el estatus morfo-funcional de los espermatozoides (Peña, 2004).

2.4.2.1. Motilidad espermática

La motilidad espermática es uno de los parámetros de mayor relevancia a la hora de estimar la calidad del semen. Básicamente se pretende determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento en una muestra, ya sea de forma general o bien cuantificando los que sean capaces de manifestar un movimiento progresivo. Además, la naturaleza del movimiento de los espermatozoides nos aporta idea de aspectos como la capacidad de fertilización de los mismos y por tanto, sobre su estructura y competencia funcional. El porcentaje de espermatozoides móviles esta correlacionado con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal espermática (Peña, 1997; Peña, 2004).

La valoración de la motilidad suele ser el primer criterio en examinar tras la recogida seminal (Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). Con el fin de minimizar la alteración del eyaculado, y que la motilidad espermática se asemeje lo máximo posible a la existente en el eyaculado canino de forma natural, debe realizarse un control de la temperatura y el medio en el que se encuentren los espermatozoides. Así, aunque se considera que los espermatozoides caninos son bastante resistentes a las variaciones de temperatura, la motilidad es uno de los parámetros espermáticos más afectados cuando la muestra es sometida a temperaturas diferentes a la corporal, por lo que debe sumergirse con la máxima brevedad en un baño maría y/o trabajar siempre con material atemperado a 37-38°C (Peña, 1997; Hewitt y England, 1997; Verstegen y cols., 2002). Por otro lado, y aunque de forma general se deben separar las 3 fracciones a la hora de recoger el semen, se ha descrito una disminución de la motilidad de los espermatozoides contenidos en la segunda fracción cuando se entremezcla con trazas de la primera. En este caso, se recomienda la dilución del eyaculado en diferentes medios como alternativa para contrarrestar este efecto (Hewitt y cols., 2001).

La velocidad y el tipo de movimiento que realizan los espermatozoides son los principales factores determinantes de este parámetro. La velocidad se evalúa teniendo por premisa que un espermatozoide debe atravesar el campo de visión del microscopio a 100 o 200 aumentos en 2 a 3 segundos (Root, 2005a). Con respecto a la dirección de movimiento, se describe que en general la motilidad normal de los espermatozoides debe ser anterógrada progresiva, carácter representativo de aquellas células con una adecuada viabilidad y capacidad de fertilización. Asimismo, se considera que los espermatozoides que se mueven de forma circular o lateralmente son células anormales (England y Ponzio, 1996; Feldman y Nelson, 2007).

A la hora de definir la motilidad espermática en la especie canina nos encontramos con que existe un amplio rango, en función de los estudios valorados. Algunos autores establecen que en muchos perros fértiles se ha observado una motilidad del 90-95% y, por tanto, consideran un descenso de fertilidad cuando la motilidad es inferior al 80% (Allen, 1992); no obstante, la mayor parte de los trabajos sitúan que el porcentaje de espermatozoides móviles en el eyaculado de perro debe superar el 70% (Johnston y cols. y cols., 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). Por otro lado, en trabajos realizados con sistemas computerizados realizados a partir de un *pool* seminal, la motilidad espermática canina quedó registrada en valores del 88%

aproximadamente de espermatozoides móviles y 81% de ellos con motilidad progresiva (Rijsselaere y cols., 2004a).

En la actualidad, la motilidad espermática puede estudiarse a través del uso de diferentes procedimientos, que se describen a continuación:

I. Observación visual directa

Para llevar a cabo esta técnica, se comienza con la preparación de la muestra a estudiar. Para ello, se deposita una pequeña gota de semen entre un portaobjetos y un cubreobjetos con el objetivo de generar una fina capa de semen que permita observar el movimiento de los espermatozoides. Esta preparación se coloca a un microscopio, generalmente con platina calefactora, evaluando la muestra a microscopia con aumentos de 10X, 20X o 40X. El examen del semen siguiendo este protocolo nos permite determinar el movimiento progresivo anterógrado de los espermatozoides, así como las posibles aglutinaciones de los mismos que puedan existir (Álamo y cols., 2005; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007).

Como se puede comprobar, se trata de un método sencillo que nos permite estimar el porcentaje de espermatozoides móviles y las características de su motilidad de forma subjetiva (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007). Al tratarse de una evaluación subjetiva, se recomienda que la muestra sea siempre valorada por el mismo observador, utilizando los mismos aumentos y la misma concentración con el objetivo de estandarizar las distintas evaluaciones (Peña, 1997; Peña, 2004). No obstante, en la actualidad, los procedimientos de evaluación objetiva de los parámetros seminales se encuentran en auge, de forma que el uso de técnicas de tinciones fluorescentes, sistemas computerizados de análisis espermático y citometría de flujo, hacen que la utilización del microscopio convencional y la evaluación subjetiva de la motilidad vayan siendo progresivamente reemplazados (Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2005).

II. Sistemas informatizados de análisis espermático

En los últimos años se ha incrementado la disponibilidad de sistemas computerizados de análisis espermáticos, denominados tradicionalmente sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Se trata de una herramienta que permite comparar objetivamente los parámetros seminales y alcanzar un alto grado de precisión, pudiendo incluso establecerse correlaciones entre la calidad del semen y su fertilidad (Peña, 1997; Verstegen y cols., 2002).

Este tipo de sistema, mediante el análisis y procesado algorítmico de la imagen digital del recorrido de cada espermatozoide, puede determinar la motilidad de una muestra de semen, así como las propiedades de movimiento espermático. Gracias a estas prestaciones, parámetros de movimiento como el movimiento progresivo, velocidad curvilínea media y lineal media, velocidad de trayectoria media y desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides, son fácilmente analizables; así, este tipo de equipamientos no sólo permite determinar el porcentaje de espermatozoides móviles, sino que ofrece la posibilidad de analizar las características de movimiento de cada uno de los espermatozoides que atraviesa el campo microscópico (Peña, 1997; Versteegen y cols., 2002).

Sin embargo, la fiabilidad, exactitud y precisión de los análisis realizados por el sistema CASA dependen en gran medida de los conocimientos y la formación de los usuarios sobre las limitaciones, calibración, validación y normalización de los mismos, así como el manejo del semen previo al análisis. Actualmente existe una falta de uniformidad a la hora de estandarizar los valores de motilidad para clasificarlos como normales o anormales a partir de los datos obtenidos por diferentes laboratorios. Es por ello que, la extremada necesidad de validación y exhaustivos controles de calidad, unido a los elevados costes de los equipos, se presentan como los principales inconvenientes del sistema CASA como alternativa factible (Igner-Ouada y Versteegen, 2001a, b; Versteegen y cols., 2002).

2.4.2.2. Concentración espermática

La concentración espermática se estima mediante el recuento total de espermatozoides existentes en el eyaculado (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001). Es uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de establecer la fertilidad del individuo, ya que se considera un estimador determinante de la calidad del semen (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001). Sin embargo, se trata de una cuantificación variable en función del volumen recogido y del número de espermatozoides que son producidos por el macho, siendo la concentración de la segunda fracción la concluyente (Root, 2005a) y, observándose una disminución de la concentración cuando la eyaculación es incompleta (Peña, 2004). Es por ello que debemos tener presente que siempre se debe intentar recolectar las distintas fracciones por separado, y en caso de no ser posible, asumir como normal una marcada variación en la concentración (Hewitt, 2000). Existen diversos métodos destinados a la medición de la concentración espermática:

a) Hemocitómetro o cámara de Neubauer: es el procedimiento tradicional. Para llevar a cabo esta técnica se hace uso de una dilución del semen con solución salina (habitualmente 1/40), que tras homogeneizar, se deja deslizar por el interior de la cámara y reposar durante unos minutos. Seguidamente, se procede a realizar el recuento a microscopía, usando habitualmente los objetivos de 10X y 40X (Hewitt, 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). No obstante, en el uso de esta técnica para realizar el conteo y estimar los cálculos de espermatozoides, se utilizan diferentes protocolos que varían en función del número de cuadrículas contabilizadas y las medidas de las mismas (England y Ponzio, 1996; England, 1999; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, b; Álamo y cols., 2005; Root, 2005a; Verstegen y cols., 2005). Sin embargo, este sistema se caracteriza por tener el inconveniente de ser tedioso, con la consecuente pérdida de tiempo que conlleva su uso cuando es la técnica de elección.

b) Espectrofotómetros: este sistema se sirve de la fotolorimetría para estimar el grado de absorción y dispersión de la luz que producen los espermatozoides contenidos en una microcubeta. Extrapolando los valores de absorbancia a través de los registros obtenidos y una recta de regresión de referencia, se puede estimar la concentración espermática del eyaculado. Una variación de estos sistemas es el uso de contadores de partículas o Coulter Counter, basados en la utilización de sistemas computerizados capaces de reconocer y realizar el conteo de los espermatozoides en función de las características propias de cada especie, con la desventaja que su alto precio conlleva (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007).

Independientemente del método utilizado para estimar la concentración espermática, la segunda fracción del eyaculado en la especie canina se caracteriza por presentar una concentración media entre 100 a 700 millones de espermatozoides/ml (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001), si bien valores comprendidos entre los 20-2000 millones de espermatozoides/ml pueden considerarse dentro del rango normal (Root, 2005a).

En cualquier caso, en relación a este parámetro, el valor de mayor interés es la cantidad de espermatozoides totales en el eyaculado. Para ello es necesario multiplicar la concentración espermática por el volumen total de semen recogido (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007; Santana, 2009), pudiendo estimarse que los valores totales deben situarse entre los 300-2000 millones/eyaculado (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a). Este

parámetro es de gran utilidad para la tecnología seminal, pues permite establecer el número de dosis seminales que se pueden extraer de un eyaculado (Peña, 1997).

2.4.2.3. Morfología espermática

El estudio de la morfología de los espermatozoides incluye todas aquellas alteraciones que puedan aparecer en las distintas partes que conforman esta célula: cabeza, pieza intermedia y cola. Este tipo de anomalías pueden deberse a múltiples causas, siendo las más habituales las infecciones del tracto reproductivo del animal, incremento de la temperatura corporal, alteraciones iatrogénicas, trauma testicular y disminución de la secreción de LH y testosterona (Johnston y cols., 2001). Otros factores que intervienen en la morfología de los espermatozoides es el tiempo de reposo sexual de los animales, de tal forma que en aquellos eyaculados obtenidos tras un largo periodo de inactividad sexual, se detecta un incremento en la aparición de morfoanomalías (Kawakami y cols., 1998).

Con respecto a la clasificación de las morfologías, cuando las alteraciones se producen durante la espermatogénesis quedan catalogadas como anomalías primarias; este tipo incluye anomalías de cabezas como pueden ser tamaño, forma inusual o cabezas sueltas si aparecen en gran cantidad y, anomalías de pieza intermedia cuando éstas aparecen con forma curvada y/o presencia de gotas citoplasmáticas proximales. Por otro lado, las anomalías producidas en la fase de tránsito del sistema ductal de los epidídimos durante la maduración del semen se denominan anomalías secundarias, y se encuentran representadas principalmente por gotas citoplasmáticas distales en la pieza intermedia y colas curvadas o enrolladas (Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007).

La alteración en la morfología de los espermatozoides es un aspecto de gran relevancia a la hora de valorar el semen, ya que esta característica va a determinar la motilidad de los espermatozoides (Root, 2005a). En general, se ha descrito que en el semen fresco de perro, el porcentaje de espermatozoides sin anomalías morfológicas debe ser superior o igual al 80% (Johnston y cols., 2001), si bien otros autores establecen dicho porcentaje en valores superiores a un 70% (Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). Asimismo, algunos trabajos han intentado relacionar la fertilidad con el porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides, estableciendo que el nivel de éxito de un eyaculado disminuye a medida que se incrementa la cantidad de espermatozoides anormales en el mismo, estimándose que la fertilidad es

significativamente inferior cuando el porcentaje de morfoanomalías supera el 60% (Oettlé, 1993; Johnston y cols., 2001).

Las técnicas existentes para valorar la morfología que presentan los espermatozoides son muy variadas. El método más sencillo consiste en tomar una gota del semen fresco sin diluir y depositarlo entre un portaobjetos y un cubreobjetos con el fin de formar una fina capa de espermatozoides que pueda ser valorada sin coloración mediante microscopía de contraste de fases (Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). Sin embargo, otras técnicas más específicas se basan en la realización de un frotis seminal y su combinación con determinadas tinciones que permitan la evaluación de las características morfológicas de los espermatozoides, como pueden ser la integridad de la membrana plasmática, el estado de capacitación y reacción acrosomal.

Una de las técnicas más habitualmente utilizadas es la tinción con eosina-nigrosina, elaborada a base de una combinación de ambos colorantes. Se inicia depositando una gota de semen y una gota de tinción eosina-nigrosina (del mismo volumen) sobre un portaobjetos, para tras realizar una extensión fina de la muestra, se valore en un microscopio de contraste de fase con objetivo de inmersión a 100X. Al realizar un recuento de 100 o 200 espermatozoides, se puede estimar el porcentaje de ellos que se encuentran no teñidos, es decir, incoloros y, por tanto, vivos, así como el porcentaje de teñidos (muertos), así como su morfología (Allen, 1992; Root, 1998; Johnston y cols., 2001; Peña, 2004; Root, 2005a; Batista y cols., 2006). Otro tipo de tinción es la denominada tinción Spermac, capaz de teñir de distintos colores las diferentes partes del espermatozoide de modo que el núcleo espermático queda teñido de rojo, mientras que el acrosoma, pieza intermedia y cola se tiñen de verde (Rota y cols., 2007). Por el contrario, la tinción Wright-Giemsa como el Diff Quick, efectiva y de fácil disponibilidad, presenta el inconveniente de no teñir el área acrosómica del espermatozoide (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007; Santana, 2009).

No obstante, algunos autores han descrito como los sistemas basados en el uso de tinciones presentan el inconveniente de poder modificar los resultados de morfoanomalías espermáticas, alterando la objetividad del procedimiento. Este tipo de estudios permite concluir que pueden existir amplias variaciones de los resultados dependiendo de la técnica utilizada, el laboratorio que la lleve a cabo, así como resultado de evaluar la morfología espermática con tinciones realizadas manualmente y de forma subjetiva (Root, 1998; Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2004a; Verstegen y cols., 2005). Como consecuencia, se ha propuesto la utilidad de

combinar los métodos tradicionales de tinción con las técnicas de análisis de imagen, para la evaluación de cambios estructurales en la morfología de los espermatozoides (Dahlbom, 1997). En este sentido, en los últimos años se han puesto en práctica la combinación de tinciones fluorescentes que permiten el examen de las características funcionales de los espermatozoides sin necesidad de inmovilizarlos (citometría de flujo) y el análisis mediante la utilización de sistemas como el CASA, con el que se obtiene información detallada y objetiva de características morfométricas con la consiguiente estandarización y validación de este tipo de determinaciones (Rijsselaere y cols., 2004a; Verstegen y cols., 2005).

2.4.2.4. Vitalidad espermática

El estudio del semen para determinar la cantidad de espermatozoides que se encuentran vivos o muertos se conoce con el nombre de vitalidad espermática. La principal técnica utilizada para valorar este parámetro es la utilización de tinciones supravitales, elaboradas a partir de colorantes vitales como la eosina-nigrosina, eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test (HOST), capaces de teñir a los espermatozoides en función de la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática (Peña, 2004). Entre ellas, la tinción eosina-nigrosina suele ser la técnica de tinción de elección dada su rapidez y sencillez de preparación, constituyendo el procedimiento más ampliamente utilizado hasta hace pocos años. El fundamento de este sistema se basa en la alteración que se ocasiona en la membrana plasmática de aquellos espermatozoides dañados y/o muertos y, en consecuencia, la entrada del colorante hacia el interior de las células alteradas y permeables que quedan totalmente teñida de color rosa (England y Ponzio, 1996; England, 1999; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, b; Peña, 2004; Verstegen y cols., 2005; Santana 2009).

Estudios más recientes han demostrado la eficacia de sistemas computerizados para determinar la vitalidad espermática en un *pool* de semen canino. Este tipo de trabajos permite estimar rápidamente la calidad del semen a través del análisis simultáneo de miles de células en una misma muestra, utilizando, por ejemplo, sistemas de citometría de flujo unido a tinciones de fluorescencia dobles o triples (Rijsselaere y cols., 2004a). De hecho, la viabilidad espermática es el principal parámetro estudiado mediante estos sistemas, siendo valorado en función de la integridad de la membrana de los espermatozoides. Otros trabajos, realizados con el fin de comparar la viabilidad de los espermatozoides caninos en citometría de flujo frente a las técnicas de tinción con eosina-nigrosina, han mostrado una alta correlación en los resultados obtenidos por ambos métodos (Peña y cols., 1998c; Peña y cols., 1999; Peña y cols., 2001).

Se considera que, a pesar de que algunos trabajos hayan registrados valores entre un 85 y un 95% de vitalidad, el valor medio de un semen fresco debe ser superior al 90% (Peña, 1997; Rijsselaere y cols., 2004a; Álamo, 2007).

2.4.2.5. Acrosomías

El acrosoma corresponde a una estructura situada en la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide. En la especie canina, adquiere una forma acuminada a modo de capuchón (Feldman y Nelson, 2007), por lo que las alteraciones más frecuentes suelen corresponder con acrosomas desprendidos o prominentes. La valoración de esta estructura presenta gran interés a la hora de determinar la calidad seminal de un eyaculado, sobre todo en los protocolos de congelación y descongelación seminal, ya que la separación del acrosoma antes de tiempo, se relaciona con el proceso de capacitación espermática prematuro y, por tanto, inefectivo. Por el contrario, una pequeña cantidad de acrosomas anormales en el semen canino no implica consecuencias relevantes (Allen, 1992; Feldman y Nelson, 2007). En general, se ha determinado que el porcentaje de acrosomas normales en el semen fresco canino debe situarse entre el 85 y el 95% (England y Ponzio, 1996).

En la especie canina, se pueden utilizar diversas técnicas para evaluar el estado de los acrosomas: técnicas de tinción para microscopio de campo claro, uso de marcadores fluorescentes y test de endósmosis, estudio de muestras seminales con microscopía de contraste de fase o interferencia de contrastes, etc... (Peña, 1997). En la actualidad, se sigue haciendo uso de tinciones no fluorescentes (Trypan blue y Giemsa o Trypan blue, Bismarck Brown y Rosa de Bengala) para la estimación combinada de vitalidad, morfoanomalías y acrosomías; se trata de tinciones óptimas para evaluar el semen fresco, existiendo otras tinciones como el Spermac® de mayor utilidad a la hora de evaluar semen congelado, si bien presenta el inconveniente de no hacer distinción entre espermatozoides vivos y muertos (Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2005).

No obstante, al igual que sucede para otros parámetros seminales, la tendencia actual es la utilización de métodos más objetivos como las tinciones fluorescentes analizadas a través del uso de microscopía fluorescente o citometría de flujo, que nos permite discriminar perfectamente los acrosomas intactos y los alterados (Peña y cols., 2001; Peña, 2004).

2.4.2.6. Pruebas de viabilidad espermática

I. Capacitación espermática

La capacitación espermática es un proceso que sucede en el espermatozoide cuando interactúan con las sustancias presentes en el tracto reproductivo femenino, necesario para que se produzca la fecundación. Para que este fenómeno acontezca, en el espermatozoide debe producirse una serie de cambios bioquímicos a nivel celular (Petrunkina y cols., 2003; Albarracín y cols., 2005).

Numerosos trabajos se han realizado con el objeto de determinar la capacidad de los espermatozoides para realizar la capacitación espermática *in vitro*. Algunos autores han confirmado que este proceso puede completarse en un medio sin la adición de glucosa ni de ningún otro azúcar como fuente de energía (Petrunkina y cols., 2003; Albarracín y cols., 2004). Por otro lado, se ha comprobado que uno de los factores más concluyentes para que posteriormente se produzca la reacción acrosómica es la concentración de calcio en el diluyente espermático; de hecho, una alta concentración de este ión incrementa los niveles de reacción acrosómica, si bien este proceso viene también influenciado por la temperatura (Sirivaidyapong y cols., 2000). Asimismo, otros ensayos describen como que la adición de *fluoresceinated lectins* (*Pisum sativum* agglutinin-PSA-, *Peanut agglutinin*-PNA-) era altamente tóxica cuando se añadía a muestras de semen incubadas en condiciones de capacitación; sin embargo, no se detectaba ninguna toxicidad cuando las muestras de semen tanto fresco como congelado eran incubadas en un Tris-buffer o en el diluyente de criopreservación, respectivamente (Peña, 2004). Finalmente, otro estudio realizado por Martins-Bessa y cols. (2009) valoró el efecto de la suplementación con taurina, hipotaurina y diferentes concentraciones de ionóforo en la reacción acrosómica en espermatozoides descongelados. En este trabajo se comprobó que existía un alto porcentaje de reacción acrosómica en semen canino congelado-descongelado tras haberle adicionado entre 2.5 y 10 mM de ionóforo calcio; sin embargo, la incorporación de taurina e hipotaurina no tuvo efecto sobre este tipo de parámetro seminal.

II. Test hiposmótico

El test hiposmótico constituye uno de los métodos indirectos más frecuentemente utilizados gracias a su fiabilidad y repetibilidad a la hora de determinar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides en la especie canina (England y Plummer, 1993; Rodríguez-Gil, 1993; Martins-Bessa y cols. 2006).

El test se basa en la peculiaridad que presentan los espermatozoides caninos para distenderse en condiciones hiposmóticas, resultado de la entrada de agua y consecuente expansión de la membrana de los espermatozoides (Kumi-Diaka, 1993). Posteriormente, el resultado se obtiene estableciendo el número de espermatozoides incrementados de volumen, valor que es inversamente proporcional al número de espermatozoides con la membrana dañada; en otras palabras, se basa en la incapacidad de los espermatozoides dañados de incrementar de tamaño (England y Plummer y cols., 1993).

2.4.2.7. Otros aspectos a valorar del semen:

El eyaculado del perro se caracteriza por tener una amplia composición. Aparte de los espermatozoides procedentes de testículos y los fluidos prostáticos, está constituido por diversos tipos celulares como eritrocitos, células epiteliales, leucocitos, macrófagos, linfocitos (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007), que en determinadas cantidades suelen ser indicativos de anomalías y/o presencia de patologías.

La presencia de eritrocitos suele estar asociado a la existencia de una hemorragia a nivel de la glándula prostática o en el pene, apareciendo con una incidencia mayor en eyaculados de individuos mayores de 5 años. No obstante, no es indicativo necesariamente de enfermedad, si bien se considera inadecuada ya que dificulta la motilidad espermática (Allen, 1992; Feldman y Nelson, 2007). Asimismo, las células epiteliales suelen asociarse a una contaminación uretral o prepucial del semen tras grandes periodos de reposo sexual (Feldman y Nelson, 2007), mientras la aparición de gran cantidad de leucocitos en el semen sugiere la presencia de una infección (Hewitt, 2000).

2.4.3. Estudio bioquímico

A la hora de determinar el pH de un eyaculado, habitualmente se utiliza el pH de la tercera fracción del eyaculado siendo, por tanto, la fracción prostática la que determina dicho valor (Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005). El valor del pH seminal habitual en la especie canina es de 6,5, si bien se consideran normal cuando se sitúan dentro de un rango de entre 6.3 y 6.7 (Bartlett, 1962; Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001). Por tanto, un aumento por encima de estos registros indicaría alteraciones como la existencia de una eyaculación incompleta o de patologías de origen inflamatorio a nivel testicular, epididimario o de la glándula prostática (Feldman y Nelson, 2007).

Por otro lado, la presión osmótica se considera un parámetro de interés debido a la intensa relación entre osmolaridad y el punto crioscópico del semen. Los valores de osmolaridad en el perro alcanzan registros de 300mOsm de concentración, cuando el punto crioscópico de la muestra se sitúa en -0.55°C (Peña, 1997).

2.5. DILUYENTES SEMINALES

Los espermatozoides pueden conservarse durante largos periodos de tiempo mediante la reducción de su actividad metabólica, lo que se consigue con la dilución en un medio adaptado a cada especie y una reducción de temperatura adecuada (Pinto, 2005). La refrigeración y la congelación se consideran los principales procesos utilizados para disminuir la tasa metabólica del semen, que puede conservarse y prolongar la vida espermática (Stornelli y cols., 2006).

Para ello, el eyaculado debe ser procesado, diluido y enfriado de una manera particular en función de sus características, lo que le permite su preservación a lo largo del tiempo y que permanezca fértil (Feldman y Nelson, 2007). Para que esto sea posible, es necesario adicionarle diluyentes seminales, que son medios elaborados a partir de una serie de componentes capaces de conservar el semen, impidiendo su deterioro (Celma, 2004; Pinto, 2005; Álamo, 2007). Estas sustancias tienen la capacidad de aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de los espermatozoides, proteger a las membranas de los espermatozoides de los daños que ocasionan los cambios de temperatura mientras que, a su vez, estabilizan el pH, evitan el desarrollo microbiano y controlan la osmolaridad y la concentración iónica del medio (Linde-Forberg, 1991; Johnston y cols., 2001; Pinto, 2005).

El semen de cada especie animal presenta unas peculiaridades propias a las que el diluyente debe adaptarse (Holt, 2000). A continuación se describen brevemente los principales componentes de los diluyentes seminales en la especie canina.

2.5.1. Componentes básicos de un diluyente

2.5.1.1. Fuentes de energía

Las principales fuentes de energía utilizadas por los espermatozoides para mantener su metabolismo y generar el movimiento flagelar que le permita desplazarse, son los azúcares simples como di- o tri-sacáridos y azúcares glicozables como la glucosa, fructosa y manosa (Álamo, 2007; Feldman y Nelson, 2007).

2.5.1.2. Soluciones tampones y electrolitos

Los diluyentes seminales deben presentar componentes iónicos y no iónicos que permitan mantener unos valores constantes de osmolaridad y pH. Así, el pH óptimo de los diluyentes caninos debe ser de entre 6.75 y 7.50, mientras que la osmolaridad se debe situar entre los 300 y 325 mOSm (Johnston y cols., 2001). Este tipo de sustancias son, entre otras, el citrato sódico, leche desnatada en polvo, leche desnatada uperizada, lactosa, ácido cítrico, TES (N-Tris hidroximetil-2-aminometano ácido sulfónico), PIPES (piperazina etano ácido sulfónico) e hidróxido potásico, si bien el Tris (Tris hidroximetil aminometano) es el más utilizado (Peña y Linde-Forsberg, 2000; Celma, 2004).

2.5.1.3. Estabilizadores de membrana

Existen sustancias orgánicas como las proteínas de la leche, la yema de huevo y la albúmina sérica bovina capaces de proteger a los espermatozoides contra el choque frío durante el enfriamiento, preservando las membranas acrosómicas y mitocondrial de los mismos (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Uno de los más utilizados es la yema de huevo, ya que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad tienen la capacidad de proteger a los espermatozoides del shock por frío (Stornelli y cols., 2006). Además, la función de este tipo de sustancias se puede potenciar con la adición de otras como el Equex STM en pasta, que se suele añadir al diluyente para maximizar el efecto protector de la yema de huevo (Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y cols., 2006).

Por otro lado, los crioprotectores son sustancias que actúan a distintos niveles para mantener la capacidad de la célula de adaptarse a los distintos procesos de dilución y descenso de temperatura que sufren cuando se conserva, minimizando los efectos de la pérdida osmótica de agua celular producida por los solutos extracelulares y disminuyen el punto crioscópico intracelular (Cabrera, 1999; Pinto, 2005). Los crioprotectores más utilizados en el preservación seminal en la especie canina son el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol (Andersen, 1975; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Hewitt y cols., 2001; Silva y cols., 2006).

2.5.1.4. Antibióticos

Este tipo de sustancias sirven para controlar el crecimiento microbiano, que puede verse favorecido por algunos componentes de los diluyentes como la glucosa y por las temperaturas a las que se conserva el semen. Los antibióticos más habitualmente usados son la penicilina y la estreptomycin (Pinto, 2005).

2.5.1.5. Otros componentes

Para elaborar los diluyentes seminales, resulta fundamental incluir en su composición aquellas sustancias destinadas a disolver los componentes que lo conformen. Para ello, se suelen utilizar sustancias como el agua bidestilada o ultrapura (Celma, 2004; Álamo, 2007).

Finalmente, en función de las variantes de diluyentes que se elaboren, son diversos los componentes que se pueden añadir. Es el caso de los aditivos, como enzimas (α y β -amilasa, β -glucuronidasa, catalasa), detergentes (SDS-dodecil sulfato sódico, STLS-trietanolamina laurel sulfato sódico), aminoácidos (alanina, prolina, glicina-betaína, glicina-betaína+prolina) y otros compuestos (cafeína, prostaglandinas) que pueden mejorar la fertilidad (Thomas y cols., 1993; Peña y Linde-Forsberg, 2000).

2.5.2. Efecto de los diluyentes sobre las propiedades de los espermatozoides

En la actualidad, son múltiples los estudios que se están realizando con la finalidad de encontrar y perfeccionar la composición de los diluyentes utilizados para conservar el semen, tanto en refrigeración como en congelación.

Los estudios basados en la influencia del tipo de azúcares sobre las características del semen han confirmado una notable modificación de diferentes parámetros seminales, en función del tipo de azúcar empleado. Por ejemplo, Rigau y cols. (2001) describieron como el uso de fructosa como fuente de energía inducía un patrón de motilidad lineal en los espermatozoides, mientras que la glucosa ocasionaba que éstos se moviesen de forma más oscilatoria. Mientras, otros trabajos al respecto han comprobado que la adición de azúcares a los diluyentes no mejoró la motilidad ni la viabilidad durante el equilibrado, mientras que el porcentaje de acrosomas dañados en las células espermáticas se redujo cuando se utilizó galactosa, lactosa, trehalosa, maltosa y sucrosa en el medio (Yildiz y cols., 2000).

Por otro lado, algunos autores han determinado que la concentración de calcio en el diluyente espermático tiene relación directa con la reacción acrosómica en los espermatozoides de perro. Unas concentraciones de calcio elevadas en el medio permiten que la reacción acrosómica se potencie en mayor medida, siendo un factor que se encuentra influenciado además por la temperatura (Sirivaidyapong y cols., 2000).

Uno de los aspectos más estudiados en la composición de los diluyentes seminales en la especie canina es el uso del Equex. Ciertos trabajos al respecto, sugieren que este detergente como parte del diluyentes beneficia la motilidad de los espermatozoides después de la criopreservación (Alhaider y Watson, 2006), comprobando como los espermatozoides congelados con medios que contenían Equex eran más resistentes a los efectos del congelado que los congelados con diluyentes sin este componente (Alhaider y Watson, 2006); no obstante, este trabajo sugiere que la respuesta de los espermatozoides a la adición de Equex en perros varía de manera individual.

Asimismo, Peña y cols. (2003) habían observado resultados semejantes en un estudio previo realizado en la especie canina. En este trabajo se comparaba el uso de diferentes tipos de Equex comerciales y los efectos que tenían sobre la supervivencia, longevidad y concentraciones de calcio intracelulares en espermatozoides congelados-descongelados; entre las conclusiones de este estudio se indica que la adición de 0.5% de Equex STM en pasta a los diluyentes seminales mejoraba significativamente la longevidad *in vitro* de los espermatozoides y prolongaba su supervivencia, lo que parece obedecer a un incremento de las concentraciones intracelulares de calcio. Este principio se repitió en muestras de semen extraídas del epidídimo de perro donde, la utilización de Equex STM en pasta, previno el daño en la integridad de la membrana inducida por la criopreservación y prolongó la motilidad durante la incubación *in vitro* tras la descongelación (Ponglowhapan y Chatdarong, 2008). Por otro lado, se han realizado trabajos donde se compara el uso de diluyentes con Equex frente a diluyentes con un 6% LDL (lipoproteínas de baja densidad) comercializado en forma de kit comercial, observándose que ambos presentan las mismas cualidades crioprotectoras (Bencharif y cols., 2010).

Otro de los aspectos valorados en la manipulación de los diluyentes es la capacidad de aumentar los índices de fertilidad del semen congelado mediante la adición de sustancias como la taurina y la hipotaurina, habiéndose comprobado que el uso de las mismas no es efectivo con tal fin (Martins-Bessa y cols., 2009).

2.5.3. Clasificación de los diluyentes

El proceso de dilución y preservación seminal mediante frío es diferente en función de si se pretende refrigerar o congelar el semen. Con este fin, son múltiples las variedades de diluyentes que se han desarrollado, pudiendo clasificarse en base a la naturaleza de los componentes utilizados para su elaboración.

2.5.3.1. Diluyentes naturales

Los diluyentes naturales son aquellos elaborados básicamente a partir de distintas variedades de leche, ya sean de origen animal o vegetal. La elección del diluyente de tales características depende de la relación precio-calidad, del tiempo de transporte, y del tiempo de conservación previo inseminación. Este tipo de diluyentes es más utilizado en la conservación seminal de rumiantes, si bien se han descrito algunos de uso canino (Celma, 2004; Pinto, 2005).

2.5.3.2. Diluyentes sintéticos

Se caracterizan por tener sustancias amortiguadoras como Tris ó citrato, fuentes de energía a base de glucosa o fructosa y protectores de las membranas celulares como la yema de huevo (Celma, 2004).

Dentro de este grupo existe gran variedad de diluyentes, en los que a partir de una solución acuosa, se incorporan distintas sustancias sintéticas como ácido cítrico, citrato de sodio dihidrato, glucosa, fructosa, yema de huevo, glicerol, antibióticos, etc., en distintas cantidades para crear diferentes combinaciones de diluyentes (Linde-Forsberg, 1995; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c; Peña y cols., 2006; Feldman y Nelson, 2007).

2.6. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO

2.6.1. Semen fresco

De manera general, para mantener la calidad del semen, éste no debe ser sometido a cambios bruscos de temperatura, alteraciones mecánicas fuertes como una excesiva agitación, ni contacto con sustancias como el agua, germicidas y detergentes. No obstante, de todos ellos, la temperatura es el factor que más se ha estudiado debido a que los espermatozoides de la especie canina pueden fácilmente sufrir shock térmico por calor; sin embargo, se muestran más resistentes al frío que en otras especies (Kutzler, 2005). Por esta razón, tras la correspondiente recogida seminal, el semen canino se debe conservar en baño María a 37°C en los tubos calibrados de plástico o cristal donde se depositó durante la recogida, evitando alteraciones hasta el momento de su utilización. Si esto no fuera posible, no debemos permitir que la muestra se enfríe con demasiada rapidez, utilizándola siempre antes de 15 minutos tras la recogida (Allen, 1992).

En estas condiciones, la viabilidad del semen fresco tras la recogida no es superior a 24 horas. Sin embargo, la adición de diluyentes aporta una fuente de energía y medios tampones que permiten la supervivencia de los espermatozoides durante su conservación, por un periodo de tiempo más largo. Además, la dilución del semen se propone como una herramienta útil para el aprovechamiento del eyaculado de los machos, si bien depende directamente del número y la concentración del eyaculado y de las dosis seminales que queramos obtener en la planificación de las inseminaciones artificiales. De este modo, se ha descrito la posibilidad de incrementar la vida media del semen hasta 4-5 días cuando se encuentra suplementado con un diluyente a base de yema de huevo o leche homogeneizada a la que se le ha eliminado el albumen, y antibióticos siempre que se conserve a 37°C. Por el contrario, cuando se preservan o transportan sin la adición de un medio adecuado, la calidad seminal disminuye considerablemente (Farstad, 2000; Celma, 2004; Kutzler, 2005; Pinto, 2005; Álamo, 2007).

Los estudios al respecto en la especie canina son muy limitados. Sin embargo, a diferencia de los perros, en algunas especies como el conejo se ha comprobado que los espermatozoides continúan siendo fértiles después de ser almacenados en un medio de glucosa-fructosa a 15°C durante 5 días (López-Gatius y cols., 2005).

2.6.2. Semen refrigerado

La temperatura es uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de preservar la calidad del semen, de forma que una disminución controlada y progresiva de la misma nos permite una conservación de los eyaculados, desde varias horas hasta varios días. Esto es posible gracias a que la reducción térmica ocasiona un descenso en el metabolismo y la motilidad espermática, así como un bloqueo del crecimiento bacteriano (Celma, 2004). En este sentido, la refrigeración del semen se convierte en una herramienta muy útil en la cría canina; además, si a esto añadimos la sencillez de la técnica, los bajos costos y el alto nivel de éxitos, explicaría que la refrigeración del semen en la especie canina se haya convertido en una de las técnicas de preservación seminal más utilizadas en la actualidad (Peña y cols., 2006).

Por otro lado, cuando se trata de periodos de preservación cortos, la refrigeración se considera un método de conservación seminal más efectivo que la congelación del semen. En relación a este asunto, determinados estudios han permitido comprobar que la calidad del semen refrigerado durante dos días era notablemente superior que el mismo semen congelado-descongelado, si bien esta iba disminuyendo a lo largo del tiempo de forma que pasadas unos 5

días de almacenaje a 5°C, las características del semen refrigerado eran equivalentes a las del semen congelado (England y Ponzio, 1996).

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la refrigeración se considera una etapa muy estresante para los espermatozoides debido a su sensibilidad frente al efecto de shock térmico que este proceso conlleva (Pinto, 2005). Además, no todo el semen va a responder de la misma forma al proceso de dilución, refrigeración y almacenamiento para transporte, por lo que en muchos casos se aconseja realizar pruebas previas al procedimiento (Kumi-Diaka y Badtrama, 1994; Root, 2005a).

De manera general, antes de someter al semen a un proceso de diluyo-conservación previo a la refrigeración, debemos realizar un análisis del mismo para determinar las características seminales y su grado de calidad. Una vez definida la concentración espermática, los principales aspectos evaluados en el semen son la motilidad y los parámetros relacionados con la misma (velocidad espermática), el estado de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma (Rota y cols., 1995).

2.6.2.1. Dilución de eyaculados y principales diluyentes utilizados en refrigeración seminal en el perro

Cuando se emplea un semen refrigerado, siempre debe haber sido diluido previamente, debido a la incapacidad que el semen canino de preservarse adecuadamente a 4°C en su propio plasma seminal (Rota y cols., 1995). Root (2005) confirmó la ausencia de motilidad espermática en un eyaculado refrigerado durante 24 y 48 horas sin la adición de ningún diluyente. Los diluyentes pueden prepararse de forma manual o bien obtenerse de fuentes comerciales que los fabrican exclusivamente para diluir el semen canino.

Los diluyentes manuales son aquellos preparados en laboratorios o clínicas particulares; presentan el inconveniente de tener que elaborarse mediante técnicas concretas, si bien muchas veces no conllevan los controles de calidad apropiados para garantizar la calidad seminal. Por otro lado, los diluyentes comerciales (CLONE) formulados de forma secreta y registrados, suelen ser caros, pero más homogéneos en su producción (Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007). No obstante, se ha evaluado la motilidad de los espermatozoides almacenados a 5°C tras ser diluidos con diluyentes elaborados a base de Tris, glucosa y yema de huevo al 20% o diluyentes

comercializados con CLONE, obteniéndose mejores resultados con los diluyentes a base de Tris-glucosa-yema de huevo (Shahiduzzaman y Linde-Forsberg, 2007).

Con respecto a los diluyentes fabricados en laboratorio para la especie canina, entre los más utilizados se encuentran aquellos elaborados a base de Tris-citrato, azúcares (glucosa/fructosa) y yema de huevo, donde la yema de huevo adquiere gran importancia gracias a su efecto protector en los parámetros de motilidad espermática a 4°C (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c). Ejemplos de ellos son los utilizados por Peña y cols. (2006) a base de Tris, glucosa, ácido cítrico, de yema de huevo al 20%, penicilina y dihidroestreptomycin, mientras que otros autores además han hecho uso de otros diluyentes donde la glucosa era sustituida por la fructosa (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c). En relación al uso de uno u otro azúcar, Ponglowhapan y Chatdarong (2004) comprobaron que el consumo espermático de glucosa es mayor que el de fructosa, siendo los diluyentes compuestos con fructosa los mejores para la refrigeración del semen canino a lo largo del tiempo.

Otros estudios han valorado la adición de sustancias que habitualmente no forman parte de los diluyentes, con objeto de diseñar un diluyente de refrigeración más óptimo. Con este fin, algunos trabajos han testado los efectos que sobre la motilidad tiene el incluir detergentes como el Equex STM en diluyentes a base de Tris para diluir el semen refrigerado a 5°C a lo largo de 24 horas. Los resultados revelaron que la motilidad se incrementa inicialmente, durante un periodo de tiempo muy corto, para disminuir rápidamente (Nizanski y cols., 2009). De igual forma, se ha evaluado la acción que, la adición de activadores comercializados con el sistema CLONE en los diluyentes de refrigeración, puede tener sobre la supervivencia de los espermatozoides caninos. Los resultados al respecto revelan que la inmovilización que el sistema CLONE produce en los espermatozoides durante su conservación a bajas temperaturas y posterior activación, no prolonga el periodo de vida de los mismos, obteniéndose mejores resultados con los diluyentes a base de Tris-glucosa-yema de huevo (Shahiduzzaman y Linde-Forsberg, 2007).

2.6.2.2. Proceso y tasa de dilución

El semen refrigerado se prepara diluyendo el semen fresco con el diluyente seleccionado, si bien la concentración de dilución ideal no se ha determinado con exactitud en la especie canina. Algunos autores (Root, 2005a) describen una tasa de dilución 1:1, es decir 1 parte de semen por 1 parte de diluyente. Por el contrario, otros trabajos proponen una tasa de dilución 1:3 o 1:5 (1 de semen por 3 o 5 partes de diluyente, respectivamente) en función de las concentraciones espermáticas del semen y del volumen final que se quiera conseguir (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c; Peña y cols., 2006). En el caso de los diluyentes comerciales, debe seguirse las recomendaciones del fabricante (Root, 2005a).

2.6.2.3. Conservación del semen refrigerado

El efecto del frío, combinado con un adecuado diluyente de refrigeración, permite que el semen pueda conservar sus características a lo largo del tiempo. Para ello, tras la correspondiente dilución, el semen se enfría a 5°C gradualmente, durante un periodo de 30 a 60 minutos y, luego, se almacena a dicha temperatura (Feldman y Nelson, 2007). Para alcanzar un descenso muy lento, algunos autores prefieren sumergir el semen diluido durante 3 a 4 horas en un recipiente con agua antes de someterlo a refrigeración, previniendo así el shock frío y las variaciones de temperaturas (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c; Peña y cols., 2006). De esta forma, cuando la dilución se realiza de forma adecuada, los espermatozoides diluidos y conservados en frío tienen la capacidad de ser perfectamente viables durante 24 horas, si bien pueden mantenerse hasta 5 días en función de la técnica utilizada (England y Ponzio, 1996).

Otros autores afirman que a temperaturas de 4°C, el semen puede conservarse al menos durante 5 y 7 días, manteniendo intacta las características de motilidad y la integridad de la membrana plasmática durante ese tiempo, para disminuir progresivamente a partir de ese momento; no obstante, siempre se recomienda su uso antes de las 48 horas (Peña y cols., 2006). Asimismo, también se describen buenos resultados de calidad en semen preservado hasta 10 días con buffer Tris-glucosa suplementado con yema de huevo (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c). Además, se ha comprobado que en el semen canino refrigerado con medio Tris-glucosa-yema de huevo, la suplementación con medio nuevo a los días 11 y 21 permite prolongar la viabilidad (la motilidad) del semen hasta las 3 semanas (Verstegen y cols., 2005).

2.6.2.4. Transporte de semen refrigerado

Este tipo de conservación de los espermatozoides a corto plazo, facilita el envío del semen a largas distancias, permitiendo reducir los inconvenientes derivados del transporte de animales o del semen congelado. Para ello, la muestra procesada debe colocarse en un recipiente pequeño y almacenarse en un contenedor térmico que mantenga la temperatura alrededor de los 5°C durante el transporte (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Este tipo de contenedores diseñados para ser sencillos de transportar, suelen comercializarse en forma de caja acolchada que contienen algún dispositivo de frío como bloques de hielo y una región reservada a mantener protegido el semen procesado (Root, 2005a).

Al igual que sucedía para los diluyentes, existen contenedores comerciales para el transporte de semen refrigerado que, en ocasiones, forman parte de un kit que incluye diluyentes y contenedor de transporte. En relación a esto, se llevaron a cabo estudios para establecer el contenedor comercial que mejor preservaba la calidad seminal; así, López y cols. (2009) compararon la influencia que el almacenamiento en Thermo flask, Styrofoam box (Minitüb) o Equitainer® (Minitub) tenía sobre el semen refrigerado con medio Tris-fructosa-yema de huevo y almacenado en los mismos durante 24, 48 y 72 horas, determinando que el mejor contenedor comercial para el transporte más de 48 horas era el Equitainer®.

Finalmente, se hace preciso reiterar que, ya que no todos los eyaculados de perros reproductores son capaces de soportar su dilución con diluyentes ni el procesado para la refrigeración, resulta imprescindible calentar a 37°C y verificar la viabilidad de los espermatozoides del semen diluido antes de su uso para inseminar (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007).

2.6.3. Semen congelado

2.6.3.1. Criobiología espermática

En la actualidad, la posibilidad de conservar el semen canino a largo plazo mediante la congelación se ha convertido en una opción cada vez más ampliamente utilizada. Las ventajas de la congelación seminal en esta especie incluyen aspectos como la difusión de los rasgos genéticos de determinados ejemplares a lo largo de tiempo y del espacio, eliminando la necesidad de transportar a las hembras para inseminar y permitiendo el comercio del semen y la creación de bancos de genes. Además, esta técnica permite la prevención de enfermedades, la

posibilidad de prescindir de la presencia de machos en lugares de investigación y criaderos, etc... (Peña y cols., 2006; Feldman y Nelson, 2007).

Por otro lado, esta técnica sigue presentando una serie de limitaciones derivadas de los índices de fertilidad obtenidos en comparación a los existentes en otras especies como el vacuno. Asimismo, es preciso valorar otros aspectos como la diferencias de tamaño entre animales o las características del semen en cuanto a su morfología, comportamiento y peculiaridades bioquímicas (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Todo ello se traduce en una falta de estandarización en la metodología de congelación-descongelación derivada de las variaciones intrínsecas en las propiedades del semen; entre ellas, se podría citar el diferente grado de sensibilidad de los espermatozoides e individuos, que hacen que exista una respuesta celular inconstante a la criopreservación (Petrunkina y cols., 2004; Elts, 2005). Por otro lado, a esto se suma la problemática derivada de la carencia de uniformidad por parte de los diferentes grupos de investigación en el proceso de crio-preservación, sobre todo en aspectos relacionados con la composición de los diluyentes y los protocolos de congelación, a los que se añade la falta de repetibilidad de los experimentos entre individuos y laboratorios (Farstad, 2009). En cualquier caso, todo proceso de congelación seminal conlleva un descenso en la calidad espermática, por lo que el nivel de éxito viene determinado por el grado de viabilidad que los espermatozoides conserven post congelación-descongelación.

Independientemente de los inconvenientes citados, en la especie canina, se considera que cuando el almacenaje y transporte del semen requiere más de 5 días para su uso, en lugar de la refrigeración, la mejor opción pasa a ser la congelación del semen (England y Ponzio, 1996). El tiempo máximo de almacenamiento sigue por determinarse, aunque algunos autores describen que las dosis seminales congeladas pueden conservarse en congelación hasta 10 años, sin presentar prácticamente reducción alguna en parámetros como la motilidad espermática (Feldman y Nelson, 2007).

2.6.3.2. Contrastación de las muestras seminales previo al proceso de congelación

A lo largo de la congelación, los espermatozoides sufren un proceso inevitable de disminución de su viabilidad, y el porcentaje de motilidad progresiva disminuye considerablemente con la congelación y descongelación. En consecuencia, sólo el semen de excelente calidad, con un número de espermatozoides adecuados y un porcentaje por encima del 70% de motilidad progresiva debería considerarse aptos para la congelación y, por tanto, desechar los eyaculados

frescos de baja calidad que no son capaces de soportar este tipo de procesado, siendo prácticamente inservibles tras la descongelación. Es por ello que antes de comenzar con el proceso de congelación seminal, siempre se debe realizar una correcta evaluación de todo semen considerado interesante de criopreservarse (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

En función de la metodología de trabajo, pueden diferir los parámetros evaluados para decidir si una muestra de semen se debe someter al proceso congelación. Sin embargo, la mayor parte de los estudios tienen en común que se debería realizar la valoración del volumen, la motilidad espermática (subjetiva o mediante sistemas computerizados), la concentración, la vitalidad y/o la morfología espermáticas (England y Ponzio, 1996; Ivanova-Kicheva y cols. 1997; Peña y cols., 1998a, b; Hori y cols., 2006; Martins-Bessa y cols., 2009). En base a estos parámetros, cada estudio establece sus propios requisitos a la hora de determinar si un semen presenta la suficiente calidad para ser o no congelado. Así, Martins-Bessa y cols. (2006) solo procesaban eyaculados que presentasen al menos un 75% de motilidad progresiva, un 75% de espermatozoides de morfología normal y una concentración de 250×10^6 de espermatozoides totales, mientras Peña y cols. (2003) congelaban eyaculados con valores medios de motilidades y de células normales en torno al 85% y concentraciones de entre 250 y 450 millones de espermatozoides aproximadamente. Otros trabajos establecen los valores medios para considerar un semen canino apto cuando se encuentran en más de 80% de motilidad y por encima del 80% de espermatozoides de morfología normal (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006).

2.6.3.3. Dilución de eyaculados, proceso y tasa de dilución

Antes de comenzar con la dilución y procesado de los espermatozoides, algunos autores realizan “lavados” del semen. Este proceso tiene por objeto eliminar el plasma seminal antes de resuspender el pellet con el correspondiente diluyente de congelación. Peña y cols. (2006), tras la recogida seminal, diluyen el semen con un diluyente a base de Tris, glucosa, ácido cítrico y antibióticos en proporción 1:1, centrifuga durante 8 minutos a 700 g y elimina el plasma seminal. Sin embargo, otros autores prefieren centrifugar directamente el semen a 700 g durante 5-6 minutos, sin añadir ningún tipo de medio previamente (Peña y cols., 2003; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Martins-Bessa y cols., 2006; Rota y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006).

A continuación debe definirse el volumen de diluyente que debe añadirse a la muestra de semen para almacenar una cantidad determinada de espermatozoides por dosis seminal, lo que se conoce como tasa de dilución; este parámetro puede variar dependiendo del grupo de trabajo. Un estudio sobre el grado de dilución óptimo para obtener una mejor calidad de semen post-descongelación, evaluó la respuesta del mismo al congelarse en diluciones de 50, 100, 200 y 400 millones de espermatozoides por mililitro, estimándose que los mejores resultados se obtenían cuando la concentración de la dilución seminal a criopreservar era de 200×10^6 espermatozoides/ml (Peña y Linde-Forsberg, 2000a). Otros autores (Peña y cols., 2003; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Peña y cols., 2006) diluyen el semen de forma que obtienen una concentración final de 150-200 millones de espermatozoides/ml, mientras que otros trabajos prefieren utilizar concentraciones inferiores como $50-80 \times 10^6$ espermatozoides/ml (Martins-Bessa y cols., 2006; Martins-Bessa y cols., 2007; Martins-Bessa y cols., 2009). No obstante, Okano y cols. (2004) no encontraron influencia del ratio de dilución y la concentración de espermatozoides/ml de dilución final, sobre las características del semen ras la descongelación.

2.6.3.4. Principales diluyentes utilizados en congelación seminal en el perro

La principal diferencia entre los diluyentes de refrigeración y los de congelación viene determinada por el uso que en estos últimos se hace de los crioprotectores, sustancias que ayudan a mantener la integridad de la membrana celular durante los procesos de congelación-descongelación (Root, 2005a). De ahí, que la composición y el uso de los diluyentes intervengan directamente en la congelabilidad del semen, si bien no tienen la capacidad de mejorar directamente su cualidades para ser congelado cuando la calidad seminal es deficiente (Farstad, 2009).

Al igual que sucede para los protocolos, tasas y métodos de congelación, existen diversas propuestas para fabricar los diluyentes de congelación para el semen canino (Root, 2005a). Así, los diluyentes más habitualmente empleados para la congelación seminal en la especie canina, suelen estar compuestos por una mezcla de un buffer como el Tris, ácido cítrico, una fuente de energía a base de glucosa o fructosa, protectores de membrana como la yema de huevo y agentes crioprotectores como el glicerol (Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006; Farstad, 2009).

El glicerol es el crioprotector más frecuentemente utilizado para la congelación seminal en diferentes especies, entre ellas la canina (Silva y cols., 2003). La adición del glicerol, y el papel que este juega sobre la calidad del semen en la descongelación, es uno de los aspectos más limitantes en el proceso de criopreservación y, por tanto, uno de los más estudiados (Peña y cols., 1998b; Peña y Linde-Forsberg, 2000b; Silva y cols., 2003; Martins-Bessa y cols., 2006; Peña y cols., 2006; Rota y cols., 2006; Silva y cols., 2006). Los espermatozoides caninos son de los que mayor tolerancia presentan al glicerol (Peña y cols., 2006), soportando concentraciones de entre 4 y 5% y, por tanto, sobrellevando ratios de congelación más bajos (20-30°C min), si bien se ha determinado que la motilidad espermática y la integridad del acrosoma era superiores cuando el diluyente estaba compuesto por un 8% de glicerol (Peña y cols., 1998b).

Por otro lado, también se han realizado estudios para determinar la forma ideal de adicionar los diluyentes glicerolados al semen a criopreservar con el fin de minimizar el deterioro del mismo. Para determinar la manera más adecuada, se ha comparado los efectos que sobre la calidad del semen canino tenía el añadir el diluyente glicerolado en 1 solo paso o en 3 pasos a intervalos de 5 minutos (Silva y cols., 2003), como se suele hacer en otras especies como el caprino (Batista y cols., 2006; Batista y cols., 2009); los resultados indican que no existen diferencias importantes en la forma de añadir el diluyente, recomendándose, por tanto, la adición de 1 sola vez en base a su sencillez y practicidad (Silva y cols., 2003).

El Equex representa uno de los componentes cruciales en la elaboración de los diluyentes seminales empleados en la congelación. De hecho, se ha comprobado como el uso del Equex STM Paste genera que los espermatozoides vivos tras la descongelación presenten una elevada concentración de calcio intracelular, siendo probable que este hecho sea un signo de crio-capacitación y de funcionalidad espermática, manteniendo la motilidad y la vitalidad durante largos periodos de tiempo (Peña, 2004). De hecho, estudios sobre los indicadores de viabilidad del semen canino demuestran que cuando los diluyentes contienen Equex, la termorresistencia de los espermatozoides aumenta considerablemente, incrementándose de forma más pronunciada cuando éste se adiciona tras el adecuado periodo de equilibrado, es decir, justo antes de la congelación (Peña y Linde-Forsberg, 2000b).

A lo largo de la historia de la tecnología seminal los protocolos de congelación seminal y, por tanto, los diluyentes utilizados para este fin han ido modificándose paulatinamente. Uno de los más conocidos es el “diluyente de Andersen” elaborado a partir de 240 mM de Tris, 63 mM

de ácido cítrico, 70mM de fructosa, 8% de glicerol y 20% de yema de huevo (Yildiz y cols., 2000; Hewitt y cols., 2001; Milani y cols., 2010). Sin embargo, en la actualidad, el diluyente más utilizado es el “diluyente Upssala” (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Batista y cols., 2006; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006), que consta de dos diluyentes compuestos como a continuación se describe:

- Diluyente 1: 2.4 g de Tris, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na bencilpenicilina, 0.1 g de estreptomicina sulfato, 20 ml de yema de huevo, 3 ml de glicerol (es decir, un 3% de glicerol) y hasta 100 ml de agua destilada.
- Diluyente 2: 2.4 g de Tris, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na bencilpenicilina, 0.1 g de estreptomicina sulfato, 20 ml de yema de huevo, 7 ml de glicerol (es decir, un 7% de glicerol), un 1% (v/v) de Equex STM Paste y hasta 100 ml de agua destilada.

No obstante, al igual que ocurría para el semen refrigerado existen diversas fórmulas comerciales destinadas a este uso, como el Freezing Medium, TEST York Buffer con glicerol 9971 de Irvine Scientific (Root, 2005a). Otro de los diluyentes comerciales más conocidos en la congelación del semen en la especie canina es el perteneciente al sistema CLONE (Cryogenetics Laboratories, New England). Este método de congelación comercial fue evaluado tras utilizarlo para crioconservar el semen canino, y los resultados concluyeron que la resistencia térmica era menor y la degradación acrosómica mayor cuando el semen era congelado con CLONE en lugar de procesado con diluyentes compuestos a base de Tris, fructosa, ácido cítrico, glicerol y huevo (Ström y cols., 1997).

2.6.3.5. Periodo de equilibrado y envasado del semen

Tras la correcta dilución, el semen procesado debe comenzar a descender progresivamente su temperatura para adaptarse de forma paulatina a estos cambios, evitando posibles daños por shock térmico antes de la congelación (Álamo, 2007); es lo que se conoce con el nombre de periodo de equilibrado.

El periodo de equilibrado puede realizarse en distintos etapas del proceso y con una duración variable. Si se utilizan diluyentes de congelación que incluyan detergentes tipo Equex, el procedimiento requiere de un período de equilibrado entre la adición del diluyente I (sin Equex) y del diluyente II (con Equex). De este modo, tras añadir al semen un diluyente glicerolado a temperatura ambiente, se realiza un periodo de equilibrado a 4-5°C durante 60-75 minutos para

posteriormente añadir en frío la correspondiente fracción del diluyente con el Equex (Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Martins-Bessa y cols., 2006; Peña y cols., 2006; Rota y cols., 2006; Martins-Bessa y cols., 2007), en ocasiones esperando incluso hasta 2 horas (Schäfer-Somi y cols., 2006). Asimismo, en alguno de los trabajos donde se usa el Equex en el segundo diluyente, se puede considerar que existe otro período de equilibrado de menor duración tras esta parte final de la dilución. En estos casos, antes almacenar el semen, y tras añadir el segundo diluyente, debemos esperar a 4°C durante 10 (Rota y cols., 2006) o 15 minutos (Peña y cols., 2003). Otros autores prefieren equilibrar el semen a la misma temperatura pero durante un mayor periodo de tiempo, hasta 3 horas (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

Es por ello que, dependiendo del protocolo de congelación, se pueden combinar diferentes tiempos de equilibrado, tanto previos como posteriores a la adición del diluyente I y II. Un estudio sobre este aspecto, realizado con los diluyentes elaborados a partir de los compuestos más habituales (Tris, citrato, glucosa y yema de huevo) determinó que los mejores resultados se alcanzaban cuando se combinaba el enfriamiento del semen a 4°C durante 2 a 3 horas previa adición del diluyente II y, posteriormente 1 hora de periodo de equilibrado con el mismo. Sin embargo, cuando esta etapa de frío era de 3 horas, el efecto del periodo de equilibrado cuando éste se encontraba entre 0 y 4 horas era inexistente (Okano y cols., 2004).

Tras la correspondiente dilución y equilibrado, debe realizarse el almacenaje del semen en dosis individuales. En la especie canina, el semen puede ser congelado en pellets, ampollas de vidrio o pajuelas, si bien la elección de uno u otro dependerá del grupo de investigación y la metodología de congelación.

Los pellets, denominados también “píldoras” se forman cuando el semen refrigerado se deposita en alícuotas de 50 o 100 µl dentro de orificios existentes en placas de hielo seco, almacenándose posteriormente en recipientes de nailon perforados en nitrógeno líquido (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007), obteniéndose los mejores resultados de supervivencia espermática cuando el volumen del pellet congelado en hielo seco era de 100 µl (Fahrig, 2000). Sin embargo, los pellets de hielo seco han sido evaluados frente al uso de tubos de aluminio de 5 ml como alternativa para el almacenaje del semen a congelar, confirmándose que en el semen criopreservado en los tubos presentaban una mejor calidad que los pellets (Ivanova-Kicheva y cols. 1997).

No obstante, el método de almacenaje más habitual consiste en depositar el semen en pajuelas de polivinilcloruro que se rellenan con el semen equilibrado, dejando siempre una cámara de aire (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Existen 2 formatos de pajuelas, pudiendo encontrarlas de 0.25 o 0.5 ml; el uso de uno u otro formato depende del grupo de trabajo; así, Silva y cols. (2003, 2006) hicieron uso de pajuelas de 0.25 ml para el almacenaje del semen canino. Sin embargo, la mayor parte de los trabajos realizados sobre congelación seminal de la especie canina utilizan pajuelas de 0.5 ml para almacenar el semen a criopreservar (Peña y cols., 2003; Martins-Bessa y cols., 2006; Rota y cols., 2006; Milani y cols., 2010). Además, estudios al respecto aconsejan la utilización de pajuelas de 0.5 ml en lugar de las de 0.25 ml, tras demostrar que la motilidad espermática, 60 minutos tras su descongelación, era mayor en el semen conservado en pajuelas de 0.5 ml en comparación con las pajuelas de 0.25 ml, mientras que el porcentaje de acrosomas anormales era inferior (Nöthling y Shuttleworth, 2005).

2.6.3.6. Congelación en nitrógeno líquido

Una vez finalizado el período de equilibrado y envasado del semen, se comienza con el proceso de congelación en sí. Este paso es crucial para el semen, ya que el descenso de temperatura que se produzca durante esta etapa va a determinar la supervivencia y calidad seminal post-descongelación, si bien el semen de cada individuo presenta diferente respuesta a este proceso. Para llevar a cabo la criopreservación en la especie canina, el método más estandarizado es la congelación mediante el uso de nitrógeno líquido en caja de poliestireno.

El proceso comienza con la colocación de las pajuelas a cierta distancia sobre la superficie del nitrógeno líquido durante un periodo de tiempo concreto. Para ello, habitualmente se suele hacer uso de un dispositivo metálico en forma de rejilla o bandeja que permite el paso de los vapores de nitrógeno hasta las pajuelas colocadas en el mismo (Álamo, 2007). La distancia que separa el nitrógeno y las pajuelas, así como la duración de esta fase depende del equipo de trabajo. Así, uno de los protocolos más utilizados es depositarlas durante 10 minutos a 4 cm sobre su superficie, dejando que los vapores de nitrógeno líquido hagan su efecto (England y Ponzio, 1996; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y cols., 2003; Martins-Bessa y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006). Por el contrario, algunos autores aconsejan situar las pajuelas a 8 cm del nitrógeno líquido durante 10-15 minutos (Okano y cols., 2004; Nöthling y Shuttleworth, 2005; Nöthling y cols., 2007), mientras que otros (Silva y cols., 2003; Silva y cols., 2006) prefieren situar las pajuelas a 5 cm del nitrógeno sólo durante un periodo de 5 minutos, si bien en

este caso, a diferencia del resto de autores citados, se hacía uso de pajuelas de 0.25 ml. No obstante, un trabajo realizado con el fin de estandarizar esta fase del proceso, evaluaba las características del semen congelado en pajuelas que habían sido sometidas a diferentes distancias sobre los vapores de nitrógeno (5, 7 y 15 cm) durante distintos periodos de tiempo (5, 10 y 15 minutos), describió que la mejor calidad la presentaban aquellos dosis seminales situadas a 7 cm durante 10 minutos y a 10 cm durante 15 minutos (Hori y cols., 2006).

Transcurrida la fase de vapores de nitrógeno, las pajuelas debe sumergirse directamente en nitrógeno líquido (Martins-Bessa y cols., 2006; Peña y cols., 2006; Rota y cols., 2006). Posteriormente, el proceso finaliza con el almacenamiento e inventario de las dosis seminales congeladas, debiendo realizarse un exhaustivo control del número de dosis, la localización de las mismas y monitorización habitual del tanque de nitrógeno para comprobar que los niveles sean los suficientes para mantener la temperatura a -196°C (Root, 2005a).

2.6.3.7. Congelación en ultracongeladores

Como resultado de la continua evolución en el campo de la tecnología y la criopreservación seminal, han aparecido nuevos sistemas de almacenamiento y conservación del semen que suponen una alternativa factible al tradicional uso del nitrógeno líquido como única posibilidad de crio-preservación seminal. Concretamente la utilización de ultracongeladores ya ha mostrado su eficacia en la preservación del semen en diferentes especies. Los ultracongeladores son congeladores capaces de adquirir temperaturas inferiores a las habituales, lo que permite la preservación de diferentes materiales de origen biológico. Existen diferentes modelos que pueden alcanzar distintas temperaturas; sin embargo, para la congelación seminal, los ultracongeladores de -152°C han demostrado ser eficaces para la conservación de semen en la especie caprina y canina (Medrano y cols., 2002; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2011).

El estudio de este tipo de congeladores comenzó cuando Medrano y cols. (2002), demostraron la posibilidad de criopreservar el semen de macho cabrío en los ultracongeladores de -152°C durante 2 meses. Estos resultados fueron evaluados posteriormente *in vitro* e *in vivo*, confirmando la eficiencia de este tipo de dispositivos para la congelación y almacenaje del semen caprino, evaluando su eficacia en muestras conservadas hasta 1 año en ultracongeladores de -152°C (Batista y cols. 2009). En la especie canina, uno de los primeros estudios fue realizado por Álamo y cols. (2005) al comprobar que la calidad del semen congelado y almacenado en ultracongelador durante 4 meses se mantuvo en niveles

equiparables a los crio-preservados en nitrógeno líquido. Posteriormente, otro estudio realizado en el Dogo Canario se encargó de valorar los parámetros de dosis seminales congeladas y criopreservadas durante 8 meses mediante esta técnica, confirmando que el uso de ultracongeladores a -152°C es una alternativa potencial al nitrógeno líquido para almacenar el semen canino por largos periodos de tiempo (Batista y cols., 2006).

Entre las ventajas de utilizar este procedimiento con respecto a la congelación convencional con nitrógeno líquido se encuentran la gran capacidad de almacenaje, la reducción en el tiempo de trabajo tras el periodo de equilibrado y la simplificación del proceso que evita los riesgos asociados al manejo del nitrógeno líquido (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006). Además, otro inconveniente de los problemas que conlleva la crioconservación con nitrógeno líquido es la reposición periódica que se debe realizar, lo que supone un importante coste económico, frente al coste global que requiere la adquisición de un ultracongelador. En base a estas premisas, se proponen los ultracongeladores a -152°C como una alternativa frente al uso tradicional del nitrógeno líquido en los procesos de congelación y criopreservación del semen canino (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006). No obstante, aunque este dispositivo presente numerosas ventajas, existen muchos factores que deben ser evaluados antes de considerar la congelación y conservación de semen a -152°C una alternativa viable, como el costo del congelador, el gasto de electricidad y el riesgo de interrupciones de la corriente eléctrica (Medrano y cols., 2002).

2.6.3.8. Transporte del semen congelado

En general, la forma más habitual de trasladar el semen congelado es mediante el uso de criocontenedores de nitrógeno líquido de volumen variable o criocontenedores de nitrógeno seco. Sin embargo, existen muy pocos trabajos sobre el transporte de semen congelado en criocontenedores de nitrógeno seco y los efectos que sobre la calidad del semen post-descongelación tienen estos sistemas (Root, 2005a). Algunos trabajos desarrollados en bovino, han validado este tipo de dispositivos para el transporte de embriones y semen, concluyendo que los vapores de nitrógeno líquido presentes en los tanques de nitrógeno seco suponen una forma segura de almacenar por un corto de tiempo este tipo de muestras biológicas, sin peligro de contaminación bacteriana o vírica (Bielanski, 2005).

Este tipo de dispositivo consiste en un tanque (con diferentes tamaños) con las paredes revestidas con una sustancia capaz de absorber el nitrógeno líquido. Por tanto, este tipo de dispositivos, sin contener propiamente nitrógeno líquido, son capaces de mantener la temperatura interior cercana a -196°C , conservando las muestras a estas temperaturas por un corto periodo de tiempo. A diferencia de los contenedores de transporte tradicionales basados en el almacenamiento y transporte de las muestras sumergidas en nitrógeno líquido, en el caso de los tanques de nitrógeno seco, al no utilizar esta sustancia en estado líquido, las compañías aéreas y de transporte permiten su transporte sin problemas. Una vez en el lugar de destino, las muestras deben transferirse a un tanque de almacenaje con nitrógeno líquido (Root, 2005a) o bien utilizar las muestras en un breve periodo de tiempo.

2.7. DESCONGELACIÓN Y CONTRASTACIÓN SEMINAL POST-CONGELACIÓN.

2.7.1. Procedimiento de descongelación

El proceso de descongelación seminal, al igual que ocurre con los procesos de congelación, puede variar mucho dependiendo de la metodología de trabajo, del procedimiento de envasado del semen, etc. Esta fase del proceso es crítica, ya que influye al mismo nivel que la congelación en la supervivencia espermática. En cualquier caso, cuando el semen congelado es enviado para ser usado en otro laboratorio o clínica, es recomendable seguir las instrucciones de descongelación del responsable de la congelación para limitar generar daños en el semen (Root, 2005a; Eilts, 2005; Feldman y Nelson, 2007). Además, se han descrito que existen variaciones significativas entre perros, por lo que es imposible diseñar un sistema estandarizado de descongelación (Yu y cols., 2002).

De manera general, el fundamento de este proceso implica que si una muestra seminal ha experimentado un proceso de congelación con cambios rápidos de temperaturas, también va a requerir de una descongelación rápida para revertir el balance osmótico, así como rehidratar y restaurar la configuración de los lípidos y las proteínas de la membrana, de forma similar a los cambios sufridos durante la congelación. Sin embargo, existen multitud de protocolos de descongelación, que difieren, entre otras cosas, en función del dispositivo de almacenamiento utilizado para congelar el semen (Farstad, 1996). Así, cuando el semen se encuentra criopreservado en forma de pellets congelados en nitrógeno seco, la forma habitual de realizar la descongelación consiste en sumergir el pellet durante 5 segundos en 0.5 ml de una solución de cloruro sódico al 0.9%, atemperada a 55°C . Otros autores prefieren introducir el pellet en un tubo eppendorf con 1 ml de solución a 37°C (dilución 1:3), y agitar vigorosamente durante 30

segundos (Fahring, 2000). Cuando el sistema de envasado es mediante tubos de aluminio, la descongelación suele llevarse a cabo por inmersión y agitación de los tubos en baño María a 65°C durante 12-15 segundos (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

Sin embargo, como las pajuelas son el principal método de envasado del semen, es aquí donde se observan una mayor variedad de protocolos de descongelación, con evidentes variaciones con respecto a la temperatura de descongelación, así como el tiempo a la que las dosis seminales deben ser sometidas a esa temperatura. Independientemente de estos factores, la descongelación siempre se realiza de la misma forma, es decir, sumergiendo las pajuelas en Baño María. En caso de utilizarse pajuelas de 0.25 ml, el método de descongelación habitualmente descrito es a 37°C durante 30 segundos (Yildiz y cols., 2000) o 39°C durante ese mismo periodo de tiempo (Hewitt y cols., 2001); sin embargo, si el volumen de envasado de la pajuela asciende a 2.5 ml, el semen debe ser descongelado durante 45 segundos a temperatura de 50°C (Thomas y cols., 1993). No obstante, las pajuelas más utilizadas son las de 0.5 ml y, por tanto, para las que se han descrito más variedad de protocolos de descongelación, entre los que podemos encontrar:

- Temperatura de 38°C durante 30 segundos (Thomas y cols., 1993; Petrunkina y cols., 2004; Layne y cols., 2008)
- Temperatura de 37°C durante 45 segundos (Hori y cols. 2006).
- Temperatura de 37-38°C durante 60 segundos (Rota y cols., 1997; Silva y cols., 2003; Oliveira y cols., 2006; Rota y cols., 2006; Milani y cols., 2010).
- Temperatura de 39°C durante 30 segundos (Hewitt y cols., 2001).
- Temperatura de 50°C durante 10 segundos (Root, 2005a).
- Temperatura de 70°C durante 8 segundos (Ström y cols., 1997; Peña y cols., 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Martins-Bessa y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006).
- Temperatura de 70°C durante 6 segundos (Hay y cols., 1997)
- Temperatura de 75°C durante 7 segundos (Oliveira y cols., 2006).

Asimismo, algunos estudios que comparan diferentes temperaturas de descongelación para un semen procesado y sometido a idénticas condiciones, sugieren que la eficiencia de la supervivencia celular post-descongelación puede mejorar cuando la temperatura de descongelación se encuentra bien ajustada (Oliveira y cols., 2006). Un estudio más específico, comparó dos temperaturas de descongelación (37°C durante 2 minutos y 70°C durante 5

segundos), concluyendo que cuando se usan pajuelas de 0.5 ml como método de envasado, la temperatura de descongelación más apropiada es 70°C (Nöthling y Shuttleworth, 2005). Posteriormente, este mismo autor evaluó el efecto de descongelar el semen con temperaturas más elevadas (98°C) durante 6.5 segundos, comprobando que la calidad seminal es peor que cuando este procedimiento se lleva a cabo a 70°C durante 8 segundos (Nöthling y cols., 2007).

2.7.2. Dilución y longevidad del semen descongelado

El siguiente paso en el proceso de descongelación sería diluir el semen descongelado en una sustancia tampón, siempre atemperada a 37-38°C, para conseguir una correcta activación del semen, incrementándose su motilidad y vitalidad post-congelación.

Si el semen ha sido descongelado en pellet, la dilución resultante de la descongelación con cloruro sódico es suficiente para mantenerla en incubación, sin necesidad de añadir ninguna otra sustancia. Esta dilución se desarrolla de igual forma si el sistema de almacenaje es a base de tubos de aluminio de 5 ml, donde se prescinde de cualquier medio para la dilución del semen post-descongelación (Ivanova-Kicheva y cols., 1997). Por el contrario, cuando el procedimiento de envasado ha sido la pajuela, en la mayor parte de los casos se realiza una dilución del semen descongelado. Uno de los medios más utilizados para esta fase es el denominado Tris buffer, compuesto por 2.4 g de Tris, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na bencilpenicilina y 0.1 g de estreptomicina sulfato en 100 ml de agua destilada (Rota y cols., 1997; Peña y cols., 1999; Álamo y cols., 2005; Rota y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006). Sin embargo, otros autores han preferido utilizar sustancias biológicas, como el fluido prostático, para diluir el semen tras la descongelación, comprobando que el éxito de fertilidad era superior cuando el semen era diluido con fluido prostático que cuando no se procesaba con ninguna sustancia (Nöthling y cols., 1995).

Algunos autores no realizan una dilución del semen previa evaluación de sus parámetros, puesto que prefieren analizar directamente el semen descongelado tras verterlo en un tubo para que se atempere (Nöthling y Shuttleworth, 2005). No obstante, de manera general, la dilución a realizar dependerá de la concentración espermática a la que se haya congelado previamente el semen. Así, mientras que ciertos trabajos han determinado que para el semen canino congelado a concentraciones de 200×10^6 de espermatozoides/ml, la dilución post-descongelación más adecuada con buffer Tris es de 1:2 o 1:4 (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), otros optan por realizar una dilución 1:1 con medio Uppsala de descongelación atemperado a

38°C, para obtener una concentración final en la dilución de 25×10^6 espermatozoides/ml (Martins-Bessa y cols., 2006). Cuando se utilizan pajuelas de 0.5 ml, con una concentración de 100×10^6 de espermatozoides/ml, se suele realizar una dilución 1:2 (Peña y cols., 1999; Álamo y cols., 2005), si bien en otros estudios se incrementa la tasa de dilución hasta 1:4 (Batista y cols., 2006). Con respecto a la temperatura de conservación del semen tras la descongelación, la mayor parte de los autores utilizan como temperatura de incubación los 37-38°C (Peña y cols., 1999; Álamo y cols., 2005; Martins-Bessa y cols., 2006).

Una vez homogeneizadas las muestras seminales en sus correspondientes diluciones, la conservación de las propiedades del semen durante la incubación representa otra complicada fase (England y Ponzio, 1996; Feldman y Nelson, 2007). De manera general se acepta que la motilidad del semen canino disminuye de forma muy marcada de 30 a 60 minutos post-descongelación; estudios relativamente antiguos (Olar, 1984) referían un detrimento de este parámetro, con valores inferiores al 10% tras 1 hora, observándose a veces incluso una ausencia total de motilidad transcurrido este tiempo. Más recientemente, algunos estudios han intentado determinar la longevidad del semen descongelado a lo largo del tiempo. Silva y cols. (2003) evaluaban muestras de semen descongeladas y conservadas a 37-39°C justo tras la descongelación y hasta 120 minutos tras la misma., obteniendo valores en torno al 20% de motilidad. Asimismo, Peña y cols. (2003) han realizado valoraciones más prolongadas en el tiempo, describiendo que la motilidad espermática total se puede mantener por encima del 50% después de su descongelación e incubación a 38°C.

Con respecto a los efectos de la utilización de distintos diluyentes en el proceso de dilución y las diferentes temperaturas de incubación post-descongelación, se ha descrito que la composición de los diluyentes influye claramente sobre la longevidad de los espermatozoides descongelados, habiéndose confirmado que la adición del Equex STM mejora la viabilidad y longevidad del semen criopreservado durante la incubación a 38°C (Rota y cols., 1997). Por otro lado, en un trabajo realizado en dosis seminales preservadas sin Equex, se realizó un análisis del semen mientras éste se conservaba en incubación a 37°C, concluyendo que la motilidad espermática presentaba unos valores muy bajos transcurridos 2 horas tras la descongelación (Oliveira y cols., 2006).

2.7.3. Contrastación del semen congelado-descongelado

Tras la descongelación seminal debe realizarse una valoración para determinar la influencia del proceso de congelación sobre las características del semen. De manera general, las características más habitualmente utilizados para determinar la calidad seminal post-congelación son la motilidad, la vitalidad y, en muchos casos, la anomalías morfológicas espermáticas y las acrosomías. Las técnicas de valoración son habitualmente las mismas que se utilizan para realizar la contrastación del semen en fresco (Thomas y cols., 1993; Hay y cols., 1997; Rota y cols., 1999; Álamo y cols., 2005; Hori y cols. 2006; Oliveira y cols. 2006).

La motilidad progresiva tras la descongelación es el parámetro más comúnmente evaluado para determinar la calidad de los espermatozoides congelados-descongelados (Johnston y cols., 2001). En general, se considera que el porcentaje de motilidad en una muestra de semen descongelado que muestre una calidad aceptable debe ser superior al 60% (Silva y Verstegen, 1995; Hay y cols., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), si bien otros autores describen que suele encontrarse entre el 50 y 60% (Johnston y cols., 2001) y pocos trabajos asumen una motilidad inferior al 40% de motilidad como valores aceptables (Thomas y cols., 1993; Rota y cols., 1999). Estos porcentajes se mantienen para el semen canino congelado en ultracongeladores de -152°C, donde los resultados se situaron entre el 60 y el 70% (Álamo y cols., 2005; Álamo, 2007; Batista y cols., 2006).

Con respecto al porcentaje de espermatozoides vivos registrados en las muestras de semen canino descongelado, muchos de los trabajos que evalúan éste parámetro lo sitúan en registros próximos o superiores al 80%, independientemente del método de congelación (Silva y Verstegen, 1995; Rota y cols., 1999; Batista y cols., 2006). Por otro lado, algunos estudios además establecen el porcentaje de morfoanomalías y estado del acrosoma, si bien ambos parámetros no son siempre evaluados. En general, se puede decir que los resultados sugieren que el porcentaje de espermatozoides anormales tras descongelación suele ser de hasta un 20-30% (England y Ponzio, 1996; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006). Con respecto a la integridad del acrosoma, los valores presentes en el semen canino post-descongelación, valorados mediante Spermac®, se sitúan entre un 38 y 45% de acrosomas anormales (Nöthling y Shuttleworth, 2005), e incluso valores inferiores al 20% (Álamo y cols., 2005).

2.7.4. Estimulación de la motilidad espermática post-congelación

Como se ha explicado con anterioridad, la calidad del semen tras la descongelación suele ser inferior a la que presentaba en fresco. Este es uno de los aspectos más trabajados en el campo de la investigación, donde se intenta desarrollar distintas técnicas con el objeto de minimizar las consecuencias que la congelación seminal tiene sobre el semen canino.

Así, se han desarrollado algunos estudios que han comprobado que determinados compuestos como la cafeína, la pentoxifilina y la 2'-deoxiadenosina a distintas concentraciones tienen la capacidad de estimular la motilidad al semen canino congelado-descongelado, mientras que el fluido prostático no presenta ningún efecto positivo en los parámetros de motilidad medidos por CASA; no obstante, estos compuestos no consiguen incrementar la longevidad del semen (Milani y cols., 2010). Por el contrario, otros trabajos han obtenido buenos resultados de motilidad después de diluir las muestras en el propio fluido prostático del animal (Rijsselaere y cols., 2003); entre ellos, Nöthling y cols. (1995) obtuvieron un mayor éxito de fertilidad cuando el semen descongelado para inseminar era diluido con fluido prostático que cuando no se procesaba con ninguna sustancia. No obstante, se debe tener en cuenta la calidad del fluido prostático, puesto que se ha demostrado que concentraciones de hematíes superiores al 10% en el fluido prostático, suponía un detrimento en la calidad del semen (Rijsselaere y cols., 2004b).

Finalmente, otros autores han centrado sus estudios en analizar el efecto que la adición de moléculas como la progesterona tienen a la hora de incrementar la reacción acrosómica en los espermatozoides descongelados (Cheng y cols., 2005) o el uso de sustancias biológicas procedentes de la hembra sobre la motilidad del semen (Iguer-ouada, 2001; Verstegen y Iguer-ouada, 2005).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. EXPERIENCIA 1: CARACTERÍSTICAS SEMINALES POST-DESCONGELACIÓN EN MUESTRAS CONSERVADAS EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

3.1.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

Esta primera experiencia se realizó utilizando 8 machos de la raza Dogo Canario. El rango de peso corporal de los ejemplares se situaba entre los 54 y 67 kilogramos (media de 53.86 kg), mientras que la edad de los animales estaba comprendida entre los 2 y los 9 años.

Los ejemplares pertenecían a propietarios particulares que los mantenían en óptimo estado de salud. Todos los perros habían sido correctamente desparasitados frente a vermes intestinales y otras parasitosis comunes en nuestra región (*Dilofilaria immitis*). Asimismo, los animales se encontraban vacunados de acuerdo con el plan de revacunación anual protocolario (Parvovirus, Moquillo, Hepatitis, Adenovirus-2, Parainfluenza, Leptospirosis canícula y Leptospirosis icterohaemorrhagiae y Rabia).

Los perros tenían una alimentación a base de pienso de diferentes casas comerciales y agua *ad libitum*. Su lugar de estancia variaba en función del propietario, pero todos los animales se alojaban en recintos apropiados a su talla, con zonas cubiertas de descanso y áreas de patio exterior con acceso al sol.

Los perros participantes en el estudio eran trasladados a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas, donde se realizaban los ensayos necesarios. Con la finalidad de valorar la funcionalidad reproductiva y descartar cualquier patología en los órganos sexuales, se llevo a cabo una exhaustiva anamnesis de su historia reproductiva y exploración detallada del aparato reproductor. Los parámetros valorados fueron el tamaño, simetría, consistencia y movilidad de ambos testículos y la ausencia de alteraciones en el pene y prepucio que pudiesen impedir o limitar una correcta estimulación sexual. Del mismo modo, se realizó una evaluación prostática, confirmando la ausencia de alteraciones de tamaño, simetría y consistencia, así como su correcta movilidad.

3.1.2. Diseño experimental

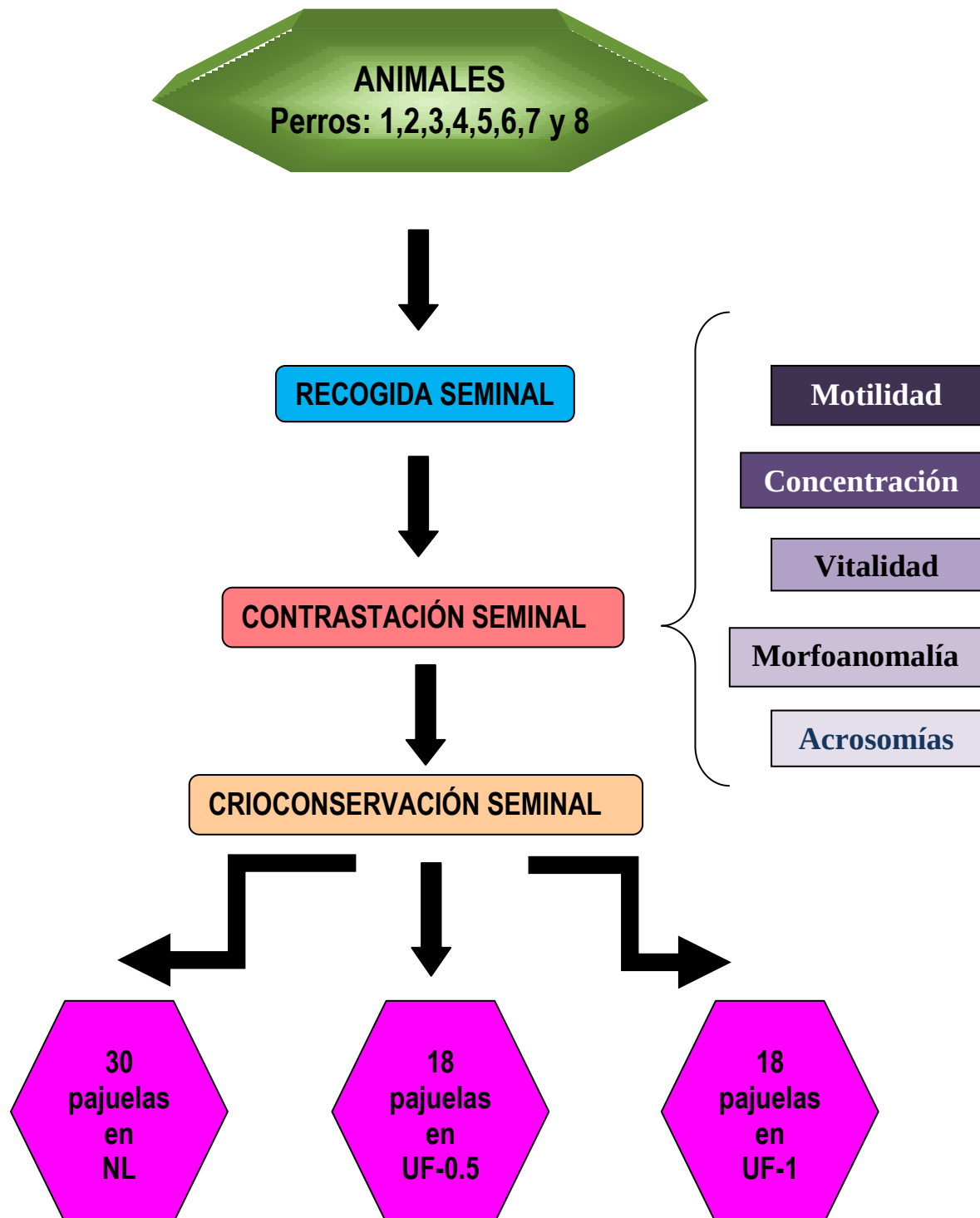
Esta experiencia pretendía definir las características seminales en ejemplares de Dogo Canario, así como determinar la calidad post-congelación en muestras de semen preservadas mediante diferentes protocolos de crioconservación. Concretamente se valoró la calidad seminal post-descongelación comparando muestras preservadas en nitrógeno líquido frente a ultracongeladores de -152°C , así como evaluando la variabilidad individual y la influencia del tiempo de congelación sobre la longevidad del semen.

De esta forma, el primer paso fue obtener los eyaculados que, tras la contrastación seminal correspondiente (volumen, color, motilidad, concentración, vitalidad, acrosomías, morfoanomalías), fueron procesado de forma individual hasta alcanzar una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml (20% yema de huevo, 3% glicerol). Tras esta primera dilución, el semen era dividido en tres alícuotas para ser sometido a tres protocolos de diluyoconservación y crioconservación seminal: grupo A, el semen tenía una concentración final del 0.5% de Equex, 20% yema de huevo y 5% glicerol, siendo crioconservado en nitrógeno líquido; grupo B: el semen tenía una concentración final del 0.5% de Equex, 20% yema de huevo y 5% glicerol, siendo crioconservado en ultracongeladores de -152°C ; grupo C: el semen tenía una concentración final del 1.0% de Equex, 20% yema de huevo y 5% glicerol, siendo crioconservado en ultracongeladores de -152°C . El número de congelaciones realizadas en cada ejemplar osciló entre 3 y 4.

Finalmente, se procedió a determinar la calidad seminal en el semen congelado-descongelado de cada uno de los protocolos, valorando prácticamente los mismos parámetros que en el semen fresco (motilidad, morfoanomalías y acrosomías). Los periodos de evaluación se establecieron tras 1 día, 1 mes, 3 meses, 12 meses y 18 meses tras la congelación.

Las **figuras 3.1 y 3.2** muestran la planificación del trabajo experimental y las valoraciones realizadas en los diferentes grupos.

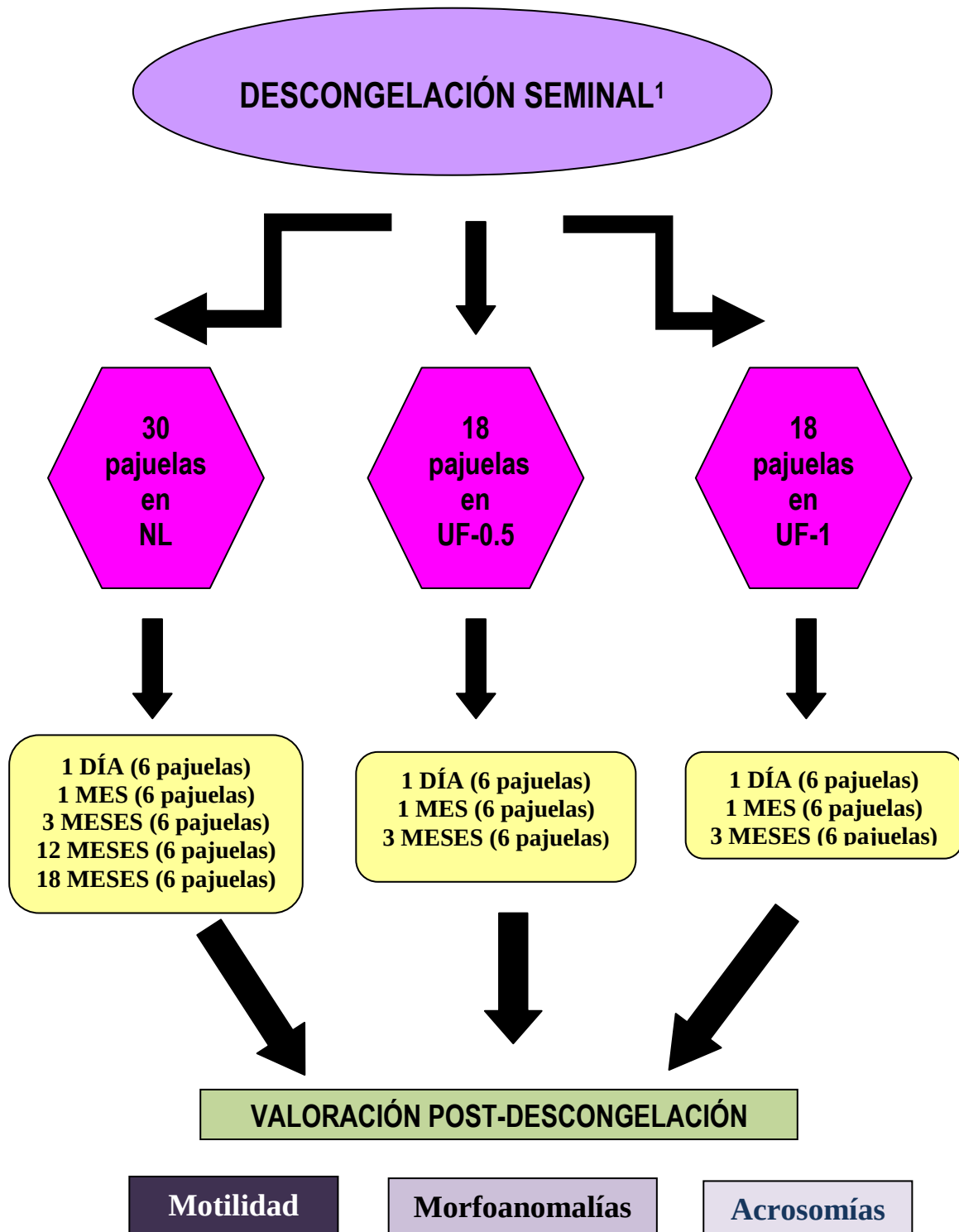
Figura 3.1. Planificación de la recogida de muestras, contrastación y crioconservación seminal



NL: Muestras congeladas y conservadas en nitrógeno líquido

UF: Muestras congeladas y conservadas en ultracongeladores de -152°C, con una concentración final de 0.5% de Equex (UF-0.5) o un 1% de Equex (UF-1)

Figura 3.2. Planificación del procedimiento de la descongelación seminal¹



¹: Esta figura representa el número de pajuelas evaluadas en cada protocolo de criopreservación para cada uno de los 8 ejemplares.

3.1.3. Recogida de semen

Las recogidas seminales se efectuaron durante un periodo de seis meses (Diciembre de 2007-Junio de 2008). El número de recogidas seminales se determinó por la concentración espermática de cada uno de los donantes y, por tanto, variaba en función del animal; si bien siempre se situó en 3-5 recogidas por animal. En todos los machos, se descartaron aquellos eyaculados que presentaban una calidad insuficiente para el estudio o bien cuando la erección no había sido óptima, de forma que si se consideraba inadecuado se repetía la recogida seminal una vez pasados 45 minutos de la primera.

La técnica seleccionada para realizar la recogida seminal fue la estimulación manual sobre el pene. Con el comienzo de la eyaculación se iniciaba también la recolección de las diferentes fracciones del semen. El material utilizado fueron tubos de cristal graduados de 10 ml acoplados a embudos de cristal, todo ello atemperado a 37°C. Se utilizaron un mínimo de 3 tubos en cada recogida seminal, uno para cada fracción del eyaculado, que se intentaban obtener por separado; se prestaba especial atención a la recogida de la segunda fracción, desechando gran parte de la tercera. A continuación, los tubos de recogida eran depositados en un baño María a 37°C (Baño termostático Selecta, Modelo Tectron 3473100) hasta finalizar las técnicas de contrastación seminal.

3.1.4. Estudio y contrastación seminal

Con el fin de determinar las características del semen tras su recogida, se realizó un minucioso estudio de sus parámetros macro y microscópicos, definiendo la calidad de cada uno de los eyaculados por separado. Durante toda la experiencia, el procesado, preparación y valoración de muestras fue realizada siempre el mismo técnico, evitando así variaciones debidas al mismo.

3.1.4.1. Estudio macroscópico

El análisis macroscópico tenía por objetivo determinar visualmente dos parámetros: color y volumen del eyaculado. Esta valoración fue realizada inmediatamente tras la recogida seminal. El **color** del eyaculado fue evaluado por observación directa a través del tubo de cristal graduado donde se había recogido el semen. Al mismo tiempo y, utilizando para ello la graduación de dichos tubos, se determinó el **volumen** (mililitros) de semen obtenido.

3.1.4.2. Estudio microscópico

Los parámetros analizados a nivel de microscópico fueron los siguientes:

- Motilidad individual progresiva
- Concentración espermática (por ml y concentración total)
- Vitalidad espermática
- Porcentaje de morfoanomalías (cabeza, pieza intermedia y cola)
- Porcentaje de acrosomas anormales

Para el estudio de los parámetros microscópicos citados anteriormente se hizo necesario la utilización de instrumental diverso. A grandes rasgos, para la observación del semen se usaron portaobjetos, cubreobjetos y pipetas Pasteur de cristal. Todo el material, se encontraba atemperado a 37°C mediante placas calefactores (modelo HT-200, Minitüb® GMBH), evitando así cualquier alteración de las características seminales del semen fresco valorado.

I. Motilidad espermática

Con el fin de evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, se tomaba una alícuota del semen con una pipeta de cristal atemperada y se depositaba una pequeña gota en la superficie de un portaobjetos. Seguidamente, esta gota era cubierta con un cubreobjetos, con lo permitíamos que la muestra se dispusiera en una fina capa que facilitaba una correcta visualización de los espermatozoides. Para cada una de las muestras, la motilidad espermática se determinaba tanto de forma subjetiva como objetiva.

El equipo utilizado para valorar la motilidad espermática constaba de un microscopio de contraste de fases U-CTR30-2 (Olympus CX41), que incluía platina calefactora (37°C). Se realizaba una observación directa por parte del técnico con el fin de establecer un valor subjetivo de la motilidad espermática. Para ello, se valoraban entre 4 y 5 campos por visualización directa a través del microscopio. En cada uno de ellos se estimó un cálculo subjetivo de la motilidad para, finalmente, definir la media de las valoraciones de los diferentes campos observados, aproximándolo al 5% más cercano. Los campos evaluados se situaban en el centro de la preparación, ya que es en esta zona de la muestra donde se mantiene el calor durante más tiempo y, por tanto, más inalterada se encuentra la motilidad (Álamo, 2007).

La valoración objetiva de la motilidad espermática se realizó mediante un sistema computerizado asistido de análisis espermático (Sperm Vision Lite®, Minitüb Ibérica, Spain). Las variables seminales incluidas en el análisis fueron el porcentaje total de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides con motilidad local y el porcentaje de espermatozoides no móviles. Para definir los parámetros de motilidad de cada muestra se contabilizaba la motilidad espermática de los espermatozoides contenidos en 7 campos (seleccionados de manera aleatoria) o bien de un número máximo de 2.000 espermatozoides. Los parámetros del análisis espermático eran los siguientes: número de fotogramas 16; fotogramas por segundo, 25; velocidad límite para espermatozoides no móviles, 10 $\mu\text{m/s}$; velocidad límite para espermatozoides con motilidad local, 20 $\mu\text{m/s}$; velocidad límite para espermatozoides con motilidad baja, 30 $\mu\text{m/s}$; velocidad límite para espermatozoides con velocidad media, 60 $\mu\text{m/s}$; filtro para partículas, 20%.

Tras las correspondientes valoraciones, se desecharon las muestras que presentasen una motilidad progresiva inferior a un 85%.

II. Concentración espermática

La determinación del número de espermatozoides presente en cada eyaculado se realizó mediante un fotómetro especialmente diseñado para la medición de la concentración espermática (Fotómetro Spermacue, modelo 12300/0500, Minitüb®). Para ello, sirviéndonos de una pipeta Pasteur, se rellenaba una microcubeta del sistema con una pequeña muestra de semen. Acto seguido, la microcubeta era introducida en el fotómetro determinando la concentración de espermatozoides por ml de eyaculado.

Para cada muestra de semen, dicho procedimiento se realizaba por duplicado con el objeto de estimar el valor medio. Finalmente, el valor se multiplicaba por el volumen de eyaculado, obteniendo de esta manera el número de espermatozoides totales. Del mismo modo, en varias ocasiones al comienzo de las diferentes experiencias, la concentración espermática también se valoraba mediante la dilución del semen a razón de 1:40 en solución salina formolada al 0.3% y recuento en una cámara cuentaglobulos (Thoma Double Zuzi); con ello se perseguía comprobar la sensibilidad y fiabilidad del fotómetro en la determinación de la concentración espermática.

Basándonos en los valores publicados en la raza Dogo Canario (Batista y cols., 2006), se decidió desechar todas aquellas muestras que contuviesen una concentración espermática total inferior a 800×10^6 totales (Batista y cols., 2006).

III. Vitalidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos fue determinado mediante la utilización de una doble tinción vital, denomina Eosina-Nigrosina. La tinción consta de un 1 gramo de Eosina B azulada y 8 gramos Nigrosina, diluidos en 100 mililitros de agua destilada hasta su correcta disolución. Sobre un portaobjetos a 37°C, se mezclaba una gota de semen con una gota de colorante también preservado a 37°C antes de su utilización.

Posteriormente, ambas gotas eran mezcladas con el extremo lateral de otro portaobjetos, y apoyándose éste sobre el que portaba la mezcla, se deslizaba en un ángulo de 45° para realizar la extensión de la misma. Tras comprobar que la preparación se encontraba seca, se procedió a su estudio en un microscopio óptico (Olympus BH2-NIC-2), a 1000 aumentos con aceite de inmersión. La valoración consistía en considerar vivos aquellos espermatozoides que mostraban sus cabezas de color blanco (indicativo de la impermeabilidad de la membrana citoplasmática, que no permitía, por tanto, el paso de la tinción). Asimismo, eran clasificados como muertos a todos los espermatozoides que presentaran una coloración rosada de la cabeza.

El porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se determinó tras realizar un recuento de un mínimo de 100 espermatozoides. La vitalidad espermática fue un parámetro que sólo se determinó en las muestras seminales en fresco.

IV. Porcentaje de Morfoanomalías

Para determinar el porcentaje de espermatozoides anormales, se hizo uso de una tinción con capacidad de colorear con diferentes tonalidades las diferentes regiones de la célula espermática. En concreto, se utilizó la tinción denominada Spermac™, que permite detectar fácilmente el espermatozoide, diferenciando el acrosoma en tono verde, la cabeza de color rosa, y la pieza intermedia y la cola de color verde.

La preparación de la tinción consistía en realizar una extensión de una gota de semen tomada directamente del eyaculado; así, sobre un portaobjetos atemperado y, con ayuda de otro porta, se preparaba de manera similar a lo descrito para la tinción eosina-nigrosina. Tras secar la muestra al aire por período no superior a 5 minutos, se procedió a desarrollar la tinción comenzando con la fijación de la preparación por inmersión de la misma en la solución fijadora del kit comercial. Posteriormente, y tras esperar un mínimo de 15 minutos a que la muestra se secase, la preparación se introducía progresivamente en 3 colorantes diferentes (colorantes A, B y C) durante 2, 1 y 1 minutos, respectivamente. Antes de comenzar esta fase de tinción y entre cada uno de ellos se realizaba un exhaustivo lavado de la muestra con agua destilada. En último lugar, la preparación se dejaba secar antes de ser estudiada a microscopía óptica (Olympus BH2-NIC-2) en objetivo de inmersión (X100).

La valoración se realizaba a cada una de las células por separado, identificando las anomalías en las regiones de la cabeza (macrocefalia, microcefalias, dobles cabezas, cabezas en flechas,...), pieza intermedia (piezas intermedias dobladas, presencia de gotas citoplasmáticas proximales,...) y cola (colas enrolladas, dobladas, dobles,...). El número de espermatozoides contabilizados para establecer el porcentaje de formas anormales fue siempre superior a 100 células.

V. Acrosomías

En último lugar, se valoraba el porcentaje de espermatozoides que presentaban anomalías en el acrosoma (acrosomas desprendidos, rugosos, aplanados, etc). El porcentaje de acrosomías se determinaba en la misma extensión realizada para estimar el porcentaje de morfoanomalías y siguiendo la misma pauta (microscopio óptico de contraste de fases, Olympus BH2-NIC-2, a 1000 aumentos). El procedimiento también fue el mismo, es decir, con conteo de un mínimo de 100 espermatozoides.

3.1.5. Dilución y congelación seminal

3.1.5.1. Procedimiento de dilución seminal

Después de determinar que la motilidad espermática y la concentración de los eyaculados eran adecuadas para que el semen se considerara apto para el estudio, se comenzaba con el procesado del mismo para evitar su deterioro.

Del mismo modo, antes de comenzar con los procedimientos de diluyo-conservación seminal, se prepararon los diluyentes para tal fin. La **tabla 3.1** expresa la composición del diluyente 1 (similar para todos los protocolos de preservación) y el diluyente 2 (cuya diferencia básica era la concentración final de Equex).

Tabla 3.1. Composición de los diferentes diluyentes (Dil-1, Dil-2a, Dil-2b) empleados en la experiencia (por cada 100 ml de diluyente)

Componentes	Dil-1	Dil-2a	Dil-2b
Tris (Hidrometil) Aminometano (Panreac)	2.4 g	2.4 g	2.4 g
D(+)-Glucosa anhidra (Panreac)	0.8 g	0.8 g	0.8 g
Acido cítrico anhidro (Sigma)	1.4 g	1.4 g	1.4 g
Glicerol -Glicerina- (Panreac)	3 ml	7 ml	7 ml
Na Bencilpenicilina (Hoechst)	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Dihidroestreptomicina sulfato (Hoechst)	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Yema de huevo	20 ml	20 ml	20 ml
Equex (Equex STM paste; Nova Chemical Inc.)	-	1 ml	2 ml
Agua destilada	hasta 100 ml	hasta 100 ml	hasta 100 ml

El primer paso consistía en procesar la fracción espermática para separar los espermatozoides del resto de fluido prostático contenido en el eyaculado. Para tal fin, el eyaculado era centrifugado a 700 x g en una centrífuga Kubota 5100 durante 8 minutos, con el objeto de conseguir una mayor concentración de espermatozoides. Posteriormente, se aspiró y desechó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, para una vez aislado el sobrenadante, se re-suspendía lentamente con el primer diluyente (Dil-1); la cantidad a añadir se estimaba a partir del número total de espermatozoides presente en cada eyaculado, de forma que se obtuviese 200 x 10⁶ de espermatozoides por ml de semen diluido. Este paso se realizaba en el laboratorio a temperatura ambiente (25°C), con ayuda de una jeringa para adicionar cuidadosamente el diluyente y de una pipeta Pasteur para homogeneizar la mezcla.

A continuación, el semen diluido era trasladado a una cámara frigorífica (Uniblock Zanotti, 805121T02G), donde debía permanecer durante la etapa de equilibrado, a una temperatura de 4°C durante 1 hora. La temperatura de la cámara estaba controlada de forma automática y, podía comprobarse en todo momento por visualización del monitor exterior del

sistema. Al mismo tiempo, el segundo diluyente y el resto de material a utilizar durante el proceso de diluyo-congelación (pipetas, jeringas, pajuelas,...) eran situados en el interior de la cámara frigorífica, con el objetivo de que estuviesen a la misma temperatura que la dilución del semen (a 4°C) en el momento de su utilización.

Transcurridos los 60 minutos de la fase de equilibrado, se depositaba una gota de la dilución entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados, siendo posteriormente valorada para determinar los parámetros relacionados con la motilidad (sistema CASA). De esta forma, se pretendía comprobar que el semen procesado no hubiese perdido excesiva calidad, permitiéndonos seguir con el procesado.

Acto seguido, el segundo diluyente (Dil-2a o Dil-2b) era adicionado a la dilución atemperada. El volumen a añadir venía determinado por el número de espermatozoides, de manera que la dilución final debía contener 100×10^6 espermatozoides por mililitro. Asimismo, con esto conseguíamos almacenar en cada pajuela de 0.5 mililitros, 50×10^6 espermatozoides, por lo que el número de pajuelas utilizadas e identificadas dependían directamente de este parámetro. El segundo diluyente era añadido cuidadosamente siguiendo el mismo procedimiento que el diluyente 1, evitando así alteraciones en los espermatozoides debidas a las distintas concentraciones de glicerol entre diluyentes.

Alrededor de 10 minutos tras la adición del 2º diluyente en la cámara de refrigeración, el semen procesado era envasado en las pajuelas. Para ello las pajuelas eran introducidas en grupos de 2-3 en la dilución final y, mediante succión directa del mismo a través del extremo no sumergido, se conseguía su almacenamiento en el interior de la pajuela. En el extremo abierto de cada pajuela se dejaba una cámara de aire de aproximadamente 1 cm de longitud. El periodo de envasado de las pajuelas nunca fue superior a los 10-15 minutos en total.

Durante el desarrollo del estudio se llevaron a cabo dos procedimientos de dilución seminal con diferentes concentraciones finales de Equex para los ultracongeladores a -152°C. Es por ello que algunos eyaculados fueron procesados con los diluyentes Dil-1 y Dil-2a mientras que otros fueron diluidos con Dil-1 y Dil-2b. En el primer caso (Dil-1 y Dil-2a), la dilución seminal final era almacenada en pajuelas que era distribuidas en dos grupos, uno conservado en nitrógeno líquido (NL) y otro en ultracongeladores de -152°C (UF), ambos con una concentración final de Equex del 0.5%. Por otro lado, la dilución seminal procesada con el segundo protocolo

(Dil-1 y Dil-2b) sólo se sometía a congelación en UF, para obtener una concentración final de Equex del 1.0.

3.1.5.2. Procedimiento de congelación seminal

Una vez realizados los protocolos de dilución descritos en el apartado anterior, y tras almacenar el semen en las correspondientes pajuelas, se comenzó con los distintos procedimientos de congelación seminal: congelación en nitrógeno líquido y congelación en ultracongeladores de -152°C.

I. Congelación en nitrógeno líquido (NL)

El protocolo de congelación seminal en nitrógeno líquido comenzó con la creación de una cámara aislada de vapores de nitrógeno. Utilizando una caja hermética de poliestireno, se añadió una cantidad adecuada de nitrógeno líquido en su interior, en suficiente volumen para crear un ambiente de vapores adecuado para la congelación. En el interior de esta caja se dispuso una rampa metálica donde se colocaron posteriormente las pajuelas, quedando éstas a una altura de unos 4-5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido.

En esta etapa, las pajuelas sometidas a los vapores de nitrógeno durante un período de 15 minutos, conseguían alcanzar una temperatura que oscilaba entre -110 a -125°C. El descenso de la temperatura se monitorizó (Álamo, 2006) mediante un termómetro Crison con sonda de inmersión, confirmando un descenso de 10°C/minuto desde 4° a -5°C, de 3.5°C/minuto desde -5 a -15°C y finalmente, 14°C/minuto desde -15 a -110°C.

Pasado este tiempo, las pajuelas se sumergían directamente en el interior del nitrógeno líquido, para terminar su congelación a -196°C. Finalmente, las dosis seminales eran distribuidas en globelets correctamente identificados y almacenadas en un contenedor con nitrógeno líquido (Criocontenedor MVE, XC 47/11-10).

II. Congelación en ultracongeladores de -152°C (ULF)

El ultracongelador utilizado para llevar a cabo la experiencia fue el mismo descrito por Álamo (2006), modelo Sanyo -152°C (MDF-1155 ATN, Sanyo Electric Co. Japan). Este sistema se encuentra equipado con un microprocesador de temperatura que mantiene el interior del congelador a -152°C. Además, se caracteriza por alimentarse energéticamente de la corriente eléctrica, con un circuito de electricidad socorrido en caso de ausencia de la misma. El

ultracongelador presenta un volumen total de 160 litros de capacidad, permitiendo el almacenamiento de un total de 40 canisters, en cuyo interior se pueden albergar alrededor de 16 globelets plásticos, que a su vez pueden almacenar alrededor de 15 pajuelas. De modo aproximado, se podría afirmar que el ultracongelador de -152°C sería capaz de almacenar aproximadamente 10000 pajuelas de 0.5 ml.

Al igual que en el protocolo de congelación con nitrógeno líquido, las pajuelas con el semen procesado se encontraban en la cámara frigorífica a 4°C . Tras distribuir las pajuelas en globelets perfectamente registrados, se colocaron en el interior de una caja de poliestireno que contenía un sistema de refrigeración, para conseguir que la temperatura continuase a 4°C . Posteriormente, las pajuelas se trasladaban hasta el ultracongelador de -152°C , donde las dosis seminales eran congeladas y almacenadas. Este traslado se hacía lo más rápido posible, intentando nunca superar los 30 segundos. Con respecto al control del descenso en la temperatura dentro de los dispositivos del ultracongelador, de manera similar a lo descrito en previas experiencias (Álamo, 2006), se utilizaba una sonda de inmersión de un termómetro Crison 638 PT, introducida en el ultracongelador a la altura de las pajuelas; con esta equipo se monitorizó una curva de descenso de temperatura lento ($-5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) desde 5°C a -10°C , seguida de un descenso rápido ($-25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) desde -10°C a -100°C y, por debajo de esta T^{a} , una curva de congelación de $-10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde -100°C a -140°C .

El número de recogidas seminales por animal fue entre 3 y 5, con el fin de obtener un mínimo de 60 pajuelas/animal. De esta forma se pretendía que, para cada uno de los ejemplares, se obtuviesen 30 pajuelas en NL (con una concentración final de 20% yema de huevo, 5% glicerol, 0.5% Equex), 18 pajuelas en UF-0.5 (con una concentración final de 20% yema de huevo, 5% glicerol, 0.5% Equex) y 18 pajuelas en UF-1 (con una concentración final de 20% yema de huevo, 5% glicerol, 1.0% Equex).

3.1.6. Descongelación del semen y valoración del semen congelado-descongelado

Las descongelaciones se realizaron entre Diciembre de 2007 y Enero de 2010. La **tabla 3.2** muestra el número de pajuelas descongeladas para cada uno de los protocolos de criopreservación (NL, UF-0.5, UF-1) y en cada uno de los periodos evaluados.

Tabla 3.2. Número de pajuelas descongeladas para cada protocolo de congelación, en los diferentes periodos, para cada uno de los animales

Protocolo	Periodo	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Perro 6	Perro 7	Perro 8
NL	1 día	6	6	6	6	7	6	6	6
	1 mes	6	7	6	6	5	6	6	7
	3 meses	7	6	6	6	5	6	4	6
	12 meses	5	6	6	6	7	6	6	6
	18 meses	6	7	6	6	4	6	6	6
UF-0.5	1 día	6	6	6	8	7	6	6	6
	1 mes	7	5	6	6	5	6	6	7
	3 meses	6	6	3	6	5	7	4	6
UF-1	1 día	6	6	6	7	6	6	6	6
	1 mes	6	6	6	6	6	6	6	6
	3 meses	0	6	6	6	6	6	6	6

Las pajuelas almacenadas bien en nitrógeno líquido o en el ultracongelador se extraían de sus respectivos dispositivos de almacenamiento y rápidamente se sumergían durante 8 segundos en un baño María a 70°C. A continuación, se realizaba un exhaustivo secado de las pajuelas para eliminar los posibles restos de agua en su superficie y se cortaba su extremo no sellado. Acto seguido, la pajuela se volcaba en un tubo de cristal que se encontraba en baño María a 37°C, conteniendo 0.5 ml de PBS (solución tampón Tris-glucosa compuesta por 2.4 g de Tris, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de dihidroestreptomicina sulfato y completada hasta 100 ml con agua destilada). Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur se resuspendía la dilución y se dejaba calentar unos 2-3 minutos antes de su valoración.

Los parámetros evaluados inmediatamente tras la descongelación fueron los mismos que los utilizados para determinar las características del semen en su valoración en fresco, a excepción obviamente de la concentración y la vitalidad. Es decir, la motilidad espermática total y progresiva (evaluada mediante sistema CASA), el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (cabeza, pieza intermedia, cola) y el porcentaje de acrosomas alterados.

3.1.7. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas con el objeto de determinar el efecto de los diferentes parámetros estudiados así como la interacción existente entre los mismos; de este modo, las variantes estudiadas fueron el método de criopreservación (NL y UF), el tiempo de congelación (1 día, 1 mes, 3 meses, 12 meses y 18 meses) y la composición de los diluyentes utilizados en UF (0.5% y 1% de Equex). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

3.2. EXPERIENCIA 2: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS A LO LARGO DEL TIEMPO

3.2.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

Para llevar a cabo la experiencia 2 fueron utilizados un total de 5 machos adultos de diversas razas (2 Beagles, 1 Bulldog francés, 1 Labrador y 1 Mestizo). Por esta razón, el rango de peso de los ejemplares era bastante amplio, estando comprendido entre los 12 y 35 kilogramos aproximadamente, y la edad oscilaba entre los 2 y 5 años.

Al igual que en la experiencia anterior, los canes pertenecían a propietarios particulares que los mantenían en óptimo estado de salud, correctamente desparasitados y vacunados, sin patologías crónicas y en un régimen de alojamiento adecuado a sus necesidades (instalaciones apropiados en función del animal, alimentados con piensos comerciales y agua *ad libitum*).

Los ejemplares se desplazaban hasta la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas en los días previstos para realizar las experiencias. No obstante, antes de realizar el primer ensayo, se realizaba una completa anamnesis, una valoración de su estado general y exploración del aparato reproductor, incluyendo una recogida y evaluación seminal, para catalogar al animal como apto o no apto para el estudio.

3.2.2. Diseño experimental

El principal objetivo de esta experiencia era valorar, a lo largo del tiempo, la capacidad de supervivencia y la calidad del semen conservado a distintas temperaturas. En primer lugar se realizó la recolección del semen de los ejemplares participantes para, posteriormente, procesarlo tanto de manera individual como en forma de *pool* y, conservarlo a distintas temperaturas, evaluándose en diferentes periodos de tiempo. La **figura 3.3** muestra la planificación del trabajo experimental y las valoraciones realizadas en los diferentes grupos.

Con tal propósito, se comenzó la experiencia con la recogida del semen de cada uno de los perros, 1 vez a la semana, durante 4 semanas consecutivas. Tras comprobar que la calidad seminal era adecuada para el estudio, el volumen de eyaculado se dividía en 5 alícuotas. Cada una de estas alícuotas era procesada de la siguiente forma:

- Alícuota A: almacenada en baño María a 37°C.
- Alícuota B: almacenada a temperatura ambiente (TA), aproximadamente a 25°C.
- Alícuota C: almacenada en cámara de refrigeración a 4°C.
- Alícuota D: destinada a congelación seminal en nitrógeno líquido.
- Alícuota P: utilizada para elaborar el *pool*. Posteriormente, una vez homogeneizado el *pool*, se procedió a dividirla nuevamente en 4 alícuotas, identificadas como PA, PB, PC y PD, que se procesaron de manera similar a lo descrito para las alícuotas A, B, C y D, respectivamente.

Para cada alícuota se valoraron diferentes parámetros de calidad seminal. En concreto se determinaba la motilidad individual (total y progresiva), así como las anomalías morfológicas y acrosomías.

3.2.3. Recogida y contrastación del semen

El número total de recogidas seminales practicadas a cada perro durante el desarrollo de la experiencia fue de 4, una inicial para una valoración previa al estudio y tres de ellas en el desarrollo del mismo.

La recogida seminal se realizaba por estimulación manual siguiendo el procedimiento descrito en el Experimento 1 y utilizando material de similares características. El semen recolectado en sus respectivos tubos de cristal, era depositado con la mayor brevedad posible en baño María a 37°C.

Una vez recogidos todos los eyaculados, se realizó la contrastación seminal. La metodología seguida y los parámetros valorados (volumen, color, motilidad total y progresiva, concentración espermática, porcentaje de vitalidad y porcentajes de acrosomías y morfoanomalías), fueron exactamente los mismos que los utilizados en el Experimento 1. Como suele ser habitual, se descartaban aquellos eyaculados resultantes de una erección inadecuada o que presentaban una calidad insuficiente (< 70% motilidad total) para el estudio y, en tal caso, se repetía la recogida seminal cuanto antes.

3.2.4. Diluyo-conservación del semen

Tras las correspondiente contrastación seminal, el semen de cada uno de los animales fue dividido en 5 alícuotas (alícuotas A, B, C, D, P). Como se especificó en el diseño experimental, cada una de ellas estaba destinada a ser sometida a unas condiciones de temperatura diferentes, a formar un *pool* y/o a congelación.

De esta forma, las alícuotas P de cada uno de los perros se mezclaron en un único tubo, donde el semen se homogeneizó correctamente, y se evaluaron los parámetros seminales de motilidad, concentración, vitalidad, acrosomías y morfoanomalías. Posteriormente, a partir de este *pool*, se volvieron a dividir en 4 alícuotas diferentes (PA, PB, PC y PD).

Una vez separadas e identificadas las alícuotas de cada eyaculado y del *pool* y, conociendo las concentraciones y el volumen de cada una de ellas, se procedió a estimar la cantidad de diluyente a añadir a cada una de las alícuotas. La cantidad de diluyente fue estimado con el fin de obtener una concentración final de 100×10^6 de espermatozoides/ml. La composición de este diluyente (por cada 100 ml) era la siguiente: Tris (3.025 mg), ácido cítrico (1.7 mg), glucosa (1.25 mg), yema de huevo (20%), estreptomycin (100 mg), penicilina (100 mg) y agua destilada (hasta completar 100 ml). Este diluyente se añadió a las alícuotas conservadas a 37°C (alícuotas A y PA), a 25°C (alícuotas B y PB) y a 4°C (alícuotas C y PC).

3.2.5. Conservación en distintas temperaturas y congelación seminal

Tras diluir el semen de cada una de las alícuotas con las cantidades correspondientes de diluyente, y una vez homogeneizado, se procedió a trasladar todas las alícuotas a sus respectivos medios de conservación.

De esta forma, las alícuotas A (de los 5 ejemplares) y PA (resultante del *pool*) se mantuvieron en baño María a 37°C durante toda la experiencia. Las alícuotas B (de cada individuo) y PB (*pool*) se depositaron en una gradilla a temperatura ambiente (aproximadamente a 25°C) de nuestro laboratorio. Finalmente, las alícuotas C (perros 1, 2, 3, 4 y 5) y PC (*pool*) fueron trasladadas a una cámara de refrigeración a 4°C, para su preservación.

Por otro lado, las alícuotas D (de cada macho) y PD (*pool*), destinadas a congelación en NL, se procesaron siguiendo el protocolo aplicado para las dosis en NL de la Experiencia 1, utilizando el mismo instrumental, procedimiento y diluyentes (Dil-1 y Dil-2a, **tabla 3.1**).

3.2.6. Valoración de la calidad seminal en los diferentes protocolos de conservación

Cada una de las alícuotas procesadas de manera individual (A, B y C) o partir del *pool* (PA, PB y PC), sometidas a las diferentes temperaturas de conservación (37°C, 25°C, 4°C) fueron evaluadas a lo largo del tiempo. La motilidad espermática se valoró de forma exhaustiva hasta la completa inactivación del semen; asimismo, la presencia de formas espermáticas anormales y acrosomas alterados se evaluó en los periodos de tiempo establecidos en la **tabla 3.3**, que recoge los parámetros seminales valorados y el momento de estudio del total de las alícuotas.

Tabla 3.3. Parámetros evaluados en las alícuotas almacenadas en diferentes temperaturas de preservación (37°C, 25°C, 4°C) a lo largo del periodo experimental

Parámetro	Horas de conservación						
	Hora 1	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 12	Hora 24	➤ 24 Horas
Motilidad	X	X	X	X	X	X	X
Morfoanomalías	X			X		X	
Acrosomías	X			X		X	

No obstante, la evaluación de estos parámetros para las alícuotas C y PC situadas en refrigeración se iniciaba exactamente a las 2 horas de haberse desplazado a la cámara de refrigeración. Se realizó de esa manera, puesto que se esperó 1 hora para que el semen alcanzara la temperatura de 4°C y, a continuación, 1 hora más para evaluar la resistencia del semen a esa temperatura a lo largo del tiempo.

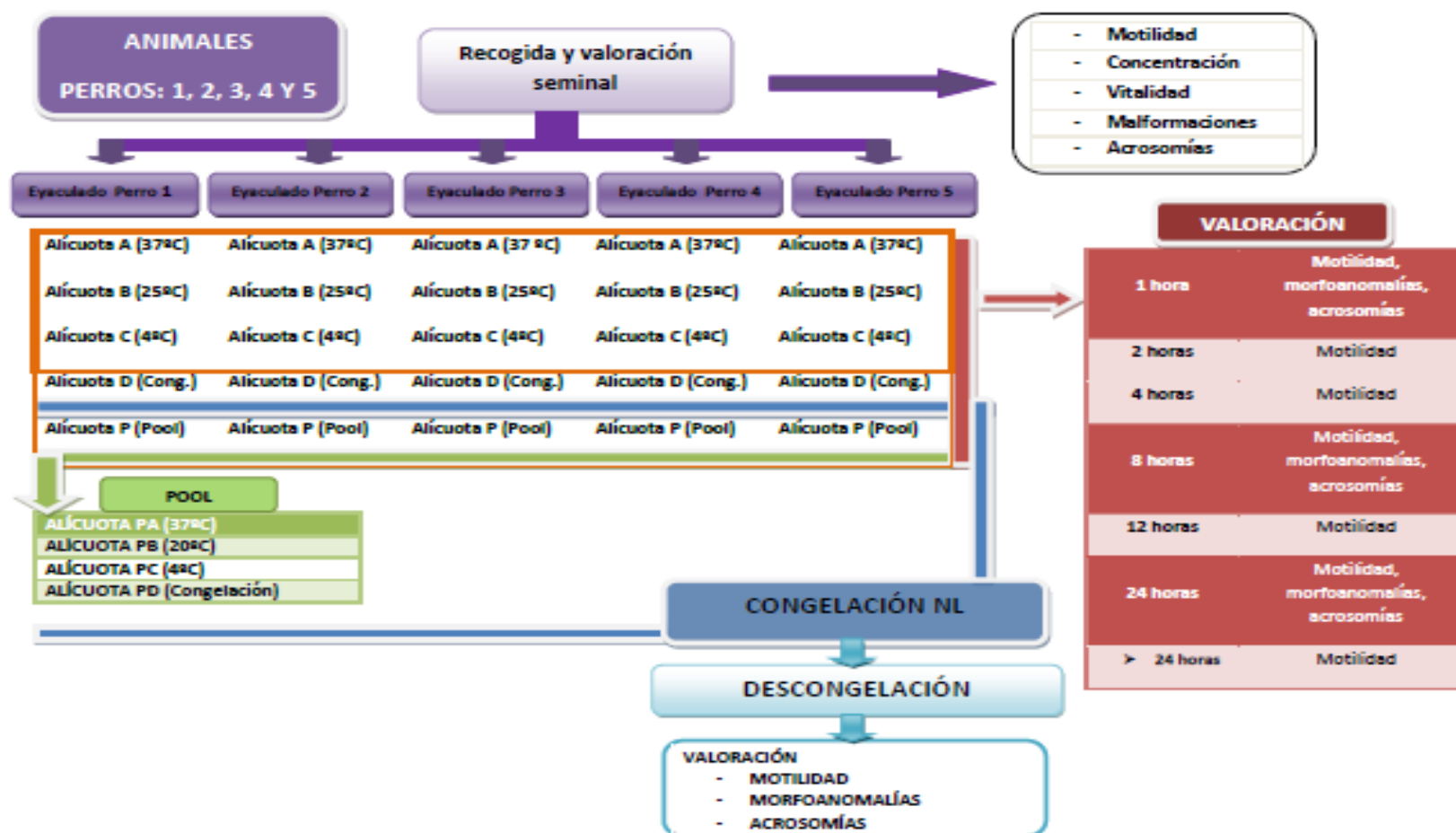
Por otro lado, las alícuotas congeladas (D y PD) fueron sometidas a descongelación por el procedimiento habitual, es decir, inmersión en agua a 70°C durante 8 segundos, secado de la pajuela y descarga de su contenido en 0.5 ml de solución tampón PBS que se encontraba a 37°C. Posteriormente, las muestras descongeladas se mantenían a 37°C (Baño María) y se realizaba la evaluación de los parámetros seminales detallados en la **tabla 3.3**, como se ha descrito hasta el momento.

Para llevar a cabo la valoración de la motilidad (total y progresiva), se resuspendía las diluciones con extrema suavidad, se tomaba una gota de cada alícuota con ayuda de una pipeta Pasteur y se depositaba entre un porta y un cubreobjetos situado sobre una placa calefactora (37°C), dónde se esperaba unos minutos (alrededor de 5) antes de comenzar su valoración, con el objeto de que se activasen los espermatozoides. La preparación y valoración de las muestras para determinar el porcentaje de anomalías morfológicas y acrosomías, se realizó también de forma idéntica a la definida en la Experiencia 1.

3.2.7. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas con el objeto de determinar el efecto de los diferentes parámetros estudiados así como la interacción existente entre los mismos; de este modo, las variantes estudiadas fueron el sistema de procesado utilizado (de forma individual y *pool*), la temperatura de conservación (37°C, 25°C, 4°C, Congelación-descongelación-37°C) y el tiempo de conservación (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 y 360 horas). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.3. Planificación del trabajo experimental en la Experiencia 2



3.3. EXPERIENCIA 3: VIABILIDAD DEL SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS TRAS SU DESCONGELACIÓN

3.3.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

Los animales participantes en la experiencia 3 fueron exactamente los mismos que intervinieron en la experiencia 2. Es por ello, que aquellos aspectos relacionados con la raza, peso, edad, estado sanitario y régimen de alojamiento y alimentación de los animales fueron similares en esta experiencia.

Por otro lado, ambos ensayos (experiencias 2 y 3) se llevaron a cabo de manera consecutiva, en un plazo inferior a 1 mes entre ambos, lo que nos permitió considerar que las características reproductivas de los ejemplares no se encontraban modificadas con respecto a las asumidas en la experiencia previa.

Como sucedía en los casos anteriores, los perros participantes eran trasladados a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas para realizar de forma programada los ensayos.

3.3.2. Diseño experimental

El objetivo de esta tercera experiencia fue determinar la capacidad de supervivencia y las características del semen conservado a distintas temperaturas a lo largo del tiempo, después de haber sido congelado y descongelado. La **figura 3.4** muestra la planificación del trabajo experimental y las valoraciones realizadas en los diferentes grupos.

Con esta finalidad, el ensayo comenzaba con la extracción seminal de los 5 ejemplares participantes y una vez definida su calidad, se mezclaba para formar un *pool*, que sería sometido a congelación y conservación en nitrógeno líquido. Posteriormente, se procedía a realizar la descongelación de las pajuelas, en grupos de 4, que se mezclaban y conservaban a diferentes temperaturas: 37°C (baño María), 25°C (temperatura ambiente), a 15°C (cámara de refrigeración) y a 4°C (refrigeración). La experiencia se repitió 2 veces, a intervalos de una 1 semana, utilizando un total de 10 eyaculados (2 por animal), mientras que el número de pajuelas congeladas-descongeladas que fueron valoradas se situó en 100.

Con el objeto de evaluar la influencia de la temperatura de conservación sobre la calidad y viabilidad del semen congelado-descongelado, se realizaba la valoración de determinados parámetros seminales en distintos periodos de tiempo para cada uno de los grupos experimentales (37°C, 25°C, 15°C, 4°C). Así, la motilidad espermática, total y progresiva, se pretendía estimar a las 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas de haber comenzado la exposición a las diferentes temperaturas; por otro lado, la determinación del porcentaje de anomalías morfológicas y acrosomías se planificó a las 1, 6 y 24 horas tras el comienzo del periodo de conservación post-descongelación.

3.3.3. Recogida y contrastación del semen

El procedimiento seguido para la obtención del semen fue exactamente el descrito para las experiencias anteriores, donde el semen se recolectó por estimulación manual, se conservó en baño María a 37°C y se valoró (volumen, color, motilidad espermática subjetiva, total y progresiva, concentración espermática, porcentaje de vitalidad, anomalías morfológicas y porcentaje de acrosomías) para determinar su calidad en fresco. No consideramos necesario realizar una recogida previa para determinar la calidad seminal ni la libido del animal, puesto que los perros ya habían testados y entrenados por su participación en el experimento 2.

Una vez definidos unos parámetros mínimos de calidad seminal (> 70% motilidad total, > 65% motilidad progresiva), los eyaculados se mezclaron para constituir el *pool* correspondiente. Una vez homogeneizada perfectamente la mezcla, se determinaron nuevamente las características seminales del *pool* a procesar.

3.3.4. Dilución y congelación seminal

A partir del *pool* y una vez determinada su concentración final, se comenzaba con el procedimiento de diluyoconservación seminal. Para ello, se utilizaron los diluyentes empleados en la primera experiencia para congelación en nitrógeno líquido (Dil-1 y Dil-2a, expuestos en la **tabla 3.1**) en volumen suficiente para obtener una concentración final de 100×10^6 de espermatozoides/ml, 20% de yema de huevo, 5% glicerol y 0.5% Equex. Tras el correspondiente tiempo de equilibrado y empajuelado, las dosis seminales se congelaban en nitrógeno líquido, para finalmente conservarse en este medio hasta el momento de su valoración.

El número de pajuelas resultantes fue superior a las 50 pajuelas en cada uno de los 2 ensayos, con una concentración de 50×10^6 de espermatozoides/ml por pajuela.

3.3.5. Descongelación del semen y conservación en distintas temperaturas

Las pajuelas se descongelaron mediante inmersión de las mismas a 70°C durante 8 segundos, es decir, siguiendo el procedimiento usual. Tras el adecuado manejo de la pajuela, su contenido era vertido en 0.5 ml de PBS atemperado en baño María a 37°C.

Las valoraciones se realizaron de forma programada, de manera que las pajuelas se descongelaban y valoraban individualmente en grupos de 4. A continuación, el contenido de cada una de las 4 pajuelas era depositado en un único tubo de cristal para hacer un *pool* homogéneo, alcanzando un volumen final de 4 ml (2 ml de semen + 2 ml de PBS). A continuación, la mezcla era valorada, determinando los aspectos relacionados con motilidad, morfoanomalías y acrosomías. Inmediatamente, la preparación era distribuida en 4 alícuotas (1 ml) que se colocaban en tubos separados, con el objeto de ser sometidas a diferentes temperaturas de conservación. Así, conseguimos la siguiente distribución:

- Alícuota A: 1 ml a 37°C
- Alícuota B: 1 ml a temperatura ambiente (25°C, aproximadamente)
- Alícuota C: 1 ml a 15°C
- Alícuota D: 1 ml a 4°C

Este procedimiento se repitió de forma consecutiva hasta descongelar un total de 50 pajuelas en cada una de las 2 reproducciones del experimento.

3.3.6. Valoración de la calidad seminal posterior a los diferentes tiempos

Se realizó un estudio preliminar para comprobar el tiempo que las alícuotas tardaban en alcanzar las temperaturas propuestas (37°C, 25°C, 15°C, 4°C) inmediatamente tras la descongelación y poder determinar, de esta forma, a partir de qué momento se podría realizar la valoración. Este procedimiento se realizó mediante un termómetro Crison con sonda de inmersión que era introducida en el semen, permitiendo monitorizar el descenso de la temperatura en cada una de las alícuotas.

Las alícuotas A (37°C) y B (25°C) alcanzaban la temperatura propuesta en un plazo inferior a los 5-10 minutos, mientras las alícuotas C (15°C) precisaban de unos 15 minutos para alcanzar su temperatura de conservación. Con respecto a las alícuotas D (4°C) se registró que era necesario 1 hora para alcanzar la temperatura de preservación. Por tanto, en las muestras conservadas a 4°C, se consideró como hora 1, cuando la alícuota había estado sometida a esa

temperatura durante 1 hora de equilibrado, es decir, alrededor de 2 horas después de ponerlo en cámara frigorífica. Esto se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de conservación del semen procesado cuando su temperatura era de 4°C, por lo que si la valoración se hubiese realizado antes probablemente éste no hubiese alcanzado tal temperatura.

Los parámetros que se pretendían evaluar a lo largo del periodo experimental son los reflejados a continuación:

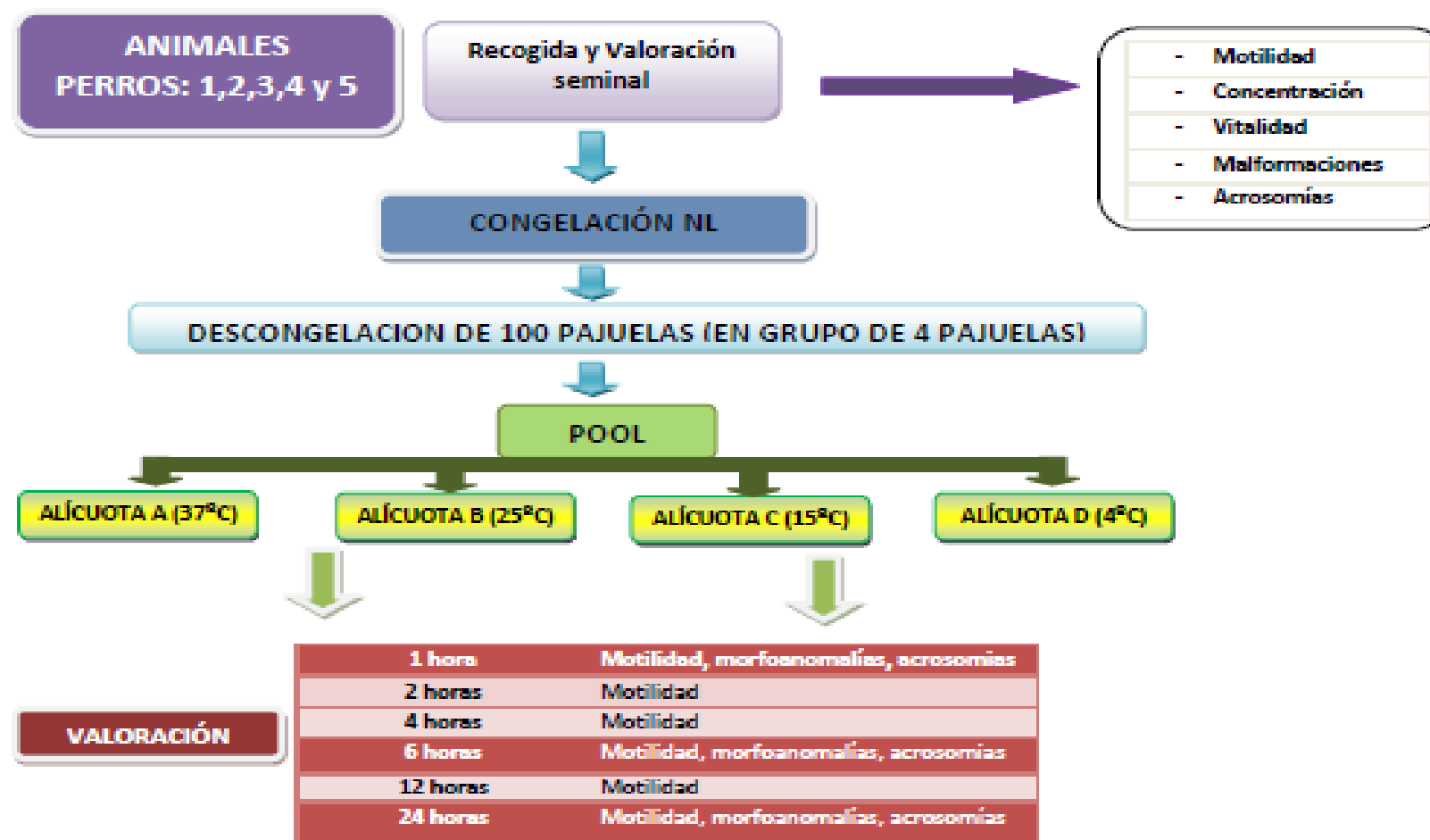
- Hora 1: Motilidad, Morfoanomalías y Acrosomías
- Hora 2: Motilidad
- Hora 4: Motilidad
- Hora 6: Motilidad, Morfoanomalías y Acrosomías
- Hora 12: Motilidad
- Hora 24: Motilidad, Morfoanomalías y Acrosomías

Como en los ensayos anteriores, el procedimiento seguido para valorar motilidad, anomalías morfológicas y acrosomías fue el descrito en las experiencias previas.

3.3.7. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA Factorial con el objeto de determinar el efecto de los parámetros estudiados y el resultado de su interacción; las variantes estudiadas fueron la temperatura de conservación (37°C, 25°C, 15°C y 4°C) y el tiempo de conservación (1, 2, 4 y 6 horas para las motilidades y 1 hora para las morfoanomalías y acrosomías espermáticas). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.4. Plan experimental del la Experiencia 3



3.4. EXPERIMENTO 4: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN PREVIO A LA CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN

3.4.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

En el desarrollo de la experiencia 4 participaron 6 machos de diferentes razas (1 Doberman, 1 Pastor Belga, 1 Bulldog inglés y 3 Beagles). El rango de pesos se situaba entre los 12 y los 30 kilos. Con respecto a la edad, los animales tenían edades comprendidas entre los 2 y los 5 años.

Nuevamente los animales pertenecían a propietarios privados, que decidieron colaborar en el estudio. Se continuó con el mismo protocolo que se ha descrito en las experiencias anteriores en lo referido a requerimientos sobre su estado sanitario, régimen de alojamiento y alimentación, así como se desarrolló un riguroso control de la capacidad/calidad reproductiva de los individuos, que confirmase su validez para el estudio.

3.4.2. Diseño experimental

El propósito de la experiencia 4 era evaluar la capacidad del semen para resistir los procesos de congelación seminal tras haber sido sometido a diferentes periodos de refrigeración, valorando detalladamente las modificaciones en la calidad del semen tras la congelación. La experiencia se realizó a intervalos de una 1 semana aproximadamente, con un total de 3 repeticiones. **La figura 3.5** expone de forma esquemática el plan experimental desarrollado en la experiencia 4.

La experiencia comenzaba con la recogida y contrastación seminal de los eyaculados para, una vez definida su calidad, mezclarlos y constituir un *pool* que posteriormente se distribuía en 6 alícuotas. La alícuota A se procesó siguiendo el método de congelación tradicional, es decir, un primer diluyente con un 3% de glicerol y 1 hora de equilibrado en cámara a 4°C, mientras las otras cinco alícuotas (R1, R6, R12, R24 y R48) eran destinadas a refrigerarse con diluyente de refrigeración (sin glicerol) a distintos tiempos (1, 6, 12, 24 y 48 horas). Pasado este tiempo, se añadía el diluyente 2, con un 7% de glicerol para la alícuota A y con un 10% de glicerol para el resto. A continuación, las diluciones eran empajueladas, congeladas y almacenadas en NL, siguiendo el método habitual. A posteriori, el semen se descongelaba y valoraba (motilidad espermática total y progresiva, anomalías morfológicas y acrosomías), como se realizaba en experiencias anteriormente descritas.

El número de pajuelas congeladas y evaluadas para cada tiempo y protocolo de refrigeración/congelación fue de 10. Por tanto, tras haber repetido la experiencia 3 veces, el número total de pajuelas trabajadas fue de 180 pajuelas, 30 para cada protocolo.

3.4.3. Recogida y contrastación del semen

Previo al estudio, a todos los animales se les realizó una recogida seminal con el fin de habituarlos al procedimiento y valorar la calidad de su semen en fresco. Al igual que para el resto de las experiencias desarrollados en la tesis, el procedimiento de elección fue la estimulación manual. Además, el manejo y valoración del semen fresco durante las repeticiones fue siempre el descrito con anterioridad: conservación en baño María a 37°C y valoración del volumen, color, motilidad espermática total y progresiva, concentración espermática, porcentaje de vitalidad, anomalías morfológicas y porcentaje de acrosomías.

3.4.4. Dilución y refrigeración a distintos tiempos

Tras comprobar que todos los eyaculados tenían una calidad aceptable, se procedió a realizar la mezcla de los mismos, obteniendo de esta manera un *pool* de trabajo, que se mantuvo a 37°C. Tras homogeneizar la mezcla con ayuda de una pipeta Pasteur, se procedió a evaluar las características seminales con el objeto de fijar los valores iniciales antes de la aplicación de los protocolos de tecnología seminal.

Acto seguido, se extrajo 1/6 parte del volumen del *pool* seminal (alícuota A) con la finalidad de ser procesada por el método de congelación tradicional, donde los diluyentes 1 y 2 tendrían un porcentaje de glicerol del 3 y 7%; esta fracción se considero como “alícuota control”. Por otro lado, en un vaso de precipitado permanecía la 5/6 parte del volumen del *pool* de semen (alícuota R) con el propósito de procesarse posteriormente durante diferentes periodos de refrigeración, antes de ser congeladas. Una vez aisladas ambas alícuotas (alícuotas A y R, representando 1/6 y 5/6 del volumen eyaculado, respectivamente), se realizó una valoración de la concentración espermática en ambas fracciones para confirmar la cantidad de espermatozoides en ellas. A continuación, estas partes se centrifugaron por separado y, tras desechar el respectivo sobrenadante, se les añadió la cantidad correspondiente del diluyente 1, calculada para obtener una dilución seminal de 200×10^6 de espermatozoides/ml. La composición del diluyente 1 añadido a la alícuota control (alícuota A, 1/6) era la misma que la especificada en la experiencia 1 (**tabla 3.1**), es decir, presentaba un 20% de yema de huevo y un

3% de glicerol. La composición del diluyente 1 añadido a la restante fracción (alícuota R, 5/6) era completamente similar, a excepción del glicerol que no se incluía dentro del mismo (0%).

El siguiente paso consistió en dividir la alícuota R en 5 fracciones (Alícuotas R1, R6, R12, R24 y R48), que serían sometidas posteriormente a diferentes tiempos de refrigeración en cámara frigorífica a 4°C y finalmente congeladas. Para ello, una vez superados los tiempos establecidos en refrigeración, se llevó a cabo la adición del diluyente 2 correspondiente a cada alícuota. El diluyente 2 adicionado a la alícuota A (alícuota control) se caracterizaba por presentar un 20% de yema de huevo, un 7% de glicerol y Equex (1%), mientras que el diluyente 2 añadido a las alícuotas R1, R6, R12, R24 y R48 presentaba un 20% de yema de huevo, un 10% de glicerol y Equex (1%). En definitiva, adicionados ambos diluyentes, se obtuvo una dilución seminal 100×10^6 de espermatozoides/ml, 20% yema huevo, 1% Equex y 5% glicerol, para todas las alícuotas (A, R1, R6, R12, R24 y R48).

De esta forma, podemos esquematizar que el *pool* fue dividido en 6 alícuotas, procesadas de la siguiente forma:

- Alícuota A (Control): se procesó para congelar con el método tradicional, donde el diluyente 1 y 2 contenía un 3% y un 7% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 1 hora.
- Alícuota R1: el diluyente 1 y 2 contenía un 0% y un 10% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 1 hora. Posteriormente, se congeló.
- Alícuota R6: el diluyente 1 y 2 contenía un 0% y un 10% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 6 horas. Posteriormente, se congeló.
- Alícuota R12: el diluyente 1 y 2 contenía un 0% y un 10% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 12 horas. Posteriormente, se congeló.
- Alícuota R24: el diluyente 1 y 2 contenía un 0% y un 10% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 24 horas. Posteriormente, se congeló.
- Alícuota R48: el diluyente 1 y 2 contenía un 0% y un 10% de glicerol, respectivamente. El tiempo de refrigeración antes de añadir el diluyente 2 fue de 48 horas. Posteriormente, se congeló.

3.4.5. Congelación seminal

Finalizados los tiempos de preservación en cámara frigorífica (4°C), en cada una de las alícuotas se valoró la motilidad espermática total y progresiva, comprobando la viabilidad del semen, antes de proseguir con el procedimiento de congelación.

De manera general, unos 10 minutos tras la adición del respectivo diluyente 2 en cada una de las alícuotas y, tal y como se indica en el protocolo de congelación en NL, el semen se dispuso en pajuelas correctamente identificadas que se expusieron durante 15 minutos a vapores de nitrógeno. El paso final fue la inmersión de las pajuelas en NL, donde quedaron almacenadas hasta su posterior descongelación.

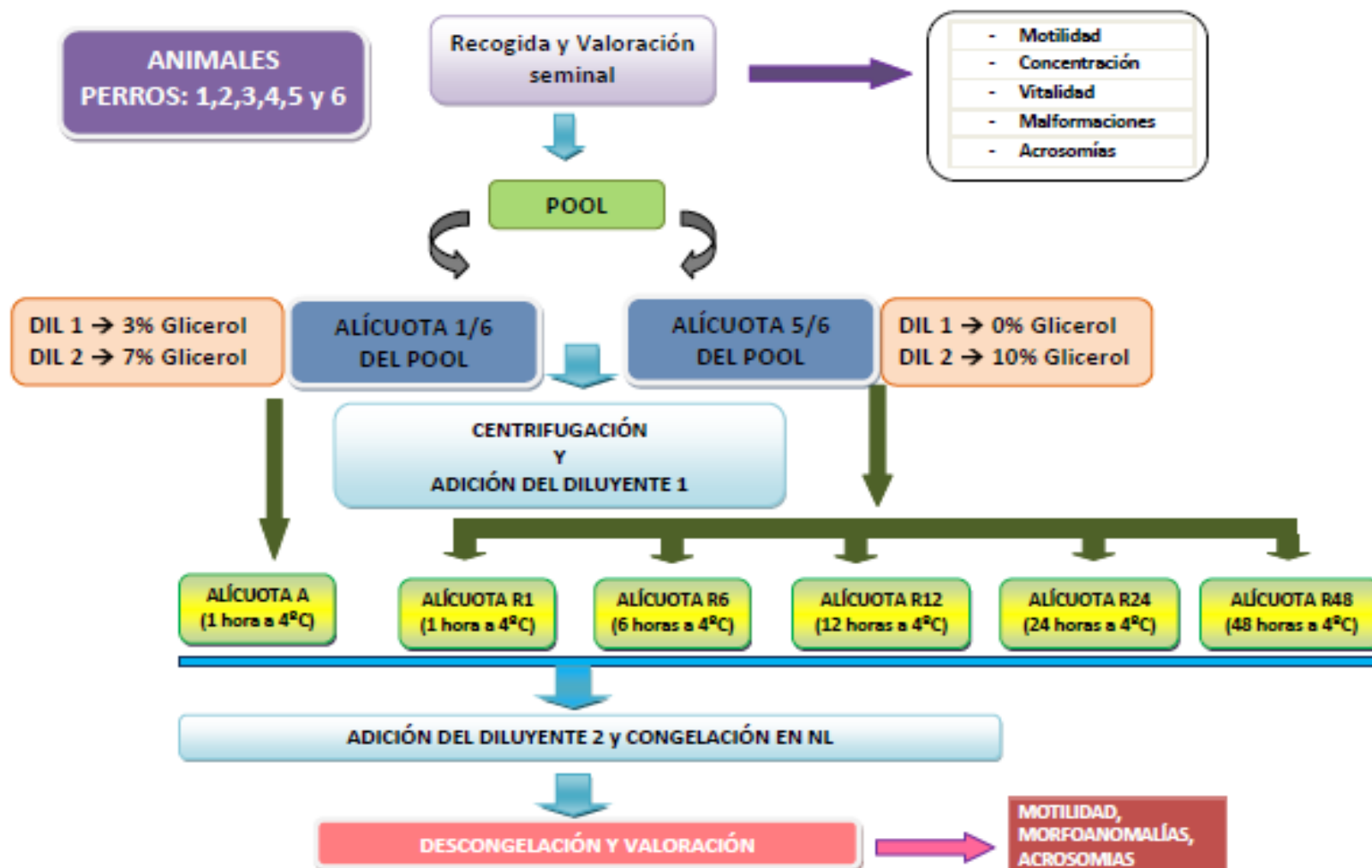
3.4.6. Descongelación del semen y valoración de la calidad seminal

La descongelación, al igual que para el resto de experiencias, se llevo a cabo mediante la introducción de las pajuelas en un medio con agua a 70°C durante 8 segundos. Posteriormente, se depositaba su contenido en 0.5 ml de PBS atemperado (37°C), donde fue correctamente resuspendido. Transcurridos unos 5 minutos, se procedió a valorar diferentes parámetros seminales, determinando la motilidad espermática total y progresiva (CASA) y el porcentaje de anomalías morfológicas y acrosomías, de manera similar a lo descrito en las experiencias previas.

3.4.7. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA Factorial con el objeto de determinar el efecto del parámetro estudiado, es decir, el tiempo de refrigeración previa congelación (1, 6, 12, 24 y 48 horas). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.5. Plan experimental de la Experiencia 4



3.5. EXPERIENCIA 5: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN TRAS SOMETERSE A DISTINTOS TIEMPOS DE EQUILBRADO Y DE VAPORES DE NITROGENO LÍQUIDO

3.5.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

En esta experiencia intervinieron 5 machos, todos ellos participantes en los experimentos anteriores. De esta forma, se utilizaron ejemplares de las razas Bulldog francés, Doberman, Pastor Belga, Bulldog inglés y Beagle, con un rango de pesos comprendido entre los 12 y 30 kilos, mientras la edad oscilaba de los 2 a los 5 años.

Como en los casos anteriores, y tratándose una vez más de ejemplares conocidos, los aspectos relacionados con la alimentación, alojamiento, estado sanitario general y cualidades reproductivas estaban perfectamente definidas y cumplían con los requisitos necesarios.

3.5.2. Diseño experimental

El método convencional de congelación del semen descrito para la raza canina incluye un periodo de equilibrado del semen en refrigeración a 4°C de 1 hora, así como un periodo de exposición de las pajuelas a vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos. La experiencia 5 tenía por objetivo evaluar las características del semen tras modificarse la duración (tiempo) de los parámetros previamente citados (tiempo de equilibrado y tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido). De esta forma, se pretendía comprobar si se producían variaciones en la calidad del semen, así como definir alternativas al método tradicional que permitiesen mejorar o simplificar el procedimiento de congelación seminal.

El plan experimental (**Figura 3.6**) consistió en recoger el semen de los distintos perros, y tras evaluar su calidad, se mezclaron formando un *pool* de trabajo. A continuación, se llevó a cabo el procesado habitual del semen para su congelación hasta añadir el diluyente 1 de congelación (Dil-1, **tabla 3.1**), con un 20% de yema de huevo y un 3% de glicerol. Acto seguido, el semen diluido se distribuía en 4 alícuotas (Alícuotas A, B, C y D) que serían equilibradas a 4°C durante diferentes periodos de tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente). Pasados estos tiempos de equilibrado, se añadía el diluyente 2 (Dil-2a, **tabla 3.1**), siguiendo el procedimiento habitual de congelación y finalmente el semen era empajuelado.

Llegados a este punto, cada grupo de pajuelas procedentes de las diferentes alícuotas, se dividieron en 3 grupos para ser expuestas a distintos tiempos a vapores de nitrógeno líquido

(5, 10 y 15 minutos). Posteriormente, las pajuelas se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron. Finalmente, las muestras fueron descongeladas, y su calidad seminal post-descongelación (motilidad espermática, anomalías morfológicas y acrosomías) fue determinada.

Se realizaron 2 repeticiones del ensayo. Para cada uno de los 12 grupos experimentales finales, se valoraron entre 15 y 20 pajuelas.

3.5.3. Recogida y contrastación del semen

Debido a que todos los ejemplares habían participado en experiencias anteriores, se obvió realizar una recogida seminal previa al estudio, para definir su calidad seminal. El semen se obtuvo por estimulación manual, realizando 2 recogidas seminales a cada animal, con una semana de diferencia.

Una vez obtenido, el semen se conservaba en el baño María a 37°C. De manera rutinaria y siguiendo la metodología de la experiencia 1, se realizó una determinación de los parámetros seminales en fresco, comprobando que el volumen, color, motilidad (total y progresiva) y concentración espermática fueran las adecuadas. Asimismo, se realizó las respectivas extensiones para valorar los porcentajes de vitalidad, acrosomías y morfoanomalías.

Una vez contrastada la calidad de los eyaculados procedentes de los 5 ejemplares, se depositaban en un único vaso de precipitado, en la búsqueda de elaborar un *pool* para trabajar. Obtenida una mezcla homogénea, se analizaban nuevamente la motilidad espermática, la concentración espermática, y los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías.

3.5.4. Dilución y distintos tiempos de equilibrado

Superada la fase de contrastación seminal en fresco, se comenzó con el procedimiento de diluyoconservación habitual. En primer lugar se realizó la centrifugación del *pool* de semen, se desechó el sobrenadante y se añadió el diluyente 1, estimado en base a la concentración espermática obtenida, para elaborar una dilución de 200×10^6 de espermatozoides/ml. La composición del diluyente 1 (Dil-1) era la misma que la recogida en la **tabla 3.1**, es decir, Tris (3.025 mg), ácido cítrico (1.7 mg), glucosa (1.25 mg), yema de huevo (20%), estreptomicina (100 mg), penicilina (100 mg), glicerol (3%) y hasta 100 ml de agua destilada. Todo este procesado se realizaba a temperatura ambiente (25°C).

A continuación, una vez realizada una homogeneización exhaustiva, se procedía a separar la dilución en 4 alícuotas que serían depositadas en distintos vasos de precipitados. Todas las diluciones se introdujeron en la cámara de refrigeración (4°C), para que las muestras fueran sometidas a diferentes periodos de equilibrado, antes de proseguir con los protocolos de congelación. De esta manera, trabajamos con las siguientes alícuotas:

- Alícuota A: 30 minutos en periodo de equilibrado
- Alícuota B: 60 minutos en periodo de equilibrado
- Alícuota C: 90 minutos en periodo de equilibrado
- Alícuota D: 120 minutos en periodo de equilibrado

3.5.5. Congelación seminal a diferentes tiempos en vapores de nitrógeno líquido

Finalizados los tiempos descritos para cada alícuota por separado, se procedía a continuar con el procedimiento de congelación tradicional, donde se adicionaba el diluyente 2: Tris (3.025 mg), ácido cítrico (1.7 mg), glucosa (1.25 mg), yema de huevo (20%), estreptomicina (100 mg), penicilina (100 mg), glicerol (7%), Equex (1%) y hasta 100 ml de agua destilada.

Unos 10 minutos tras la adición del diluyente 2, el semen se almacenaba en pajuelas para obtener un total de 50×10^6 de espermatozoides/pajuela. Después, las pajuelas eran distribuidas de forma equitativa en 3 grupos (5, 10, 15), cada uno de ellos destinados a someterse a vapores de NL, durante distintos tiempos (5, 10 y 15 minutos). Para ello, se habían preparado 3 cajas de poliestireno con sus respectivas rampas de congelación y su correspondiente volumen de nitrógeno líquido, todo ello diseñado para crear una atmósfera adecuada de vapores de nitrógeno líquido. Las pajuelas pertenecientes al grupo 5 eran expuestas a estas condiciones únicamente 5 minutos antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido y almacenarlas en sus respectivos globelets en el interior del criocontenedor. Esto se repetía para los grupos de pajuelas 10 y 15, pero exponiéndose en este caso 10 y 15 minutos a vapores, respectivamente.

En resumen, el semen fue dividido en 4 alícuotas y cada una de ellas sometida a un tiempo de equilibrado diferente (30, 60, 90 y 120 minutos, alícuotas A, B, C y D, respectivamente). Posteriormente, estas alícuotas fueron sometidas a 3 tiempos distintos (5, 10 y 15 minutos) de exposición a vapores de nitrógeno líquido, antes de ser finalmente congeladas. Es decir, se obtuvieron 12 grupos de pajuelas, cuya nomenclatura se recoge en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Grupos experimentales definidos en función del tiempo de equilibrado (30, 60, 90, 120 minutos) y la posterior exposición a vapores de nitrógeno líquido (5, 10, 15 minutos)

Congelación en vapores NL	Periodo de equilibrado a 4°C			
	30 Minutos	60 Minutos	90 Minutos	120 Minutos
5 Minutos	A5	B5	C5	D5
10 Minutos	A10	B10	C10	D10
15 Minutos	A15	B15	C15	D15

3.5.6. Descongelación del semen y valoración de la calidad seminal

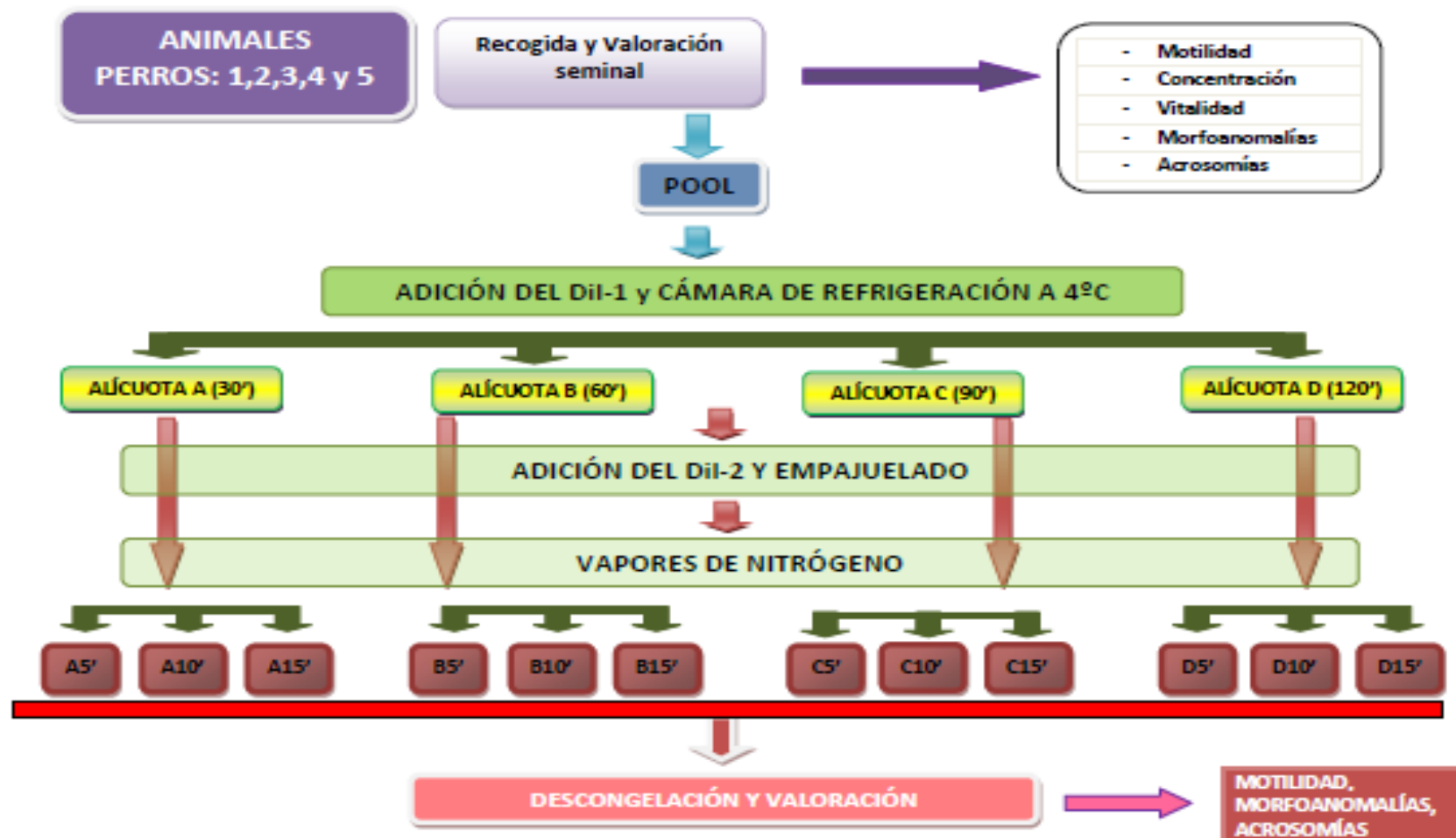
La descongelación se realizó de la forma habitual (70°C, 8 segundos). Posteriormente, se depositaba su contenido en 0.5 ml de PBS (37°C), esperando unos 5 minutos a que la muestra se atemperase, antes de comenzar con la evaluación post-descongelación. Las pajuelas de cada uno de los 12 grupos experimentales se valoraron de manera individual.

La motilidad espermática total y progresiva se evaluó en la totalidad de las pajuelas descongeladas (entre 15 y 20 pajuelas/grupo), mientras el porcentaje de espermatozoides normales (cabeza, pieza intermedia, cola) y de acrosomas alterados se determinó en 1 de cada 2 pajuelas descongeladas. La metodología empleada fue similar a las experiencias previas.

3.5.7. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas con el objeto de determinar el efecto de los diferentes parámetros estudiados así como la interacción existente entre los mismos; de este modo las variantes estudiadas fueron el tiempo de equilibrado (30, 60, 90 y 120 minutos) y el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido (5, 10 y 15 minutos). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y acrosomías) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.6. Plan experimental de la Experiencia 5



3.6. EXPERIENCIA 6: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONGELADO Y ALMACENADO EN NITRÓGENO LÍQUIDO VS NITRÓGENO SECO

3.6.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

La experiencia 6 fue llevada a cabo utilizando 5 machos de distintas razas (1 Beagle, 1 Bulldog Francés, 1 Teckel, 1 Labrador Retriever y 1 mestizo) pertenecientes, como en casos anteriores, a propietarios particulares. Una vez más, se solicitaba que los animales se encontrasen dentro de los requerimientos sanitarios y capacidades reproductivas exigidas, para catalogarlos aptos para nuestro estudio.

En función de la combinación de razas utilizadas, el peso de los animales participantes se situó entre los 6 y 25 kilos, mientras que su edad se comprendía entre 1 y 4 años.

3.6.2. Diseño experimental

La experiencia comenzaba con la recogida y estudio seminal de los 5 perros, se generaba un *pool* y finalmente el semen se sometía al protocolo habitual de congelación seminal en nitrógeno líquido. Una vez congeladas en nitrógeno líquido, las pajuelas se distribuían en 2 grupos: un grupo continuaba almacenado en el criocontenedor de nitrógeno líquido (NL), mientras el segundo grupo se almacenaba en el criocontenedor de nitrógeno seco (NS). El plan experimental aparece reflejado en la **figura 3.7**.

Posteriormente, las pajuelas eran descongeladas tras varios días de crioconservación en ambos protocolos. El objetivo era valorar las características seminales (motilidad espermática total y progresiva, anomalías morfológicas y acrosomías), contrastando si la calidad seminal se modificaba en función del tiempo almacenado y el método de almacenamiento. Siguiendo este procedimiento, el número de pajuelas valoradas fueron 10 para cada método (NL y NS) a los días 1, 2, 3, 5 y 7 post-congelación.

3.6.3. Recogida, contrastación, dilución y congelación seminal

La experiencia comenzaba con la obtención del semen mediante estimulación manual y se continuaba con una valoración del mismo, para determinar sus características, mientras se conservaba a baño María de 37°C. Después de seleccionar los eyaculados adecuados para el estudio, se procedió a realizar la mezcla de los mismos y generar un *pool*.

Tras definir las características del *pool* (motilidad espermática total y progresiva, concentración espermática, anomalías morfológicas y acrosomías), se continuó con los procesos de diluyo-conservación, de forma similar a lo descrito para la experiencia 1. Brevemente, en primer lugar se adicionó el diluyente 1 (Dil-1, **tabla 3.1**) en volumen suficiente para obtener una dilución seminal de 200×10^6 millones de espermatozoides/ml. Seguidamente, tras pasar el correspondiente periodo de equilibrado en cámara frigorífica a 4°C (1 h) y comprobar que el semen mantenía suficiente calidad para continuar el proceso, se proseguía con la adición del diluyente 2 (Dil-2a, **tabla 3.1**) hasta alcanzar una concentración final de 100×10^6 millones de espermatozoides/ml, 20% de yema de huevo, 5% de glicerol y 1% Equex.

Posteriormente, el semen fue empajuelado y las pajuelas expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos, para terminar por sumergirlas en nitrógeno líquido. Finalmente, las pajuelas fueron equitativamente distribuidas en globelets formando 2 grupos: uno de ellos se almacenó en el criocontenedor de nitrógeno líquido (NL), mientras que el otro se dispuso en un criocontenedor de nitrógeno seco (NS). El criocontenedor de NS había sido previamente rellenado con NL y una vez que la temperatura en la cámara interna del criocontenedor de NS era inferior a -160°C, el nitrógeno líquido residual fue eliminado. Durante el resto del periodo experimental no se añadió más nitrógeno líquido al criocontenedor de nitrógeno seco.

El criocontenedor de nitrógeno seco utilizado fue el modelo Cryogenic Dry Shipper PSX1000 (Cryoport System®). Las dimensiones externas del mismo eran de 62.2 cm x 7.1 cm de diámetro, mientras que el radio de acceso a la zona interna de stock de muestras era de 7.1 mm. Su capacidad de almacenaje es de 290 pajuelas de 0.5 ml, el volumen de nitrógeno líquido capaz de absorber es 5 litros y puede mantener (según las indicaciones del fabricante) una temperatura inferior a -160°C, hasta 8 días aproximadamente.

El número de pajuelas congeladas fue de 100, de manera que en cada uno de los métodos testados se almacenaron un total de 50 pajuelas.

3.6.4. Descongelación y valoración seminal post-descongelación

Con el objetivo de evaluar las modificaciones que pudieran ocasionarse en los parámetros seminales como resultado del método de almacenamiento y el tiempo de permanencia en los mismos, se estandarizó un protocolo de descongelaciones seriadas los días 1, 2, 3, 5 y 7 post-congelación. Por tanto, para cada día de descongelación propuesto se llevo a cabo la descongelación de 20 pajuelas (10 almacenadas en NL y 10 almacenadas en NS).

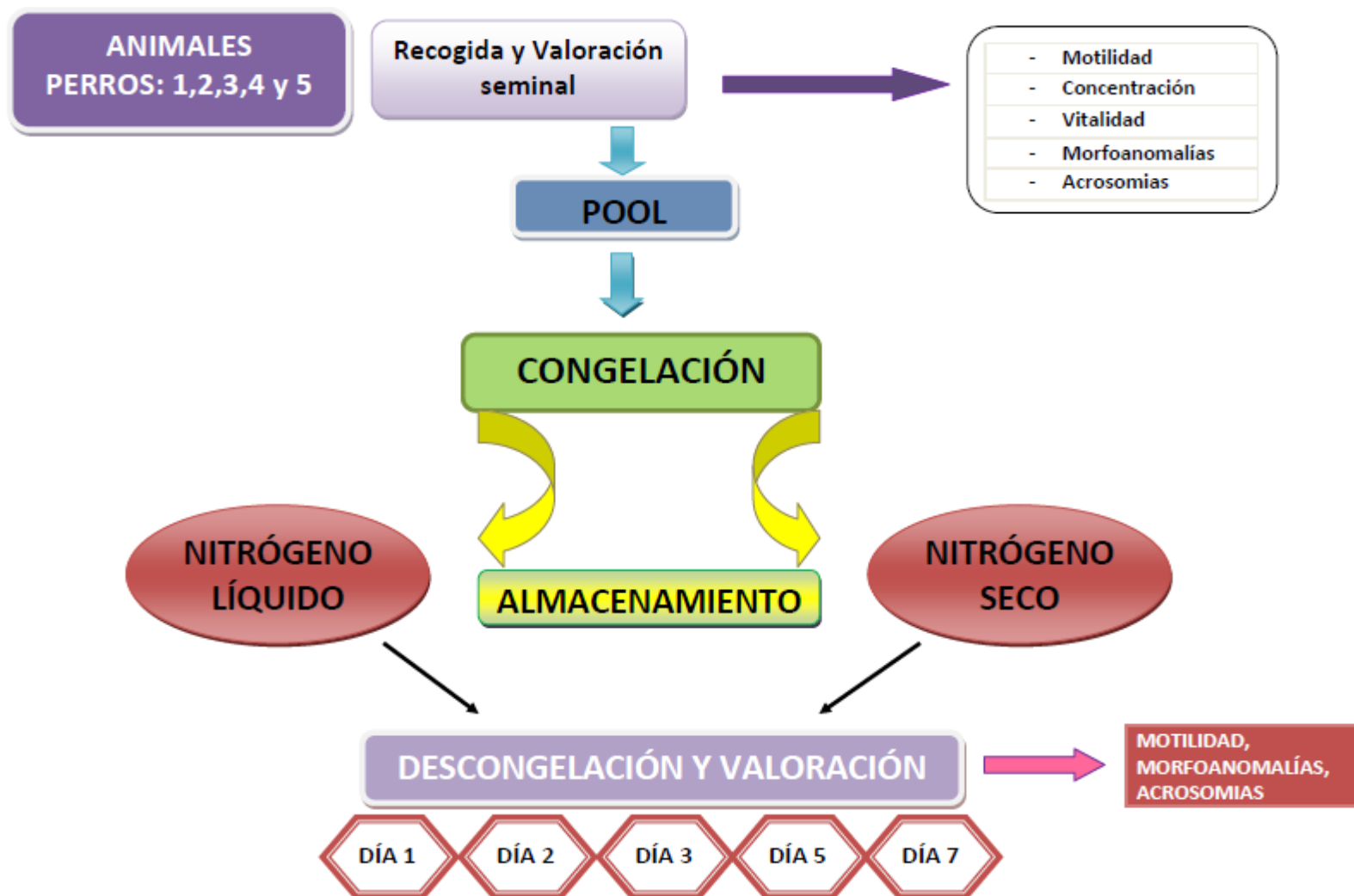
El procedimiento seguido fue idéntico que los descritos con anterioridad, es decir, depositar el contenido de la pajuela en 0.5 ml de tampón Tris Buffer, tras haber sumergido la pajuela durante 8 segundos en un baño a 70°C. La valoración de los diferentes parámetros seminales (motilidad espermática subjetiva, total y progresiva, anomalías morfológicas y acrosomías) se realizó siguiendo el procedimiento descrito en las experiencias anteriores. La motilidad espermática se valoró en todas las pajuelas, alrededor de 5 minutos tras la descongelación de las mismas, una vez que el semen se hubiese atemperado a 37°C. Asimismo, las acrosomías y morfoanomalías se valoraron en 1 de cada dos pajuelas, seleccionadas al azar.

Por otro lado, con el fin de monitorizar las variaciones de temperatura en el criocontenedor de NS, este parámetro se valoró todos los días evaluados (1, 2, 3, 5 y 7) haciendo uso de un termómetro Crison. Para ello, la sonda se introducía hasta el fondo del criocontenedor donde, tras cerrar herméticamente el recipiente, la temperatura se registraba (a través de la pantalla digital). El tiempo que se empleaba en la determinación de la temperatura era alrededor de 5 minutos.

3.6.5. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA Factorial con el objeto de determinar el efecto y la interacción de los parámetros estudiados, que en este experimento fueron el método de congelación (NL y NS) y el tiempo de criopreservación (1, 2, 3, 5 y 7 días). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.7. Plan experimental de la Experiencia 6



3.7. EXPERIENCIA 7: NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA EN FUNCIÓN DE LA ESTIMULACIÓN SEXUAL

3.7.1. Animales, plan sanitario, alimentación y alojamiento

En esta fase experimental se utilizaron 4 machos de raza Beagle, con pesos comprendidos entre los 12 y 14 kilos y un rango de edad que se situaba entre los 3 y 6 años. Dos de ellos pertenecían a la Unidad de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria (ULPGC), mientras que los otros dos eran de propietarios particulares.

En cualquier caso, e independientemente del origen, al igual que para el resto de experiencias descritas, se realizó un control adecuado de su estado sanitario, alimentación, alojamiento y cualidades reproductivas (líbido y características reproductivas).

3.7.2. Diseño experimental

El objetivo de esta experiencia era determinar si se producían variaciones en los niveles plasmáticos de testosterona alrededor de la estimulación sexual y la eyaculación. El plan experimental se muestra en la **figura 3.8**.

Para ello se utilizaron 4 perros de la raza Beagle, a los que se le extrajeron muestras de sangre durante diferentes tiempos distribuidos en torno a la estimulación sexual (justo antes de la mismas y 10, 30, 60 y 120 minutos después). Este protocolo de extracción sanguínea se repitió un total de 9 veces, distribuidas en 3 ciclos:

- Ciclo 1, grupo control: 3 repeticiones sin estimulación sexual, para determinar los niveles plasmáticos de testosterona basal en ausencia de estímulo.
- Ciclo 2, estimulación hormonal: 3 repeticiones con estimulación mediante la aplicación de hCG.
- Ciclo 3, estimulación sexual: 3 repeticiones con recogida seminal mediante estimulación manual.

Una vez procesadas las muestras, se almacenaron en congelación hasta el momento de su valoración. La determinación de los niveles plasmáticos de testosterona se realizó mediante quimioluminiscencia en un laboratorio especializado.

3.7.3. Extracción de sangre

La extracción de sangre para determinar la concentración de testosterona en plasma se realizaba por punción de las venas braquiales y/o yugulares. Al tratarse de 6 tomas de sangre, se alternó los vasos de extracción para producir el mínimo daño posible al animal, intentando no puncionar dos veces seguidas el mismo vaso sanguíneo.

El volumen de sangre extraída oscilaba entre 2 y 3 ml y se disponía inmediatamente en un tubo heparinizado (Venoject Terumo®), homogeneizando adecuadamente con el fin de evitar siempre que se produjese la coagulación.

Las muestras eran almacenadas en refrigeración hasta el momento de su procesado; en cualquier caso, el periodo máximo de refrigeración antes de su procesado nunca fue superior a 1 hora. Las muestras se centrifugaban en una centrífuga Kubota (Modelo 5100) durante 15 minutos a una velocidad de 2.000 x g. A continuación, el plasma resultante era depositado en tubos debidamente identificados que se almacenaban en congelación a -80°C para la correcta conservación del plasma.

3.7.4. Métodos de estimulación: recogida seminal y hCG

Como se expuso en el plan experimental, el ensayo fue repetido un total de 9 veces. Los primeros 3 ensayos (grupo control, ciclo 1), se caracterizaban por la ausencia de estimulación sexual, mientras que en los 6 ensayos restantes se produjo algún tipo de estimulación, bien tras administración de un tratamiento hormonal (ciclo 2) o por recogida seminal (ciclo 3). En el grupo control, las muestras sanguíneas se recogieron durante 2 horas consecutivas, concretamente a los 0, 10, 30, 60 y 120 minutos, realizando este proceso en 3 ocasiones.

Tras finalizar la fase control, se realizó un nuevo ciclo de 3 repeticiones que se desarrolló en un periodo de 2 semanas. En este caso, se pretendía valorar la influencia de la administración de hCG exógena sobre la función esteroidogénica. El producto que se utilizó fue la Gonadotropina Coriónica humana (hCG Lepori, Farma Lepori®) a una dosis de 1000 UI y la vía de administración fue subcutánea. El protocolo llevado a cabo en esta fase se describe a continuación:

- 1º) Extracción de sangre → justo antes de la administración de hCG.
- 2º) Administración de hCG → Inmediatamente después de la 1º extracción sanguínea.
- 3º) Extracción de sangre → 10 minutos después de la administración de hCG.

- 4º) Extracción de sangre → 30 minutos después de la administración de hCG.
- 5º) Extracción de sangre → 60 minutos después de la administración de hCG.
- 6º) Extracción de sangre → 120 minutos después de la administración de hCG.

Por otro lado, el último ciclo del experimento constaba de 3 repeticiones y también tuvo lugar en un periodo de 2 semanas (al menos con 3-4 días de descanso entre extracciones). En este caso, la toma de muestras de sangre fue acompañada de una recogida seminal (estimulación manual) y eyaculación. El protocolo seguido en esta fase fue el siguiente:

- 1º) Extracción de sangre → justo antes de la recogida seminal.
- 2º) Recogida seminal → Inmediatamente después de la 1º extracción sanguínea.
- 3º) Extracción de sangre → 10 minutos después de la recogida seminal.
- 4º) Extracción de sangre → 30 minutos después de la recogida seminal.
- 5º) Extracción de sangre → 60 minutos después de la recogida seminal.
- 6º) Extracción de sangre → 120 minutos después de la recogida seminal.

En este grupo, el momento 0 se definió cuando los perros completaron la eyaculación. El tiempo que transcurría entre el inicio de la estimulación sexual hasta la completa eyaculación osciló entre 5-6 minutos en todos los perros. No se utilizó una hembra en celo para inducir la estimulación sexual.

El semen obtenido fue valorado en fresco para determinar los parámetros de calidad seminal. Así, utilizando los protocolos habituales, se definieron la motilidad espermática subjetiva, total y progresiva, concentración de espermatozoides, anomalías morfológicas y acrosomías.

3.7.5. Determinación de los niveles plasmáticos testosterona

Finalmente, tras finalizar la recogida de muestras sanguíneas, una vez obtenido el plasma se almacenó, para posteriormente ser enviado a un laboratorio de referencia (VetLab, Barcelona) para la determinación de los niveles hormonales de testosterona en sangre en los distintos tiempos propuestos.

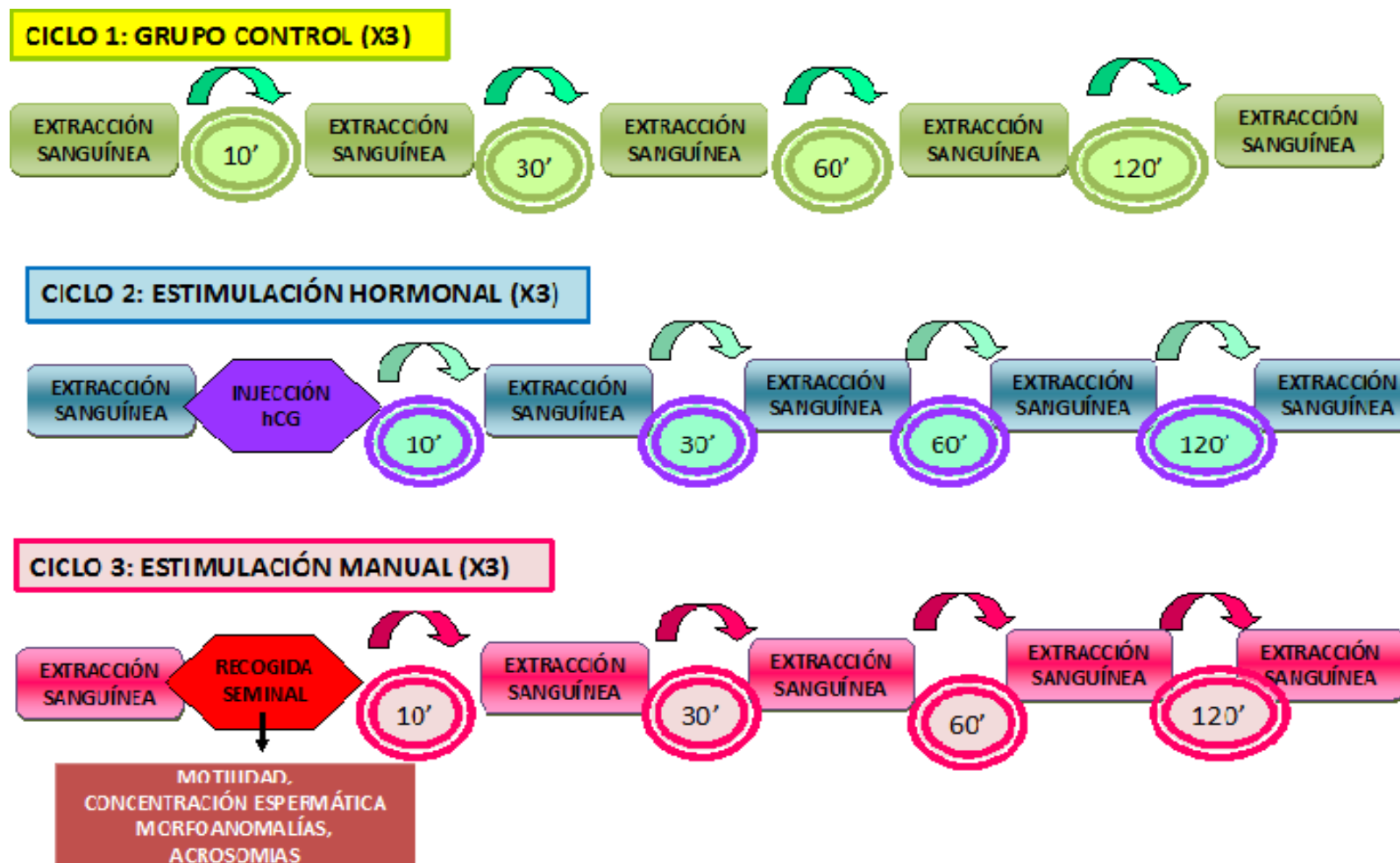
La técnica utilizada para tal fin fue la electroquimioluminiscencia, definida como la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química. Se utilizó un kit comercial de testosterona (Testosterona, Roche Diagnostics®) que el laboratorio había validado para su utilización en la especie canina. El procedimiento presenta un principio básico donde la muestra (50 µl) se incubaba con un anticuerpo específico antitestosterona y un derivado de testosterona marcado con quelato de rutenio. Los puntos de fijación del anticuerpo marcado son ocupados, según sea la concentración de testosterona presente en la muestra, en parte por la testosterona de la muestra y en parte por el hapteno marcado con rutenio, provocando la formación del inmunocomplejo respectivo. En una segunda incubación, tras la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y estreptavidina. Finalmente, la mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Al aplicar una corriente eléctrica definida, se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

El protocolo incluía la utilización de un analizador automático Elecsys 1010/2010 (Roche Diagnostics®). La curva de referencia presentaba un rango que oscilaba entre 0.1 y 20 ng/ml. La sensibilidad del ensayo fue de 0.04 ng/ml y los coeficientes de variación intraensayo fueron del 2.8% y 11.2%, para unas muestras conocidas con baja (0.5 ng/ml) y alta (8 ng/ml) concentración de testosterona, respectivamente.

3.7.6. Análisis estadístico

Los resultados han sido presentados como media ($\pm$ error estándar de la media). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC). El modelo de estudio se realizó mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas con el objeto de determinar el efecto de los diferentes parámetros estudiados así como la interacción existente entre los mismos; de este modo las variantes estudiadas fueron los machos (4 perros), el tratamiento experimental (control, administración de hCG y recogida seminal) y el tiempo de la medición hormonal (0, 10, 30 60 y 120 minutos tras la estimulación). Las variables (motilidad espermática, espermatozoides con morfología anormal y espermatozoides con acrosomas alterados) se expresaban en porcentajes calculados a partir de la transformación de los datos mediante el arcoseno antes del análisis. Las diferencias significativas entre medias quedaban establecidas cuando se comparaban utilizando un test de Tukey, considerando que los valores eran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Figura 3.8. Plan experimental de la Experiencia 7



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: CARACTERÍSTICAS SEMINALES POST-DESCONGELACIÓN EN MUESTRAS CONSERVADAS EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

4.1.1. Características del semen fresco

En la **tabla 4.1** quedan recogidos los resultados individuales y la media de las valoraciones del semen en fresco de los perros participantes en el experimento 1. El volumen medio de los 8 ejemplares se estableció en 5.42 ml mientras que el rango medio individual oscilaba entre los 4 y 7 ml aproximadamente, si bien en 6 de ellos estuvo por debajo de los 6 ml. La concentración espermática se mantuvo por encima de los 300 millones de espermatozoides/ml en 7 de los animales, alcanzando los perros 2 y 3 más de 550×10^6 de espermatozoides/ml, para terminar por alcanzar unos registros de 2.200 millones de espermatozoides totales de media. Los parámetros de motilidad fueron bastantes homogéneos para todos los individuos participantes. Así, la motilidad subjetiva media alcanzó un valor del 92%, siendo siempre superior al 90% (excepto en el perro 7 con un registro del 86%) con rangos individuales que continuamente la situaban entre el 80% y 95%. Asimismo, la motilidad total se mostró ligeramente superior, con porcentajes individuales muy homogéneos cercanos al 98%, valor que se repitió en la media; además, los valores más bajos registrados para este parámetro en todos los ejemplares siempre fueron superiores al 95%. Por otro lado, la motilidad progresiva nuevamente mostró una distribución muy uniforme para cada uno de los perros, de forma que los porcentajes medios individuales siempre se encontraron entre el 89 y el 94%, mientras que la media se situó en un 91.5%.

En referencia al porcentaje de anomalías morfológicas existentes en el semen, se observó que este parámetro variaba ligeramente en función de los perros; así, en 6 de los ejemplares (perros 1, 2, 3, 5, 6 y 8) el porcentaje se situó por debajo del 10%, mientras que los individuos 4 y 7 alcanzaron registros medios superiores al 18% y 13%, respectivamente. Finalmente, el porcentaje de acrosomas alterados reveló diferencias entre individuos de hasta un 8% entre algunos ejemplares, aunque de forma individual las medias siempre se situaron entre el 4% y el 12%, estableciéndose la media del total de individuos en un 7% aproximadamente.

Tabla 4.1. Características (media $\pm$ sem) del semen fresco de los diferentes ejemplares utilizados en la experiencia 1

	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Perro 6	Perro 7	Perro 8	Media
Volumen	7.07 $\pm$ 0.83	5.87 $\pm$ 0.18	4.30 $\pm$ 0.91	6.00 $\pm$ 0.74	4.7 $\pm$ 0.60	4.88 $\pm$ 0.31	5.60 $\pm$ 0.32	5.58 $\pm$ 0.36	5.42 $\pm$ 0.23
	(6.00-8.70)	(5.60-6.20)	(2.90-6.00)	(4.50-7.50)	(3.00-6.50)	(4.00-5.50)	(5.10-6.20)	(4.50-6.00)	(2.90-8.70)
Concentración (x 10⁶ esp/ml)	387.3 $\pm$ 83.8	579.6 $\pm$ 73.5	562.7 $\pm$ 95.7	335.7 $\pm$ 54.6	247.2 $\pm$ 19.5	395.7 $\pm$ 63.7	423.0 $\pm$ 77.0	492.0 $\pm$ 27.9	407.8 $\pm$ 27.6
	(251.0-540.0)	(437.0-682.0)	(442.0-794.0)	(245.0-490.0)	(161.0-280.0)	(260.0-567.0)	(269.0-501.0)	(424.0-557.0)	(161.0-794.0)
Motilidad Subjetiva	90.00 $\pm$ 5.00	95.00 $\pm$ 0.00	95.00 $\pm$ 0.00	90.00 $\pm$ 2.04	91.67 $\pm$ 1.05	92.50 $\pm$ 1.44	86.67 $\pm$ 1.67	95.00 $\pm$ 0.00	92.00 $\pm$ 0.74
	(80.00-95.00)	(95.00-95.00)	(95.00-95.00)	(85.00-95.00)	(90.00-95.00)	(90.00-95.00)	(85.00-90.00)	(95.00-95.00)	(80.00-95.00)
Motilidad Total	97.73 $\pm$ 1.39	98.63 $\pm$ 0.08	98.99 $\pm$ 0.05	97.84 $\pm$ 1.37	96.99 $\pm$ 0.62	99.33 $\pm$ 0.09	97.16 $\pm$ 0.44	97.64 $\pm$ 1.32	97.87 $\pm$ 0.30
	(96.34-99.11)	(98.47-98.73)	(98.93-99.04)	(96.47-99.21)	(95.30-98.59)	(99.24-99.42)	(96.69-98.05)	(95.10-99.54)	(95.10-99.54)
Motilidad Progresiva	91.58 $\pm$ 2.20	92.43 $\pm$ 0.67	93.48 $\pm$ 0.18	91.72 $\pm$ 2.90	91.43 $\pm$ 0.97	93.98 $\pm$ 0.32	90.09 $\pm$ 0.40	89.06 $\pm$ 2.34	91.52 $\pm$ 0.53
	(89.38-93.78)	(91.10-93.12)	(93.29-93.66)	(88.82-94.62)	(88.40-93.65)	(93.66-94.30)	(89.36-90.74)	(85.00-93.10)	(85.00-94.62)
Morfoanomalias	9.67 $\pm$ 0.88	8.33 $\pm$ 1.20	8.00 $\pm$ 2.31	18.75 $\pm$ 2.17	9.17 $\pm$ 1.54	5.75 $\pm$ 2.14	13.33 $\pm$ 2.40	6.00 $\pm$ 0.71	9.83 $\pm$ 0.94
	(8.00-11.00)	(6.00-10.00)	(4.00-12.00)	(15.00-23.00)	(5.00-15.00)	(1.00-7.00)	(10.00-18.00)	(4.00-7.00)	(1.00-23.00)
Acrosomías	10.00 $\pm$ 0.58	5.00 $\pm$ 1.00	4.33 $\pm$ 0.88	7.50 $\pm$ 3.57	11.83 $\pm$ 2.34	5.00 $\pm$ 1.83	5.00 $\pm$ 0.58	5.25 $\pm$ 1.03	6.37 $\pm$ 0.89
	(9.00-11.00)	(4.00-7.00)	(3.00-6.00)	(3.00-18.00)	(7.00-21.00)	(1.00-9.00)	(4.00-6.00)	(3.00-7.00)	(1.00-21.00)

4.1.2. Evolución de la motilidad total post-descongelación en los diferentes protocolos de congelación

La **tabla 4.2.** recoge los porcentajes medios de motilidad total en el protocolo de criopreservación en NL. La motilidad total se situó para todos los perros, independientemente del tiempo de conservación transcurrido, por encima del 54%. Durante los primeros 3 meses de criopreservación, los porcentajes medios individuales se situaron entre el 60% y el 80% aproximadamente, mientras que pasados 12 meses de conservación, los valores se redistribuyeron entre el 65% y el 85%. Los porcentajes máximos y mínimos siempre pertenecieron a los mismos ejemplares, mostrando los perros 3 y 8 los valores más altos, mientras el macho 5 presentaba los porcentajes más bajos. Finalmente, después de 18 meses en almacenamiento, la motilidad total decreció hasta situarse en porcentajes comprendidos entre el 54% y el 77%, mostrando 4 ejemplares (machos 2, 3, 5 y 7) valores inferiores al 65%. Al analizar los valores de la totalidad de individuos, la motilidad total media registró una gran uniformidad para los 4 primeros periodos de tiempos evaluados (1 día y 1, 3 y 12 meses), no existiendo diferencias relevantes entre ellos (valores medios: 72-74%). Por el contrario, tras 18 meses de criopreservación en NL, el porcentaje medio de este parámetro se redujo hasta un 65% aproximadamente, valor que mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) con los registrados con anterioridad en el resto de periodos de estudio.

Tabla 4.2. Motilidad total (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en nitrógeno líquido

	Periodos de evaluación				
	1 día	1 mes	3 meses	12 meses	18 meses
Perro 1	72.31 $\pm$ 5.45	68.48 $\pm$ 7.50	70.58 $\pm$ 7.07	72.74 $\pm$ 3.91	69.53 $\pm$ 7.60
Perro 2	73.83 $\pm$ 6.79	78.19 $\pm$ 2.90	75.20 $\pm$ 3.90	65.82 $\pm$ 3.50	60.14 $\pm$ 3.11
Perro 3	78.02 $\pm$ 1.82	81.06 $\pm$ 2.08	81.21 $\pm$ 2.75	85.20 $\pm$ 2.02	58.14 $\pm$ 5.68
Perro 4	62.58 $\pm$ 3.61	69.97 $\pm$ 3.16	61.38 $\pm$ 9.94	67.83 $\pm$ 4.24	71.54 $\pm$ 2.66
Perro 5	60.01 $\pm$ 4.62	62.09 $\pm$ 7.31	60.53 $\pm$ 5.83	68.75 $\pm$ 6.22	62.27 $\pm$ 8.19
Perro 6	78.17 $\pm$ 3.00	76.15 $\pm$ 4.06	79.62 $\pm$ 2.06	79.66 $\pm$ 3.01	77.06 $\pm$ 2.31
Perro 7	70.89 $\pm$ 1.87	68.90 $\pm$ 1.76	72.29 $\pm$ 2.20	70.33 $\pm$ 2.36	54.67 $\pm$ 6.77
Perro 8	82.07 $\pm$ 2.75	82.96 $\pm$ 1.37	81.77 $\pm$ 2.01	80.68 $\pm$ 3.07	66.45 $\pm$ 5.26
Total	72.38 $\pm$ 1.54 ^x	73.83 $\pm$ 1.52 ^x	72.96 $\pm$ 1.92 ^x	73.82 $\pm$ 1.47 ^x	64.72 $\pm$ 1.94 ^y

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

La **tabla 4.3** muestra los porcentajes de motilidad total registrados en las muestras de semen procesadas con un 0.5% de Equex y posteriormente almacenadas en ultracongeladores durante un periodo de 3 meses. Tras 1 día de criopreservación, la motilidad total individual casi siempre se situaba por encima del 60%, alcanzando valores superiores al 75% en tres ejemplares (perros 1, 2 y 3). En los siguientes periodos de valoración (1 y 3 meses), en 6 de los 8 ejemplares (perros 3, 4, 5, 6, 7 y 8), los porcentajes de motilidad fueron muy similares dentro de cada macho, no observándose diferencias relevantes a lo largo del tiempo. Los machos 1 y 2, experimentaron un notable descenso de sus valores medios al mes de conservación, pero recuperaron sus niveles tras 3 meses de preservación. Como consecuencia, al comparar los valores medios del total de individuos a lo largo del tiempo, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras valoradas tras 1 día y 90 días de preservación, pero si existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores registrados entre los 30 (66.4%) y 90 días (71.7%) de criopreservación.

Tabla 4.3. Motilidad total (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en ultracongelador (0.5% Equex) a lo largo del tiempo

	Periodos de evaluación		
	1 día	1 mes	3 meses
Perro 1	76.43 $\pm$ 5.07	48.78 $\pm$ 6.77	71.41 $\pm$ 7.03
Perro 2	76.55 $\pm$ 5.21	57.41 $\pm$ 8.95	80.67 $\pm$ 5.76
Perro 3	79.90 $\pm$ 0.87	79.74 $\pm$ 3.05	82.71 $\pm$ 2.99
Perro 4	59.71 $\pm$ 4.39	64.39 $\pm$ 4.97	59.43 $\pm$ 7.16
Perro 5	63.79 $\pm$ 4.27	60.36 $\pm$ 4.03	62.16 $\pm$ 4.36
Perro 6	65.99 $\pm$ 7.40	73.99 $\pm$ 3.77	72.70 $\pm$ 4.57
Perro 7	59.68 $\pm$ 3.80	61.59 $\pm$ 2.43	66.69 $\pm$ 1.87
Perro 8	71.00 $\pm$ 3.87	77.95 $\pm$ 3.57	79.74 $\pm$ 1.99
Media	68.71 $\pm$ 1.76 ^{xy}	66.36 $\pm$ 2.16 ^y	71.71 $\pm$ 2.11 ^x

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la **tabla 4.4** quedan registrados los porcentajes de motilidad total del semen procesado con un 1.0% de Equex y posteriormente almacenadas en ultracongeladores durante distintos periodos de tiempo. En el día 1 post-congelación, los porcentajes de motilidad total se situaban siempre por debajo del 80%, alcanzando los valores más bajos en los perros 4 y 7. Dentro de cada individuo, estos valores se mantuvieron prácticamente inalterados transcurridos 30 días de conservación, con porcentajes bastante similares con respecto al día 1 post-congelación (nunca superior a un 10% de diferencia). No obstante, a los 3 meses de conservación los valores medios individuales oscilaron de forma más notoria, mostrando un rango que se situaba entre un 50 y un 80%. En cualquier caso, al analizar los valores medios del total de individuos, se constató que los porcentajes de motilidad siempre se situaban entre un 66-67%, independientemente del periodo de tiempo transcurrido, por lo que evidentemente no se detectaron diferencias significativas entre estos valores para los tiempos evaluados.

Tabla 4.4. Motilidad total (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en ultracongelador (1.0% Equex) a lo largo del tiempo

	Periodos de evaluación		
	1 día	1 mes	3 meses
Perro 1	69.87 $\pm$ 2.83	63.74 $\pm$ 1.69	71.41 $\pm$ 7.03
Perro 2	67.03 $\pm$ 4.13	75.84 $\pm$ 3.02	76.14 $\pm$ 2.12
Perro 3	79.10 $\pm$ 2.68	74.72 $\pm$ 4.73	82.90 $\pm$ 2.64
Perro 4	57.92 $\pm$ 2.72	55.84 $\pm$ 3.56	49.50 $\pm$ 3.24
Perro 5	59.65 $\pm$ 4.96	64.43 $\pm$ 4.64	63.78 $\pm$ 2.65
Perro 6	74.82 $\pm$ 4.96	78.10 $\pm$ 4.15	60.75 $\pm$ 5.16
Perro 7	57.40 $\pm$ 4.15	55.68 $\pm$ 3.64	55.00 $\pm$ 4.47
Perro 8	63.09 $\pm$ 6.27	71.90 $\pm$ 4.21	67.76 $\pm$ 3.76
Media	66.14 $\pm$ 1.69	67.76 $\pm$ 1.68	66.13 $\pm$ 2.05

La **tabla 4.5** representa los porcentajes medios de motilidad total obtenidos en los diferentes métodos de congelación para los distintos periodos de tiempos establecidos. Cuando se realiza una comparativa de los métodos de congelación para un periodo de tiempo determinado, se puede evidenciar como, en el día 1 de preservación, el porcentaje de motilidad total de las muestras almacenada en NL se mostró significativamente mayor (72%, $p < 0.01$) que el obtenido para las conservadas en UF-1 (66%), no evidenciando diferencias con respecto a los porcentajes obtenidos para las muestras conservadas a UF-0.5. Asimismo, tras 1 mes de conservación, las alícuotas procesadas en NL fueron las que seguían manteniendo los valores más elevados, si bien sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto a las dosis procesadas con el protocolo UF-0.5. Finalmente, 3 meses después de la preservación seminal, los porcentajes registrados en NL y UF-0.5 (próximos al 72%) fueron significativamente superiores ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) que los observados en UF-1 (66%).

Tabla 4.5. Motilidad total (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en los diferentes protocolos de criopreservación a lo largo del tiempo

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	72.38 $\pm$ 1.54 ^{x,1}	68.71 $\pm$ 1.76 ^{xy,12}	66.14 $\pm$ 1.69 ²
1 mes	73.83 $\pm$ 1.52 ^{x,1}	66.36 $\pm$ 2.16 ^{y,2}	67.76 $\pm$ 1.68 ¹²
3 meses	72.96 $\pm$ 1.92 ^{x,1}	71.71 $\pm$ 2.11 ^{x,1}	66.13 $\pm$ 2.05 ²
12 meses	73.82 $\pm$ 1.47 ^x	-	-
18 meses	64.72 $\pm$ 1.94 ^y	-	-

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

4.1.3. Evolución de la motilidad progresiva post-descongelación en los diferentes protocolos de congelación

En la **tabla 4.6** quedan reflejados los porcentajes de motilidad progresiva en las muestras de semen almacenadas en NL durante diferentes periodos de tiempo. En general, los valores registrados 1 día post-congelación se situaban entre el 52% y el 72% aproximadamente, de forma que la mitad de los ejemplares (perros 2, 3, 6 y 8) presentaban valores por encima del 60% mientras que la otra mitad (perros 1, 4, 5 y 7) se encontraban por debajo de este porcentaje. Este rango de motilidad progresiva prácticamente se mantuvo transcurridos 30 y 90 días de preservación en nitrógeno líquido, alcanzando en ambos periodos valores superiores al 60% en 5 de los individuos, mostrando el perro 5 los valores más bajos, con registros del 43% y 37%, respectivamente para 1 y 3 meses.

Por otro lado, 12 meses después de la congelación, los registros fueron algo más heterogéneos que los descritos para los periodos anteriores, de forma que en el 75% (6/8) de los animales, los porcentajes se mantuvieron por encima del 55%, si bien en 3 de ellos, incluso, se situaron próximos o superiores al 70%. Transcurridos 18 meses de almacenamiento en NL, se detectó una disminución de la motilidad en la totalidad de los animales con valores siempre por debajo del 63%. Asimismo, se pudo observar que para todos los periodos de estudio, los animales

que presentaron continuamente los mayores registros fueron los perros 3, 6 y 8, mientras que el perro 5 se caracterizó por manifestar siempre los menores porcentajes.

Con respecto a los valores de motilidad progresiva medios, éstos se situaron en torno al 60% desde el día 1 post-congelación hasta transcurridos 12 meses de la misma; sin embargo, el decrecimiento en los porcentajes de este parámetro después de 18 meses de congelación quedo de manifiesto con el 47% registrado en este periodo, valor significativamente inferior ($p < 0.01$) al resto de los resultados medios detectados con anterioridad.

Tabla 4.6. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en nitrógeno líquido

	Periodos de evaluación				
	1 día	1 mes	3 meses	12 meses	18 meses
Perro 1	55.97 $\pm$ 8.26	60.61 $\pm$ 8.08	56.12 $\pm$ 7.66	55.28 $\pm$ 6.30	57.67 $\pm$ 8.95
Perro 2	61.10 $\pm$ 9.83	66.46 $\pm$ 3.70	61.09 $\pm$ 5.71	49.26 $\pm$ 5.66	35.57 $\pm$ 8.06
Perro 3	64.44 $\pm$ 2.88	72.72 $\pm$ 4.77	71.62 $\pm$ 3.76	75.28 $\pm$ 3.27	40.74 $\pm$ 4.80
Perro 4	53.12 $\pm$ 4.50	56.83 $\pm$ 5.26	51.68 $\pm$ 8.35	57.70 $\pm$ 4.35	63.28 $\pm$ 2.81
Perro 5	51.95 $\pm$ 4.63	43.27 $\pm$ 3.83	37.66 $\pm$ 9.01	49.79 $\pm$ 9.65	45.19 $\pm$ 10.30
Perro 6	66.92 $\pm$ 4.02	65.81 $\pm$ 5.42	68.76 $\pm$ 3.27	70.38 $\pm$ 3.44	62.24 $\pm$ 2.78
Perro 7	57.87 $\pm$ 3.01	51.84 $\pm$ 3.56	60.91 $\pm$ 2.25	56.62 $\pm$ 2.90	41.78 $\pm$ 7.11
Perro 8	71.59 $\pm$ 3.16	73.41 $\pm$ 1.91	70.80 $\pm$ 2.64	69.78 $\pm$ 5.12	37.18 $\pm$ 5.36
Total	60.57 $\pm$ 1.81 ^x	62.03 $\pm$ 2.07 ^x	60.10 $\pm$ 2.30 ^x	60.65 $\pm$ 2.08 ^x	47.53 $\pm$ 2.53 ^y

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

La **tabla 4.7** recoge los datos de motilidad progresiva para las muestras seminales congeladas en ultracongelador tras haber sido procesadas con un 0.5% de Equex. Tras un día de congelación, los porcentajes de motilidad fueron superiores al 55% en 5 de los perros (ejemplares 1, 2, 3, 6 y 8); no obstante, en los restantes machos, los valores obtenidos fueron inferiores, situándose

en torno al 50% e incluso por debajo (perro 7). Posteriormente, 1 mes post-congelación, los porcentajes oscilaron de forma no uniforme, de manera que se incrementaron en algunos ejemplares mientras que en otros decrecieron; en cualquier caso, el rango en este periodo se situó entre el 30% y el 70% aproximadamente, si bien en la mitad de los ejemplares los registros se encontraron por debajo del 50%. Por otro lado, a los 3 meses de preservación, los porcentajes de motilidad progresiva no mostraron un descenso importante con respecto a los valores obtenidos al mes, e incluso en dos de los ejemplares (perros 1 y 2), los registros de motilidad fueron equiparables a los obtenidos tras 1 mes de conservación. Al analizar el total de ejemplares, sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras preservadas durante 1 y 3 meses (53.5% y 59.9%, respectivamente), no evidenciándose diferencias con el valor medio obtenido el día 1 de preservación.

Tabla 4.7. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en ultracongelador (0.5% Equex) a lo largo del tiempo

	Periodos de evaluación		
	1 día	1 mes	3 meses
Perro 1	66.54 $\pm$ 6.21	29.96 $\pm$ 6.33	59.17 $\pm$ 9.41
Perro 2	67.20 $\pm$ 5.48	43.59 $\pm$ 10.85	72.01 $\pm$ 7.79
Perro 3	69.42 $\pm$ 2.38	66.58 $\pm$ 4.90	71.86 $\pm$ 6.45
Perro 4	50.51 $\pm$ 4.61	58.80 $\pm$ 5.57	49.68 $\pm$ 8.43
Perro 5	50.47 $\pm$ 4.96	47.31 $\pm$ 5.81	45.34 $\pm$ 4.14
Perro 6	57.13 $\pm$ 8.20	64.30 $\pm$ 4.53	61.38 $\pm$ 3.43
Perro 7	42.42 $\pm$ 3.89	40.82 $\pm$ 2.79	52.91 $\pm$ 3.53
Perro 8	59.25 $\pm$ 2.67	70.10 $\pm$ 4.62	69.10 $\pm$ 2.88
Media	57.21 $\pm$ 1.99 ^{xy}	53.54 $\pm$ 2.76 ^x	59.98 $\pm$ 2.55 ^y

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los porcentajes de motilidad progresiva de las muestras procesadas con un 1% de Equex y posteriormente congeladas y almacenadas en ultracongelador durante 3 meses quedan expuestos en la **tabla 4.8**. Transcurridas 24 horas de almacenamiento en ultracongelador, los porcentajes alcanzaron valores superiores al 60% en 2 de los perros y por debajo del 40% en otros 2, estableciéndose los registros medios en un 52%, aproximadamente. Asimismo, 1 mes después del procesado y almacenamiento, estos registros sólo descendieron de forma notoria en el perro 1, mientras que en el resto de los ejemplares se mantuvieron iguales o, incluso, aumentaron ligeramente, lo que produjo que el valor medio se estableciese en torno a un 55%. Algo similar sucedió después de 3 meses de preservación, ya que los porcentajes no disminuyeron en todos los ejemplares, situándose siempre entre el 41% y el 72%, mientras que el registro medio se situó en torno a un 55%. Por tanto, al comparar las medias en la totalidad de los animales, la motilidad progresiva mostró unos valores muy similares para los distintos periodos de tiempos evaluados en UF-1, no registrándose diferencias significativas.

Tabla 4.8. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en ultracongelador (1.0% Equex) a lo largo del tiempo

	Periodos de evaluación		
	1 día	1 mes	3 meses
Perro 1	54.71 $\pm$ 3.14	44.11 $\pm$ 3.55	-
Perro 2	52.91 $\pm$ 5.77	62.72 $\pm$ 5.45	64.59 $\pm$ 3.40
Perro 3	66.97 $\pm$ 4.02	62.56 $\pm$ 6.69	72.46 $\pm$ 4.22
Perro 4	39.57 $\pm$ 5.76	41.15 $\pm$ 6.56	45.41 $\pm$ 5.82
Perro 5	41.32 $\pm$ 6.94	54.16 $\pm$ 5.94	45.68 $\pm$ 3.59
Perro 6	68.30 $\pm$ 6.62	68.65 $\pm$ 4.68	53.30 $\pm$ 7.52
Perro 7	39.62 $\pm$ 4.23	38.79 $\pm$ 5.19	41.51 $\pm$ 6.37
Perro 8	52.43 $\pm$ 6.62	61.61 $\pm$ 6.32	56.24 $\pm$ 5.76
Media	51.84 $\pm$ 2.32	54.55 $\pm$ 2.31	54.59 $\pm$ 2.54

La **tabla 4.9** muestra los resultados medios de motilidad progresiva obtenidos en el semen procesado y almacenado en los diferentes métodos (NL, UF-0.5 y UF-1) a lo largo del periodo experimental. Cuando analizamos los resultados entre los distintos métodos para un periodo de tiempo determinado, se puede observar como el porcentaje de motilidad progresiva del semen almacenado en UF-1 (52%) fue inferior ($p<0.01$ para NL; $p<0.05$ para UF-0.5) a los alcanzados en NL y UF-0.5 (en torno al 57-60%). Transcurrido 1 mes de preservación, la motilidad progresiva continuó siendo superior en el protocolo con NL (60%, $p<0.01$) con respecto a los valores alcanzados para las muestras procesadas en el ultracongelador (53-54%), que no mostraban diferencias entre sí. Finalmente, 3 meses después de la congelación, los porcentajes de motilidad presentes para NL y UF-0.5 (60%) fueron ligeramente superiores al existente en UF-1 (55%), sin llegar a mostrar diferencias significativas entre ellos.

Tabla 4.9. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras criopreservadas en los diferentes protocolos a lo largo del tiempo

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	60.57 $\pm$ 1.81 ^{x,1}	57.21 $\pm$ 1.99 ^{xy,1}	51.84 $\pm$ 2.32 ²
1 mes	62.03 $\pm$ 2.07 ^{x,1}	53.54 $\pm$ 2.76 ^{y,2}	54.55 $\pm$ 2.31 ²
3 meses	60.10 $\pm$ 2.30 ^x	59.98 $\pm$ 2.55 ^x	54.59 $\pm$ 2.54
12 meses	60.65 $\pm$ 2.08 ^x	-	-
18 meses	47.53 $\pm$ 2.53 ^y	-	-

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

12: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p<0.05$)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

4.1.4. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en los diferentes protocolos de criopreservación

Las **tabla 4.10** muestra los registros de cabezas anormales presentes en el semen preservado, que mostraban una distribución bastante homogénea. De esta manera, en la mayor parte de los periodos valorados e independientemente del método, el valor máximo alcanzado siempre estuvo por debajo de un 10%, a excepción de una muestra crioconservada en UF-0.5% (1 día de conservación, 13%). Los porcentajes de cabezas anómalas en las dosis conservadas en NL fueron muy similares durante los 3 primeros meses de almacenamiento, presentando valores medios que se situaban entre el 2.9% y 3.4%, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Asimismo, transcurridos 12 y 18 meses de la congelación, los porcentajes de anomalías en la cabeza se mantuvieron prácticamente inalterables (en torno al 2%) en ambos intervalos de tiempo, siendo ($p<0.05$) con respecto a los periodos de tiempos previos (1 día, 1 mes, 3 meses). Por el contrario, en las dosis seminales conservadas en ultracongeladores, los porcentajes de cabezas anómalas se mostraron bastante homogéneas a lo largo del tiempo, de forma que tanto en UF-0.5 como en UF-1 no existieron diferencias importantes en los porcentajes medios a lo largo de todo el periodo experimental, oscilando entre un 2 y un 3% aproximadamente.

Por otro lado, cuando realizamos un análisis de los resultados obtenidos entre los distintos métodos de criopreservación para un periodo de tiempo concreto, no se detectaron diferencias significativas entre los distintos métodos tras 1 día de congelación. No obstante, en las muestras conservadas durante un mes post-congelación, el porcentaje de cabezas anómalas en NL (3.4%) fue significativamente superior ($p<0.05$) al alcanzado (2.4%) en las muestras conservadas en UF-1, si bien ninguna de ellas mostró diferencias relevantes respecto al obtenido en UF-0.5. Tras 3 meses de conservación, el NL registró una cantidad de anomalías de cabezas significativamente mayor ($p<0.05$) que las halladas en el UF-0.5, mientras que el porcentaje (2.8%) detectado en UF-1 no estableció diferencias en relación a los otros dos métodos.

Tabla 4.10. Porcentaje de cabezas espermáticas anormales (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras criopreservadas en los diferentes protocolos

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	2.91 $\pm$ 0.29 ^x	3.21 $\pm$ 0.42	2.48 $\pm$ 0.36
	(0.00-9.00)	(0.00-13.00)	(1.00-8.00)
1 mes	3.40 $\pm$ 0.34 ^{x,1}	3.11 $\pm$ 0.20 ¹²	2.40 $\pm$ 0.28 ²
	(1.00-8.00)	(1.00-5.00)	(0.00-5.00)
3 meses	3.25 $\pm$ 0.34 ^{x,1}	2.38 $\pm$ 0.31 ²	2.84 $\pm$ 0.36 ¹²
	(1.00-6.00)	(0.00-5.00)	(0.00-6.00)
12 meses	1.97 $\pm$ 0.29 ^y	-	-
	(0.00-6.00)	-	-
18 meses	2.04 $\pm$ 0.36 ^y	-	-
	(0.00-7.00)	-	-
Media total	2.71 $\pm$ 0.15	2.93 $\pm$ 0.19	2.55 $\pm$ 0.19

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5 : muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

Los porcentajes de piezas intermedias anómalos (**tabla 4.11**) detectados en NL fluctuaron a lo largo del tiempo, de manera que los mayores valores se alcanzaron el día 1 post-congelación. Sin embargo, estos valores fueron descendiendo progresivamente a lo largo del tiempo, si bien sólo se establecieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los registros hallados el día 1 (3.9%) y a los 12 meses (2.2%) de preservación. Analizando el protocolo UF-0.5, los registros de piezas intermedias anormales se situaron entre un 3-4%, no existiendo diferencias significativas a lo largo del tiempo. Una evolución similar se observó en los porcentajes de piezas intermedias alteradas en las muestras preservadas en UF-1, donde no existía variación en los valores medios (en torno a 2.5-3%) para los distintos periodos de tiempos evaluados. Por otro lado, tampoco se detectaron diferencias relevantes entre métodos cuando se analizó la evolución de los porcentajes de anomalías a nivel de la pieza

intermedias en un mismo periodo de tiempo. Con respecto a los porcentajes de piezas intermedias, la mayor parte de los registros se situaron entre un 0% y un 16%, y sólo una medición puntual en un individuo mostró un porcentaje mayor (24%, día 1, UF-0.5).

Tabla 4.11. Porcentaje de piezas intermedias anormales (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras criopreservadas en los diferentes protocolos

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	3.91 $\pm$ 0.71 ^x (0.00-16.00)	3.85 $\pm$ 0.84 (0.00-24.00)	2.81 $\pm$ 0.54 (0.00-11.00)
1 mes	3.13 $\pm$ 0.45 ^{xy} (0.00-9.00)	2.93 $\pm$ 0.49 (0.00-9.00)	2.96 $\pm$ 0.47 (0.00-8.00)
3 meses	2.67 $\pm$ 0.52 ^{xy} (0.00-13.00)	2.92 $\pm$ 0.55 (0.00-13.00)	2.47 $\pm$ 0.48 (0.00-6.00)
12 meses	2.20 $\pm$ 0.49 ^y (0.00-11.00)	-	-
18 meses	3.22 $\pm$ 0.73 ^{xy} (0.00-14.00)	-	-
Media total	3.07 $\pm$ 0.27	3.28 $\pm$ 0.39	2.77 $\pm$ 0.29

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

Con respecto al porcentaje de anomalías de colas espermáticas (**tabla 4.12**), en las muestras conservadas en NL, los porcentajes obtenidos los días 1, 30 y 90 de conservación se encontraban cercanos al 5%, siendo estos valores significativamente inferiores ($p < 0.01$) a los alcanzados a los 12 y 18 meses post-congelación (con un 8.9 y 10.1%, respectivamente). En cambio, estas diferencias no se detectaron cuando el método utilizado para la conservación fue el ultracongelador. De esta forma, los porcentajes de anomalías en las dosis seminales conservadas

en UF-0.5 se encontraban entre un 4.0 y 5.4%; mientras, en las muestras preservadas en UF-1, el rango se amplió ligeramente (3.8-5.7%), siempre en ausencia de diferencias relevantes. Asimismo, los registros de colas anómalas para los distintos métodos de congelación (NL, UF-0.5 y UF-1) transcurridos entre 1 y 90 días se caracterizaron por ser muy similares entre sí (en ausencia de diferencias importantes) y situándose siempre entre un 4% y un 6% aproximadamente. El rango de valores observados a lo largo los 3 primeros meses fue bastante uniforme, independientemente del método de conservación, de forma que los valores mínimos durante estos periodos de tiempo estaban entre el 0 y 1%, mientras que los máximos se encontraron entre el 10% y el 20%.

Tabla 4.12. Porcentaje de colas espermáticas anormales (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras criopreservadas en los diferentes protocolos

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	5.51 $\pm$ 0.51 ^x	5.36 $\pm$ 0.72	3.81 $\pm$ 0.66
	(1.00-12.00)	(1.00-20.00)	(0.00-12.00)
1 mes	4.77 $\pm$ 0.48 ^x	4.04 $\pm$ 0.53	4.72 $\pm$ 0.73
	(0.00-11.00)	(0.00-10.00)	(0.00-17.00)
3 meses	4.92 $\pm$ 0.58 ^x	4.62 $\pm$ 0.49	5.74 $\pm$ 0.74
	(0.00-10.00)	(0.00-10.00)	(1.00-11.00)
12 meses	8.87 $\pm$ 1.14 ^y	-	-
	(1.00-28.00)		
18 meses	10.14 $\pm$ 1.26 ^y	-	-
	(0.00-25.00)		
Media total	6.86 $\pm$ 0.41	4.71 $\pm$ 0.35	4.65 $\pm$ 0.41

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

Al analizar el promedio total de anomalías morfológicas (**tabla 4.13**) en las muestras preservadas en los distintos métodos de congelación, se determinó que los porcentajes entre el día 1 y 90 de almacenamiento, nunca mostraron más de un 3% de diferencia entre sí, situándose entre un 9 y un 12.5%. Esta distribución homogénea hizo que no se estableciesen diferencias entre métodos dentro de un periodo de tiempo concreto, ni a lo largo de los 3 primeros meses cuando se estudiaba la evolución de este parámetro dentro de un mismo protocolo de congelación. No obstante, pasado este periodo de tiempo, las dosis conservadas en NL mostraron un incremento en el promedio total de anomalías morfológicas que comenzó a evidenciarse a los 12 meses, cuando el porcentaje alcanzado fue del 13%, si bien sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras conservadas durante 18 meses (15.7%) y aquellas dosis preservadas durante los primeros 3 meses. Con respecto a los rangos, las muestras crioconservadas en NL durante 12 meses fueron las que mostraron un rango de valores más amplio, donde en una medición se alcanzó un porcentaje del 41%.

Finalmente, al realizar un estudio general de las anomalías morfológicas (**tablas 4.10. a 4.13**) de cada una de las partes del espermatozoide por separado (cabeza, pieza intermedia y cola), sin tener en cuenta los distintos periodos de tiempos evaluados, podemos observar como los valores medios obtenidos eran muy similares entre las muestras obtenidas tras almacenamiento en NL y en UF. Así, tanto el porcentaje medio de cabezas como de piezas intermedias se situaron en torno al 3%, mientras los valores medios de colas anormales fluctuaron ligeramente entre un 5% y un 7% aproximadamente, sin que, al igual que ocurría para las anomalías de cabeza y pieza intermedia, implicase la aparición de diferencias significativas entre métodos de crioconservación. Con respecto a las medias de los promedios totales, las muestras conservadas en NL fueron las que presentaron mayores porcentajes, con valores superiores al 12%, siendo significativamente diferentes con respecto a los registros observados en las muestras en UF-1.

Tabla 4.13. Porcentaje total de morfoanomalías (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en los diferentes protocolos de criopreservación

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	12.34 $\pm$ 1.01 ^x	12.42 $\pm$ 1.16	9.11 $\pm$ 0.92
	(4.00-27.00)	(2.00-30.00)	(2.00-16.00)
1 mes	11.30 $\pm$ 0.87 ^x	10.07 $\pm$ 0.76	10.08 $\pm$ 0.96
	(2.00-21.00)	(2.00-16.00)	(1.00-24.00)
3 meses	10.83 $\pm$ 0.80 ^x	9.92 $\pm$ 0.88	11.05 $\pm$ 1.28
	(4.00-20.00)	(3.00-19.00)	(2.00-21.00)
12 meses	13.03 $\pm$ 1.65 ^{xy}	-	-
	(4.00-41.00)		
18 meses	15.70 $\pm$ 1.68 ^y	-	-
	(1.00-29.00)		
Media total	12.64 $\pm$ 0.57 ¹	10.92 $\pm$ 0.57 ¹²	9.97 $\pm$ 0.58 ²

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas (p<0.05)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas (p<0.05)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

4.1.5. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en los diferentes protocolos de criopreservación

Los porcentajes de acrosomas anormales post-descongelación en las muestras procesadas y congeladas en los diferentes protocolos (NL, UF-0.5 y UF-1), quedan recogidos en la **tabla 4.14**. En referencia a las muestras conservadas en NL se observó como los mayores registros (11.8%, 10.9% y 8.6%) se obtuvieron para los días 1, 30 y 90, respectivamente. Sin embargo, transcurrido 1 año de preservación en este medio, estos valores comenzaron a disminuir, de forma que a los 12 y 18 meses el porcentaje de acrosomas anormales se situó entre un 5 y un 6%, significativamente ($p<0.05$) inferiores a los 3 primeros periodos de tiempo evaluados.

Con respecto a las muestras preservadas en ultracongeladores, no se detectaron diferencias relevantes en las cuantías de anomalías acrosómicas. Así, en UF-0.5, tanto los valores medios (entre un 9% y un 11% aproximadamente) como sus rangos (entre 1% y un 29%), fueron bastantes uniformes durante los 3 periodos de tiempos evaluados (1, 30 y 90 días), sin diferencias a destacar entre sí. Por otro lado, para las muestras en UF-1, los porcentajes obtenidos los días 1 y 30 correspondían con un 12.6% y un 9% respectivamente, con rangos que se situaban entre el 1 y el 27%; sin embargo, transcurridos 3 meses, este valor descendió hasta un 7% (tendente a la significación con respecto al porcentaje registrado el día 1; $p<0.07$).

Finalmente, al analizar los porcentajes medios de anomalías acrosómicas entre los distintos métodos, se evidenció como los valores mínimos se obtuvieron en el semen conservado en NL frente a las muestras almacenadas en UF, si bien nunca se registraron diferencias significativas en ninguno de los periodos de tiempo evaluados.

Tabla 4.14. Porcentaje de acrosomas anormales (media $\pm$ sem) post-descongelación de muestras preservadas en los diferentes protocolos de criopreservación

Periodos de evaluación	Protocolos de criopreservación		
	NL	UF-0.5	UF-1
1 día	11.80 $\pm$ 1.38 ^x	10.73 $\pm$ 1.11	12.56 $\pm$ 1.55
	(3.00-33.00)	(3.00-28.00)	(2.00-25.00)
1 mes	10.87 $\pm$ 1.67 ^x	9.39 $\pm$ 1.18	9.00 $\pm$ 1.60
	(1.00-32.00)	(1.00-25.00)	(1.00-27.00)
3 meses	8.54 $\pm$ 1.16 ^x	8.58 $\pm$ 1.54	7.05 $\pm$ 0.45
	(2.00-23.00)	(2.00-29.00)	(1.00-8.00)
12 meses	6.13 $\pm$ 0.59 ^y	-	-
	(0.0-11.00)		
18 meses	5.74 $\pm$ 0.64 ^y	-	-
	(0.00-14.00)		
Media total	8.82 $\pm$ 0.60	9.66 $\pm$ 0.72	9.03 $\pm$ 0.90

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas (p<0.05)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas (p<0.05)

NL: muestras preservadas en nitrógeno líquido. UF-0.5: muestras preservadas en ultracongeladores y un 0.5% de Equex;

UF-1: muestras preservadas en ultracongeladores y un 1.0% de Equex

4.2. EXPERIMENTO 2: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS A LO LARGO DEL TIEMPO

4.2.1. Motilidad espermática del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación

En la **tabla 4.15** se recopilan los datos del semen en fresco (individual y *pool*) de los ejemplares utilizados en la experiencia 2. El volumen medio individual osciló entre 1.33 y los 6.37 ml, presentando la concentración media del *pool* un valor de 361 millones de espermatozoides/ml; con respecto a la cantidad total de espermatozoides en el eyaculado, mostró un rango individual entre 600 a 3000 millones de espermatozoides/eyaculado.

Al analizar los datos de motilidad espermática, se observó como la motilidad subjetiva se situó entre el 75 y 80% en 4 de los perros (perros 2, 3, 4 y 5), mientras que un macho obtuvo un porcentaje próximo al 95%. La motilidad total (valorada por sistema CASA) siempre fue superior al 85%, registrándose un valor medio del 90% para el total de ejemplares. Asimismo, los porcentajes de motilidad progresiva (valorada por sistema CASA) mostraron valores que se distribuían de la misma forma que los registrados para la motilidad subjetiva, es decir, individuos del 2 al 5 entre 75-80% aproximadamente, y el perro 1 por encima de 90%. Con respecto al *pool*, se determinaron valores medios del 87%, 97% y 90% para la motilidad subjetiva, total y progresiva, respectivamente.

En relación al porcentaje medio de anomalías morfológicas y acrosomías, siempre se situaron entre un 1 y un 6% en la totalidad de los ejemplares, mientras que en el *pool* presentaban valores no superiores al 5 %.

Tabla 4.15. Características (media $\pm$ sem) del semen fresco de los diferentes ejemplares y del *pool*

	Media						<i>Pool</i>
	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Individual	
Volumen	6.37 $\pm$ 0.55	2.13 $\pm$ 0.29	5.00 $\pm$ 0.35	1.33 $\pm$ 0.41	2.75 $\pm$ 0.35	3.68 $\pm$ 0.60	3.17 $\pm$ 0.54
	(5.50-7.00)	(1.80-2.60)	(5.00-6.00)	(1.00-2.00)	(2.50-3.00)	(1.00-7.00)	(2.50-4.00)
Concentración (x 10 ⁶ esp/ml)	504.33 $\pm$ 52.16	228.00 $\pm$ 28.80	139.67 $\pm$ 31.66	472.33 $\pm$ 88.44	657.00 $\pm$ 96.17	381.93 $\pm$ 55.8	361.33 $\pm$ 8.73
	(454.0-589.0)	(185.0-266.0)	(98.0-187.0)	(328.0-549.0)	(589.0-725.0)	(98.0-725.0)	(351.0-375.0)
Motilidad Subjetiva	93.33 $\pm$ 2.04	78.33 $\pm$ 7.36	75.00 $\pm$ 3.54	80.00 $\pm$ 7.07	75.00 $\pm$ 21.51	80.33 $\pm$ 9.93	86.67 $\pm$ 4.08
	(90.00-95.00)	(70.00-90.00)	(70.00-80.00)	(70.00-90.00)	(40.00-95.00)	(40.00-95.00)	(80.00-90.00)
Motilidad Total	98.22 $\pm$ 1.11	88.53 $\pm$ 4.95	86.65 $\pm$ 1.75	86.63 $\pm$ 6.95	91.12 $\pm$ 9.92	90.23 $\pm$ 2.24	96.99 $\pm$ 1.00
	(96.54-99.66)	(82.92-96.38)	(85.20-89.51)	(76.38-95.97)	(74.93-99.77)	(74.93-99.77)	(95.36-97.85)
Motilidad Progresiva	92.20 $\pm$ 1.50	81.56 $\pm$ 5.63	78.05 $\pm$ 2.21	76.65 $\pm$ 8.09	81.13 $\pm$ 14.09	81.92 $\pm$ 2.91	89.94 $\pm$ 1.30
	(89.96-94.18)	(75.80-90.64)	(75.75-81.60)	(66.02-88.76)	(58.18-94.14)	(58.18-94.18)	(87.83-91.24)
Morfoanomalías	2.00 $\pm$ 1.07	4.00 $\pm$ 1.07	3.56 $\pm$ 0.48	2.67 $\pm$ 0.19	3.44 $\pm$ 1.28	3.13 $\pm$ 0.40	4.44 $\pm$ 0.11
	(0.00-4.00)	(2.00-6.00)	(2.00-5.00)	(2.00-3.00)	(2.00-6.00)	(0.00-6.00)	(1.00-6.00)
Acrosomías	1.00 $\pm$ 0.58	4.00 $\pm$ 2.08	3.33 $\pm$ 1.45	2.00 $\pm$ 0.58	1.33 $\pm$ 0.33	2.33 $\pm$ 0.55	3.62 $\pm$ 0.31
	(0.00-2.00)	(0.00-7.00)	(1.00-6.00)	(1.00-3.00)	(1.00-2.00)	(0.00-7.00)	(2.00-5.00)

Las **Figuras 4.1, 4.2 y 4.3** presentan los resultados de motilidad total obtenidos para las muestras de semen individual y en *pool* expuestas a los diferentes protocolos de preservación: baño María (37°C), temperatura ambiente (25°C), 4°C y/o congelación-descongelación (y conservación a 37°C). Los valores de motilidad total registrados inicialmente (hora 0) fueron siempre superiores al 90%, tanto para medias individuales como en el *pool* (91% y 97%, respectivamente).

En las alícuotas preservadas a **37°C (Figura 4.1)**, se detectó un descenso significativo ($p<0.01$) de los porcentajes de motilidad total desde la hora 1 (con respecto al momento inicial), presentando valores que se mantuvieron muy estables (alrededor del 60-65%) hasta las 8 h. de preservación en el *pool* y 4 h. en las muestras individuales, no observándose diferencias importantes a lo largo de este periodo de tiempo. Sin embargo, pasadas 8 h. de incubación a 37°C, las muestras individuales sufrieron una considerable ($p<0.01$) disminución de la motilidad total (42.1%) con respecto a las 4 h., continuando este descenso a las 12 h. (28.4%). Al comparar muestras individuales y muestras en *pool* no se detectaron diferencias significativas, si bien los valores del *pool* fueron superiores a las 8 y 12 h. de incubación. Tras 24 h., la motilidad total alcanzó valores prácticamente indetectables.

Las muestras conservadas a **25°C (Figura 4.1 y Figura 4.3)** presentaron unos valores de motilidad total que perduraron en niveles aceptables ($> 50\%$) prácticamente el doble de tiempo que las preservadas a 37°C. En las muestras procesadas individualmente, los porcentajes de motilidad total oscilaron entre el 55% y el 70%, entre las horas 1 y 24 de conservación, sin diferencias relevantes entre ellos. Sin embargo, a partir de las 48 horas de preservación, la motilidad espermática sufrió un abrupto descenso, con valores inferiores al 10%, muy por debajo ($p<0.01$) a los registrados hasta ese momento. En referencia al *pool* seminal, los porcentajes registrados tampoco mostraron diferencias trascendentes a lo largo del tiempo entre 1 y 24 horas de conservación, con valores en torno a un 60-70% de motilidad total. Posteriormente, a las 48 y 72 h. de preservación, el porcentaje de motilidad total se redujo aproximadamente hasta el 20%, detectándose diferencias significativas ($p<0.01$) con los registros existentes entre las 0 y 24 horas. Además, continuaron disminuyendo progresivamente a las 96 y 120 horas, alcanzando valores inapreciables tras 6 días de preservación en estas condiciones. Al comparar las muestras preservadas a 37°C y a 25°C, los valores fueron bastante similares durante las primeras 8 h., pero a partir de ese momento, se registraron mejores porcentajes en las muestras conservadas a 25°C.

Las muestras conservadas a **4°C** (**Figura 4.2 y Figura 4.3**) fueron las que más perduraron en el tiempo respecto al resto de temperaturas de preservación, con porcentajes de motilidad total que disminuyeron de manera mucho más progresiva. De este modo, en las medias de las muestras individuales, el porcentaje de motilidad total se mantuvo por encima del 50% (rango 52-71%) desde la hora 1 a la hora 48, no existiendo diferencias relevantes entre los valores detectados en esos periodos de tiempo. Sin embargo, entre los días 3 y 4 de preservación, la motilidad descendió hasta situarse en valores próximos al 41-48%, produciéndose diferencias significativas respecto a los registros en los periodos de tiempos anteriores ($p<0.05$). A partir de 5 días de preservación, el descenso fue muy progresivo, de tal manera que tras 10 días de conservación a 4°C, el semen presentó valores inferiores al 10% de motilidad total. Con respecto al *pool*, de manera general, a lo largo del tiempo se registraron porcentajes de motilidad total algo superiores a los existentes en las medias individuales. De hecho, durante los primeros 4 días, los registros oscilaron entre un 65-80%, con valores prácticamente equiparables a los observados en la hora 0 (96%). A partir de los 7 días de conservación, los porcentajes de motilidad se mantuvieron en torno al 50-60%, para a partir del día 11 comenzar un progresivo descenso, aunque siempre con porcentajes superiores a los detectados en las medias individuales.

Finalmente, el semen **congelado-descongelado** y posteriormente preservado a 37°C (CD-37°C) mostró datos de motilidad total más bajos así como menor perdurabilidad a lo largo del tiempo (**Figura 4.2**). Los valores medios de las muestras individuales revelaron unos porcentajes próximos al 40% a las 1 y 2 horas, para sufrir una reducción significativa ($p<0.05$) tras 4 horas de conservación. Esta evolución se repitió ($p<0.01$) a las 8 horas, alcanzando en este periodo valores inferiores al 10% de motilidad total. En las muestras del *pool*, no se detectó una reducción tan patente, presentando valores en torno al 40% durante las primeras 4 horas, para mostrar un valor medio del 27% tras 8 horas de preservación, justo antes de la inactivación (12 h.) de las alícuotas. En cualquier caso, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras individuales y las muestras del *pool*.

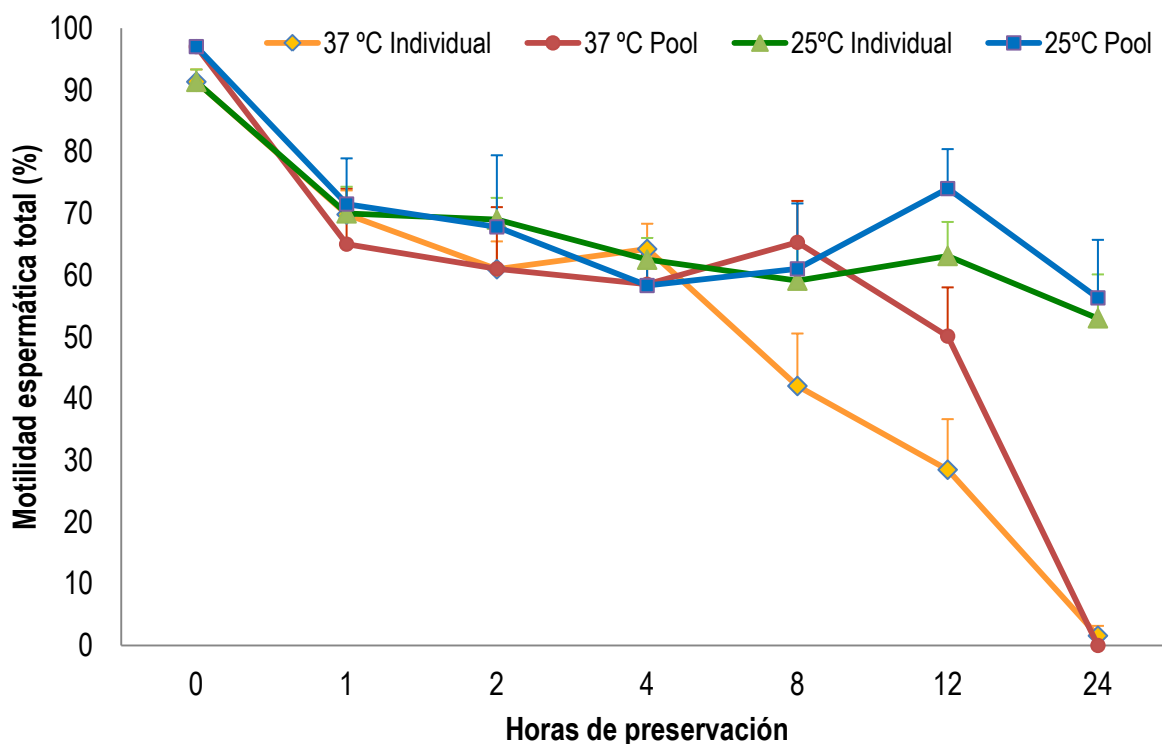


Figura 4.1. Motilidad espermática total (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 37°C y 25°C durante las primeras 24 h. de conservación

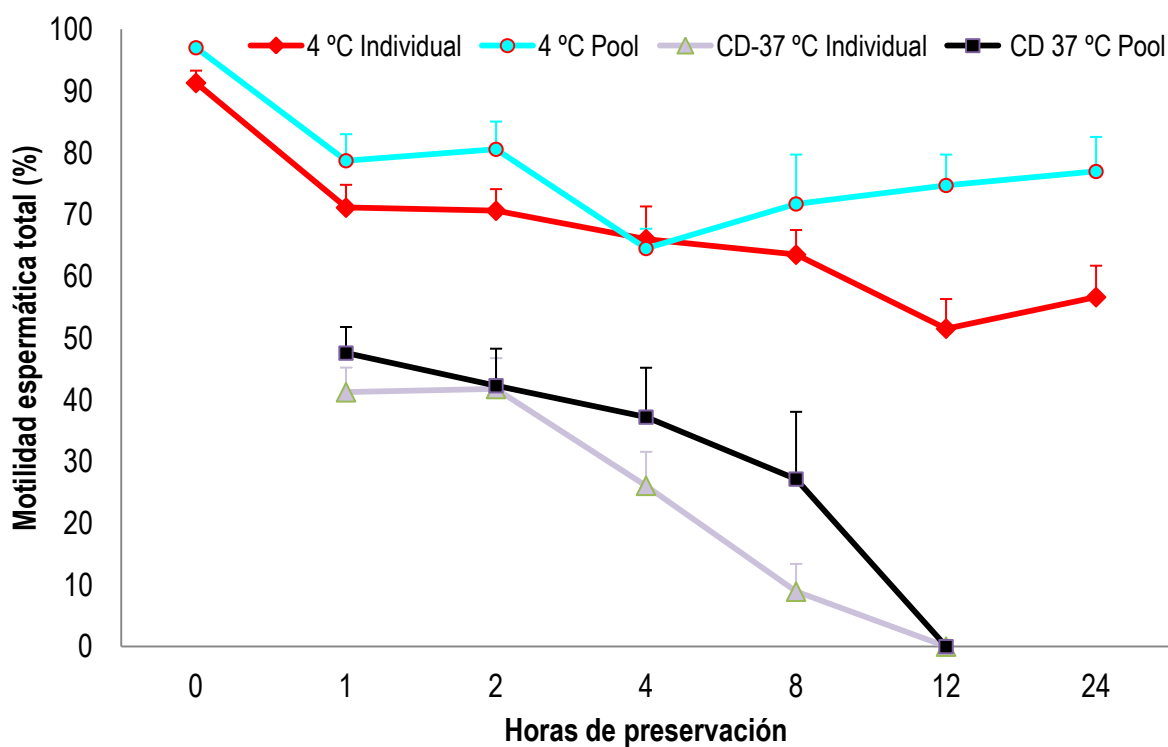


Figura 4.2. Motilidad espermática total (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 4°C y en muestras congeladas-descongeladas (CD-37°C) durante las primeras 24 horas de conservación

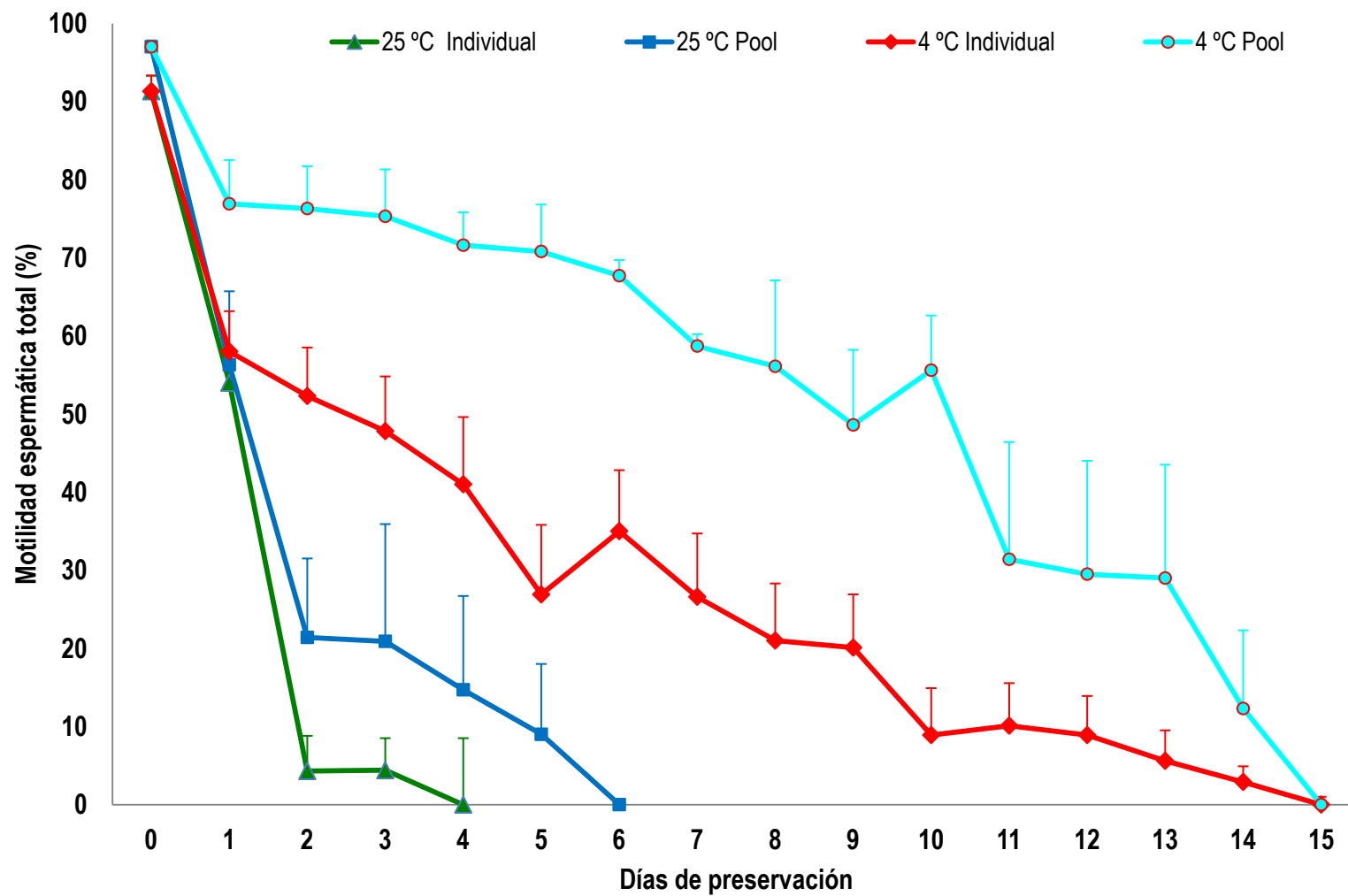


Figura 4.3. Evolución de la motilidad espermática total (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 25°C y 4°C hasta su completa inactivación

Las Figuras 4.4, 4.5 y 4.6 muestran los porcentajes de motilidad progresiva registrados para las diferentes alícuotas de semen que, de forma individual y a modo de *pool*, se mantuvieron conservadas a distintas temperaturas a lo largo del tiempo. En general, se pudo observar como en la casi totalidad de las muestras (tanto en medias individuales como en *pool*) preservadas durante 1 hora en cualquier temperatura, se registraron porcentajes de motilidad progresiva significativamente ($p<0.05$) inferiores a los detectados en el momento inicial (hora 0) de valoración.

Las muestras preservadas a **37°C (Figura 4.4)** obtuvieron unos registros muy homogéneos (rango aproximado: 40-50%) de motilidad progresiva entre las horas 1 y 4 para la alícuotas valoradas individualmente. Sin embargo, transcurridas 8 horas de preservación se produjo una reducción significativa ($p<0.01$) de la motilidad (25.4%) que se hizo más evidente tras 12 horas de incubación, para finalmente inactivarse a las 24 horas. Un comportamiento algo similar fue el observado en las muestras del *pool*, con porcentajes de motilidad elevados (rango: 42-53%) durante las primeras 8 horas, siendo a partir de las 12 horas de preservación cuando los valores se redujeron aproximadamente a la mitad (23.8%), alcanzando también porcentajes del 0% de motilidad progresiva a las 24 horas. Al comparar las muestras individuales con las muestras del *pool*, no se detectaron diferencias significativas, si bien los valores medios fueron más elevados en las alícuotas del *pool* a partir de 8 horas de conservación.

Los porcentajes de motilidad progresiva en las alícuotas conservadas a 25°C (Figura 4.4 y Figura 4.6) siempre se mantuvieron con registros muy homogéneos, con valores medios entre un 40 y un 55%, sin existir diferencias significativas entre muestras individuales y muestras del *pool*, durante las primeras 24 horas. No obstante, tras 24 horas de preservación, las muestras individuales iniciaron un notable descenso de la motilidad progresiva, para mostrar una abrupta caída ($p<0.01$) ya evidente a partir de las 48 horas ($< 5\%$), e inactivarse completamente tras 4 días de preservación. Por otro lado, en las muestras de *pool* seminal, a las 24 horas de preservación los porcentajes de motilidad se redujeron hasta el 30%, valor que se mostró significativamente diferente ($p<0.01$) al registro detectado 12 horas antes. A partir de este momento, la motilidad progresiva en el *pool* descendió muy gradualmente, alcanzando valores inferiores al 10% tras 3 días de preservación, hasta que el semen se inactivó a los 5 días de conservación a 25°C.

El estudio de las alícuotas conservadas a **4°C** (**Figura 4.5** y **Figura 4.6**) puso de manifiesto una mayor calidad espermática a lo largo del tiempo. En general, se pudo observar como el descenso de este parámetro fue siempre muy progresivo, aunque el *pool* siempre obtuvo registros superiores a los existentes en las muestras individuales. De este modo, las muestras individuales preservadas a 4°C se mantuvieron con unos porcentajes de motilidad progresiva superiores al 40% (sin evidenciar diferencias importantes) hasta pasadas 8 horas de conservación. Entre las 12 y las 96 horas de conservación, los valores se situaron entre un 20 y un 30%, no existiendo diferencias entre ellos, pero si con respecto a los valores registrados durante las primeras 4 horas de preservación ($p < 0.05$). Después del 5º día, el descenso en los porcentajes de motilidad progresiva fue tan gradual que no se volvieron a detectar diferencias significativas entre registros consecutivos hasta la inactivación seminal. Por otro lado, en el semen valorado en forma de *pool*, la motilidad progresiva presento porcentajes bastante elevados (rango: 40.0%-64.7%) durante los primeros 7 días de preservación, no existiendo diferencias relevantes a lo largo de este periodo de tiempo. A partir de este momento, el decrecimiento del porcentaje de motilidad continuo siendo gradual, presentando valores superiores al 20% hasta los 10 días de preservación, para inactivarse completamente a las 360 horas del comienzo de las valoraciones.

Por último, las muestras de semen **congeladas-descongeladas** y posteriormente conservadas en baño María (CD-37°C), revelaron los porcentajes de motilidad progresiva más bajos y la menor perdurabilidad en el tiempo (**Figura 4.5**). De esta forma, en muestras individuales, la motilidad progresiva presentó valores superiores al 20% sólo durante las primeras 2 horas de preservación, para posteriormente mostrar un rápido descenso ($p < 0.05$) a las 4 horas; finalmente, el movimiento progresivo de los espermatozoides fue inapreciable tras 8 horas de incubación. En las muestras del *pool* seminal, los valores de motilidad progresiva tuvieron un descenso más gradual, de forma que presentaron porcentajes cercanos al 20% durante las primeras 4 horas de preservación, sin mostrar diferencias significativas, para terminar inactivándose a las 8 horas del inicio del estudio de este protocolo de conservación.

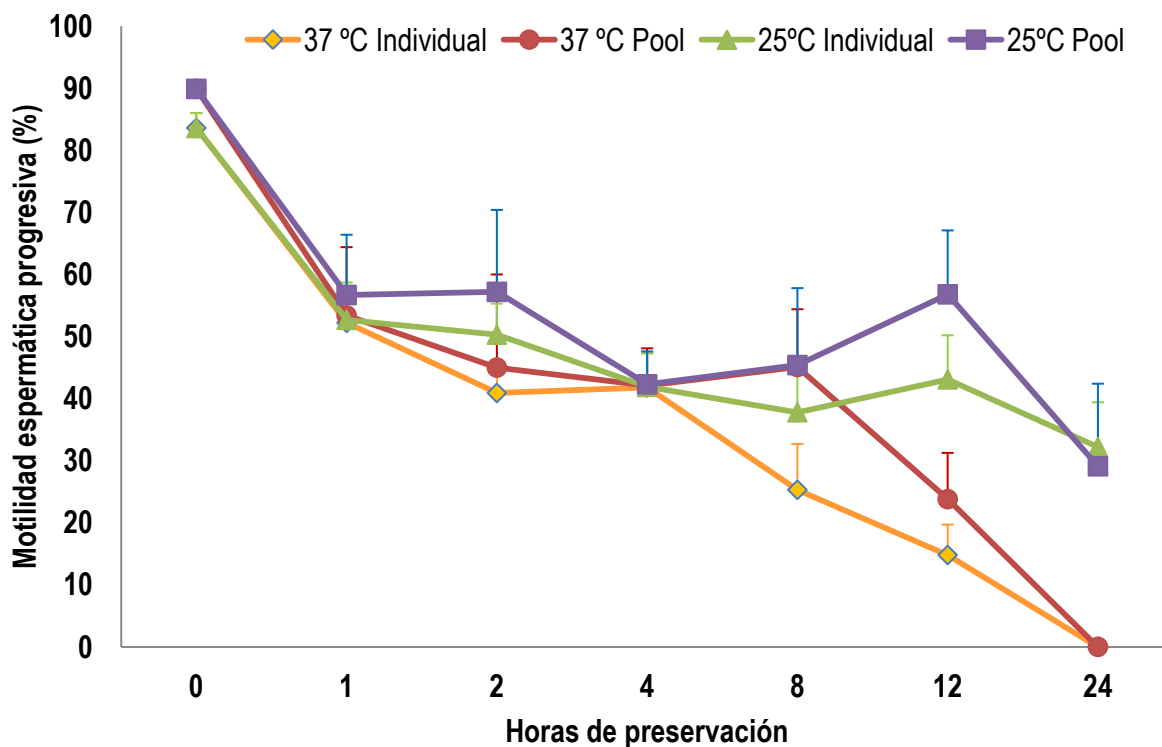


Figura 4.4. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 37°C y 25°C durante las primeras 24 h. de conservación

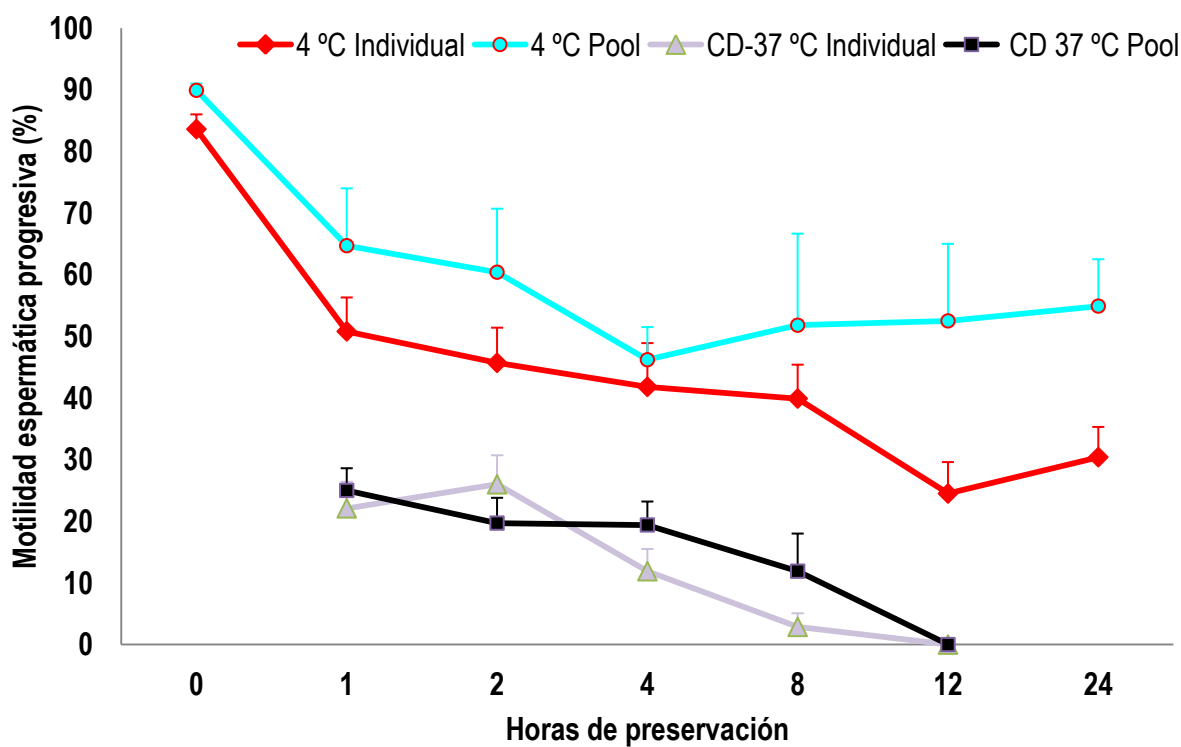


Figura 4.5. Motilidad progresiva (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 4°C y en muestras congeladas-descongeladas (CD-37°C) durante las primeras 24 horas de conservación

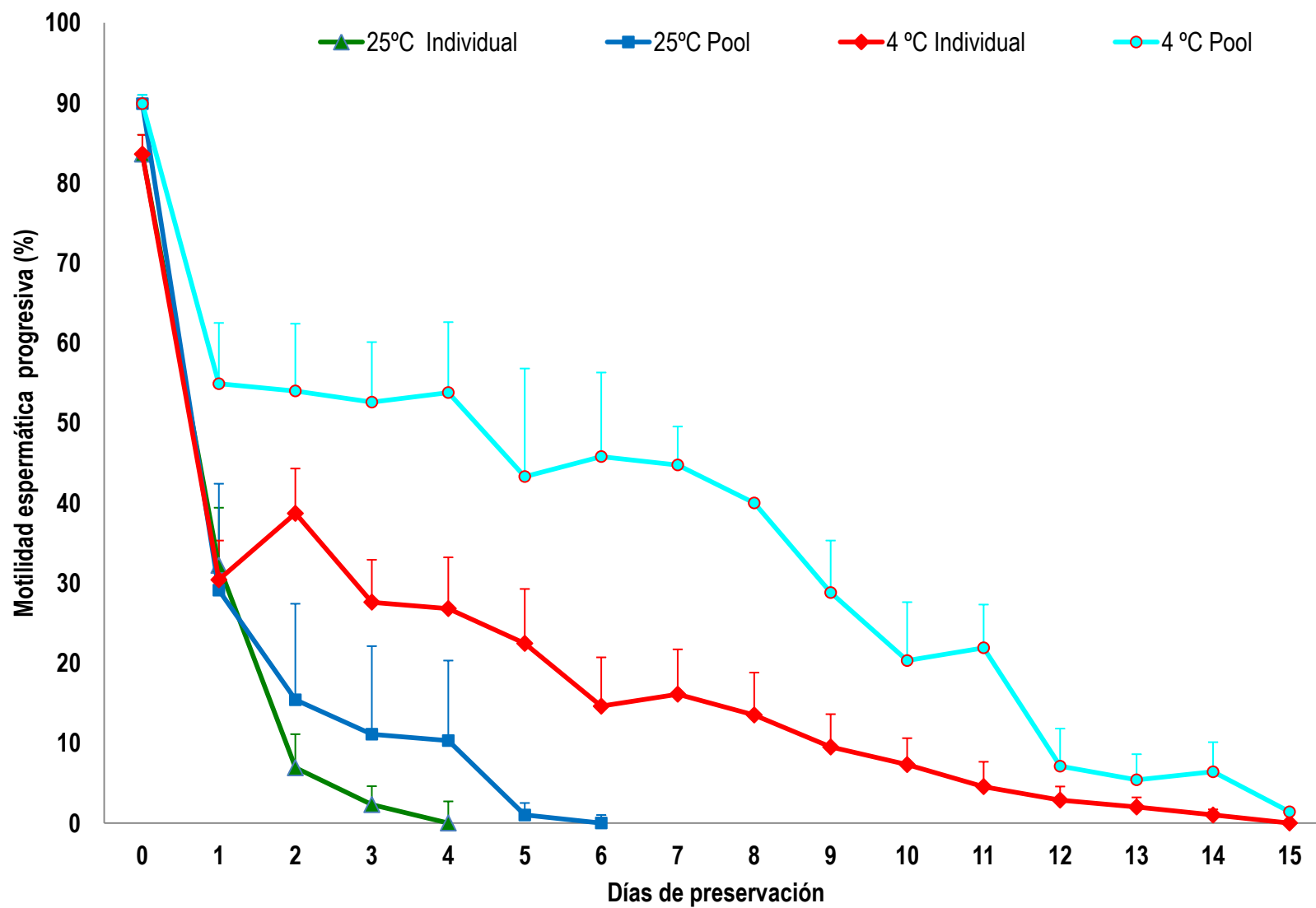


Figura 4.6. Evolución de la motilidad progresiva (media $\pm$ sem) en muestras preservadas a 25°C y 4°C hasta su completa inactivación

4.2.2. Morfoanomalías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación

La **tabla 4.16** recoge los porcentajes medios de anomalías morfológicas de las cabezas espermáticas detectadas en el semen sometido a distintas temperaturas de preservación (37°C, 25°C, 4°C y congelado-descongelado) a lo largo del periodo experimental (0-24 h.). En general, el porcentaje de anomalías de cabeza siempre presentó un rango muy pequeño (0-5%), en todos los protocolos de preservación valorados.

Al analizar los valores medios individuales, no se detectaron diferencias significativas entre las muestras conservadas a 37°C, 25°C, 4°C y semen congelado-descongelado que, mostraban valores muy equiparables en los diferentes periodos de tiempo evaluados (0, 1, 8 y 24 h.). Del mismo modo, cuando se registraron los valores medios dentro de cada temperatura de conservación, no se encontraron diferencias a lo largo del periodo experimental en aquellas muestras preservadas a 37°C, 25°C y 4°C. No obstante, sí se detectaron diferencias significativas en las muestras congeladas-descongeladas, con un porcentaje de morfoanomalías de cabeza ligeramente superior en aquellas alícuotas preservadas durante 1 hora ($p < 0.05$), en comparación con las muestras evaluadas inmediatamente tras ser descongeladas.

Con respecto al *pool* y, al analizar los datos registrados dentro de cada protocolo de preservación (37°C, 25°C, 4°C, CD-37°C), no se encontraron diferencias en los diferentes periodos de tiempo evaluados. Del mismo modo, al comparar el porcentaje de anomalías de cabeza espermática entre los distintos métodos de conservación, se observó que los valores eran muy similares entre muestras (1.0-2.5%), con independencia de la temperatura de preservación de las mismas.

Finalmente, no se encontraron diferencias entre los registros medios en los valores observados en el semen (individual y *pool*) sometido a una determinada temperatura (37°C, 25°C, 4°C, CD-37°C) y correspondientes a un periodo de tiempo concreto.

Tabla 4.16. Porcentaje de morfoanomalías (media $\pm$ sem) de cabezas espermáticas en diferentes temperaturas de preservación a lo largo del periodo experimental

Temperaturas de preservación		Tiempo (h.) de conservación de las muestras espermáticas			
		0	1	8	24
INDIVIDUAL	37°C	1.14 $\pm$ 0.36	1.29 $\pm$ 0.25	1.14 $\pm$ 0.33	1.44 $\pm$ 0.29
	20	1.14 $\pm$ 0.36	1.86 $\pm$ 0.38	1.38 $\pm$ 0.37	1.00 $\pm$ 0.23
	4°C	1.14 $\pm$ 0.37	1.00 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.29	1.23 $\pm$ 0.28
	CD-37°C	1.14 $\pm$ 0.36 ^x	2.14 $\pm$ 0.35 ^y	1.25 $\pm$ 0.63 ^{xy}	-
POOL	37°C	1.33 $\pm$ 0.33	1.33 $\pm$ 0.33	1.00 $\pm$ 0.33	1.67 $\pm$ 0.58
	TA	1.33 $\pm$ 0.33	1.67 $\pm$ 0.33	2.50 $\pm$ 1.50	1.33 $\pm$ 0.33
	4°C	1.33 $\pm$ 0.33	2.33 $\pm$ 0.33	1.67 $\pm$ 0.67	0.67 $\pm$ 0.67
	CD-37°C	1.33 $\pm$ 0.33	2.33 $\pm$ 0.67	1.00 $\pm$ 0.00	-

TA: Temperatura ambiente, 25°C ; CD-37°C: Semen congelado-descongelado y posteriormente preservado a 37°C

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la **tabla 4.17** se muestran los porcentajes de piezas intermedias espermáticas anormales. Al igual que sucedía con las cabezas espermáticas, los valores registrados de piezas intermedias anormales fueron muy similares (1-4%) con independencia de la temperatura de preservación, tanto en los registros de muestras individuales como para el *pool*.

Al analizar los resultados en las muestras individuales, sólo se encontraron diferencias en el semen congelado-descongelado; concretamente, las muestras preservadas durante 8 horas presentaron mayores porcentajes ($p < 0.05$) con respecto a la hora 1. Referente al *pool*, los valores fueron completamente equiparables entre diferentes temperaturas de conservación y para los distintos tiempos evaluados, no existiendo diferencias relevantes.

Finalmente, tampoco se detectaron diferencias entre los porcentajes de piezas intermedias anormales existentes en el *pool* o de forma individual, para aquellas alícuotas que se encontraban sometidas a unas mismas condiciones (37°C, 25°C, 4°C, CD-37°C) a un tiempo concreto.

Tabla 4.17. Porcentaje de morfoanomalías (media $\pm$ sem) de piezas intermedias espermáticas en diferentes temperaturas de preservación a lo largo del periodo experimental

Temperaturas de preservación		Tiempo (h.) de conservación de las muestras espermáticas			
		0	1	8	24
INDIVIDUAL	37°C	2.86 $\pm$ 0.59	2.71 $\pm$ 0.64	2.43 $\pm$ 0.59	2.33 $\pm$ 0.80
	TA	2.86 $\pm$ 0.59	2.57 $\pm$ 0.70	1.46 $\pm$ 0.29	1.92 $\pm$ 0.43
	4°C	2.86 $\pm$ 0.59	1.64 $\pm$ 0.42	2.64 $\pm$ 0.45	2.85 $\pm$ 0.82
	CD-37°C	2.86 $\pm$ 0.59 ^x	1.43 $\pm$ 0.20 ^y	3.75 $\pm$ 1.03 ^x	
POOL	37°C	1.33 $\pm$ 0.67	0.67 $\pm$ 0.33	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
	TA	1.33 $\pm$ 0.67	0.33 $\pm$ 0.33	2.50 $\pm$ 1.50	0.67 $\pm$ 0.33
	4°C	1.33 $\pm$ 0.67	1.33 $\pm$ 0.67	3.00 $\pm$ 1.00	2.00 $\pm$ 0.58
	CD-37°C	1.33 $\pm$ 0.67	1.67 $\pm$ 0.67	1.00 $\pm$ 0.00	

CD-37°C: Semen congelado-descongelado y posteriormente preservado a 37°C

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los porcentajes medios de colas espermáticas anormales quedan recogidos en la **tabla 4.18**. En la mayor parte de las muestras individuales, se observó que los valores de colas anómalas siempre se situaron entre el 3% y el 9%, para alícuotas conservadas a 25°C, a 4°C o sometidas a congelación-descongelación. Del mismo modo, en las muestras del *pool* preservadas a la misma temperatura, los porcentajes de colas anómalas fueron algo más bajos (rango: 2-7%).

En las muestras conservadas a 37°C (tanto individualmente como en *pool*) se reveló una cantidad de colas alteradas mayor que para el resto de las temperaturas. De esta forma, el porcentaje de colas anormales en las alícuotas individuales fue muy superior ($p < 0.01$) a las 24 horas con respecto a todas las valoraciones previas. Asimismo, el porcentaje observado a las 8 horas (10.7%) también estaba considerablemente incrementado ($p < 0.01$) respecto a la hora 0. En referencia al *pool*, el semen presentó durante la primera hora un porcentaje de colas anómalas inferior ($p < 0.01$) al registrado a las 8 y 24 horas de conservación a 37°C.

Tabla 4.18. Porcentaje de morfoanomalías (media $\pm$ sem) de colas espermáticas en diferentes temperaturas de preservación a lo largo del periodo experimental

Temperaturas de preservación		Tiempo (h.) de conservación de las muestras espermáticas			
		0	1	8	24
INDIVIDUAL	37°C	4.79 $\pm$ 0.79 ^x	7.79 $\pm$ 1.57 ^{xy}	10.71 $\pm$ 1.89 ^y	17.33 $\pm$ 2.92 ^z
	TA	4.79 $\pm$ 0.79	5.14 $\pm$ 0.96	6.15 $\pm$ 0.88	5.38 $\pm$ 1.06
	4°C	4.79 $\pm$ 0.79	4.29 $\pm$ 0.84	5.79 $\pm$ 0.96	3.31 $\pm$ 0.45
	CD-37°C	4.79 $\pm$ 0.79	7.64 $\pm$ 0.87	8.50 $\pm$ 1.85	-
POOL	37°C	1.67 $\pm$ 0.33 ^x	9.33 $\pm$ 1.86 ^x	23.33 $\pm$ 4.37 ^y	30.00 $\pm$ 4.04 ^y
	TA	1.67 $\pm$ 0.33	4.00 $\pm$ 0.57	2.00 $\pm$ 0.00	7.67 $\pm$ 3.84
	4°C	1.67 $\pm$ 0.33	4.33 $\pm$ 0.33	6.00 $\pm$ 2.00	2.67 $\pm$ 0.66
	CD-37°C	1.67 $\pm$ 0.33	7.00 $\pm$ 2.52	6.50 $\pm$ 1.50	-

TA: Temperatura ambiente, 25°C ; CD-37°C: Semen congelado-descongelado y posteriormente preservado a 37°C

^{xyz}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

La **tabla 4.19** refleja el porcentaje de anomalías morfológicas totales presentes en el semen preservado a las diferentes temperaturas. En general, la cantidad de anomalías morfológicas se distribuyó de forma homogénea en las muestras individuales y en el *pool*, tanto a temperatura ambiente, a 4°C y muestras congeladas-descongeladas, no existiendo diferencias significativas en función del medio de preservación utilizado o del tiempo transcurrido.

Por el contrario, aparecieron diferencias significativas a lo largo del tiempo en las alícuotas de semen sometidas a 37°C, tanto en *pool* como en media individual. De este modo, en las muestras individuales, los registros de morfoanomalías totales fueron incrementándose progresivamente conforme transcurría el tiempo de preservación, alcanzando su máximo valor a las 24 horas (21.1%), siendo significativamente superior ($p < 0.01$) al resto de registros (horas 0, 1 y 8). En las muestras del *pool*, los porcentajes de morfoanomalías alcanzados para las 8 y 24 horas de incubación a 37°C (25% y 33%, respectivamente) fueron superiores ($p < 0.01$) a los porcentajes existentes a la hora 0 y 1 (4% y 11%), no existiendo diferencias entre estos últimos.

Al comparar el porcentaje de morfoanomalías espermáticas totales entre las alícuotas individuales y el *pool*, se comprobó que en las muestras conservadas a 37°C, los registros obtenidos en el *pool* a las 8 y 24 horas fueron superiores ($p < 0.05$) de los existentes a esos mismos tiempos y condiciones en el semen individual. No obstante, para el resto de los registros no se observaron diferencias relevantes entre *pool* y las muestras individuales sometidos a los mismos protocolos de preservación e idénticos periodos de tiempo.

Tabla 4.19. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas totales (media $\pm$ sem) en diferentes temperaturas de preservación a lo largo del periodo experimental

Temperaturas de preservación		Tiempo (h.) de conservación de las muestras espermáticas			
		0	1	8	24
INDIVIDUAL	37°C	8.79 $\pm$ 1.09 ^x (1.00-17.00)	11.79 $\pm$ 1.96 ^{xy} (3.00-31.00)	14.29 $\pm$ 2.05 ^y (4.00-30.00)	21.11 $\pm$ 2.74 ^z (5.00-35.00)
	TA	8.79 $\pm$ 1.09 (1.00-17.00)	9.57 $\pm$ 1.58 (4.00-24.00)	8.64 $\pm$ 0.95 (4.00-17.00)	8.31 $\pm$ 1.26 (4.00-21.00)
	4°C	8.79 $\pm$ 1.09 (1.00-17.00)	6.93 $\pm$ 1.25 (1.00-18.00)	9.43 $\pm$ 1.06 (5.00-21.00)	7.38 $\pm$ 1.10 (4.00-14.00)
	CD-37°C	8.79 $\pm$ 1.09 (1.00-17.00)	11.21 $\pm$ 1.02 (6.00-18.00)	13.50 $\pm$ 2.25 (7.00-17.00)	-
	37°C	4.33 $\pm$ 0.33 ^x (4.00-5.00)	11.33 $\pm$ 1.86 ^x (9.00-15.00)	25.33 $\pm$ 3.84 ^y (21.00-33.00)	32.67 $\pm$ 3.84 ^y (27.00-40.00)
	TA	4.33 $\pm$ 0.33 (4.00-5.00)	6.00 $\pm$ 1.00 (4.00-7.00)	7.00 $\pm$ 3.00 (4.00-10.00)	9.67 $\pm$ 3.84 (4.00-17.00)
	4°C	4.33 $\pm$ 0.33 (4.00-5.00)	8.00 $\pm$ 0.00 (8.00-8.00)	10.67 $\pm$ 2.73 (7.00-16.00)	5.33 $\pm$ 1.20 (3.00-7.00)
	CD-37°C	4.33 $\pm$ 0.33 (4.00-5.00)	11.00 $\pm$ 2.89 (6.00-16.00)	8.50 $\pm$ 1.50 (7.00-10.00)	-
POOL					

TA: Temperatura ambiente, 25°C ; CD-37°C: Semen congelado-descongelado y posteriormente preservado a 37°C

^{xy}: Letras diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.3. Porcentaje de acrosomías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación

La **tabla 4.20** muestra los porcentajes de anomalías en el acrosoma, tanto en las medias de semen valorado de forma individual como en *pool*. En general, este parámetro mostró una distribución bastante regular para todas las temperaturas y periodos de tiempo, siempre presentando registros medios entre el 8.0% y 14%, no estableciéndose diferencias relevantes dependientes del tiempo transcurrido o de la temperatura de preservación dentro de las medias individuales ni del *pool*.

Tabla 4.20. Porcentaje de acrosomías espermáticas (media $\pm$ sem) en diferentes temperaturas de preservación a lo largo del periodo experimental

Temperaturas de preservación		Tiempo (h.) de conservación de las muestras espermáticas			
		0	1	8	24
INDIVIDUAL	37°C	8.36 $\pm$ 0.56 (1.00-11.00)	9.14 $\pm$ 0.75 (0.00-12.00)	9.79 $\pm$ 0.71 (1.00-13.00)	12.33 $\pm$ 0.37 (1.00-14.00)
	TA	8.36 $\pm$ 0.56 (1.00-11.00)	8.07 $\pm$ 0.85 (0.00-12.00)	8.69 $\pm$ 0.62 (2.00-14.00)	9.00 $\pm$ 0.83 (3.00-11.00)
	4°C	8.36 $\pm$ 0.56 (1.00-11.00)	9.21 $\pm$ 1.03 (1.00-15.00)	8.50 $\pm$ 0.63 (2.00-14.00)	11.00 $\pm$ 0.41 (4.00-14.00)
	CD-37°C	8.36 $\pm$ 0.56 (1.00-11.00)	12.00 $\pm$ 2.31 (0.00-15.00)	11.25 $\pm$ 1.31 (0.00-14.00)	-
	37°C	9.00 $\pm$ 0.65 (2.00-13.00)	9.67 $\pm$ 1.20 (3.00-13.00)	11.67 $\pm$ 0.88 (2.00-13.00)	13.90 $\pm$ 1.90 (4.00-18.00)
	TA	9.00 $\pm$ 0.65 (2.00-13.00)	9.33 $\pm$ 0.67 (1.00-13.00)	10.00 $\pm$ 0.00 (10.00-10.00)	12.07 $\pm$ 1.20 (2.00-16.00)
	4°C	9.00 $\pm$ 0.65 (2.00-13.00)	10.00 $\pm$ 0.58 (0.00-14.00)	10.67 $\pm$ 0.88 (3.00-13.00)	10.27 $\pm$ 0.56 (6.00-15.00)
	CD-37°C	9.00 $\pm$ 0.65 (2.00-13.00)	11.33 $\pm$ 0.67 (0.00-20.00)	13.00 $\pm$ 0.00 (3.00-16.00)	-

TA: Temperatura ambiente, 25°C; CD-37°C: Semen congelado-descongelado y posteriormente preservado a 37°C

4.3. EXPERIMENTO 3: VIABILIDAD DEL SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS TRAS SU DESCONGELACIÓN

Los datos referentes a la calidad del semen en fresco de los individuos y del *pool* utilizados para la experiencia 3 quedan recogidos en la **tabla 4.21**. En ella se observa como el volumen medio obtenido se distribuía ampliamente entre los 2.7 y 6.3 ml. La concentración de espermatozoides oscilaba entre los 285 y 705 millones de espermatozoides por mililitro de semen recolectado, de forma que el *pool* alcanzó una concentración media de 518.5×10^6 espermatozoides/ml. En relación a las motilidades valoradas, la motilidad subjetiva siempre fue superior al 75% en todos los ejemplares y por encima de 90% en 2 de ellos (perros 1 y 5). Las motilidades total y progresiva (valoradas por sistema CASA) fueron algo superior a la subjetiva, situándose siempre en registros mayores al 80% en el caso de la motilidad total y por encima de 77% para la motilidad progresiva y, alcanzando valores medios para el *pool* próximos al 90% en ambos casos. Por último, las anomalías morfológicas y acrosomías tuvieron una distribución bastante homogéneas, de forma que el porcentaje de estos parámetros no varió nunca más de un 4% entre distintos ejemplares, obteniendo medias de 10% y 2%, respectivamente, para el *pool* seminal.

Tabla 4.21. Características (media $\pm$ sem) del semen fresco de los diferentes ejemplares

	Volumen	Concentración ($\times 10^6$ esp./ml)	Motilidad Total	Motilidad progresiva	Anomalías Morfológicas	Acrosomías
Perro 1	6.30 ± 0.3	705.00 ± 197.0	88.52 ± 7.8	83.69 ± 7.7	10.00 ± 6.0	0.50 ± 0.5
Perro 2	3.75 ± 0.4	285.00 ± 71.0	84.00 ± 14.3	79.23 ± 14.8	11.00 ± 3.0	0.50 ± 0.5
Perro 3	2.75 ± 0.2	508.50 ± 45.5	82.12 ± 2.7	77.37 ± 4.4	11.50 ± 0.5	4.50 ± 2.50
Perro 4	4.50 ± 0.5	475.00 ± 11.0	90.59 ± 3.2	81.72 ± 5.6	11.50 ± 1.0	1.50 ± 0.50
Perro 5	3.50 ± 0.5	545.00 ± 27.0	96.24 ± 2.4	90.77 ± 3.6	7.00 ± 2.0	1.50 ± 1.0
Pool	20.00 ± 0.0	518.50 ± 24.5	93.35 ± 1.3	88.92 ± 0.4	10.00 ± 7.0	2.00 ± 1.0

La **tabla 4.22** muestra los porcentajes de motilidad total obtenidos del semen descongelado después de haber sido sometido a diferentes condiciones de temperatura (37°, 25°C, 15°C, 4°C) a lo largo del tiempo (hora 0, 1, 2, 4 y 6). En todos los casos, se observó como la motilidad subjetiva disminuyó significativamente ($p < 0.01$) tras 1 hora post-descongelación. Este descenso fue menos marcado a TA, temperatura a la cual se observó unos valores de motilidad total significativamente superiores ($p < 0.05$) a la existente a 4° C. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron progresivamente, de manera que el semen continuó perdiendo motilidad total sin evidenciar diferencias entre grupos a las 2, 4 y 6 horas de la descongelación, si bien las alícuotas conservadas en baño María fueron siempre las que presentaron los valores más bajos a partir de las 4 horas. Por otro lado, dentro de cada temperatura se pudo registrar como la disminución en el movimiento de los espermatozoides se produjo de una forma gradual, lo que hizo que las diferencias entre los porcentajes de motilidad total fueran muy variables a lo largo del tiempo y, no se pudiese detectar un grado de significación uniforme.

Tabla 4.22. Evolución de la motilidad total (media $\pm$ sem) en las diferentes temperaturas de conservación a lo largo del periodo experimental

Tiempo de preservación	Temperaturas de conservación del semen congelado-descongelado			
	37° C	25°C	15° C	4° C
0 h.	69.67 $\pm$ 1.82 ^x	69.67 $\pm$ 1.82 ^x	69.67 $\pm$ 1.82 ^x	69.67 $\pm$ 1.82 ^x
1 h.	37.95 $\pm$ 1.58 ^{12,y}	47.27 $\pm$ 3.27 ^{1,y}	39.13 $\pm$ 3.03 ^{12,y}	30.64 $\pm$ 3.56 ^{2,y}
2 h.	27.80 $\pm$ 3.40 ^y	36.42 $\pm$ 2.19 ^{yz}	30.30 $\pm$ 3.91 ^y	26.24 $\pm$ 4.56 ^{yz}
4 h.	12.26 $\pm$ 4.31 ^z	26.59 $\pm$ 2.46 ^z	27.88 $\pm$ 2.84 ^{yz}	22.70 $\pm$ 4.19 ^{yz}
6 h.	0 ^z	6.52 $\pm$ 2.18 ^w	12.23 $\pm$ 3.61 ^z	10.01 $\pm$ 3.68 ^z

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

^{xyzw}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

La evolución de los valores de motilidad progresiva a lo largo del tiempo para el semen descongelado en las diferentes temperaturas se muestran en la **tabla 4.23**. Nuevamente, se evidenció una marcada disminución ($p<0.01$), una hora tras la descongelación, en todas las temperaturas de preservación, siendo las muestras conservadas a TA las que mayores valores presentaban, mostrando un porcentaje de movimiento significativamente superior ($p<0.01$) a las muestras a 4°C. Además, entre las 2 y 6 horas de preservación, se observó como la motilidad progresiva se mantenía bastante constante en el semen conservado a las temperaturas más bajas (15°C y 4°C), no observándose diferencias considerables en este parámetro. No obstante, el semen expuesto a 37°C y 25°C, sufrió un decrecimiento más evidente, que hizo que se registrasen diferencias significativas ($p<0.05$) a lo largo del tiempo de estudio.

Tabla 4.23. Evolución de la Motilidad Progresiva (media $\pm$ sem) en las diferentes temperaturas de conservación a lo largo del periodo experimental

Tiempo de preservación	Temperaturas de conservación del semen congelado-descongelado			
	37° C	25°C	15°C	4°C
0 h.	52.60 $\pm$ 3.93 ^x	52.60 $\pm$ 3.93 ^x	52.60 $\pm$ 3.93 ^x	52.60 $\pm$ 3.93 ^x
1 h.	16.84 $\pm$ 1.64 ^{12,y}	26.09 $\pm$ 3.80 ^{1,y}	17.44 $\pm$ 2.94 ^{12,y}	10.97 $\pm$ 2.09 ^{2,y}
2 h.	8.85 $\pm$ 1.94 ^{yz}	17.34 $\pm$ 2.85 ^{yz}	13.19 $\pm$ 2.79 ^y	10.52 $\pm$ 2.25 ^y
4 h.	1.84 $\pm$ 0.74 ^z	8.82 $\pm$ 1.20 ^{zw}	10.19 $\pm$ 1.53 ^y	10.79 $\pm$ 2.32 ^y
6 h.	0 ^z	2.38 $\pm$ 0.87 ^w	5.69 $\pm$ 1.59 ^y	5.09 $\pm$ 2.19 ^y

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p<0.05$)

^{xyzw}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p<0.05$)

Por último, la **tabla 4.24**. recoge los porcentajes de anomalías morfológicas y de acrosomas anormales detectados en el semen descongelado, después de haber sido sometido 1 hora a sus respectivos ambientes de conservación. En general, el porcentaje de cabezas, piezas intermedias, colas y acrosomías se mantuvieron bastantes homogéneos en todas las temperaturas de conservación, e incluso si se comparan con respecto a la hora 0 (momento de la descongelación). De esta forma, el porcentaje de cabezas anormales se situó en torno al 1.50%, mientras que las piezas intermedias, colas y acrosomías estuvieron alrededor del 2%, 11.5% y 8%, respectivamente. En definitiva, no se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías entre los protocolos de conservación evaluados con respecto al momento 0, ni entre ellas una vez pasada 1 hora de la descongelación.

Tabla 4.24. Evolución de las morfoanomalías y acrosomías (media $\pm$ sem) en las diferentes temperaturas de conservación tras 1 hora de preservación

Morfoanomalías espermáticas	Hora 0	37° C	25°C	15° C	4° C
Cabezas	1.30 $\pm$ 0.34 (0.00-5.00)	1.80 $\pm$ 0.29 (0.00-5.00)	1.50 $\pm$ 0.20 (0.00-3.00)	1.10 $\pm$ 0.28 (0.00-3.00)	1.53 $\pm$ 0.28 (0.00-5.00)
Piezas Intermedias	1.95 $\pm$ 0.50 (0.00-6.00)	2.35 $\pm$ 0.42 (0.00-7.00)	1.90 $\pm$ 0.25 (0.00-4.00)	1.95 $\pm$ 0.29 (0.00-5.00)	2.84 $\pm$ 0.27 (1.00-5.00)
Colas	9.95 $\pm$ 1.51 (3.00-22.00)	12.50 $\pm$ 1.34 (5.00-27.00)	11.80 $\pm$ 0.75 (5.00-18.00)	11.95 $\pm$ 1.14 (3.00-22.00)	11.26 $\pm$ 1.05 (2.00-17.00)
Morfoanomalías Totales	13.20 $\pm$ 2.20 (3.00-31.00)	16.65 $\pm$ 1.48 (7.00-34.00)	15.20 $\pm$ 0.73 (8.00-19.00)	15.00 $\pm$ 1.20 (5.00-24.00)	15.63 $\pm$ 1.09 (6.00-23.00)
Acrosomías	8.20 $\pm$ 0.61 (0.00-10.00)	9.25 $\pm$ 0.85 (0.00-12.00)	9.45 $\pm$ 0.80 (0.00-14.00)	8.00 $\pm$ 0.71 (0.00-10.00)	9.05 $\pm$ 0.96 (0.00-17.00)

4.4. EXPERIMENTO 4: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN PREVIO A LA CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN

En la **tabla 4.25.** quedan recogidos los datos que describen la calidad seminal en fresco de los 6 perros participantes en la experiencia 4, así como del *pool* resultante de la mezcla de los eyaculados obtenidos. El volumen medio (2ª fracción) recolectado varió en función de la raza, situándose entre los 3.5 y 6.9 ml, mientras la concentración media de espermatozoides, en el *pool*, fue de $200 \times 10^6/\text{ml}$, si bien los valores individuales se distribuyeron ampliamente entre los 98 y 312 millones de espermatozoides por mililitro. Por otro lado, la motilidad subjetiva alcanzaba valores superiores al 80% en todos los ejemplares, mientras que tanto la motilidad total como la motilidad progresiva (valoradas por sistema CASA) presentaron niveles muy uniformes, a excepción del perro 1 que siempre presentó los porcentajes más bajos. En el *pool* seminal, los valores finales de motilidad subjetiva, total y progresiva fueron del 83, 93 y 86%, respectivamente. Finalmente, el porcentaje de morfoanomalías y acrosomas anormales sólo se valoró en *pool*, situándose en valores que rondaban el 20% de anomalías morfológicas y el 3% en el caso de los acrosomas alterados.

Tabla 4.25. Características (media $\pm$ sem) del semen fresco de los diferentes ejemplares

	Volumen	Concentración ($\times 10^6$ esp./ml)	Motilidad total	Motilidad Progresiva	Anomalías Morfológicas	Acrosomías
Perro 1	6.17 ± 1.9	98.92 ± 0.5	71.57 ± 6.2	62.70 ± 3.6	-	-
Perro 3	3.67 ± 0.2	165.00 ± 19.7	87.58 ± 4.7	81.88 ± 4.7	-	-
Perro 4	6.83 ± 0.9	312.00 ± 21.7	94.90 ± 1.5	86.52 ± 4.0	-	-
Perro 5	3.50 ± 0.5	168.67 ± 60.7	93.29 ± 3.1	88.76 ± 1.2	-	-
Perro 6	4.17 ± 0.6	121.33 ± 24.6	84.20 ± 2.5	79.20 ± 2.6	-	-
Pool	28.17 ± 2.4	201.33 ± 20.9	93.42 ± 2.2	86.26 ± 2.7	19.67 ± 1.7	3.33 ± 1.4

Los porcentajes de motilidad espermática total y progresiva obtenidos del semen congelado-descongelado, tras ser preservado durante diferentes tiempos de refrigeración antes de ser congelado aparecen en la **tabla 4.26.** Como se comentó con anterioridad, los porcentajes de motilidad progresiva en el *pool* inicial rondaron el 85%, mientras que la motilidad total estuvo por

encima del 90%, siendo estos registros siempre significativamente superiores con respecto al resto de tratamientos valorados. En general, la motilidad espermática en el grupo control fue inferior a la detectada en las muestras refrigeradas durante 1 o 6 horas; no obstante, sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la motilidad progresiva entre el grupo control y las muestras preservadas a 4°C durante 6 horas previa congelación.

Tabla 4.26. Porcentajes (media $\pm$ sem) de motilidad total y progresiva del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de refrigeración

		Motilidad Total	Motilidad Progresiva
Periodo de refrigeración previo a la congelación	Pool inicial	93.42 $\pm$ 2.24 ^x (89.14-96.69)	86.26 $\pm$ 2.70 ^x (81.38-90.69)
	Control *	63.21 $\pm$ 1.21 ^{yz} (47.52-72.48)	39.94 $\pm$ 2.03 ^{zw} (18.15-59.34)
	1 hora	67.03 $\pm$ 1.79 ^{yz} (46.36-81.72)	49.10 $\pm$ 2.86 ^{yz} (11.87-70.77)
	6 horas	69.54 $\pm$ 1.56 ^y (50.79-85.30)	52.23 $\pm$ 2.42 ^y (30.68-75.39)
	12 horas	60.90 $\pm$ 1.45 ^z (46.29-76.19)	36.33 $\pm$ 2.19 ^w (18.57-64.71)
	24 horas	61.22 $\pm$ 1.62 ^z (43.94-80.99)	36.05 $\pm$ 2.88 ^w (8.73-70.32)
	48 horas	60.71 $\pm$ 1.87 ^z (39.20-78.11)	33.46 $\pm$ 2.52 ^w (10.39-57.31)

*: Muestras procesadas y congeladas según protocolo convencional

xyzw: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

En aquellas muestras refrigeradas durante 12 horas, se detectó un descenso de la motilidad espermática con respecto a las muestras refrigeradas durante 1 y 6 horas, si bien se acercaban bastantes a los detectados en el grupo control. A partir de 12 horas de refrigeración, el descenso de la motilidad espermática fue muy gradual, de forma que no se observaron diferencias significativas en la motilidad total y progresiva entre el semen que había sido refrigerado 12, 24 y 48 horas antes de la congelación, con valores muy similares al grupo control (en torno al 60% para la motilidad total y entre el 35-40% para la motilidad progresiva). Sólo se detectaron diferencias significativas ($p < 0.01$) cuando se compararon los resultados de motilidad espermática (total y progresiva) entre las muestras congeladas-descongeladas, que habían sido refrigeradas durante 6 horas y aquellas muestras que habían sido refrigeradas durante 12, 24 y 48 horas antes de ser congeladas.

La **tabla 4.27** muestra los resultados de morfoanomalías del semen descongelado, tras los distintos periodos de refrigeración. El pool inicial presentó unos registros totales del 20%, si bien aproximadamente el 13% correspondían con anomalías en la cola. Esta misma distribución en los porcentajes de morfoanomalías espermáticas se mantuvo en el grupo control y durante todos los periodos de refrigeración. Es decir, en todos los grupos experimentales, el porcentaje de colas anormales después de descongelar el semen fue siempre muy superior que el de cabezas y piezas intermedias, situándose continuamente en valores próximos al 13%; mientras las cabezas y piezas intermedias obtuvieron registros entre 1-2% y 2-4%, respectivamente, independientemente de las horas de refrigeración a la que hubiese estado sometido el semen. Por tanto, las medias totales fueron muy homogéneas en todos los tiempos de estudio, situándose siempre entre el 17% y el 20%, no detectándose diferencias significativas en ningún caso.

Finalmente, el porcentaje de anomalías en los acrosomas se registra en la **tabla 4.28**. Este parámetro mostraba un comportamiento muy similar a las morfoanomalías citadas en el apartado anterior. Por tanto, también se observó la ausencia de diferencias para las acrosomías, con una escasa variabilidad (del 6% al 11%) en los porcentajes medios de acrosomas alterados en las muestras conservadas durante diferente tiempo de refrigeración antes de someterse a los procedimientos de congelación.

Tabla 4.27. Porcentaje (media $\pm$ sem) de anomalías morfológicas del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de refrigeración

		Cabezas	Piezas intermedias	Colas	Totales
Periodo de refrigeración previo a la congelación	Pool inicial	0.67 $\pm$ 0.33	6.00 $\pm$ 1.53	13.00 $\pm$ 0.58	19.67 $\pm$ 1.67
		(0.00-1.00)	(4.00-9.00)	(12.00-14.00)	(18.00-23.00)
	Control	1.33 $\pm$ 0.35	3.20 $\pm$ 0.46	13.93 $\pm$ 1.11	18.47 $\pm$ 1.45
		(0.00-4.00)	(1.00-8.00)	(7.00-21.00)	(12.00-29.00)
	1 hora	1.20 $\pm$ 0.30	2.80 $\pm$ 0.42	13.60 $\pm$ 1.32	17.60 $\pm$ 1.26
		(0.00-3.00)	(0.00-6.00)	(5.00-20.00)	(9.00-24.00)
	6 horas	1.27 $\pm$ 0.27	2.93 $\pm$ 0.43	12.87 $\pm$ 0.88	17.07 $\pm$ 1.01
		(0.00-3.00)	(1.00-6.00)	(7.00-20.00)	(13.00-26.00)
	12 horas	1.33 $\pm$ 0.21	4.07 $\pm$ 0.71	13.20 $\pm$ 1.14	18.60 $\pm$ 1.35
		(0.00-3.00)	(0.00-9.00)	(5.00-21.00)	(9.00-26.00)
	24 horas	1.07 $\pm$ 0.41	3.73 $\pm$ 0.49	13.67 $\pm$ 1.15	18.47 $\pm$ 1.52
		(0.00-6.00)	(1.00-7.00)	(5.00-20.00)	(9.00-27.00)
	48 horas	2.13 $\pm$ 0.34	3.87 $\pm$ 0.40	12.80 $\pm$ 0.96	18.80 $\pm$ 1.08
		(0.00-4.00)	(2.00-7.00)	(7.00-20.00)	(11.00-27.00)

Tabla 4.28. Porcentaje (media $\pm$ sem) de acrosomías del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de refrigeración

		Periodo de refrigeración previo a la congelación				
Pool inicial	Control	1 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
3.33 $\pm$ 1.45	7.00 $\pm$ 1.04	6.00 $\pm$ 0.81	7.13 $\pm$ 0.98	7.47 $\pm$ 1.13	8.53 $\pm$ 1.09	10.47 $\pm$ 1.1
(1.00-6.00)	(1.00-19.00)	(2.00-13.00)	(3.00-14.00)	(2.00-16.00)	(3.00-16.00)	(3.00-17.00)

EXPERIMENTO 5: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN TRAS SOMETERSE A DISTINTOS TIEMPOS DE EQUILIBRADO Y DE VAPORES DE NITRÓGENO LÍQUIDO

En la **tabla 4.29**, se recogen los datos referentes a la calidad seminal en fresco de los animales que participaron en la experiencia 5. Al igual que sucedió en experiencias anteriores, la participación de perros pertenecientes a diferentes razas quedó reflejada en el volumen medio obtenido que alcanzó valores entre 2.20 y 5.30 ml y en el número de espermatozoides en el eyaculado, que se situó entre los 557 y 822 millones de espermatozoides/ml. Sin embargo, a pesar de la diferencia entre individuos, las motilidades (subjetiva, total y progresiva) mostraron porcentajes muy similares. Así, la motilidad subjetiva se mantuvo entre el 80% y el 85% para 4 de los 6 perros, y por encima de 90% en los 2 restantes. Por otro lado, la motilidad total (valorada por sistema CASA) se caracterizó por alcanzar valores siempre superiores al 85% para todos los ejemplares, mientras, la motilidad progresiva (determinada por sistema CASA) fue la más homogénea, encontrándose todos los valores entre 80 y 90%.

En relación a las anomalías morfológicas, éstas mostraron una considerable variación entre perros debido a que los perros 3 y 4 mostraron porcentajes algo mayores (20.5% y 27.5%, respectivamente) a los registrados para el resto de animales (entre 3.5% y 10.5% en los demás ejemplares), situando el porcentaje de anomalías morfológicas del *pool* en torno a un 12%. Por el contrario, los datos de acrosomías tuvieron una distribución bastante homogénea, en la que el porcentaje no varió en ningún caso más de un 4% entre distintos perros, obteniéndose una media de 1.5% para el *pool*.

Tabla 4.29. Características (media $\pm$ sem) del semen fresco de los diferentes ejemplares

	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Perro 6	Pool
Volumen	3.25 $\pm$ 0.75	2.95 $\pm$ 0.05	5.30 $\pm$ 1.70	5.00 $\pm$ 2.00	2.40 $\pm$ 0.60	2.20 $\pm$ 0.20	20.00 $\pm$ 5.00
	(2.50-4.00)	(2.90-3.00)	(3.60-7.00)	(3.00-7.00)	(1.80-3.00)	(2.00-2.40)	(15.00-25.00)
Concentración	822.00 $\pm$ 114.0	657.50 $\pm$ 92.50	557.50 $\pm$ 26.50	679.50 $\pm$ 93.50	639.50 $\pm$ 46.50	591.5 $\pm$ 108.5	700.00 $\pm$ 90.00
	(708.00-936.00)	(565.00-750.00)	(531.00-584.00)	(586.00-773.00)	(593.00-686.00)	(483.00-700.00)	(610.00-790.00)
Motilidad Total	95.80 $\pm$ 0.48	95.25 $\pm$ 3.22	86.96 $\pm$ 4.38	93.80 $\pm$ 0.14	93.40 $\pm$ 2.49	87.36 $\pm$ 4.87	90.50 $\pm$ 2.42
	(95.32-96.28)	(92.03-98.47)	(82.58-91.33)	(93.65-93.94)	(90.90-95.89)	(82.49-92.22)	(88.07-92.92)
Motilidad Progresiva	87.22 $\pm$ 1.56	89.47 $\pm$ 2.21	81.17 $\pm$ 5.61	85.58 $\pm$ 2.43	86.58 $\pm$ 2.04	80.08 $\pm$ 4.24	82.57 $\pm$ 1.20
	(85.66-88.78)	(87.26-91.68)	(75.56-86.77)	(83.15-88.01)	(84.54-88.61)	(75.84-84.31)	(81.37-83.77)
Morfoanomalías	7.50 $\pm$ 0.50	3.50 $\pm$ 1.50	20.50 $\pm$ 2.50	27.50 $\pm$ 4.50	10.50 $\pm$ 0.50	8.50 $\pm$ 0.50	12.00 $\pm$ 0.00
	(7.00-8.00)	(2.00-5.00)	(18.00-23.00)	(23.00-32.00)	(10.00-11.00)	(8.00-9.00)	(12.00-12.00)
Acrosomías	0.50 $\pm$ 0.50	0.50 $\pm$ 0.50	2.00 $\pm$ 0.00	4.50 $\pm$ 2.50	1.00 $\pm$ 1.00	1.00 $\pm$ 1.00	1.50 $\pm$ 1.50
	(0.00-1.00)	(0.00-1.00)	(2.00-2.00)	(2.00-7.00)	(0.00-2.00)	(0.00-2.00)	(0.00-3.00)

Los porcentajes de motilidad total en el semen estudio descongelado después de procesarse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido (VNL) aparecen en la **tabla 4.30**. En este caso, para el semen sometido durante 5 minutos a VNL, los mayores registros se obtuvieron tras equilibrarse durante 90 minutos, si bien sólo mostraron valores significativamente mayores ($p<0.05$) con respecto a los alcanzados en el semen equilibrado durante 60 minutos, no existiendo distinciones de ambos porcentajes con respecto a los conseguidos tras el equilibrado durante 30 y 120 minutos. Por otro lado, en el semen congelado durante 10 minutos en VNL, las diferencias ($p<0.05$) se detectaron entre el semen equilibrado durante 60 y 90 minutos (porcentajes próximos al 60%) respecto a las muestras que permanecieron durante 120 minutos en equilibración (porcentajes cercanos al 50%). En referencia al semen expuesto 15 minutos a VNL, el mayor porcentaje de motilidad total (68%) quedó registrado para el semen equilibrado durante 30 minutos, mostrándose evidentemente superior ($p<0.01$) al existente a los 60 minutos de equilibrado, pero con valores similares a los observados a los 90 y 120 minutos de esta fase.

Tabla 4.30. Porcentajes de motilidad total (media $\pm$ sem) del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido

Vapores de NL	Tiempo de equilibrado			
	30 Minutos	60 Minutos	90 Minutos	120 Minutos
5 Minutos	59.00 $\pm$ 1.83 ^{12,x}	56.24 $\pm$ 2.76 ¹	66.41 $\pm$ 2.46 ²	61.72 $\pm$ 3.31 ^{12,x}
10 Minutos	57.21 $\pm$ 2.72 ^{12,x}	60.78 $\pm$ 2.83 ¹	61.01 $\pm$ 1.76 ¹	51.55 $\pm$ 3.54 ^{2,y}
15 Minutos	68.51 $\pm$ 2.24 ^{1,y}	58.02 $\pm$ 3.78 ²	64.72 $\pm$ 2.26 ¹²	63.87 $\pm$ 3.10 ^{12,x}

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p<0.05$)

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p<0.05$)

Por otro lado, al analizarse los diferentes periodos de equilibrado en relación con los distintos tiempos de vapores de NL, los porcentajes de motilidad total sólo mostraron diferencias significativas en el semen equilibrado 30 y 120 minutos, no existiendo en las muestras seminales equilibradas durante 60 y 90 minutos. El máximo valor de motilidad total (68.5%) se detectó para el semen equilibrado durante 30 minutos y posteriormente sometido 15 minutos a VNL, siendo superior ($p<0.05$) a los hallados a los 5 y 10 minutos en VNL. Asimismo, en el semen equilibrado durante 120 minutos, los porcentajes fueron notoriamente superiores ($p<0.01$) en las muestras

expuestas 5 y 15 minutos a VNL, respecto al registrado cuando este tiempo se situó en 10 minutos.

La **tabla 4.31** recopila los valores de motilidad progresiva del semen congelado-descongelado tras someterse a los distintos tiempos de refrigeración y de vapores de nitrógeno líquido. En ella se puede observar, aunque con porcentajes inferiores, que los registros de motilidad progresiva siguen el mismo comportamiento que los detectados para la motilidad total en el semen sometido a 5 y 15 minutos de vapores de nitrógeno. Es decir, el semen congelado después de situarse 5 minutos en VNL, obtuvo el mayor porcentaje de motilidad (superior al 55%) en la alícuota equilibrada previamente durante 90 minutos; este valor fue significativamente superior ($p<0.05$) al registrado para el semen equilibrado durante 60 minutos, no siendo así para los registros obtenidos a los 30 y 120 minutos (ambos próximos al 46%). Por el contrario, no se detectaron diferencias importantes en los porcentajes de motilidad progresiva entre los distintos tiempos de equilibrado para el semen procesado con 10 minutos de VNL. Asimismo, los porcentajes de motilidad progresiva registrados cuando el tiempo de VNL aplicado fue de 15 minutos se situó entre el 43% y el 56%, correspondiendo estos registros a los valores mínimo y máximo (60 y 30 minutos de equilibrado, respectivamente), mostrando diferencias significativas ($p<0.05$) entre sí.

Con respecto a las posibles diferencias existentes en aquellas muestras equilibradas durante un tiempo concreto, pero sometidas a diferentes tiempos de VNL, sólo se observaron contrastes relevantes en los porcentajes de motilidad progresiva de las muestras equilibradas durante 30 y 120 minutos. Según estos resultados, en el semen equilibrado durante 30 minutos, el 57% de motilidad progresiva alcanzado en el semen sometido 15 minutos a VNL, fue superior ($p<0.05$) al registrado en las muestras expuestas a 5 y 10 minutos de vapores (46% y 42%, respectivamente). Asimismo, un mayor porcentaje de motilidad progresiva (53.1%) fue también evidente ($p<0.01$) en las muestras equilibradas durante 120 minutos y posteriormente sometidas a 15 minutos a VNL, respecto al expuesto 10 minutos a VNL (38%). Finalmente, en aquellas muestras equilibradas a 4°C durante 60 o 90 minutos, los valores de motilidad progresiva fueron muy uniformes con independencia del tiempo (5, 10 o 15 minutos) posterior al que dichas muestras fueron sometidas a VNL.

Tabla 4.31. Porcentajes de motilidad progresiva (media $\pm$ sem) del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido

Vapores de NL	Tiempo de equilibrado			
	30 Minutos	60 Minutos	90 Minutos	120 Minutos
5 Minutos	45.81 $\pm$ 2.80 ^{12,x}	44.40 $\pm$ 3.01 ¹	55.56 $\pm$ 3.23 ²	47.61 $\pm$ 4.22 ^{12,xy}
10 Minutos	42.40 $\pm$ 3.56 ^x	46.65 $\pm$ 3.77	47.33 $\pm$ 2.68	37.93 $\pm$ 4.05 ^y
15 Minutos	56.91 $\pm$ 3.20 ^{1,y}	43.84 $\pm$ 4.89 ²	53.57 $\pm$ 2.74 ¹²	53.15 $\pm$ 3.85 ^{x,12}

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los porcentajes de morfoanomalías espermáticas en el semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y a VNL se recogen en la **tabla 4.32**. Los resultados evidenciaron que los porcentajes medios de cabezas (rango: 3.7-6.1%) y piezas intermedias (rango: 2.7-4.7%) anómalas mostraron valores muy uniformes, no observándose diferencias relevantes entre ellos para las alícuotas sometidas a diferentes tiempos de equilibrado y de exposición a VNL. Sin embargo, el porcentaje de colas anómalas mostró un considerable incremento en el número y una mayor variación, con respecto a las cabezas y piezas intermedias. De esta forma, se observó que en muestras equilibradas durante 30 o 120 minutos y posteriormente expuestas 10 minutos a VNL, se alcanzaron porcentajes de colas anormales (40% y 47%, respectivamente) muy superiores ($p < 0.01$) a las registradas en aquellas alícuotas equilibradas durante 30 o 120 minutos, y posteriormente expuestas 5 o 15 minutos a VNL. Asimismo, al analizar el porcentaje de colas anormales en las muestras expuestas a VNL durante 10 minutos, también se detectó un mayor número ($p < 0.05$) de colas anómalas en las alícuotas equilibradas 30 y 120 minutos, respecto a los registros observados en las muestras seminales equilibradas durante 60 o 90 minutos.

Cuando el porcentaje de morfoanomalías se valoró en su conjunto, los mayores registros se detectaron en aquellas alícuotas expuestas 10 minutos a VNL y previamente equilibradas durante 30 o 120 minutos, alcanzando valores del 48% y 56%, respectivamente. En ambos casos, estos porcentajes fueron muy superiores a los observados en las muestras equilibradas durante 60 o 90 minutos en esas mismas condiciones de VNL (10 min.), con valores

significativamente inferiores ($p < 0.01$). En las muestras seminales expuestas 5 y 15 minutos a VNL, el porcentaje total de anomalías morfológicas apenas se modificó con independencia del tiempo de equilibrado, con valores en torno al 30-36%. Por último, cuando el semen era equilibrado 30 o 120 minutos se establecieron importantes diferencias en el porcentaje total de morfoanomalías, siendo los porcentajes siempre superiores ($p < 0.01$) en aquellas alícuotas sometidas 10 minutos a VNL que en las expuestas 5 o 15 minutos a tales condiciones para ambos tiempos de equilibrado.

Tabla 4.32. Porcentaje (media $\pm$ sem) de Morfoanomalías totales del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido

			Tiempo de equilibrado				
			Vapores de NL (min.)	30 Minutos	60 Minutos	90 Minutos	120 Minutos
MORFOANOMALIAS	Cabezas	5	6.11 ± 1.01	4.50 ± 0.87	4.88 ± 1.37	4.75 ± 0.73	
		10	4.87 ± 1.08	5.50 ± 1.16	3.75 ± 0.75	4.75 ± 1.58	
		15	4.63 ± 1.12	3.88 ± 0.74	4.38 ± 1.38	4.63 ± 1.48	
	Piezas	5	4.67 ± 0.94	2.75 ± 0.50	3.75 ± 0.73	3.50 ± 0.95	
		10	3.13 ± 0.55	3.38 ± 0.86	3.25 ± 0.65	4.63 ± 1.21	
		15	3.75 ± 0.84	2.75 ± 0.70	3.75 ± 0.80	2.88 ± 0.99	
	Colas	5	26.00 ± 2.80 ^x	25.25 ± 2.76	25.63 ± 3.53	28.00 ± 3.57 ^x	
		10	39.8 ± 2.70 ^{1,y}	28.88 ± 3.17 ²	24.0 ± 2.23 ²	46.8 ± 4.11 ^{1,y}	
		15	26.50 ± 2.08 ^x	26.88 ± 2.02	24.63 ± 3.92	26.00 ± 4.10 ^x	
		Total	5	36.78 ± 3.67 ^x	32.50 ± 2.88	34.25 ± 4.40	36.25 ± 3.98 ^x
	10	47.88 ± 3.25 ^{12,y}	37.75 ± 4.36 ²³	31.00 ± 2.70 ³	56.25 ± 2.47 ^{1,y}		
	15	34.88 ± 3.37 ^x	33.50 ± 2.41	32.75 ± 5.05	33.50 ± 5.04 ^x		

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila y categoría (cabezas, piezas intermedias, colas, morfoanomalías totales) indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna y categoría (cabezas, piezas intermedias, colas, morfoanomalías totales) representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Por último, la **tabla 4.33.** expresa el porcentaje de acrosomas anómalos en el semen congelado-descongelado en los diferentes grupos experimentales. El número de acrosomías, a pesar de mostrar una distribución bastante homogénea (intervalo entre 7% y 13%, aproximadamente), reveló diferencias cuando se contrastaban distintos tiempos de equilibrado frente a vapores de nitrógeno líquido. De esta forma, se pudo observar como el mayor porcentaje de acrosomías en el semen expuesto 5 minutos a VNL se registró en muestras equilibradas durante 60 minutos (13.2%), siendo significativamente superior ($p<0.05$) al detectado a los 90 minutos de equilibrado (7.9%). Asimismo, en el semen procesado con 15 minutos de VNL, los periodos de equilibrado de 60 y 90 minutos fueron los que alcanzaron valores más bajos de acrosomías, siendo inferiores respecto al porcentaje encontrado para los 120 minutos de equilibrado (12%, $p<0.05$) y a los registrados para 30 minutos de equilibrado (11%, $p=0.08$). Finalmente, cuando se valoró el porcentaje de acrosomías en aquellas alícuotas sometidas al mismo tiempo de equilibrado, sólo en el semen equilibrado durante 60 minutos, se detectaron diferencias significativas ($p<0.01$) entre el semen expuesto durante 5 y 15 minutos a VNL.

Tabla 4.33. Porcentaje (media $\pm$ sem) de acrosomías del semen congelado-descongelado tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido

Vapores de NL	Tiempo de equilibrado			
	30 Minutos	60 Minutos	90 Minutos	120 Minutos
5 Minutos	12.00 $\pm$ 2.27 ^{1,2}	13.25 $\pm$ 1.81 ^{x,1}	7.88 $\pm$ 1.77 ²	9.88 $\pm$ 1.08 ^{1,2}
10 Minutos	9.38 $\pm$ 1.86	8.88 $\pm$ 1.25 ^{xy}	9.88 $\pm$ 0.99	11.00 $\pm$ 1.92
15 Minutos	11.00 $\pm$ 1.70 ^{1,2}	7.00 $\pm$ 0.80 ^{y,2}	7.25 $\pm$ 1.44 ²	12.00 $\pm$ 1.28 ¹

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ($p<0.05$)

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p<0.05$)

4.6. EXPERIMENTO 6: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONGELADO Y ALMACENADO EN NITRÓGENO LÍQUIDO VS NITRÓGENO SECO

Una vez recogidos los eyaculados, y tras realizar una valoración inicial de su calidad, se procedió a realizar el pool seminal que presentó una concentración media cercana a los 800×10^6 espermatozoides/ml. La motilidad espermática (valorada de manera subjetiva y por sistema CASA) presentó un valor medio superior al 90%, mientras los porcentajes medios de morfoanomalías y acrosomías mostraron unos valores medios del 18.0% y del 4.1%, respectivamente.

Los valores medios de motilidad subjetiva, total y progresiva en los diferentes métodos de congelación del semen a lo largo del tiempo de conservación, ha quedado registrada en la **Tabla 4.34**. La motilidad subjetiva para ambos métodos de preservación seminal (NL y NS) se mantuvo prácticamente inalterada a lo largo del tiempo, no existiendo diferencias significativas en los valores detectados entre los distintos días. Asimismo, al comparar ambos métodos entre sí a lo largo del periodo de estudio, tampoco se observaron modificaciones en este parámetro, mostrando valores medios muy uniformes entre ellos.

Con respecto a la motilidad total (sistema CASA), tras 1 día de conservación se observó una diferencia significativa entre ambos métodos de preservación (71.01% vs 47.4%, $p < 0.01$, NL vs NS, respectivamente). No obstante, esta diferencia no fue observada entre ambos métodos para el resto de días de estudio. Un comportamiento similar se produjo en la motilidad progresiva (sistema CASA), donde sólo se observaron tales diferencias entre NL y NS en el día 1 (57.6% vs 36.6%, $p < 0.01$, NL vs NS, respectivamente).

Con respecto a la evolución de los valores medios de motilidad total y progresiva a lo largo del periodo de preservación, indicar que en el NL no se detectaron diferencias significativas ni en la motilidad total ni en la progresiva, con valores muy uniformes a lo largo del tiempo. Por otro lado, sólo se registraron diferencias para NS en el caso de la motilidad total en el día 1, cuando mostró un valor significativamente inferior ($p < 0.05$) que para los días 3, 5 y 7. Del mismo modo, la motilidad progresiva en este método (NS) para el día 1 alcanzó unos valores notablemente inferiores a los registrados el día 7 ($p < 0.05$).

Tabla 4.34. Valores medios ($\pm$ sem) de la motilidad espermática (subjética, total y progresiva) en los diferentes métodos de conservación a lo largo del tiempo

	Motilidades					
	Subjetiva		Total		Progresiva	
	NL	NS	NL	NS	NL	NS
Día 1	65.00 $\pm$ 2.69	53.57 $\pm$ 5.53	71.01 $\pm$ 1.79 ¹	47.40 $\pm$ 5.74 ^{2,x}	57.62 $\pm$ 2.26 ¹	36.06 $\pm$ 6.43 ^{2,x}
Día 2	57.50 $\pm$ 2.91	56.50 $\pm$ 2.79	68.27 $\pm$ 2.66	59.03 $\pm$ 3.19 ^{xy}	50.44 $\pm$ 4.14	45.03 $\pm$ 2.99 ^{xy}
Día 3	63.00 $\pm$ 2.38	62.50 $\pm$ 4.23	72.10 $\pm$ 1.98	66.46 $\pm$ 3.91 ^y	57.34 $\pm$ 2.97	53.06 $\pm$ 4.73 ^{xy}
Día 5	62.50 $\pm$ 3.59	61.00 $\pm$ 3.05	66.60 $\pm$ 2.90	65.58 $\pm$ 2.14 ^y	55.54 $\pm$ 4.08	52.65 $\pm$ 3.90 ^{xy}
Día 7	59.50 $\pm$ 2.29	57.50 $\pm$ 3.44	72.63 $\pm$ 2.04	69.62 $\pm$ 1.55 ^y	57.92 $\pm$ 2.74	59.78 $\pm$ 2.60 ^y

NL: Conservación en nitrógeno líquido, NS: Conservación en nitrógeno seco.

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila y dentro de cada categoría (motilidad subjetiva, total o progresiva) indican diferencias significativas ($p < 0.01$)

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.01$)

En la **tabla 4.35** se exponen los resultados obtenidos en relación al porcentaje de morfoanomalías espermáticas y su distribución en función de la localización de la anomalía morfológica (cabeza, pieza intermedia o cola) a lo largo del tiempo en NL y NS así como los valores totales de las mismas. Como se puede observar, en ninguno de los parámetros estudiados se observaron diferencias debidas al método utilizado o al tiempo de conservación transcurrido, presentando valores muy homogéneos entre protocolos y a lo largo del periodo valorado. Sin embargo, en el promedio de las sumas totales de las morfoanomalías si se pudieron detectar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el día 2 con respecto al día 5, pero sólo en el NS.

Tabla 4.35. Porcentaje (media $\pm$ sem) de morfoanomalías en los diferentes métodos de conservación a lo largo del tiempo

	Morfoanomalías							
	Cabezas		Piezas Intermedias		Colas		Totales	
	NL	NS	NL	NS	NL	NS	NL	NS
Día 1	1.60 $\pm$ 0.6	1.00 $\pm$ 0.4	1.40 $\pm$ 0.5	1.50 $\pm$ 0.3	10.20 $\pm$ 2.0	12.00 $\pm$ 1.5	13.20 $\pm$ 2.3	14.50 $\pm$ 1.3 ^{xy}
Día 2	1.20 $\pm$ 0.4	1.30 $\pm$ 0.3	1.60 $\pm$ 0.7	1.20 $\pm$ 0.4	11.40 $\pm$ 1.0	10.40 $\pm$ 0.7	14.20 $\pm$ 1.3	12.60 $\pm$ 1.1 ^x
Día 3	3.20 $\pm$ 0.6	2.30 $\pm$ 0.6	1.60 $\pm$ 0.4	2.20 $\pm$ 0.8	14.20 $\pm$ 1.6	11.40 $\pm$ 1.4	19.00 $\pm$ 1.9	16.20 $\pm$ 1.6 ^{xy}
Día 5	2.00 $\pm$ 0.7	2.40 $\pm$ 0.4	2.40 $\pm$ 0.7	3.00 $\pm$ 0.6	12.80 $\pm$ 1.8	17.60 $\pm$ 1.2	17.20 $\pm$ 2.6	21.00 $\pm$ 0.7 ^y
Día 7	1.20 $\pm$ 0.4	3.00 $\pm$ 0.9	1.40 $\pm$ 0.7	3.00 $\pm$ 0.8	14.40 $\pm$ 3.3	11.80 $\pm$ 1.4	17.00 $\pm$ 3.1	17.80 $\pm$ 0.5 ^{xy}

NL: Conservación en nitrógeno líquido, NS: Conservación en nitrógeno seco

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Finalmente, el porcentaje de acrosomías (**tabla 4.36**) presento unos valores medios que oscilaban entre un 4-9%. De manera similar a lo observado con las morfoanomalías, el porcentaje de *acrosomías* se vio inalterado a lo largo del tiempo, tanto en las muestras conservadas con NL, como en las muestras preservadas en NS. Al comparar ambos protocolos entre sí, tampoco se detectaron diferencias significativas, si bien el primer día de conservación, el porcentaje medio de acrosomías fue inferior en las dosis conservadas en NL.

Tabla 4.36 Porcentaje (media $\pm$ sem) de acrosomías en los diferentes métodos de conservación a lo largo del tiempo

		Acrosomías	
		NL	NS
Preservación	Día 1	4.50 $\pm$ 0.63	8.75 $\pm$ 0.48
	Día 2	6.20 $\pm$ 1.31	8.00 $\pm$ 1.70
	Día 3	6.80 $\pm$ 0.80	7.20 $\pm$ 1.16
	Día 5	6.60 $\pm$ 1.03	8.80 $\pm$ 2.27
	Día 7	8.40 $\pm$ 2.75	8.60 $\pm$ 1.87

NL: Conservación en nitrógeno líquido, NS: Conservación en nitrógeno seco

4.7. EXPERIENCIA 7: NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA EN FUNCIÓN DE LA ESTIMULACIÓN SEXUAL

La **tabla 4.37** recoge los valores medios que describen la calidad del semen de los 4 individuos de raza Beagle participantes en la experiencia 7. Como se observa, el volumen seminal recolectado se encontraba entre los 2 y 3.33 ml, mientras la concentración espermática oscilaba entre 200 y 380 millones de espermatozoides por ml. Por otro lado, la motilidad espermática total se distribuyó de forma homogénea presentando unos valores entre un 70% y un 85%, mientras que la motilidad progresiva lo hizo entre un 55% y el 65%. Finalmente, los perros 1 y 3 presentaron los niveles más elevados de morfoanomalías y acrosomías, siendo muy superiores a los observados en los perros 2 y 4.

Tabla 4.37. Características seminales (media $\pm$ sem) en los eyaculados de los perros donantes

Parámetros seminales	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4
Volumen	2.00 $\pm$ 0.40	2.00 $\pm$ 0.29	2.67 $\pm$ 0.17	3.33 $\pm$ 0.17
Concentración ¹	378.00 $\pm$ 63.15	347.00 $\pm$ 76.05	202.00 $\pm$ 6.53	193.67 $\pm$ 31.54
Motilidad Total	75.87 $\pm$ 5.59	81.47 $\pm$ 6.10	75.53 $\pm$ 2.00	72.57 $\pm$ 7.12
Morfoanomalías	30.50 $\pm$ 8.57	5.33 $\pm$ 0.67	26.67 $\pm$ 7.22	5.67 $\pm$ 0.67
Acrosomias	14.00 $\pm$ 1.63	1.67 $\pm$ 0.33	5.33 $\pm$ 0.67	0.67 $\pm$ 0.33

¹: x 10⁶ espermatozoides/ml

En la **tabla 4.38** quedan reflejados los niveles de testosterona (ng/ml) de los diferentes perros y su media a lo largo del tiempo para el **grupo control**. Como se puede observar, las concentraciones plasmáticas de esta hormona no siguen un patrón común para todos los individuos. En el perro 1, los niveles descienden progresivamente desde de la primera muestra, mientras para los perros 2 y 4, los niveles de esta hormona muestran un incremento inicial, para posteriormente descender. No obstante, los valores medios de testosterona se caracterizaron por ser bastantes uniformes a lo largo de todo el periodo estudiado, manteniéndose en torno a 7-8 ng/ml. En ningún caso, se observaron diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de testosterona a lo largo del tiempo dentro de un mismo animal.

Tabla 4.38. Evolución de los niveles plasmáticos de testosterona (media $\pm$ sem) en el grupo control

Tiempo (min.)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Media
0	5.15 $\pm$ 1.93	5.17 $\pm$ 0.83	10.25 $\pm$ 1.07	8.34 $\pm$ 2.68	7.22 $\pm$ 1.35
10	4.24 $\pm$ 0.71 ²	5.82 $\pm$ 0.81 ^{1,2}	9.72 $\pm$ 2.12 ¹	10.28 $\pm$ 1.31 ¹	7.52 $\pm$ 1.47
30	4.11 $\pm$ 1.63 ²	6.24 $\pm$ 0.16 ^{1,2}	11.20 $\pm$ 0.00 ¹	10.15 $\pm$ 1.50 ¹	7.92 $\pm$ 1.61
60	3.89 $\pm$ 0.40 ¹	4.92 $\pm$ 0.61 ¹	11.10 $\pm$ 0.00 ²	9.65 $\pm$ 1.06 ²	7.42 $\pm$ 1.68
120	3.81 $\pm$ 0.73 ¹	5.54 $\pm$ 0.58 ¹	11.20 $\pm$ 0.00 ²	9.54 $\pm$ 1.16 ²	7.53 $\pm$ 1.63

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Por otro lado, la **tabla 4.39** muestra los niveles plasmáticos de testosterona después de la administración (SC) de hCG (min. 0). Como se puede observar, en este caso todos los individuos se comportaron de forma similar, ya que siempre se produjo un incremento en los niveles plasmáticos de testosterona a partir del minuto 30 tras la aplicación de la hormona exógena, si bien estas diferencias solo fueron significativas en el perro 4 a partir del minuto 60. Los valores medios siguieron un comportamiento similar de manera que, a los 60 y 120 minutos tras la hCG, las concentraciones hormonales fueron significativamente superiores a los niveles iniciales (0 y 10 min.). Por último, al valorar entre sí los diferentes ejemplares, sólo se observaron diferencias significativas en las concentraciones de testosterona registradas inicialmente (0 min.).

Tabla 4.39. Evolución de los niveles plasmáticos de testosterona (media $\pm$ sem) en el grupo estimulado con hCG

Tiempo (min.)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Media
0	8.49 $\pm$ 3.87 ¹²	7.81 $\pm$ 2.95 ¹²	9.59 $\pm$ 2.30 ¹	5.15 $\pm$ 3.41 ^{2,x}	7.76 $\pm$ 1.53 ^x
10	8.44 $\pm$ 3.95	8.41 $\pm$ 2.88	8.70 $\pm$ 3.58	4.38 $\pm$ 2.91 ^x	7.36 $\pm$ 1.64 ^x
30	8.81 $\pm$ 3.41	8.74 $\pm$ 3.26	9.72 $\pm$ 2.11	8.43 $\pm$ 2.72 ^{xy}	8.93 $\pm$ 1.26 ^{xy}
60	9.14 $\pm$ 2.95	9.44 $\pm$ 2.51	10.76 $\pm$ 0.63	10.47 $\pm$ 1.05 ^y	9.95 $\pm$ 0.91 ^y
120	9.86 $\pm$ 1.90	9.10 $\pm$ 2.14	11.20 $\pm$ 0.00	10.70 $\pm$ 0.71 ^y	10.22 $\pm$ 0.72 ^y

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

La evolución de los niveles de testosterona a lo largo del tiempo en los ejemplares tras la estimulación manual (inmediatamente después de la recogida) se recoge en la **tabla 4.40**. En este caso, al igual que en el grupo control, existió una gran variabilidad en la evolución de las concentraciones plasmáticas de testosterona, de forma que no siguieron un patrón común entre ejemplares. En cualquier caso, no se observaron modificaciones significativas en los niveles plasmáticos de testosterona a lo largo de la monitorización, tanto en el estudio de cada ejemplar por separado como en los concentraciones plasmáticas medios. Asimismo, entre individuos, solo se detectaron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el perro 1 y el perro 3, y exclusivamente en dos de los periodos valorados (minuto 0 y minuto 30).

Tabla 4.40. Evolución de los niveles plasmáticos de testosterona (media $\pm$ sem) en el grupo estimulado sexualmente

Tiempo (min.)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Media
0	2.92 $\pm$ 0.93 ¹	4.40 $\pm$ 0.98 ¹²	7.48 $\pm$ 2.75 ²	6.17 $\pm$ 2.10 ¹²	5.24 $\pm$ 1.09
10	2.74 $\pm$ 1.13	4.45 $\pm$ 1.15	6.44 $\pm$ 2.71	4.89 $\pm$ 1.17	4.63 $\pm$ 0.91
30	3.21 $\pm$ 0.99 ¹	4.55 $\pm$ 0.21 ¹²	7.87 $\pm$ 4.14 ²	4.55 $\pm$ 0.78 ¹²	5.05 $\pm$ 1.18
60	3.26 $\pm$ 0.59	4.89 $\pm$ 1.21	6.66 $\pm$ 4.08	6.69 $\pm$ 0.85	5.38 $\pm$ 1.12
120	3.75 $\pm$ 0.95	4.91 $\pm$ 0.71	6.29 $\pm$ 6.40	7.25 $\pm$ 1.41	5.48 $\pm$ 1.15

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p < 0.01$)

La **tabla 4.41** muestra la evolución de los niveles de testosterona a lo largo de los distintos periodos en los diferentes grupos experimentales (control, estimulación manual, administración de hCG). Como se citó con anterioridad, sólo la aplicación de hCG consiguió un incremento de los valores de testosterona relevantes a partir del minuto 30, manifestando los valores más elevados a los 60 y 120 minutos post-aplicación. Al valorar los diferentes grupos entre sí, se observó que los niveles plasmáticos en el momento inicial del estudio no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, para los tiempos 10 y 30 minutos, las concentraciones hormonales detectadas en la fase control y tras la administración de hCG fueron significativamente superiores ($p<0.05$) a los observados en el grupo de estimulación sexual. Tras 1 hora, los valores del grupo hCG fueron superiores al resto de tratamientos, si bien sólo se establecieron diferencias significativas ($p<0.05$) con respecto al grupo de estimulación sexual. Finalmente, 120 minutos después de comenzar la medición, las concentraciones de testosterona alcanzadas tras aplicar hCG mostraron valores notablemente superiores a las detectados tanto en el grupo de estimulación manual ($p<0.01$) como en el grupo control ($p<0.05$).

Tabla 4.41. Comparación (media $\pm$ sem) de los niveles plasmáticos de testosterona en los grupos control, grupo estimulado con hCG y grupo estimulado sexualmente

Tiempo (min.)	Control	hCG	Estimulación manual
0	7.22 $\pm$ 1.35	7.76 $\pm$ 1.53 ^x	5.24 $\pm$ 1.09
10	7.52 $\pm$ 1.47 ¹	7.36 $\pm$ 1.64 ^{1,x}	4.63 $\pm$ 0.91 ²
30	7.92 $\pm$ 1.61 ¹	8.93 $\pm$ 1.26 ^{1,xy}	5.05 $\pm$ 1.18 ²
60	7.42 $\pm$ 1.68 ¹²	9.95 $\pm$ 0.91 ^{1,y}	5.38 $\pm$ 1.12 ²
120	7.53 $\pm$ 1.63 ¹	10.22 $\pm$ 0.72 ^{2,y}	5.48 $\pm$ 1.15 ¹

^{xy}: Letras distintas dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p<0.05$)

¹²: Números diferentes dentro de la misma fila representan diferencias significativas ($p<0.05$)

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. EXPERIMENTO 1: CARACTERÍSTICAS SEMINALES POST-DESCONGELACIÓN EN MUESTRAS CONSERVADAS EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

La congelación del semen canino en nitrógeno líquido es un protocolo perfectamente definido en la especie canina (England y Ponzio, 1996; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y cols., 2003; Martins-Bessa y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006; Milani y cols., 2010). Asimismo, nuestro equipo de investigación ha determinado que el semen canino puede ser congelado y criopreservado en ultracongeladores (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006; Álamo, 2007), si bien el tiempo de estudio nunca superó el año. La mayoría de estos estudios utilizan el protocolo habitual de congelación, en la que los medios de congelación, conocidos como “diluyente Upssala”, estaban elaborados a base de Tris, ácido cítrico, glucosa, antibióticos, yema de huevo, glicerol y Equex a una concentración final de 0.5%, (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Batista y cols., 2006; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006). No obstante, el efecto que la modificación de las concentraciones de Equex podría tener sobre la viabilidad del semen post-congelación en ultracongelador no se ha estudiado en profundidad. En base a esa premisa, se propuso analizar la utilización de un 1% de Equex en las muestras criopreservadas en ultracongeladores. Por tanto, en el actual estudio hemos determinado, la calidad del semen de perros de raza Dogo Canario criopreservado en NL y la influencia del tiempo de almacenamiento, así como los resultados obtenidos de congelar semen con distintas concentraciones de Equex (0.5-1%) en ultracongeladores de -152°C.

5.1.1. Características del semen fresco

Las características del semen en fresco entre individuos, al igual que dentro de cada animal, fueron bastantes homogéneas, mostrando las mayores variaciones en los parámetros de volumen y concentración espermática, resultado probablemente de la variabilidad individual dentro de cada perro (Feldman y Nelson, 2007).

En general, el volumen de los eyaculados fue muy similar dentro de cada individuo, no existiendo grandes oscilaciones de una recogida seminal a otra (valores medios entre 4 y 7 ml). Estos resultados fueron algo superiores a los descritos por Batista y cols. (2006) en esta misma raza, que refieren un volumen entre 2.6 y 4.2 ml. Asimismo, otros trabajos desarrollados en perros entre 10 y 30 kg, describen volúmenes comprendidos entre 1 y 4.8 ml (England, 1999;

Santana, 2009), y en un estudio realizado con Pastores Alemanes se registró un volumen ligeramente superior a los 3 ml (Risopatrón y cols., 2005). Estas diferencias pueden ser debidas a numerosos factores como la edad, el tamaño del ejemplar, la frecuencia de recogida y la cantidad de fracción prostática; todos ellos generan que se trate de un parámetro inconstante y, por tanto, no concluyente a la hora de determinar la calidad seminal (Feldman y Nelson, 2007).

En nuestros ejemplares, la concentración media registrada fue de 400×10^6 espermatozoides/ml. Esta concentración es similar a los 400×10^6 espermatozoides/ml registrados por England (1999) en perros de raza grande y aproximadamente duplicaba la concentración descrita (200×10^6 espermatozoides/ml) en Pastores Alemanes (Risopatrón y cols., 2005). En el estudio realizado por Batista y cols. (2006) en Dogo Canario, las concentraciones espermáticas medias (700×10^6 espermatozoides/ml) fueron superiores a las obtenidas en los perros de nuestro estudio. Sin embargo, el número de espermatozoides totales en el eyaculado se situó alrededor de los 2.200 millones en ambos trabajos, no existiendo diferencias entre ellos. En cualquier caso, nuestros resultados de concentración se encuentran dentro de los definidos como habituales en la especie canina (entre 100 a 700 millones de espermatozoides/ml, Peña, 1997) y cercanos a los 20-2000 millones de espermatozoides eyaculado (Root, 2005a).

Por otro lado, la motilidad subjetiva registró valores muy homogéneos para todos los perros, siempre superiores al 90%, prácticamente idéntica a la descrita para esta misma raza por Batista y cols. (2006) y en perros de tamaño similar a nuestra raza (Szász y cols., 2000). Por otro lado, algunos trabajos realizados en perros de diferentes razas y menor talla refieren también resultados superiores al 90% de motilidad subjetiva (Silva y Verstegen, 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Álamo y cols., 2005). En todo caso, nuestros resultados fueron muy superiores a los considerados como límite aceptable (70%) de motilidad espermática en el semen fresco de la especie canina (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a).

Un comportamiento similar se observó en el porcentaje de anomalías morfológicas y acrosomías, donde la variación en el porcentaje de las mismas fue sutil en la mayoría de los ejemplares, con valores siempre inferiores al 18% de morfoanomalías y del 13% de acrosomías. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Álamo (2007), quien obtuvo valores medios por debajo del 18% en espermatozoides anormales y del 10% de acrosomas alterados. Asimismo, en otros trabajos que utilizan también Spermac® como sistema de evaluación de la

morfología espermática, se obtuvo un registro medio en torno al 90% de espermatozoides normales (Nöthling y Shuttleworth, 2005). De manera general, diversos autores establecen que en el semen fresco canino, el porcentaje de espermatozoides sin anomalías morfológicas debe ser superior al 70-80% (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a), todos ellos compatibles con nuestros resultados. Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales de nuestros ejemplares se encontraba dentro del rango (85-95%) considerado como normal en el semen fresco de perro (England, 1996).

Los resultados de concentración, motilidad, morfología y acrosomías espermáticas confirman que en nuestro estudio se utilizaron individuos de condición corporal, estado sanitario y rango de edad óptimos para los procesos de generación de espermatozoides normales.

5.1.2. Características seminales del semen congelado y descongelado en NL y UF

5.1.2.1. Motilidad espermática tras la descongelación

La refrigeración y la congelación se consideran los principales procesos utilizados para disminuir la tasa metabólica del semen y, por tanto, prolongar la vida espermática (Stornelli y cols., 2006). No obstante, este tipo de procesos se caracterizan por producir una importante reducción en la motilidad y longevidad del semen con respecto al semen fresco, siendo esta circunstancia más marcada en el semen congelado que en el refrigerado (Milani y cols., 2010).

A la descongelación, las muestras almacenadas en NL registraban un porcentaje medio de motilidad espermática total alrededor del 70% y progresivo del 60%, valores que se mantuvieron uniformes durante la mayor parte del tiempo de conservación (1 día y 1, 3 y 12 meses). Sin embargo, a los 18 meses de congelación, las muestras seminales sufrieron una significativa reducción de los porcentajes de motilidad (50-60%). Estos resultados fueron similares a los descritos en otros estudios que realizaron congelación-descongelación de semen canino en nitrógeno líquido (England y Ponzio, 1996; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997; Ström y cols., 1997; Yildiz y cols, 2000; Peña y cols., 2000 a, b), donde el porcentaje de motilidad obtenido se situaba entre el 45 y el 70%. Sin embargo, al igual que la mayor parte de los trabajos realizados en congelación del semen canino, en los estudios citados no se especificaba el tiempo de preservación de las dosis seminales antes de su valoración post-descongelación.

La influencia del tiempo de almacenaje en las muestras criopreservadas es un factor que se ha valorado en las muestras seminales congeladas en distintas especies animales (Leboeuf y cols., 2000; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006), si bien no se ha estudiado con demasiada profundidad. En la especie canina, el tiempo máximo de almacenamiento sigue por determinarse, aunque algunos autores describen que las dosis seminales congeladas pueden conservarse en congelación hasta más de 10 años, sin presentar prácticamente reducción alguna en parámetros como la motilidad espermática (Feldman y Nelson, 2007). Asimismo, diversos autores, empleando diferentes protocolos de trabajo (diversas dosis seminales, distintos sistemas y rutas de inseminación, diferente frecuencia de inseminación, etc), describen el éxito obtenido al inseminar perras con semen canino congelado, si bien, como se cita con anterioridad, la mayor parte de ellos no especifica el tiempo de congelación de las dosis seminales utilizadas (Farstad, 1984; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y cols., 1995; Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg y cols., 1999). No obstante, algunos estudios que valoraron la influencia del tiempo de conservación sobre la calidad del semen, comprobaron que la motilidad post-descongelación comenzaba a manifestar un ligero descenso en aquellas valoraciones realizadas con el paso del tiempo (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

En nuestra experiencia, al realizar un análisis más detallado de los resultados se confirmó la existencia de ciertas modificaciones de motilidad espermática a lo largo del tiempo. Durante los primeros 12 meses de conservación, nuestros resultados fueron prácticamente idénticos (60-70% de motilidad) a los registrados en otro estudio (Batista y cols., 2006) desarrollado en la misma raza de perros, y donde no se evidenciaron diferencias consecuentes al tiempo de congelación. Por el contrario, otro trabajo realizado con muestras criopreservadas en perros de la raza Beagle, observó que la motilidad espermática no se modificaba durante los 3 primeros meses de conservación, pero a partir de ese momento, se constató un notable empeoramiento de la calidad seminal tras 6-12 meses de criopreservación en NL (Álamo, 2007). Asimismo, en la especie caprina, se ha confirmado un descenso de la motilidad espermática conforme se incrementase el tiempo de conservación en nitrógeno líquido (Leboeuf y cols., 2000). Nuestros hallazgos son coherentes con esos estudios, observándose una disminución de la calidad seminal, en las muestras conservadas durante 18 meses con respecto a los periodos previos.

Este efecto sobre la motilidad podría explicarse como resultado del proceso de criopreservación ya que, la conservación del semen es consecuencia de una disminución del metabolismo celular, pero no de su completa inactivación; en consecuencia, se produce un gasto energético que, aunque lento, es continuo, ocasionando el agotamiento definitivo y muerte de los espermatozoides congelados conforme progresa el tiempo de conservación (Leboeuf y cols., 2000). Por otro lado, algunos trabajos describen la existencia de diferentes subpoblaciones de espermatozoides con distintas características espermáticas; concretamente, Peña y cols. (2003) describen la presencia de una pequeña subpoblación de espermatozoides con membranas celulares más resistentes a la criopreservación, y por tanto con mayor capacidad de sobrevivir a los procedimientos de diluyocervización y congelación seminal, con bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Otra teoría propone la existencia de grupos de espermatozoides con diferentes velocidades de respuesta al efecto que los procedimientos de congelación-descongelación podrían ejercer sobre la motilidad y la estructura de las membranas espermáticas (Núñez-Martínez y cols., 2005). De la misma forma, ambos procesos (incompleta inactivación del semen y existencia de subpoblaciones espermáticas menos móviles) podrían ser válidas para explicar porqué las muestras seminales de Dogo Canario almacenadas durante 18 meses registraron unos valores significativamente inferiores al resto de periodos evaluados.

Con respecto a las dosis seminales congeladas y preservadas en ultracongeladores, en las muestras procesadas con 0.5% de Equex, no se registraron variaciones importantes (65-70% motilidad total, 55-60% de motilidad progresiva) a lo largo del tiempo. Estos resultados son similares a los obtenidos en los estudios previos que utilizaron los ultracongeladores como método de criopreservación (Álamo, 2003; Álamo y cols., 2005), donde la motilidad espermática se mantenía prácticamente constante a lo largo de los 4 meses que duró el periodo experimental (rango medio: 68.2-70.6%). Asimismo, nuestros porcentajes de motilidad son comparables a los registrados en perros de la raza Dogo Canario tras 4 meses de conservación mediante ultracongelador de $-152^{\circ}C$, con valores que oscilaban entre 57-75% (Batista y cols., 2006). Por otro lado, en las muestras conservadas en UF con un 1% de Equex, los valores medios de motilidad espermática total se encontraban entre el 65-70%, con porcentajes de espermatozoides con movimiento progresivo superiores al 50%, sin diferencias significativas a lo largo del periodo experimental (3 meses). No existen estudios previos que nos puedan ofrecer información sobre el comportamiento del semen procesado con un 1% de Equex y criopreservado en ultracongeladores. Sin embargo, determinados trabajos han analizado el

importante papel del Equex en las muestras seminales congeladas en la especie canina. Algunos de ellos han descrito una mayor calidad seminal post-descongelación como respuesta a una mejor protección de las membranas celulares de los espermatozoides congelados con diluyentes que contuviesen Equex; gracias a este compuesto, la bomba de Ca^{2+} mejora su capacidad de controlar el paso de calcio extracelular al interior de la célula, disminuyendo la concentración del mismo, evitando así que la célula se despolarice y muera (Peña y cols., 2003). Este mismo trabajo, además, evidencia la presencia de determinadas subpoblaciones de espermatozoides caracterizadas por presentar una membrana más resistente a la criopreservación, lo que explicaría las diferencias a lo largo del tiempo de los distintos individuos.

En relación a la variabilidad individual, los porcentajes de motilidad de las muestras conservadas en NL dentro de un mismo individuo a lo largo del tiempo y entre individuos para un mismo periodo de tiempo fueron muy uniformes durante los primeros periodos evaluados (1 día y 1 mes de congelación). Sin embargo, a partir del 3º mes de almacenamiento comenzaron a registrarse ligeras variaciones dentro de cada perro, si bien los máximos y mínimos porcentajes de motilidad espermática siempre pertenecieron a los mismos ejemplares. Con respecto a los ultracongeladores, con independencia de la concentración final de Equex (0.5, 1%), las dosis seminales de cada uno de los individuos mantenían un comportamiento similar de forma que aquellos perros que mostraban los máximos registros en otros métodos de conservación, los conservaban en este procedimiento.

La presencia de ciertos individuos que muestran unos mayores niveles de motilidad espermática y, por tanto, una calidad seminal superior a lo largo del tiempo, viene determinada no solo por las características seminales en fresco, sino probablemente por la capacidad que el semen tiene para ser congelado (congelabilidad). En este sentido, se ha descrito ampliamente como, resultado de las variaciones intrínsecas en las propiedades del semen y el grado de sensibilidad de los espermatozoides en los distintos individuos, se produce una inconstante respuesta del mismo a los procesos de congelación en la especie canina (Fahrig, 2000; Petrunkina y cols., 2004; Eilts, 2005). Así, en nuestra experiencia, el hecho que ciertos individuos registrasen siempre unos mayores valores de motilidad espermática, independientemente del protocolo de congelación utilizado, puede ser consecuencia de una mayor capacidad de respuesta celular a la criopreservación y, por tanto, en la capacidad de supervivencia espermática tras la descongelación. Asimismo, la dispersión de los registros a partir de los 12

meses de almacenamiento en NL puede estar vinculada a una pérdida en la calidad del semen a lo largo del tiempo. Como ya hemos citado anteriormente, esta circunstancia ya se ha registrado en diferentes especies (canina, Batista y cols., 2006; Álamo, 2007; caprina, Leboeuf y cols., 2000), constatando una reducción significativa de la motilidad espermática conforme se incrementaba el tiempo de conservación en nitrógeno líquido.

Al realizar un análisis global entre métodos se observó que las muestras conservadas en NL siempre presentaron los mejores resultados de motilidad espermática. Cuando las muestras de semen eran criopreservadas en UF con un 0.5% de Equex, los porcentajes de motilidad espermática tras la descongelación fueron equiparables a los obtenidos en las dosis almacenadas en NL tras 1 y 90 días. Sólo existieron diferencias relevantes con respecto a las muestras conservadas durante 30 días en UF-0.5, siendo resultado del marcado descenso en los niveles de motilidad en 2 de los individuos participantes en el estudio. Sin embargo, los registros de motilidad de ambos individuos recuperaron sus niveles iniciales a los 3 meses de preservación lo que parece indicar que pueda tratarse un descenso fortuito y que, por tanto, las diferencias de motilidad espermática entre las muestras congeladas en NL y UF-0.5 en este periodo de tiempo no son realmente representativas. Salvando esta excepción, en base a los resultados de nuestra experiencia podemos proponer que no existen diferencias entre ambos métodos de congelación (NL y UF-0.5), siendo igualmente válidos para la criopreservación seminal en la especie canina y, de forma más específica, en perros de raza Dogo Canario. Estos hallazgos vienen a confirmar las premisas establecidas previamente en estudios de similares características, donde se había registrado que la motilidad espermática no mostraba diferencias significativas entre las muestras seminales congeladas con nitrógeno líquido y ultracongeladores de -152°C a corto plazo (4 meses, Álamo y cols., 2005) y medio plazo (6-12 meses) (Batista y cols., 2006, Álamo 2007), pero siempre en muestras seminales procesadas con una concentración final de Equex del 0.5%.

Con respecto a las dosis seminales procesadas en UF-1, se pudo observar como la motilidad espermática revelaba valores inferiores a los registrados en NL en prácticamente todos los periodos evaluados. En vista a estos resultados, se puede deducir que la criopreservación de muestras seminales procesadas con un 1% de Equex y congeladas en ultracongeladores no es tan efectiva como cuando el método de elección para llevar a cabo esta técnica es el nitrógeno líquido (y un 0.5% de Equex). Por el contrario, al analizar los resultados de las muestras

congeladas en ultracongelador utilizando distintas concentraciones de Equex, los resultados se caracterizaron por presentar una falta de discrepancias entre los porcentajes de motilidad espermática. Por tanto, se puede especular que la calidad en el movimiento de los espermatozoides en las muestras criopreservadas no parece quedar determinada únicamente por el método de congelación o los porcentajes de Equex utilizados, sino por las interacciones que se establecen entre ambas. Según esta hipótesis, cuando las muestras son procesadas de la misma forma (igual cantidad de Equex) tanto el NL como los UF son métodos igualmente válidos para la congelación; asimismo, ante un mismo método de congelación (bien NL o UF), se obtienen similares resultados con diluyentes que contengan 0.5% o 1% de Equex.

En definitiva, los resultados de motilidad espermática de nuestro estudio confirman las premisas establecidas por otros estudios de nuestro equipo de investigación (Álamo y cols., 2005; Álamo, 2007) que determinaban como la utilización de ultracongeladores de -152°C para congelar y conservar el semen canino se presenta como una opción completamente válida que garantiza resultados satisfactorios de motilidad espermática post-congelación. Por otro lado, con objeto de perfeccionar la técnica de congelación mediante ultracongeladores de -152°C , estos estudios (Álamo y cols., 2005; Álamo, 2007) valoraron los efectos que diferentes concentraciones de glicerol en la composición de los diluyentes de congelación, pueden tener sobre la capacidad del semen canino para soportar la criopreservación. Persiguiendo esta misma finalidad y en base a la importante función crioprotectora que el Equex tiene sobre el semen canino a congelar, en esta experiencia se ha analizado por primera vez la influencia que la variación en la concentración de Equex (0.5% vs 1%) puede tener sobre las dosis seminales caninas procesadas en UF; los resultados preliminares al respecto indican que no existen diferencias entre ambos protocolos de criopreservación. Sin embargo, se considera necesario realizar estudios más profundos sobre aquellos aspectos relacionados con las variaciones que podrían realizarse en el semen canino (perfeccionamiento de la composición de los diluyentes y proceso de diluyo-conservación, etc), con el fin de mejorar su congelabilidad en ultracongeladores.

5.1.2.2. Porcentaje de morfoanomalías en el semen congelado-descongelado

Los resultados de morfoanomalías espermáticas observados en los protocolos de criopreservación fueron comparables a los obtenidos en diferentes estudios. Con respecto a las dosis seminales procesadas en nitrógeno líquido, la mayoría de los autores sitúan los porcentajes de morfoanomalías entre un 10 y un 30% (England y Ponzio, 1996; Silva y cols.,

1996; Álamo y cols., 2005). En nuestro caso, el porcentaje medio de morfoanomalías en el semen criopreservado mediante NL fue ligeramente superior al 12% y el porcentaje máximo se detectó en las dosis almacenadas durante 18 meses (registros del 15.7%). Con respecto a las muestras criopreservadas en ultracongeladores, independientemente de las concentraciones de Equex utilizadas para su procesamiento, los porcentajes siempre mostraron valores medios inferiores al 11%. Nuestros resultados fueron muy similares a los estudios que han utilizado los ultracongeladores en la criopreservación seminal; Batista y cols. (2006) describen un porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en torno al 10% en esta misma raza, mientras en otras razas caninas (Álamo y cols., 2005) el valor medio se situó próximo al 12%. En conjunto, el bajo porcentaje de espermatozoides con morfología anormal tras la descongelación podría corresponderse con la excelente calidad del semen de partida. De hecho, la selección de ejemplares se realizó en base a una condición corporal, estado sanitario y rango de edad óptimos para los procesos de generación de espermatozoides normales. Esta aseveración resulta coherente con los hallazgos de diferentes estudios que describen como inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de testosterona, alteraciones iatrogénicas, edad avanzada, etc..., pueden ocasionar un incremento en el porcentaje de anomalías en el semen eyaculado y, por tanto, reducir su calidad (Kawakami y cols., 1998; Johnston y cols. 2001; Peña, 2004).

Cuando los protocolos de criopreservación se compararon entre sí durante los 3 primeros meses de conservación, no se detectaron diferencias significativas. Por tanto, en base a nuestros resultados, se puede afirmar que el porcentaje medio de morfoanomalías no difiere en función de la técnica de congelación empleada (NL, UF-0.5, UF-1.0), puesto que ninguno de estos protocolos produce un incremento en el porcentaje de espermatozoides con defectos de forma con respecto al otro.

En relación a la influencia del periodo de almacenamiento sobre la aparición de morfoanomalías, los porcentajes se mantuvieron muy homogéneos en las dosis seminales procesadas en ultracongelador, y sólo en el protocolo de criopreservación en NL se describieron puntualmente algunas variaciones. Concretamente, los resultados de colas anormales a los 12 y 18 meses duplicaban los registrados durante los primeros tres meses de almacenamiento. En consecuencia, en las medias totales de espermatozoides anormales de las muestras conservadas en NL, el porcentaje fue significativamente mayor conforme se incrementaba el

tiempo de conservación. En la especie canina, muy pocos estudios han valorado la influencia del tiempo de conservación en la aparición de anomalías morfológicas del semen. Batista y cols. (2006) y Álamo (2007) comprobaron que el porcentaje de espermatozoides anormales en muestras congeladas en NL o UF variaba de forma irregular en función del tiempo de almacenamiento y del animal, de forma que no se evidenció una clara tendencia al aumento en el porcentaje de morfoanomalías conforme se incrementaba el periodo de almacenamiento. No obstante, en la especie caprina, se ha confirmado que al aumentar el tiempo de conservación en nitrógeno líquido, se producía un incremento significativo del porcentaje de morfoanomalías (Leboeuf y cols., 2000). En nuestro estudio, el porcentaje de morfoanomalías se incremento en aquellas muestras preservadas durante más tiempo (12-18 meses, NL), y si bien no se observaron modificaciones en las dosis criopreservadas en ultracongeladores durante 3 meses, no se descarta la posibilidad de que el porcentaje de espermatozoides anormales se pudiese haber incrementado si se ampliara el tiempo de congelación en este método.

5.1.2.3. Porcentaje de acrosomías en el semen congelado-descongelado.

El porcentaje medio de acrosomías se mantuvo siempre por debajo del 10% en todos los protocolos valorados. Al comparar nuestros resultados con otros estudios que utilizaron el mismo método de evaluación acrosómica (Spermac®), existe disparidad de registros. De esta forma, nuestros resultados son compatibles con varios estudios que obtienen valores máximos de acrosomías del 12% para muestras criopreservadas en NL y del 16% en dosis almacenadas en UF (Álamo y cols., 2005; Álamo, 2007). No obstante, Nöthling y Shuttleworth (2005) describen unos resultados entre un 40 y un 45% de acrosomas alterados. Los bajos porcentajes de acrosomas alterados, registrados en las dosis seminales post-descongelación, pueden ser indicativos de la capacidad del semen para resistir los procesos de crioconservación; en nuestro caso, se partió de una semen fresco de alta calidad con porcentajes medios de acrosomías próximos al 6% pudiendo, por tanto, resistir mejor los procedimientos de criopreservación.

Por otro lado, cuando se compararon los tres protocolos entre sí, no se observaron diferencias en el porcentaje de acrosomías espermáticas entre distintos protocolos de congelación, concluyendo que los acrosomas espermáticos no se ven afectados por el método de congelación y, en caso de utilizar ultracongeladores, por la concentración de Equex utilizada. Esta apreciación es totalmente compatible con las postulaciones que autores como Álamo (2007)

han realizado tras comprobar que no se detectaban diferencias significativas en el porcentaje de acrosomías en muestras seminales caninas congeladas en NL y UF.

Finalmente, con respecto a la influencia que el tiempo de preservación puede tener sobre los valores de acrosomías, no se detectaron diferencias relevantes en muestras conservadas en ultracongeladores. Sin embargo, las muestras seminales criopreservadas en NL durante los 3 meses mostraban registros algo más elevados (8-12%) que las conservadas durante 12 y 18 meses (6-7%), siendo en todo caso variaciones no extremas. En un estudio realizado en perros de raza Beagle (Álamo, 2007) utilizando ambos protocolos de criopreservación, se relata que sólo la mitad de los ejemplares evaluados mostraron modificaciones en el porcentaje de acrosomías post-descongelación en función del tiempo de almacenamiento (hasta 12 meses), aunque no se pudo definir un patrón común. Por tanto, ante la ausencia de trabajos que permitiesen contrastar nuestros resultados, así como el comportamiento poco uniforme de nuestros resultados (escasas diferencias a lo largo del tiempo, que si bien son significativas, se sitúan en porcentajes muy similares), se hacen necesarios estudios más específicos para definir con más contundencia si el tiempo de preservación puede afectar al porcentaje de acrosomas alterados en la especie canina.

5.2. EXPERIMENTO 2: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS A LO LARGO DEL TIEMPO

5.2.1. Semen en fresco

La adición de diluyentes aporta una fuente de energía y medios tampones que permiten la preservación de los espermatozoides durante un corto (refrigeración) o largo (congelación) periodo de tiempo (Farstad, 2000; Celma, 2004; Kutzler, 2005; Pinto, 2005). No obstante, el procesamiento del semen produce un descenso en la calidad de los espermatozoides, reduciendo su viabilidad y el nivel de fertilidad tras su utilización; con el fin de minimizar estos efectos, se han realizado numerosos estudios sobre la conservación del semen y los factores que la afectan (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Rigau y cols., 2001). En función de estas premisas, el principal objetivo de esta experiencia fue valorar la capacidad de supervivencia y la calidad del semen conservado a distintas temperaturas (37°C, 25°C, 4°C y semen congelado-

descongelado), así como si existían diferencias en función de procesar el semen de manera individual o a modo de *pool*.

El semen en fresco de los ejemplares utilizados en la experiencia se caracterizaba por presentar un volumen medio individual entre 1.33 y los 6.37 ml y un rango de concentración 140-657 millones de espermatozoides/ml. Asimismo, la motilidad progresiva se situó entre un 75% y un 95%, mientras el porcentaje medio de anomalías morfológicas y acrosomías oscilaba entre el 1-6% en la totalidad de los ejemplares. Esta amplia distribución de los registros de los parámetros evaluados en el semen fresco obedecía principalmente a la diversidad de razas y tamaño de perros utilizados en nuestro estudio. No obstante, estos valores son equiparables a los descritos como normales para perros de la misma raza y/o similar tamaño a los utilizados en nuestro estudios (Silva y Verstegen, 1995; England, 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, b, c; Álamo y cols. 2005; Verstegen y cols., 2005; Schäfer-Somi y cols., 2006), así como a los registrados en otras de la experiencias realizadas a lo largo de este trabajo.

5.2.2. Motilidad espermática del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación

En nuestro estudio, las muestras situadas en a **37°C** mostraron un descenso progresivo y rápido de la motilidad espermática, de forma que tras un día de preservación el semen se encontraba inmóvil. Esta ampliamente aceptado que la vida media del semen conservado a 37°C se incrementa cuando se suplementa con un diluyente a base de yema de huevo; por el contrario, cuando se preserva o transporta sin la adición de un medio adecuado, la calidad seminal disminuye considerablemente (Farstad, 2000; Celma, 2004; Kutzler, 2005; Root, 2005). En relación a estas premisas, nuestros resultados muestran como, en general (tanto en muestras individuales como en *pool*), transcurrida una hora de conservación en incubación, las dosis seminales presentaban una motilidad total del 65-70%, manteniendo valores en torno al 40-50% durante las primeras 4 horas de preservación. Posteriormente, tras 8 horas de incubación, se produjo una reducción evidente en la motilidad espermática que, fue más marcada en las muestras individuales, para finalizar inactivándose completamente tras 24 horas de preservación. Pocos trabajos han valorado la capacidad de supervivencia del semen fresco tras ser diluido con medios ricos en nutrientes (azúcares, yema de huevo) y conservados a 37°C. Así, Couto y cols. (2002) determinaron que cuando el semen se procesaba en un diluyente a base de agua de

coco, la motilidad espermática mantenía niveles aceptables durante 3 horas a 37°C. Del mismo modo, nuestros resultados son compatibles con los obtenidos por Rigau y cols. (2001) que desarrollaron un estudio con diluyentes similares a los nuestros, registrando una motilidad total en torno al 70% tras 1 hora de incubación a 37°C. Estos autores concluyeron que el semen canino presenta subpoblaciones de espermatozoides con una sensibilidad incrementada a la glucosa y a la fructosa; sin embargo, sus resultados no se prolongan más allá de los 60 minutos de incubación y, por tanto, no pueden ser equiparados a los nuestros más allá de este tiempo de análisis.

Cuando las alícuotas seminales eran conservadas a **temperatura ambiente**, la motilidad espermática se prolongó más en el tiempo, presentando una mayor calidad de movimiento, de forma que los porcentajes de motilidad se mantuvieron más elevados y su deterioro se demoró hasta los 4-6 días. No obstante, los valores de motilidad comprendidos entre la hora 1 y 4 fueron similares a los detectados a 37°C, por lo que consideramos que cuando se requiere de conservación seminal por un muy corto periodo de tiempo (hasta 4 horas), ambas temperaturas (37°C, 25°C) son igualmente válidas. Sin embargo, el descenso se hizo más evidente a partir de las 24 horas, momento en el que tanto las muestras individuales como el *pool* registraron un descenso por debajo del 45-55% de motilidad total y del 40% de motilidad progresiva. Por tanto, se puede afirmar que el semen expuesto a 25°C es capaz de permanecer con niveles aceptables de motilidad prácticamente el doble de tiempo que las preservadas a 37°C.

Nuestra experiencia es una de las escasos trabajos que han evaluado la viabilidad y perdurabilidad del semen en la especie canina conservado a esta temperatura (25°C). Así, Koutsarova y cols. (1997) analizó la longevidad del semen canino conservado a 25°C, pero sólo durante 24 horas. En otras especies, como el conejo (Roca y cols., 2000; López-Gatius y cols., 2005) y el garañón (Bateller y cols., 2001) se ha determinado que el almacenamiento del semen a 15°C permite preservar su fertilidad, siendo una alternativa a la refrigeración a 4°C. Por otro lado, en la especie ovina, se asume que la conservación del semen por encima de los 25°C disminuye su vida útil, puesto que a estas temperaturas no se produce una adecuada reducción del metabolismo espermático ni se detiene el crecimiento bacteriano (Celma, 2004). En relación a estas premisas en otras especies, uno de los objetivos de esta experiencia era comprobar si el semen canino era capaz de mantenerse viable gracias a la dilución del mismo con componentes a base de Tris-glucosa y yema de huevo, prescindiendo de control térmico, es decir,

manteniendo las muestras a temperatura ambiente (25°C). Nuestros resultados sugieren que el almacenamiento del semen a temperatura ambiente permite mantener unos niveles de motilidad aceptables durante 24 horas, pudiendo ser viable en estas condiciones, pero no a partir de los 2 días de preservación.

Con respecto a las muestras conservadas a **4°C**, se registraron unos porcentajes de motilidad espermática que, si bien no presentaban grandes diferencias en las primeras horas de almacenamiento con respecto a las muestras preservadas a 37°C o 25°C, se caracterizaban por perdurar activas durante mucho más tiempo, con porcentajes más elevados de motilidad, circunstancia que se hizo más evidente en *pool* que en las muestras individuales. Esta apreciación también fue observada en un trabajo realizado (Bouchard y cols., 1990) en *pool* seminal canino conservado a 4°C con diluyentes a base de leche desnatada y glucosa, donde se pudo comprobar que los parámetros de motilidad eran significativamente superiores en la muestras almacenadas a 4°C que cuando lo hacían a 35 y 22°C en la mayor parte de los tiempos evaluados (hasta 5 días).

Al analizar nuestros resultados de muestras refrigeradas, el sistema CASA definía unos valores de motilidad espermática total por encima del 50% hasta los 2 días en las alícuotas almacenadas individualmente, mientras el *pool* seminal consiguió mantener valores superiores o próximos al 50% hasta los 10 días de refrigeración. Posteriormente (tras 2 días de conservación en muestras individuales y 10 días en el *pool*) los porcentajes comenzaron a decrecer, inactivándose por completo a los 15-16 días. Estos resultados son equiparables a los obtenidos por otros autores que han evaluado la respuesta del semen canino a la preservación mediante refrigeración a 4°C. Entre ellos, un estudio de similares características al nuestro (*pool* seminal y diluyentes de similar composición), ha descrito como el semen canino presentaba niveles de motilidad superiores al 50% después de 13 días de almacenaje en tales condiciones (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c), si bien otros han obtenido porcentajes medios por encima del 80% durante los 10 primeros días de refrigeración (Verstegen y cols., 2005) o superiores al 70% de motilidad total y 50% de motilidad progresiva después de 14 días (Schahiduzzaman y cols., 2007). No obstante, otros trabajos (England y Ponzio, 1996) registraron que la motilidad del semen conservado en Tris-glucosa-yema era prácticamente inexistente a los 10 días del inicio de la conservación a 4-5°C.

Independientemente de la perdurabilidad del semen, los porcentajes registrados en nuestro *pool* durante los primeros días de conservación fueron prácticamente idénticos a los obtenidos por Rota y cols. (1995), en muestras seminales procesadas individualmente en Tris-fructosa-yema donde los valores se situaban en un 74, 70, 60 y 53% para los días 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Registros similares a los nuestros fueron obtenidos también por Ponglowhapan y Chatdarong (2004), quienes detectaron porcentajes medios de motilidad en *pool* superiores al 78% durante los 3 primeros días de conservación del semen a 5°C, próximos al 64% entre 4 y 8 días y menos del 45% pasados 10 días, independientemente del azúcar utilizado (glucosa o fructosa). Según nuestros resultados se puede deducir que, ante un mismo diluyente de conservación compuesto a base de Tris-glucosa y yema de huevo, el almacenaje a 4°C permite prolongar la motilidad de los espermatozoides durante un periodo de tiempo mayor que las otras temperaturas valoradas.

Al analizar las diferentes temperaturas de preservación (37°C, 25°C, 4°C) utilizadas, se podrían proponer diferentes tiempos de almacenaje según la temperatura utilizada. Así, se podría optar por hacer uso del semen antes de las 4-8 horas cuando es conservado a 37°C, mientras que si la conservación se realiza a temperaturas comprendidas en torno a los 25°C, el semen puede presentar una motilidad aceptable hasta las 24 horas de preservación, aproximadamente. Sin embargo, cuando el semen es conservado a 4°C, mantiene niveles aceptables de motilidad hasta 10 días. Una explicación a la menor viabilidad de las muestras conservadas a 37°C podría relacionarse con el diferente grado de actividad metabólica del espermatozoide en función de la temperatura de conservación. De esta forma, se acepta ampliamente que el espermatozoide es capaz de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar el movimiento a través del flagelo; sin embargo, este proceso se encuentra limitado en el tiempo (Pinto, 2005). En base a esta premisa, numerosos estudios han definido como un descenso del metabolismo a través de la reducción de la temperatura hacen de la refrigeración y la congelación una opción válida para la conservación del semen canino. En contraposición, se ha descrito como un incremento muy superior a 37°C en la conservación del semen de la especie canina supondría la degradación y/o alteración de los espermatozoides, de forma que temperaturas por encima de los 39°C provocan una extenuación rápida de los espermatozoides como consecuencia de su elevado metabolismo (Allen, 1992; England, 1996; Kutzler, 2005). En nuestro caso, el rápido descenso de la motilidad espermática en las alícuotas conservadas a 37°C con respecto a las demás muestras (25°C y 4°C), nos permite postular que

la generación de unos más elevados niveles metabólicos en los espermatozoides, a través de una temperatura más elevada que el resto de medios, pudo producir un agotamiento más rápido de los mismos y, por tanto, una inactivación del semen más temprana.

Por otro lado, los resultados de esta experiencia parecen evidenciar que cuando la conservación del semen se realiza en forma de *pool*, su vida media se incrementaba, sobre todo a temperaturas de 4°C. La refrigeración del semen canino a temperaturas de 5°C no produce modificaciones físicas ni funcionales en los espermatozoides cuando se almacenan durante 24 horas (Kumi-Diaka y Badtrama, 1994). No obstante, se asume que cuando el tiempo de refrigeración se prolonga, siempre ocasiona un detrimento en el porcentaje de motilidad total de los espermatozoides comparado con el semen fresco; algunos autores han explicado este efecto debido a la existencia de subpoblaciones de espermatozoides caninos con diferente sensibilidad a los cambios del entorno, especialmente a la temperatura (Ponglowhapan y Chatdarong, 2004). Basándonos en esta idea, se podría especular que posiblemente estas subpoblaciones de espermatozoides no se presenten de forma homogénea para todos los individuos y, por tanto, al igual que la variabilidad que existe entre individuos ante el proceso de congelación-descongelación seminal (Fahrig, 2000; Petrunkina y cols., 2004; Eilts, 2005), las muestras seminales de los distintos perros no son igual de resistentes a la refrigeración. Esto explicaría las diferencias entre los porcentajes medios de motilidad individual, frente al *pool* que presentaba mayores valores. No obstante, esta capacidad de las muestras del *pool* conservadas a 4°C para mantener unos mayores niveles de motilidad puede obedecer a algún proceso que acontezca en el semen como resultado de la mezcla de los mismos; de esta forma, podríamos plantear la existencia de un fenómeno de mejora de las propiedades seminales como respuesta a la combinación de semen procedente de diferentes individuos, haciendo que el *pool* resultante adquiriera una mayor viabilidad y resistencia al procesado y al estrés térmico.

Con respecto a las muestras de semen **congeladas-descongeladas** y posteriormente conservadas a 37°C, fueron las que obtuvieron un menor porcentaje de motilidad, así como una menor viabilidad a lo largo del tiempo. En general, sólo una hora tras la descongelación e incubación, los porcentajes de motilidad espermática (tanto en muestras individuales como en el *pool*) eran considerablemente inferiores al resto de protocolos. Esta evolución continuó con el paso del tiempo, con valores inferiores al 12% de motilidad progresiva a las 4 horas post-descongelación, y una completa inactivación por encima de 8 horas de conservación. Aunque la

calidad seminal post-descongelación se determina de manera habitual en numerosos estudios realizados en la especie canina (Silva y cols. 1996; Hay y cols., 1997; Ström y cols., 1997; Peña y cols., 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Álamo y cols., 2005), no son muchos los trabajos que valoran la evolución que los parámetros seminales siguen a lo largo del tiempo ni, por tanto, la longevidad del semen canino tras la descongelación. Entre estos trabajos, se describe que con independencia de la motilidad espermática inmediatamente tras descongelación (25%, Peña y cols., 1998a; 44%, Rota y cols., 2007; 60%, Peña y cols., 1998b), todas mostraban una disminución muy importante a lo largo del transcurso del tiempo. Por tanto, lo que parece evidente es que la congelación, descongelación y posterior incubación (a 37°C) del semen canino, no se presenta como una alternativa efectiva para la preservación seminal del mismo antes de su uso, debiéndose aplicar inmediatamente tras la descongelación.

5.2.3. Morfoanomalías y acrosomías del semen conservado en diferentes temperaturas de preservación

El porcentaje de anomalías morfológicas (alícuotas individuales y *pool*) no mostró diferencias entre las muestras que se preservaron a temperatura ambiente, las conservadas a 4°C y las congeladas-descongeladas; en ellas, los valores de espermatozoides con morfología normal siempre fueron superiores al 85%. Dado que los estudios realizados sobre el semen procesado y almacenado a temperatura ambiente son muy escasos, nuestro estudio es uno de los primeros en describir los porcentajes de espermatozoides anormales tras la preservación del semen canino en estas condiciones. Por otro lado, los resultados en el semen preservado a 4°C son equiparables a los descritos por diferentes autores; de esta forma, Pinto y cols. (1999) obtienen valores entre el 80 y el 85% de espermatozoides normales en semen refrigerado 24 y 48 horas, respectivamente. Asimismo, Rijsselaere y cols. (2002) establecieron que la conservación del semen a 4°C durante 3 días no tenía influencia sobre la aparición de formas anormales, con valores en torno al 85%. Con respecto a las muestras congeladas-descongeladas, nuestros registros fueron similares a los detectados en la experiencia 1 y a los descritos por otros autores quienes sitúan los valores de morfoanomalías entre un 10% y un 25% (Silva y cols., 1996; Álamo y cols., 2005).

Por otro lado, los registros de morfoanomalías en las alícuotas preservadas a 37°C fueron incrementándose conforme transcurría el tiempo de preservación, de forma que tras 24 horas de incubación, los porcentajes observados (30%) eran significativamente superiores que el resto de registros previos. Estos mayores porcentajes de formas anormales correspondían básicamente a un incremento en los valores de colas anormales conforme transcurría el tiempo, mientras las morfoanomalías de cabeza y pieza intermedia se mantuvieron estables (siempre inferior al 5%) a lo largo del tiempo. Al analizar los resultados, se puede observar como las alícuotas conservadas a 37°C que presentaron un mayor porcentaje de formas anormales eran las mismas que mostraban un menor porcentaje de motilidad. Además, esta reducción en el movimiento espermático fue más evidente a partir de las 8 horas de conservación, momento en el que el porcentaje de colas anormales y, por tanto, de morfoanomalías generales, se detectó notablemente incrementado, sobre todo en el *pool*. Posteriormente, transcurridas 24 horas de conservación, se alcanzaron los máximos registros de espermatozoides con morfología anómala, coincidiendo con la completa inactividad del semen evaluado. Por el contrario, en el resto de temperaturas de preservación (temperatura ambiente y 4°C), el porcentaje de morfoanomalías se mantuvo estable, con un descenso más gradual de la motilidad.

Estas observaciones parecen indicar que existe una clara relación entre la capacidad de movimiento de los espermatozoides y su morfología. Está ampliamente aceptado que tanto el agotamiento metabólico de los espermatozoides como una morfología inadecuada producen una insuficiente capacidad de movimiento o inmovilidad completa (Root, 2005a). Nuestros resultados revelan una clara relación entre un incremento de colas anómalas en los espermatozoides almacenados a 37°C y un descenso más rápido de la motilidad a lo largo del tiempo. En cualquier caso, los resultados de nuestra experiencia parecen indicar que las muestras sometidas a 37°C sufren una disminución de la motilidad asociada y/o consecuente con un alto porcentaje de espermatozoides con colas anormales, mientras que cuando el semen es conservado a menor temperatura (25°C, 4°C) el descenso más progresivo parece corresponder más a un agotamiento metabólico que a la aparición de formas anormales.

Con respecto a los porcentajes de acrosomas anómalos, a diferencia de las formas anormales, se caracterizaron por presentar valores relativamente uniformes en todas las muestras, sin variaciones consecuentes a cambios en las condiciones de conservación o al tiempo transcurrido. En todo caso, nuestros porcentajes de espermatozoides con acrosomas

normales se mostraron superiores a los detectados por otros autores. Rota y cols. (2007) observaron unos registros de acrosomías en torno al 30% en el semen descongelado y del 17% cuando el semen se preservó a 38°C durante 2 horas. Asimismo, otro trabajo realizado para evaluar la influencia de distintas concentraciones de glicerol sobre la calidad seminal, confirmó que el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos en el semen descongelado e incubado a 39°C (hasta 4 horas tras su descongelación) era siempre inferior al 70% (Peña y cols., 1998a).

Por otro lado, nuestros registros para el semen preservado a 4°C (8-11%) fueron muy similares a los referidos por Rijsselaere y cols. (2002), que tras 3 días en almacenamiento del semen a 4°C, situaban los porcentajes de acrosomas intactos alrededor del 90-95%. Asimismo, Shahiduzzaman y Linde-Forsberg, (2007) partiendo de un semen con un 76% de acrosomas normales en *pool* fresco, obtuvo un porcentaje del 65% en semen diluido y refrigerado de la misma forma y, posteriormente conservado a 5°C entre 1 y 8 días. Sin embargo, en otro estudio donde se valoró el porcentaje de acrosomas anormales en muestras refrigeradas durante 4 días, se presentaba valores entre el 15 y el 25% (Rota y cols., 1995), registros que prácticamente duplicaban a los observados en nuestro estudio.

En cualquier caso, lo que sí parece evidente es que la temperatura de preservación de las muestras seminales, tiene más influencia sobre el desarrollo de anomalías morfológicas más que sobre la aparición de alteraciones en el acrosoma. Esta circunstancia fue particularmente más evidente en aquellas muestras incubadas a 37°C.

5.3. EXPERIMENTO 3: VIABILIDAD DEL SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO CONSERVADO A DIFERENTES TEMPERATURAS TRAS SU DESCONGELACIÓN

Se han realizado numerosos trabajos sobre la criopreservación seminal en perros donde se prueban diferentes procedimientos con el objeto estandarizar y perfeccionar la técnica de la congelación (Martins-Bessa y cols., 2006; Peña y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006; Milani y cols., 2010). Sin embargo, este procedimiento continúa presentando ciertas limitaciones, básicamente relacionadas con el acentuado descenso en la calidad del semen descongelado que se traduce en unos índices de fertilidad inferiores a los obtenidos con el semen fresco o

refrigerado (Fontbonne y Badinand, 1993; Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg, 1999). Esta reducción depende de diversos factores como son la optimización de la dilución, el procesado seminal, el ratio de descenso de la temperatura, el tiempo de equilibrado, las temperaturas de congelación, pero también de la descongelación y la manipulación del semen post-descongelación (Farstad, 1996, Peña y cols., 2006). Si bien la influencia de muchos de estos factores ha sido ampliamente estudiados (Silva y cols., 2003; Okano y cols., 2004; Hori y cols., 2006; Oliveira y cols., 2006; Nöthling y cols., 2007; Farstad, 2009), pocos estudios (Hay y cols., 1997; Silva y cols., 2003; Oliveira y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols., 2006) han analizado la evolución de los parámetros seminales de muestras congeladas-descongeladas e incubadas a diferentes temperaturas posteriormente. Siguiendo esta línea de trabajo, nuestra experiencia pretendía definir el efecto que tenía conservar el semen descongelado a diferentes temperaturas y la capacidad de mantener sus propiedades, con el fin de determinar la mejor opción para preservar las cualidades del semen canino tras los procesos de criopreservación.

Los resultados de esta experiencia evidencian un porcentaje de **motilidad espermática** a la descongelación próximo al 65-70% de motilidad total y al 50% de progresiva. Estos valores son muy similares a los obtenidos en la experiencia 1 de este trabajo, donde los registros de motilidad espermática total de las muestras seminales congeladas en nitrógeno líquido se situaban entre un 60% y un 70% a la descongelación. Además, se encuentran dentro de los valores de motilidad detectados por numerosos autores en trabajos sobre criopreservación seminal (Silva y cols. 1996; Hay y cols., 1997; Ström y cols., 1997; Yildiz y cols, 2000; Peña y cols., 2000a, b; Oliveira y cols., 2006).

En este ensayo, cuando se realizaron las evaluaciones de las muestras de semen preservadas en las diferentes temperaturas (37°, 25°C, 15°C y 4°C) post-descongelación, se pudo observar como los porcentajes de motilidad espermática disminuyeron de forma muy significativa tras 1 hora de preservación, con valores en torno al 30-40% en aquellas muestras conservadas a 37°C, 15°C y 4°C. A partir de las 2 horas de preservación, los porcentajes de motilidad total comenzaron a igualarse entre las diferentes temperaturas de conservación, de forma que a las 4 y 6 horas la motilidad era inferior al 10-30% en todos los ambientes de almacenamiento, si bien los porcentajes detectados en las muestras a 37°C eran menores al resto. Este patrón de comportamiento también fue evidente en el estudio de la motilidad progresiva donde, tras 1 hora post-descongelación, los valores oscilaban entre un 10 y 20% de

motilidad progresiva en las muestras conservadas a 37°C, 15°C y 4°C, mientras las muestras incubadas a temperatura ambiente se mantuvieron en torno al 25%; a partir de este momento, la motilidad progresiva continuo descendiendo en todas las temperaturas de conservación, si bien se constató que las alícuotas de semen expuesto a 37°C y TA sufrían un decrecimiento más marcado que las conservadas a menor temperatura (15°C y 4°C).

Este descenso en los porcentajes de motilidad del semen transcurrida una hora tras su descongelación fue también observada por England y Ponzio, (1996), quienes describieron una reducción de la motilidad espermática en muestras de semen canino preservadas a 37°C tras descongelarse. Otros autores, como Silva y cols. (2003) registraron valores en torno al 15% tras una hora de incubación del semen descongelado a 37°C, mientras que Milani y cols. (2010) detectó un porcentaje próximo al 14% en muestras descongeladas e incubadas en Tris durante 60 minutos. En nuestro estudio, las alícuotas almacenadas con esas condiciones y valoradas mediante sistema CASA presentaban motilidades cercanas al 38%. Este sistema informatizado también permitió determinar que los porcentajes de motilidad progresiva en condiciones de preservación a 37°C tras una hora (15% aproximadamente), eran algo superiores a los descritos en otros trabajos con muestras seminales caninas procesadas con diluyentes de similar composición y almacenadas a baño María tras 37°C, donde se registraban unos porcentajes de motilidad inferiores al 10%, después de 60 minutos de incubación (Oliveira y cols., 2006; Rota y cols., 2007).

Posteriormente, transcurridas 2 horas de incubación en baño María a 37°C, nuestros resultados de motilidad espermática total (27.8%) fueron comparables a los observados (Rota y cols., 2007) en semen canino descongelado y preservado en buffer Tris a 38°C, donde se pudo registrar valores del 22% de motilidad subjetiva. Asimismo, este parámetro se comportó de igual forma en el trabajo realizado por Peña y cols. (1998) que estimaron unos porcentajes de motilidad espermática del 33% a los 60 minutos de incubación a 39°C. No obstante, otros investigadores (Peña y cols., 2003) han realizado valoraciones más prolongadas en el tiempo, describiendo que la motilidad espermática total se puede mantener por encima del 50% después de su descongelación e incubación a 38°C durante 5 horas cuando se utiliza Equex STM Paste en el procesado seminal.

Con respecto a las muestras seminales conservadas a 25°C tras la descongelación, Hori y cols. (2006) establecieron porcentajes de motilidad espermática próximos al 20%, 18%, 15% y 10%, para las alícuotas seminales descongeladas y preservadas a esa temperatura durante 1, 2, 4 y 6 horas, respectivamente; en nuestro estudio, la motilidad progresiva presentaba una evolución comparable en las muestras conservadas a 25°C, con valores de 26.1%, 17.3%, 8.9% y 2.4%, para los mismos periodos evaluados (1, 2, 4 y 6 horas post-descongelación). En otro estudio (Peña y cols., 1998a) donde las dosis seminales descongeladas se incubaban a 22°C a lo largo del tiempo, se detectaron valores ligeramente inferiores, con registros de motilidad espermática en torno a un 15% a los 60 minutos de conservación a esa temperatura, para pasar a valores inferiores a un 10% tras 2 horas, alcanzando niveles inferiores al 5% tras 4-6 horas de incubación.

Por otro lado, si bien no existen referencias al respecto, el hecho de que las muestras descongeladas y conservadas a temperatura ambiente (entre 25°C) presentasen unos porcentajes de motilidad espermática aparentemente mejores que las muestras preservadas a mayor (a 37°C) o menor (15°C y 4°C) temperatura, podría explicarse en base a la calidad del semen de partida, la congelabilidad del mismo y su capacidad para soportar cambios de temperatura posteriores a la descongelación. En general, se asumen como premisas básicas en relación al semen canino la alta sensibilidad que éste presenta ante los cambios de temperatura y el descenso de la viabilidad seminal como consecuencia de la congelación del mismo. Basándonos en ambas ideas, se podría deducir que el semen canino congelado-descongelado puede encontrarse más sensibilizado a los cambios de temperatura que se produzcan en el medio, no siendo capaz de mantener sus cualidades (motilidad espermática) cuando el semen se preserva en calor (37°C) o en frío (15°C y 4°C), en comparación con las muestras conservadas a temperatura ambiente. Si a esto añadimos un mayor agotamiento por parte de los espermatozoides incubados a 37°C como consecuencia del gasto metabólico que supone la preservación a estas temperaturas, se entendería aún más que los porcentajes de motilidad espermática en las muestras preservadas a 37°C fuesen peores que los almacenados a temperatura ambiente.

Los porcentajes de **espermatozoides con morfología y acrosomas anormales** registrados en el semen descongelado y conservado a diferentes temperaturas fueron bastantes homogéneos. En general, el porcentaje medio de espermatozoides normales (> 85%) en el semen en fresco apenas se modificó en las muestras congeladas-descongeladas y preservadas durante 1 hora a las distintas temperaturas. Asimismo, el porcentaje medio de acrosomas alterados después de la crioconservación y conservación en las condiciones estudiadas nunca superó el 10%. Estos porcentajes registrados inmediatamente tras la descongelación son muy similares a los detectados por Oliveira y cols. (2006), en muestras descongeladas y preservadas a 37°C, donde el porcentaje de espermatozoides con morfología normal oscilaba entre un 85-88%. No obstante, en otro estudio (Silva y cols., 2003) los valores obtenidos fueron algo superiores, estableciendo porcentajes de formas anormales del 24-25%

Con respecto a los registros de acrosomas anómalos, algunos autores han establecido el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales en el momento de la descongelación en valores que se sitúan entre un 30%-40% tras incubarlo entre 1 y 2 horas a 38-39°C (Peña y cols., 1998a; Rota y cols., 2007). Además, en otra experiencia enfocada a determinar el efecto del glicerol sobre la integridad del acrosoma se describió registros más cercanos a los nuestros, con valores de espermatozoides con acrosoma normal cercanos al 60% cuando éstos eran incubados a 39°C durante 1 hora (Peña y cols., 1998a). En cualquier caso, estos registros medios se encuentran por debajo de los detectados en nuestra experiencia con valores siempre fueron superiores al 90% de espermatozoides con acrosomas inalterados. Esto puede deberse a la calidad del semen de partida; así, en nuestro estudio, el porcentaje de acrosomas normales siempre se situó por encima del 95% en el semen fresco, mientras que en otros estudios se partía de eyaculados que en algunos casos se encontraban constituidos por un 70-75% de espermatozoides con acrosomas intactos (Peña y cols., 1998a; Rota y cols., 2007).

Finalmente, la falta de trabajos que evalúen la perdurabilidad del semen congelado-descongelado conservado a temperaturas diferentes a 37-39°C, no hace posible la obtención de valores sobre los porcentajes de espermatozoides con forma anormales y/o acrosomas alterados que puedan ser útiles a la hora de analizar los valores registrados en el presente estudio.

5.4. EXPERIMENTO 4: INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN PREVIO A LA CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN

En diferentes experiencias de este estudio se han planteado las ventajas e inconvenientes que presenta la congelación seminal como herramienta en la reproducción canina. Este método de conservación seminal se hace imprescindible cuando se trata de preservar el semen durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, en determinadas áreas geográficas, el envío de muestras seminales congeladas plantea ciertas restricciones consecuentes a las políticas aéreas. Este es el caso de nuestra área geográfica, Canarias, donde, en numerosas ocasiones, el transporte de semen congelado hacia el exterior se transforma en una ardua tarea que limita las posibilidades que este método nos ofrece. Por el contrario, este tipo de complicaciones no resulta tan evidente cuando el semen es procesado y enviado mediante refrigeración, convirtiéndose este protocolo de preservación seminal en el método idóneo para el envío de muestras seminales desde Canarias, si bien su periodo de supervivencia es más limitado. En este sentido, si bien existen numerosos ensayos sobre la preservación del semen canino mediante refrigeración y congelación por separado, prácticamente no se han realizado trabajos que combinen ambos métodos con el fin de preservar el semen. La presente experiencia ha pretendido analizar la viabilidad del semen canino congelado tras ser refrigerado durante distintos periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas).

La calidad del semen en fresco presentaba un volumen medio entre los 3.5 y 6.9 ml, una concentración espermática que oscilaba entre $100-300 \times 10^6$ espermatozoides, unos valores de motilidad espermática por encima del 90% en el *pool* de eyaculados, mientras los porcentajes de espermatozoides con morfología y acrosoma normales, se encontraban por encima del 80% y el 95%, respectivamente. Estos valores son comparables a los descritos por otros autores en la especie canina (Peña, 1997; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a; Johnston y cols., 2001; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Martins-Bessa y cols., 2006) y a los hallados en el resto de ensayos realizados en este estudio cuando se utilizaban diversas razas de perros.

Con respecto a la **motilidad espermática** de las muestras congeladas-descongeladas tras los diferentes tiempos de refrigeración, se pudo observar que la motilidad del semen previa congelación siempre era significativamente superior a las muestras criopreservadas. Este comportamiento fue similar tanto en las dosis seminales del grupo control (procesadas mediante

los métodos de crioconservación habituales) como en los grupos experimentales (procesadas con diluyentes de refrigeración antes del inicio de la fase de congelación), donde los porcentajes de motilidad se redujeron con respecto a los valores pre-congelación. Un comportamiento similar en la motilidad fue observado por Hermansson y Linde-Forsberg, (2006) en uno de los escasos estudios que se ha realizado tras refrigerar y congelar el semen canino, donde el semen descongelado presentaba valores de motilidad inferiores al *pool* inicial utilizado e, incluso, al semen refrigerado previa congelación.

En nuestro estudio se detectó que las muestras refrigeradas 1 y 6 horas antes de la congelación no evidenciaban diferencias en relación a las alícuotas seminales procesadas con el método de congelación clásico, e incluso los valores de motilidad progresiva parecían ser mejores que los controles, con porcentajes superiores al 50%. Estos resultados son equiparables a los obtenidos por otros autores que utilizaban los protocolos habituales de congelación seminal directa (sin refrigeración previa), donde los porcentajes de espermatozoides móviles tras la descongelación se encontraban entre el 45 y el 70% (England y Ponzio, 1996; Silva y cols. 1996; Hay y cols., 1997; Ström y cols., 1997; Yildiz y cols, 2000). Por tanto, los resultados de motilidad espermática sugieren que la congelación del semen, tras conservarse a 4°C con diluyente de refrigeración hasta 6 horas, se considera una alternativa totalmente viable con respecto al método clásico de congelación habitualmente utilizado.

La motilidad progresiva en las muestras refrigeradas durante 12, 24 y 48 horas previa congelación presentaban porcentajes de motilidad algo inferiores a las muestras procesadas tras permanecer refrigeradas durante 1 o 6 horas. No obstante, los porcentajes de motilidad del semen descongelado tras refrigerarse 12, 24 y 48 horas antes de la congelación, eran muy parecidos a los del grupo control y, por tanto, dentro de los considerados normales para el semen congelado de forma tradicional (Ström y cols., 1997; Yildiz y cols, 2000). Se podría asumir, por tanto, que el procesado del semen en estos tiempos de refrigeración, previa congelación, pueden considerarse igualmente efectivo que la congelación directa del semen. Además, estos resultados de motilidad son totalmente compatibles con los descritos en un estudio (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006) de similares características a nuestro estudio, cuyos resultados indicaron que los espermatozoides de perro pueden ser congelados de forma efectiva después de 1-2 días de refrigeración a 4°C.

El descenso en los porcentajes de motilidad cuando se prolongaba el tiempo de refrigeración, podría explicarse como resultado de un descenso en la capacidad del semen para resistir los procesos de criopreservación conforme se prolonga el tiempo de refrigeración a 4°C. Si bien no existen documentos que referencien de forma específica esta posible relación, son diversos los autores (Verstegen y cols., 2005; Schahiduzzaman y cols., 2007) que han descrito como el semen canino se caracteriza por presentar una elevada estabilidad frente a los procesos de refrigeración, de forma que los niveles de motilidad espermática pueden mantenerse elevados (entre 50-80%) durante un largo periodo de tiempo. Por el contrario, como se ha citado en experiencias anteriores, también se encuentra ampliamente aceptado que los procesos de congelación seminal producen inevitablemente una degradación de los espermatozoides que queda manifiesta a través de una notable disminución en la capacidad de movimiento (Farstad, 1996; Fahrig, 2000; Peña y cols., 2006). En nuestra experiencia, partimos de un semen procedente de los mismos ejemplares y procesado mediante réplicas de un protocolo de refrigeración y congelación idéntico. Por tanto, todas las variantes ocasionadas en los parámetros seminales estudiados no responderían a los procesos de refrigeración y/o congelación seminal por sí sólo, sino que deben ser ocasionadas por la interacción entre ambos.

Por otro lado, nuestra experiencia detectó unos similares porcentajes de **anomalías morfológicas** en las distintas regiones del espermatozoide en todos los protocolos evaluados, no detectándose diferencias en el grupo control con respecto a las muestras congeladas tras diferentes periodos de refrigeración. En todos los grupos analizados, la cantidad de espermatozoides con morfología normal siempre fue superior al 80%, y la mayor parte de las anomalías correspondían a la región de la cola espermática (porcentajes medios entre 12-14%). Nuestros resultados fueron semejantes a los descritos en otras experiencias que registran valores entre un 10% y un 25% de morfoanomalías en el semen congelado-descongelado (Silva y cols., 1996; Álamo y cols., 2005). Esta ausencia de diferencias en los porcentajes de formas anormales, independientemente de los tiempos de refrigeración entre ellos y con respecto a las muestras controles, resulta totalmente compatible con el análisis de la motilidad espermática, evidenciándose nuevamente como la refrigeración seminal previa congelación seminal no produce daños adicionales en la morfología de los espermatozoides. Por tanto, en este aspecto, congelación directa y/o refrigeración inicial hasta 48 horas podrían considerarse procedimientos igualmente válidos.

Un patrón muy similar al encontrado para las morfoanomalías quedó reflejado en la distribución y aparición de **acrosomas anómalos**, que se caracterizaron por presentar valores muy homogéneos en todos los grupos valorados, con porcentajes que siempre se mantuvieron entre un 6% y un 10%. Estos registros coinciden con los hallados por otros trabajos que registran valores entre un 3-12% de acrosomas anormales en espermatozoides descongelados (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006; Álamo, 2007). Por el contrario, Hermansson y Linde-Forsberg, (2006) describieron como los valores de los mismos se iban incrementando progresivamente conforme transcurría el tiempo de refrigeración previo a la congelación. Estos autores obtuvieron registros de acrosomas normales (79.6%) que se situaban próximos a los nuestros cuando el semen descongelado había sido refrigerado durante día, mientras que cuando la refrigeración se prolongaba a dos días, los porcentajes de acrosomías se incrementaban hasta un 38%. En nuestro estudio, la aparición de un reducido número de acrosomas anómalos con respecto a los encontrados por Hermansson y Linde-Forsberg, (2006) puede deberse a las particulares del semen inicialmente utilizado. Así, a diferencia de este autor quién hizo uso de un *pool* de semen con porcentajes de acrosomas normales en torno al 85-90% previa congelación, nuestro *pool* seminal de partida se caracterizaba por presentar un menor número de acrosomías (< 4%). Finalmente, otro aspecto a considerar es el número de animales utilizados; en nuestro estudio, se usaron 6 animales y un total de 18 eyaculados, mientras que Hermansson y Linde-Forsberg, (2006) utilizaron sólo 4 animales y un máximo de 10 eyaculados.

En resumen, los resultados de esta experiencia ponen de manifiesto que la refrigeración seminal (hasta 48 horas) previa congelación no genera una degradación de la calidad seminal con respecto al método de congelación tradicional. En este sentido, nuestros resultados revelan dos aspectos fundamentales sobre esta opción de preservación del semen canino. En primer lugar, la refrigeración del semen canino durante un periodo de 6 horas parece ser mejor opción que la congelación seminal directa. En segundo lugar, se confirma la posibilidad de congelar el semen tras 12, 24 y 48 horas de refrigeración sin que esto suponga un detrimento de la calidad con respecto al semen congelado desde el primer momento. En conclusión, consideramos que, en la especie canina, la congelación del semen refrigerado hasta 2 días es una alternativa completamente viable, ampliando por tanto las posibilidades de envío del semen en esta especie. Además, basándonos en esta premisa, se podría plantear la opción de, una vez recibido el semen en el laboratorio o clínica de destino, utilizar parte del semen refrigerado remitido para llevar a cabo la inseminación artificial de las hembras (si fuese el caso), mientras la dosis restantes podrían congelarse para un uso futuro.

5.5. EXPERIMENTO 5: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN TRAS SOMETERSE A DISTINTOS TIEMPOS DE EQUILIBRADO Y DE VAPORES DE NITRÓGENO LÍQUIDO

La congelación seminal en la especie canina es un proceso que se encuentra muy estandarizado, existiendo numerosos estudios que han analizado diferentes aspectos relacionados con los procesos de criopreservación con el objeto de perfeccionar la técnica (Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Silva y cols., 2003; Nöthling y Shuttleworth, 2005; Schäfer-Somi y cols., 2006; Silva y cols., 2006; Nöthling y cols., 2007). En nuestro equipo, el sistema utilizado para la congelación seminal ha sido habitualmente uno de los protocolos tradicionales, basado en someter al semen a una fase de equilibrado a 4°C durante un periodo de tiempo de 60 minutos y posteriormente, disponer el semen a 15 minutos de vapores de nitrógeno líquido, antes de sumergirla en nitrógeno líquido (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006). No obstante, existen diversas variantes de este protocolo, siendo los aspectos relacionados con el equilibrado y los vapores de nitrógeno, los más modificados (Peña y Linde-Forsberg, 2000b; Okano y cols., 2004; Nöthling y Shuttleworth, 2005; Hori y cols., 2006). Por esta razón, en la presente experiencia se ha pretendido evaluar la influencia que la utilización de diferentes tiempos de equilibrado (30, 60, 90 y 120 minutos) y de exposición a vapores de nitrógeno líquido (5, 10 y 15 minutos) pueden tener sobre la calidad del semen criopreservado, teniendo por objeto determinar si existen diferencias importantes entre protocolos, así como establecer cuál de ellos puede considerarse más práctico y efectivo.

La calidad del **semen en fresco**, tanto a nivel individual como en el *pool* final, presentaba valores dentro de los rangos registrados en la especie canina (Silva y Verstegen, 1995; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, Álamo y cols. 2005; Verstegen y cols., 2005; Schäfer-Somi y cols., 2006). Se debe destacar que la motilidad progresiva fue siempre superior al 80% y el porcentaje de acrosomías nunca superaba el 5% en ninguno de los perros utilizados, mientras los porcentajes de formas anormales seguían una distribución algo menos uniforme en función del ejemplar, estableciendo valores en el *pool* seminal próximos al 12%

En la presente experiencia, los resultados sobre la **motilidad espermática** muestran diversas tendencias. De esta forma, puede observarse como las muestras equilibradas durante los periodos de tiempos intermedios (60 y 90 minutos), no mostraban diferencias en los parámetros de motilidad total cuando se modificaban los tiempos de vapores de nitrógeno, con

valores muy uniformes (56.2-66.4%) en todos los grupos valorados. Sin embargo, cuando las alícuotas fueron equilibradas durante 30 y 120 minutos previa congelación, los porcentajes de motilidades variaban en función del tiempo en exposición a VNL de manera que los mejores porcentajes siempre se obtenían cuando las muestras eran expuestas a 5 o 15 minutos de vapores. Con respecto a los porcentajes de motilidad progresiva, este parámetro mostró un comportamiento prácticamente idéntico al observado para la motilidad total, obteniendo los máximos registros (en torno al 55%) cuando las pajuelas fueron equilibradas durante 90 minutos y se sometían posteriormente a VNL durante 5 o 15 minutos, mientras aquellas muestras equilibradas por periodos de 30 o 120 minutos reflejaron modificaciones ante los diferentes tiempos de VNL.

En general, los porcentajes de espermatozoides móviles tras la descongelación, independientemente de las combinaciones realizadas en cuanto a tiempos de equilibrado y VNL, siempre se encontraron dentro de los valores considerados como normales (40-60%) para el semen descongelado por numerosos autores (Thomas y cols., 1993; Rota y cols., 1999; Silva y Verstegen, 1995; Hay y cols., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b). Asimismo, en el estudio realizado por Okano y cols. (2004), el semen era sometido a diferentes tiempos de equilibrado (entre 0 y 26 horas) antes de exponerlo a vapores de nitrógeno líquido (durante 15 minutos), describiendo como los porcentajes de motilidad post-descongelación se mantenían durante todo el periodo evaluado por encima del 55%. Concretamente, en las muestras equilibradas durante 1 o 2 horas, estos autores (Okano y cols., 2004) obtuvieron unos resultados de motilidad espermática en torno al 60%, siendo prácticamente idénticos a los registrados en nuestro estudio con muestras equilibradas durante 1 y 2 horas (58% y 63.9%, respectivamente) y posteriormente expuestas a VNL. En otro estudio (Hori y cols., 2006), se evaluó la calidad seminal post-congelación de muestras seminales expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 5, 10 y 15 minutos; los resultados de motilidad espermática (al igual que en nuestra experiencia) no mostraron diferencias entre muestras equilibradas durante 1 hora y expuestas posteriormente a vapores por periodos de 5, 10 o 15 minutos.

En conjunto, los resultados de motilidad espermática permiten asumir que, en aquellas muestras equilibradas entre 60 y 90 minutos, el tiempo de exposición del semen a los vapores de nitrógeno líquido no parece tener efecto sobre la capacidad de movimiento de los espermatozoides. Por el contrario, cuando el periodo de equilibrado se sitúa fuera de ese rango

(se reduce a 30 minutos o se prolonga hasta las 2 horas), es posible que existan ciertas variaciones en las características del semen, modificándose la capacidad de los espermatozoides para soportar la posterior exposición a los vapores de nitrógeno líquido. En cualquier caso, los resultados de motilidad espermática permiten establecer algunas combinaciones de tiempo de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido como más efectivas que otras. Por esta razón, con el objeto de minimizar el tiempo de trabajo durante la congelación seminal y, basándonos en los resultados de motilidad espermática obtenidos, podemos deducir que el protocolo viable más rápido sería el equilibrado del semen a 4°C durante 30 minutos y, posteriormente, 15 minutos de vapores de NL, con unos resultados del 69% y 57% de motilidad espermática total y progresiva, respectivamente.

Con respecto a la aparición de espermatozoides con **formas anormales** en las muestras de semen congelado-descongelado, nuestros resultados evidenciaron una estabilidad por parte de determinadas regiones del espermatozoide como la cabeza y la pieza intermedia, con porcentajes siempre inferiores al 7%. Por el contrario, se observó como el porcentaje de colas anómalas presentaba un importante incremento, existiendo además variaciones en relación a la forma de procesar las alícuotas en distintas condiciones. Esta tendencia también fue detectada por Hori y cols. (2006) que también comprobaron un mayor porcentaje de colas anormales en el semen expuesto a vapores de nitrógeno líquido por periodos de 5, 10 y 15 minutos, con respecto a los porcentajes de morfoanomalías a nivel de cabezas y piezas intermedias.

Las muestras equilibradas durante 30 y 120 minutos y posteriormente sometidas a 10 minutos de vapores de nitrógeno, fueron las que mayores porcentajes de colas anómalas presentaban, con registros que rondaban el 40-45%. Estos resultados son totalmente compatibles con los obtenidos sobre la motilidad espermática ya que, son precisamente las dosis seminales preservadas a 4°C por un intervalo de 30 y 120 minutos y expuestas a vapores durante 10 minutos, las que peores porcentajes de motilidad espermática presentaban con respecto al resto. Asimismo, los resultados para el resto de alícuotas (equilibradas durante 60 o 90 minutos) siempre se situaron entre el 25-30% de colas alteradas, con independencia del tiempo de exposición a vapores de NL. Por tanto, podemos especular que tiempos de equilibrado de 60-90 minutos producen en el semen una mayor estabilidad ante los cambios en el momento de la criopreservación; esta hipótesis podría sustentarse en la marcada uniformidad en los

porcentajes de motilidad espermática y de morfoanomalías en las muestras equilibradas durante 60 y 90 minutos, independientemente del tiempo al que sean sometidas a vapores de nitrógeno durante la posterior congelación.

Al analizar el porcentaje total de morfoanomalías, se constata que los mejores resultados se obtienen cuando el semen era equilibrado 60 y 90 minutos, con valores de espermatozoides normales que oscilaban entre un 65% y un 70% aproximadamente. Asimismo, nuestros valores de morfoanomalías fueron ligeramente superiores a los descritos por otros autores (England y Ponzio, 1996; Silva y cols., 1996; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006) que tras congelar semen por el procedimiento habitual (60 minutos de equilibrado, 15 minutos en vapores de nitrógeno líquido), obtienen valores de morfoanomalías entre el 10 y el 30%.

En el semen fresco, la aparición de anomalías morfológicas en los espermatozoides puede obedecer a numerosas circunstancias: infecciones en el tracto reproductivo, grado de actividad sexual, incremento de la temperatura corporal, alteraciones iatrogénicas, etc (Kawakami y cols., 1998; Johnston y cols. 2001; Peña, 2004). Sin embargo, la aparición de morfoanomalías como resultado de los procesos de congelación-descongelación es un aspecto que se encuentra en debate, no existiendo teorías claramente establecidas sobre la misma. Los resultados de nuestro estudio permiten vislumbrar una cierta influencia del procesado seminal sobre la morfología espermática (sobre todo a nivel de la cola). De hecho, mientras que Hori y cols. (2006) definieron un bajo porcentaje de formas anormales cuando el semen era expuesto a diferentes tiempos de vapores de nitrógeno líquido (5, 10 y 15 minutos) pero el tiempo de equilibrado siempre era el mismo (1 hora), Okano y cols. (2004) obtuvieron valores que se situaban entre un 45 y 50% de morfoanomalías cuando modificaban los tiempos de equilibrado para un sistema de congelación concreto. Por tanto, podemos deducir que el equilibrado (y el manejo del semen asociado al mismo), es la fase que determina, en mayor medida, la aparición de morfoanomalías espermáticas en el proceso de congelación seminal.

Finalmente, los valores medios de espermatozoides con **acrosomas anormales** mostraron unos registros bastante homogéneos, si bien los porcentajes más bajos se alcanzaban cuando las muestras eran equilibradas por períodos de 60 y 90 minutos y procesadas durante 15 minutos de vapores de NL, correspondiente además a las que menos porcentajes de anomalías morfológicas totales presentaban. En cualquier caso, las acrosomías

observadas en los diferentes protocolos (valores medios entre un 7% y un 13%) fueron notablemente inferiores a los descritos por otros autores en semen congelado-descongelado procesado de la forma tradicional (Nöthling y Shuttleworth, 2005) y los hallados por Okano y cols. (2004) cuando las muestras seminales eran expuestas a un periodo de equilibrado de 1 o 2 horas previas a la congelación. Diversos trabajos han demostrado que el estado del acrosoma se mantiene muy estable ante la modificación del proceso de congelación. De esta forma, Peña y cols. (2000b) describieron cómo, ante un mismo procesado seminal (composición de diluyentes, número de pasos de dilución), el método utilizado para la congelación (congelación en caja o tanque comercial) y, por tanto, las condiciones de vapores de nitrógeno a las que las pajuelas son sometidas, no tenían influencia sobre la proporción de espermatozoides con acrosomas intactos. En este sentido, otro estudio realizado sobre la influencia del tamaño de la pajuela y el ratio de congelación y descongelación sobre la aparición de acrosomas alterados comprobó que el ratio de congelación no tenía efecto sobre la morfología de los acrosomas espermáticos (Nöthling y Shuttleworth, 2005).

En conclusión, aunque se detectaban diferencias puntuales entre los diferentes protocolos evaluados en esta experiencia, los resultados basados en los parámetros seminales (motilidad espermática, morfoanomalías y acrosomías) nunca mostraron que uno de los protocolos evaluados fuese más efectivo que el resto. Por tanto, ante igualdad de resultados en cuanto a calidad espermática post-descongelación de los diferentes protocolos, se propone como opción más rápida y viable para la criopreservación seminal canina, la utilización de un tiempo de equilibrado a 4°C de 30 minutos y, posteriormente, 15 minutos de vapores de NL.

5.6. EXPERIMENTO 6: CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN CONGELADO Y ALMACENADO EN NITRÓGENO LÍQUIDO VS NITRÓGENO SECO

El presente estudio tenía por objetivo valorar la influencia que el tiempo de preservación tenía sobre la calidad del semen de las dosis seminales almacenadas en contenedores de nitrógeno seco, y si existían diferencias o no con respecto a las conservadas en nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos demostraron que la calidad seminal no se modificaba durante el periodo de preservación (7 días), confirmando la eficacia de los contenedores de nitrógeno seco para preservar las muestras congeladas durante un corto periodo de tiempo.

Los valores medios de motilidad, morfoanomalías y acrosomías del semen en fresco fueron similares a los observados en otros estudios (Silva y Verstegen, 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Hermansson y Linde-Forsberg, 2006; Santana, 2009), indicativo de que la calidad seminal inicial era la adecuada. Tras la descongelación, la motilidad de las dosis seminales preservadas en nitrógeno líquido fue bastante constante a lo largo de todo el análisis, con valores equiparables a los observados en numerosos estudios (Rota y cols. 1999; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Batista y cols., 2006; Bencharif y cols., 2010). Por otro lado, el porcentaje de morfoanomalías espermáticas en las dosis conservadas en nitrógeno líquido mostró valores medios entre 13-19%, siendo resultados también similares a los descritos en diferentes razas caninas, al igual que el porcentaje de acrosomas alterados (Silva and Verstegen 1995; England y Ponzio, 1996; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

En referencia a los porcentajes de motilidad espermática de las muestras almacenadas en **nitrógeno seco**, se registraron valores (50-60%) muy similares a los obtenidos en las dosis seminales preservadas en nitrógeno líquido. Estos resultados se mantuvieron homogéneos prácticamente durante todo el periodo de estudio. Además, salvo ligeras excepciones, los valores medios en los porcentajes de espermatozoides normales y acrosomas intactos permanecieron bastantes uniformes a lo largo del tiempo, no existiendo diferencias entre ambos protocolos de preservación. Por lo tanto, los resultados de este estudio muestran que los contenedores de nitrógeno seco no ocasionan modificaciones en la viabilidad espermática, permitiendo preservar de manera satisfactoria las dosis de semen canino durante un periodo de tiempo corto, aproximadamente unos 7 días.

Hasta el momento presente, la viabilidad de las dosis seminales preservadas en vapores de nitrógeno líquido no se ha definido estrictamente en animales domésticos. Un trabajo desarrollado en peces valoró la motilidad espermática en muestras seminales almacenadas en vapores de nitrógeno líquido, con valores que oscilaban entre el 5 y 85% después de 7 días de preservación (Carolsfeld y cols., 2003). Por otro lado, muy pocos estudios han propuesto métodos alternativos al nitrógeno líquido para la crioconservación del semen. Entre ellos, el uso de ultracongeladores se ha contrastado como protocolo válido para la congelación y almacenamiento del semen canino a temperaturas entre -140°C y -150°C (Álamo y cols. 2005; Batista y cols. 2006; Álamo, 2007). En nuestra experiencia, la temperatura en el interior del contenedor de nitrógeno seco durante el periodo de estudio (7 días), siempre se mantuvo entre los -150°C y -160°C . Por esta razón, nuestros resultados podrían ser comparables con los obtenidos con el uso de los ultracongeladores, donde la motilidad espermática y los porcentajes de espermatozoides normales y de acrosomas con integridad intacta, no mostraban modificaciones a lo largo del periodo de preservación en este método.

Por otro lado, cuando se trata de periodos de preservación cortos, la refrigeración se considera un método de conservación más efectivo que la congelación del semen. Diversos trabajos desarrollados en semen canino refrigerado mostraron que la motilidad y la integridad del acrosoma permanecían en niveles elevados durante 5 días (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001c; Verstegen y cols., 2005; Nizânsky y cols. 2009). No obstante, como consecuencia del descenso de la calidad del semen refrigerado a lo largo del tiempo, se asume que transcurridos 5 días de almacenaje a 5°C , las características del semen refrigerado son equivalentes a las del semen congelado (England y Ponzio, 1996; Verstegen y cols., 2005). Por otro lado, desde un punto de vista práctico, el semen refrigerado debería utilizarse tan pronto como sea posible, idealmente dentro de las primeras 48 horas tras su recogida (Peña y cols., 2006). Asimismo, existe acuerdo en la falta de uniformidad en la respuesta a la refrigeración del semen canino, debida a que no todos los eyaculados de perros reproductores son capaces de soportar la dilución y el procesamiento requerido por este método de conservación (Johnston y cols., 2001; Root, 2005a; Feldman y Nelson, 2007).

Entre las limitaciones que presenta el semen refrigerado, se hace necesario indicar que existen diferentes situaciones que pueden modificar la calidad del semen refrigerado durante el transporte hasta su lugar de destino. Entre estas limitaciones se encuentra disponer de un

sistema de transporte adecuado, la preservación de la temperatura de almacenaje durante el transporte y el control de las fuentes de infección para evitar posibles contaminaciones del semen (Roth y cols., 1999). Este tipo de factores de riesgos quedan minimizados cuando las muestras son congeladas, almacenadas y/o transportadas en depósitos de nitrógeno seco. Así, en las dosis seminales caninas criopreservadas, el control de la temperatura y del ratio de descenso de temperatura seminal hasta su completa congelación e inmersión en nitrógeno líquido, es una parte del proceso perfectamente descrita (Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y cols., 2003; Martins-Bessa y cols., 2006; Schäfer-Somi y cols. 2006; Rota y cols., 2006). De igual forma, el control de la temperatura en nuestro estudio con nitrógeno seco fue exhaustivo, pudiendo comprobar cómo en el interior del contenedor la temperatura no mostraba modificaciones a lo largo del periodo experimental. En relación a una posible contaminación, se ha demostrado que la conservación del semen durante 7 días de almacenaje en contenedores de vapores de nitrógeno líquido previene la transmisión bacteriana y viral (Bielanski 2005).

Por tanto, el transporte de muestras seminales criopreservadas en contenedores de nitrógeno seco se propone como una alternativa totalmente viable y segura al envío de semen refrigerado, sobre todo en aquellas áreas geográficas (como las Islas Canarias) donde sea necesario al menos 2-3 días de transporte para que el semen alcance su destino. Por otro lado, nuestros resultados confirman que el transporte de las muestras seminales en contenedores de nitrógeno seco supone una opción totalmente viable que solventa la actual problemática existente en la exportación de las dosis de semen congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido y, por tanto, nos proporciona y facilita la posibilidad de ampliar las opciones que la criopreservación clásica nos ofrece en la especie canina.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio confirman la eficacia de los contenedores de nitrógeno seco para preservar adecuadamente las dosis seminales durante un corto periodo de tiempo. La calidad del semen congelado y almacenado en nitrógeno líquido fue similar a la observada en muestras criopreservadas en vapores de nitrógeno durante un periodo experimental de 7 días. No obstante, sería muy interesante desarrollar diferentes estudios enfocados a comprobar la capacidad de fertilización de las muestras de semen conservadas durante diferentes periodos de tiempo en contenedores de nitrógeno seco, así como evaluar si los niveles de fertilidad son equivalentes a los obtenidos con el semen refrigerado.

5.7. EXPERIENCIA 7: NIVELES PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA EN FUNCIÓN DE LA ESTIMULACIÓN SEXUAL

En la especie canina, los aspectos relacionados con la fisiología reproductiva y el comportamiento sexual han sido definidos en profundidad. Asimismo, las concentraciones de testosterona se han establecido en condiciones normales y tras la administración de hormonas exógenas (Tsutsui y cols., 1987; Kawakami y cols., 1997). Sin embargo, las relaciones existentes entre la estimulación sexual y los niveles plasmáticos de testosterona no se han estudiado estrictamente en la especie canina. Así, en esta experiencia, el objetivo era determinar los niveles plasmáticos de testosterona en perros de raza Beagle y evaluar las posibles fluctuaciones ocasionadas en las concentraciones de esta hormona como consecuencia de la estimulación sexual mediante recogida seminal y la administración de hormonas exógenas (hCG).

En estudios previos se ha determinado las características seminales en perros de raza Beagle sanos y, por tanto, con una función espermatogénica normal (Tsutsui y cols., 1988; Kojima y cols., 2001). Los resultados de nuestra experiencia son comparables a los descritos en otros estudios realizados en perros de raza Beagle (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a, b; Álamo y cols. 2005; Verstegen y cols., 2005), con similares resultados de volumen y concentración espermática, y unos niveles de motilidad espermática ligeramente superior (80-95%) a la nuestra. Asimismo, los valores de acrosomías y morfoanomalías fueron bastante parecidos a los descritos para esta raza canina (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001b, c; Albarracín y cols., 2004; Álamo y cols. 2005; Verstegen y cols., 2005), si bien, en nuestro estudio, el porcentaje de anomalías morfológicas fue menos uniforme, observándose los registros más elevados en los perros de mayor edad. Entre las causas que pueden provocar una mayor presencia de formas anormales en el eyaculado se describen infecciones del tracto reproductivo, alteraciones iatrogénicas, trauma testicular, disminución de la secreción de LH y testosterona, tiempo de reposo sexual de los animales, etc... (Kawakami y cols., 1998; Johnston y cols. 2001), todas ellas con mayor casuística en perros de edad avanzada que en perros jóvenes.

Diferentes estudios se han encargado de establecer los niveles plasmáticos de testosterona en perros sanos; algunos autores (Tsutsui y cols. 1987; Hewitt, 2000) han determinado que los valores de testosterona basales pueden llegar a alcanzar concentraciones que rondan los 3.5-6.0 ng/ml, mientras que otros consideran que los valores normales de testosterona deben pueden oscilar entre los 0.4 y los 10 ng/ml (Feldman y Nelson, 2007). En otros trabajos, se han registrado valores de testosterona que se situaban entre los 2 y los 5 ng/ml (Tsutsui y cols., 1987; Kawakami y cols., 1997). En nuestro estudio, las concentraciones plasmáticas medias de testosterona del grupo control se situaron próximas a los 7-8 ng/ml, siendo comparables a los estudios citados. Asimismo, si bien no se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de testosterona a lo largo del tiempo dentro de un mismo animal, sí se detectó una importante variabilidad entre los ejemplares cuando se comparaban dentro de los mismos periodos de tiempo. Esta variabilidad puede ser debida a las diferencias que se establecen como resultado de la secreción pulsátil a la que responde la testosterona, y que obedece a la secreción de GnRH (Knol y cols., 1993). Este hecho ha sido ampliamente descrito como base de la fisiología reproductiva (García y cols., 1996; Guyton y Hall, 1996; Dvorkin y Cardinali, 2003; Hewitt, 2000), presentándose como premisa básica para explicar las fluctuaciones habituales de las concentraciones hormonales, considerablemente variables de un individuo a otro y dentro del mismo individuo.

Algunas experiencias han constatado que los niveles plasmáticos de testosterona pueden sufrir modificaciones en función de diferentes parámetros. La edad influye en las concentraciones de esta hormona, confirmando que las concentraciones plasmáticas de testosterona son más bajas en perros pre-puberales y en perros mayores a 12 años (Fukuda y cols., 1988) que en perros adultos; no obstante, otros autores no encontraron ninguna variación en los niveles de testosterona en perros entre 1 y 6 años (Taha y Noakes, 1982). Por otro lado, se ha determinado que los niveles de esta hormona no se mantienen constantes a lo largo del año sino que, por el contrario, pueden sufrir fluctuaciones en función de la estación, siendo en verano y otoño cuando se alcanzan los máximos niveles de testosterona (Taha y Noakes, 1982); además, se ha comprobado que factores estresantes como las altas temperaturas o una elevada pluviometría disminuyen las concentraciones de esta hormona (Mello-Martins y cols., 2006). Asimismo, se ha descrito que en el patrón de secreción diaria de testosterona de la especie canina se caracteriza por dos aspectos. Uno de ellos es su patrón pulsátil, habiéndose definido que el número e intervalo de los picos de LH y testosterona en la especie canina es dependiente

de la oscuridad, determinando que durante las horas de luz los picos de testosterona suceden cada 111 minutos aproximadamente (DePalatis y cols., 1978). El segundo aspecto viene determinado por el ritmo circadiano (Fukuda y cols., 1988; Fukuda, 1990), de manera que, los niveles más bajos se registran sobre el mediodía (a las 12:00), incrementándose en forma de picos en la tarde y madrugada (a las 18:00 y 6:00). En nuestra experiencia, se puede descartar una influencia de tales factores sobre las concentraciones plasmáticas de testosterona, puesto que todos los animales se encontraban dentro del mismo rango de edad (entre 3 y 6 años) y el estudio se realizó en un periodo de unas 5-6 semanas durante el otoño, con condiciones climáticas estables; asimismo, las muestras de sangre para medición hormonal siempre fueron extraídas entre las 12.00 y las 15.00 horas.

Por otro lado, existen numerosos estudios realizados con perros que han determinado la influencia que la aplicación de análogos de GnRH o hCG puede tener sobre la libido y/o los niveles plasmáticos de testosterona (DePalatis y cols., 1978; Purswell y Wilcke, 1993; Kawakami y cols., 1998; Hess y cols., 2006). Algunos estudios describen como, tras administrar esta hormona, se alcanzan niveles plasmáticos de testosterona muy elevados entre 30 y 120 minutos tras la aplicación, con picos que se sitúan en 30 y 60 minutos (Knol y cols., 1993; Günzel-Apel y cols., 1994). Por otro lado, los niveles plasmáticos de testosterona tras la aplicación de análogos hormonales difieren en función de la dosis aplicada y la forma de administración. Un estudio realizado por Knol y cols. (1993) muestra como la administración endovenosa de GnRH produce un incremento inmediato en los niveles plasmáticos de LH, que se traduce en un incremento de la testosterona a partir de los 10 minutos después de la inyección. No obstante, Purswell y Wilcke (1993) observaron que el efecto sobre la respuesta de la testosterona no es tan inmediato como cuando la aplicación de GnRH es intramuscular.

En nuestra experiencia, la aplicación hormonal se realizó con hCG a nivel subcutáneo, lo que produjo, en todos los perros, un incremento en los niveles plasmáticos de testosterona tras 30 minutos de su administración; asimismo, este efecto se mantuvo hasta que transcurrieron 2 horas de la administración. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Purswell y Wilcke (1993), que describen un incremento inmediato (a los 15 minutos) de LH, mientras el pico de testosterona no se alcanzaba hasta transcurrida una hora de la administración hormonal. Del mismo modo, cuando la GnRH se administra a nivel subcutáneo, los resultados mostraron que las concentraciones plasmáticas de testosterona se incrementaban 30 minutos tras la

administración de GnRH (15 minutos después del pico de LH), alcanzándose los niveles máximos entre 45 y 60 minutos después (Kawakami y cols., 1997).

Además de la vía de administración, la concentración de las hormonas exógenas aplicadas puede interferir en el efecto ocasionado sobre los niveles de testosterona del individuo. De hecho, se asume como premisa la acción dosis-dependiente que la aplicación de agonistas de la GnRH tiene sobre los niveles de LH y testosterona (Knol y cols., 1993). La administración intramuscular de 400-500 UI de hCG en perros adultos se tradujo en un incremento de las concentraciones plasmáticas de testosterona, comenzando 2 horas tras la aplicación, y alcanzando su pico más elevado entre 4 y 9 horas tras su administración (Post, 1982; Tremblay y Belanger, 1985). En nuestro estudio, los niveles de testosterona alcanzaron sus valores más elevados entre 1 y 2 horas tras la administración de hCG; no obstante, nuestros perros recibieron una dosis de 1000 UI de hCG comparada con los 400-500 UI administradas en los estudios citados (Post, 1982; Tremblay and Belanger, 1985). Esta mayor dosis de hCG (1000 UI) podría haber generado un más rápido incremento (a los 30 minutos) de los niveles plasmáticos de testosterona que los observados (60 minutos) en condiciones de estudio similares (Tremblay and Belanger, 1985; Purswell y Wilcke, 1993), donde las dosis de hCG fueron menores.

Por otro lado, algunos estudios han valorado la influencia que la estimulación sexual puede tener sobre las concentraciones de testosterona en diversas especies como toros, carneros y garañones (Katongole y cols., 1971; Moore y cols. 1978; Rabb y cols., 1989), siendo escasos los trabajos, al respecto, en la especie canina (Fukuda y cols., 1988; Santana, 2009). En los procedimientos de recogida seminal, resulta una práctica habitual la utilización de una perra en celo, con el objeto de incrementar la libido de los machos donantes y facilitar la recogida seminal (Root, 2005a). Asimismo, estudios realizados en machos de la raza Beagle confirmaron que, tras permitir que los perros oliesen las secreciones vaginales de una perra en estro (Fukuda y cols., 1988), se confirmó un incremento significativo en los niveles plasmáticos de testosterona entre 3 y 7 horas más tarde, comparado con machos no expuestos a tal estimulación. Por el contrario, otros indican que cuando los perros eran expuestos directamente a la presencia de una perra en celo (Fukuda y cols., 1988), no se observaban modificaciones en los niveles plasmáticos de testosterona. En nuestro estudio, las concentraciones de testosterona del grupo control y del grupo sexualmente estimulado (recogida seminal) no mostraron diferencias relevantes, indicativo de una ausencia de influencia de la recogida seminal sobre la secreción de

esta hormona. Por otro lado, en nuestro estudio no se utilizó ningún tipo de reclamo sexual para la recogida (ni hembras en celo ni secreciones vaginales) y los perros participantes no habían sido entrenados antes del estudio. Estas circunstancias unidas a que el grupo sexualmente estimulado fue el último experimento de este estudio, permite descartar un efecto aditivo de la repetida estimulación sexual sobre las concentraciones plasmáticas de testosterona.

Está ampliamente aceptado que las situaciones de estrés provocan efectos directos sobre la secreción de hormonas sexuales. Así, durante las situaciones estresantes, la mayoría de los mamíferos reaccionan produciendo un incremento en las concentraciones de cortisol que se traduce en un descenso de los niveles de LH y FSH, y por tanto de la producción de testosterona (Dvorkin y Cardinali, 2003). Esto ha sido descrito en otras especies como la equina (Rabb y cols., 1989), donde los niveles de cortisol se incrementaron rápidamente en garañones tras la estimulación con una hembra en estro, mientras que los niveles plasmáticos de testosterona se mantuvieron constantes o incluso disminuían pasado un tiempo después. Esta disminución fue explicada como consecuencia del estrés ocasionado por la demanda de la actividad física que supone la monta, que incrementa las cantidades de cortisol, lo que se traduce en una disminución de las cantidades de testosterona. Del mismo modo, Fukuda y cols. (1988) describieron como aquellos perros ubicados directamente con perras en celo no mostraban cambios en los niveles de testosterona. Por lo tanto, podemos especular que, en nuestro estudio, la falta de influencia de la estimulación sexual sobre las concentraciones de testosterona pueden encontrarse asociada con el estrés inducido por la recogida seminal en perros no entrenados. Este mayor grado de excitación y el estrés puede haber ocasionado un incremento de los niveles cortisol en el grupo sexualmente estimulado, superior al resto de los grupos experimentales.

Por otro lado, diferentes estudios han concluido que el dolor y el estrés asociado a la punciones intravenosas asociadas a la administración de hormonas o las extracciones sanguíneas seriadas, no muestran influencias significativas de los niveles plasmáticos de LH, testosterona y cortisol en perros entrenados (Knol y cols., 1993). En nuestro estudio, todos los grupos experimentales (control, estimulados con hCG y sexualmente estimulados) recibieron un similar manejo, y por tanto, fueron sometidos al mismo nivel de estrés (en relación con la obtención de muestras), siendo un factor que no modificaba los niveles plasmáticos de testosterona en ninguno de los grupos experimentales.

En definitiva, nuestro estudio confirmó que la estimulación sexual asociada a la recogida seminal (durante las primeras 2 horas tras la recogida) no producía modificaciones en los niveles plasmáticos de testosterona. Además, se comprobó que la administración subcutánea de 1000 UI de hCG generaba un rápido y notable incremento de las concentraciones plasmáticas de testosterona. Por tanto, consideramos que se precisan estudios más específicos sobre el efecto que diferentes tipos de estimulación (monta natural, perra en celo, recogida seminal en perros entrenados, administración de feromonas comerciales) y la administración de distintas dosis de hormonas exógenas (hCG) puedan ocasionar sobre la secreción de cortisol, LH y testosterona, a corto, medio y largo plazo.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Experimento 1: Características seminales post-descongelación en muestras conservadas en diferentes protocolos de criopreservación

1. El tiempo de preservación no influye sobre la motilidad espermática post-descongelación de las muestras conservadas durante 12 meses en nitrógeno líquido, pero si se confirma una marcada reducción tras 18 meses de preservación.
2. Los ultracongeladores de -152 °C son capaces de mantener la calidad del movimiento espermático en las muestras criopreservadas durante un periodo de 3 meses, con independencia de las concentraciones de Equex utilizadas (0.5%, 1%).
3. Los porcentajes de espermatozoides anormales y de acrosomías post-descongelación no mostraban diferencias en función del protocolo de criopreservación utilizado, fuese nitrógeno líquido o ultracongeladores de -152°C, durante los primeros 3 meses de conservación.
4. En base a los resultados globales de la calidad seminal post-descongelación, la criopreservación mediante la utilización de ultracongeladores de -152°C es un procedimiento alternativo a la congelación en nitrógeno líquido.

Experimento 2: Características del semen conservado a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo

5. El semen canino diluido en un medio a base de Tris-glucosa-yema conserva valores aceptables de motilidad espermática durante un periodo de 4 y 24 horas, cuando se preserva a 37 y a 25 °C, respectivamente.
6. El semen canino procesado de manera individual y conservado a 4°C mantuvo unos porcentajes de motilidad espermática aceptables hasta un periodo de 4 días.
7. En las muestras preservadas a 4°C, parece existir un fenómeno de resistencia a los procesos de estrés térmico por parte de los espermatozoides, cuando el semen se procesa en forma de *pool* en lugar de individualmente.

8. La temperatura de conservación influye directamente en la morfología espermática de forma que, a diferencia de las muestras preservadas a 25°C y a 4°C, la incubación a 37°C produce un incremento en los porcentajes de morfoanomalías, básicamente a nivel de la cola del espermatozoide.

Experimento 3: Viabilidad del semen congelado-descongelado conservado a diferentes temperaturas tras su descongelación

9. Los porcentajes de motilidad espermática en muestras de semen canino congelado disminuyen de forma muy significativa 1 hora post-descongelación, independientemente de que se preserven a 37°C, 25°C, 15°C o 4°C, recomendándose su utilización de forma inmediata.

10. La temperatura de preservación no influye sobre la presentación de morfoanomalías y acrosomías en el semen descongelado y conservado durante 1 hora.

Experimento 4: Influencia del tiempo de refrigeración previo a la congelación sobre la calidad del semen

11. La calidad seminal post-descongelación de muestras refrigeradas durante 6 horas antes de congelarse, fue superior a la observada en muestras refrigeradas por periodos de 12, 24 y 48 horas y posteriormente congeladas.

12. La refrigeración seminal (hasta 48 horas), previa congelación, no genera una degradación de la calidad seminal post-congelación con respecto al método de congelación tradicional y puede considerarse un protocolo igualmente efectivo, sin ventajas ni desventajas sobre el mismo.

Experimento 5: Características del semen tras someterse a distintos tiempos de equilibrado y de vapores de nitrógeno líquido

13. La combinación de diferentes tiempos de equilibrado (30, 60, 90 y 120 minutos) y de exposición a vapores de nitrógeno líquido (5, 10 y 15 minutos) para diseñar un protocolo de congelación, no se traduce en una diferencia evidente de la calidad seminal post-congelación.

14. Los resultados globales de calidad espermática post-descongelación muestran como opción más rápida para la criopreservación seminal canina, la utilización de un tiempo de equilibrado de 30 minutos y, posteriormente, 15 minutos de vapores de nitrógeno líquido.

Experimento 6: Características del semen congelado y almacenado en nitrógeno líquido vs nitrógeno seco

15. La calidad del semen conservado en contenedores de nitrógeno seco, durante un periodo de 7 días, es similar a la observada en muestras criopreservadas en nitrógeno líquido durante ese mismo periodo de tiempo, confirmando su eficacia para preservar la calidad de las dosis seminales caninas.

16. En aquellas áreas geográficas, como las Islas Canarias, donde se precisen al menos de 2-3 días para el completo tránsito de dosis seminales, la utilización de contenedores de nitrógeno seco se muestra como una alternativa totalmente viable, segura y equiparable al envío de semen congelado en nitrógeno líquido.

Experiencia 7: Niveles plasmáticos de testosterona en función de la estimulación sexual

17. La estimulación sexual asociada a la recogida seminal no produce modificaciones en los niveles plasmáticos de testosterona durante las 2 horas siguientes a la recogida.

18. La administración subcutánea de 1000 UI de hCG genera un incremento notable de las concentraciones de testosterona en sangre 30 minutos tras la misma, efecto que se prolonga, al menos, hasta pasadas 2 horas.

7. RESUMEN

7. RESUMEN

Este trabajo de investigación ha pretendido realizar un recorrido por las diversas técnicas de preservación seminal canina, intentando realizar aportaciones que puedan ser aplicadas a los procesos de conservación, refrigeración y congelación canina.

La **experiencia 1** se encargó de analizar, en el Dogo Canario, la viabilidad del semen conservado en distintos métodos de congelación. Se utilizaron 8 ejemplares, a los que se recogió el semen que fue procesado hasta obtener una primera dilución (20% de yema de huevo, 3% de glicerol). Posteriormente, el semen era dividido en tres alícuotas: grupo NL, criopreservación en nitrógeno líquido (5% glicerol, 20% yema de huevo) con 0.5% de Equex; grupo UF-0.5, criopreservación en ultracongeladores de -152°C (5% glicerol, 20% yema de huevo) con 0.5% de Equex; grupo UF-1, criopreservación en ultracongeladores de -152°C (5% glicerol, 20% yema de huevo) con 1.0% de Equex. La calidad seminal (motilidad, morfoanomalías y acrosomías) se evaluó tras diferentes tiempos de conservación; así, en los grupos UF-0.5 y UF-1, la calidad se determinó tras 1 día, 1 mes y 3 meses de conservación, mientras en el grupo NL, la calidad seminal se evaluó tras 1 día, 1 mes, 3 meses, 12 meses y 18 meses de criopreservación. En las muestras preservadas en NL, la calidad seminal apenas se modificó durante los primeros 12 meses de congelación, pero a los 18 meses de preservación, se observó un descenso de la motilidad espermática y un incremento en el porcentaje de morfoanomalías. Por otro lado, los resultados de motilidad espermática (66-71%), morfoanomalías y acrosomías en las muestras conservadas en UF-0.5 y UF-1 durante 3 meses, no mostraron diferencias generalizadas cuando se compararon con las muestras preservadas en NL. Así, se puede concluir que nitrógeno líquido y ultracongeladores de -152°C son métodos igualmente válidos para la criopreservación del semen del Dogo Canario.

La **experiencia 2** pretendía analizar las características del semen canino conservado a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo. Partiendo de 5 perros de diferentes razas, se obtuvo semen que, posteriormente, era procesado de manera individual y en forma de *pool*. Para ello, el volumen de eyaculado se dividía en 5 alícuotas: (A) almacenada en baño María a 37°C; (B) almacenada a temperatura ambiente, aproximadamente a 25°C; (C) almacenada en cámara de refrigeración a 4°C; (D) destinada a congelación seminal en nitrógeno líquido; (P) utilizada para elaborar el *pool*, que a su vez fue dividido en alícuotas (PA), (PB), (PC) y (PD) procesadas de manera similar a lo descrito para las alícuotas A, B, C y D, respectivamente. Posteriormente,

las alícuotas A, B, C, PA, PB y PC eran diluidas con medio Tris-glucosa-yema, preservadas en sus respectivas temperaturas y evaluadas a lo largo del tiempo (motilidad espermática hasta su completa inactivación y anomalías morfológicas y acrosomías a las 1, 8 y 24 horas). Las alícuotas destinadas a criopreservación (D y PD) fueron procesadas de manera habitual y congeladas en NL, para una vez descongeladas, evaluar los mismos parámetros seminales que para el resto de muestras. En general, esta experiencia demostró que las dosis seminales diluidas en medio Tris-glucosa-yema, son capaz de mantener unos valores aceptables de motilidad espermática (por encima del 50%) durante 4, 24 y 96 horas cuando se almacenaban a 37°C, 25°C y 4°C, respectivamente, siendo estos valores muy inferiores en las muestras congeladas-descongeladas (con registros por debajo del 50% desde la hora 1 de conservación). Asimismo, entre otros hallazgos, se evidenció la existencia de un incremento de la viabilidad seminal cuando las muestras conservadas a 4°C, eran procesadas en forma de *pool*, mientras las muestras preservadas a 37°C mostraban un significativo incremento en los valores de morfoanomalías espermáticas a los largo del tiempo de incubación.

La **experiencia 3** se desarrolló para evaluar la perdurabilidad y las características del semen congelado, sometido a distintas temperaturas de conservación tras la descongelación. Se utilizaron los mismos 5 animales que en la experiencia 2, a los que se le extrajo semen que fue mezclado formando un *pool*, posteriormente procesado (5% glicerol, 20% yema huevo, 0.5 % Equex) y almacenado en NL. El siguiente paso consistió en descongelar las pajuelas y conservar el semen a diferentes temperaturas: 37°C (baño María), 25°C (temperatura ambiente), a 15°C (cámara de refrigeración) y 4°C (refrigeración). La motilidad espermática se estimó a las 1, 2, 4 y 6 horas tras el comienzo del periodo de conservación post-descongelación, mientras que los porcentajes de anomalías morfológicas y acrosomías se determinaron sólo tras 1 hora de preservación. Los resultados mostraron como la motilidad espermática disminuía de forma significativa tras 1 hora de preservación a 37°, 25°C, 15°C o 4°C, con valores en torno al 30-40%, no siendo tan evidentes las modificaciones respecto al porcentaje de formas anormales y acrosomías. Por tanto, independientemente de la temperatura de conservación, los porcentajes de motilidad espermática disminuyen muy rápidamente tras la descongelación, por lo que se uso debe ser de forma inmediato tras la misma.

La **experiencia 4** se realizó con el objeto de estudiar las características del semen congelado tras haber sido sometido a diferentes periodos de refrigeración antes de ser congelado. Se obtuvo semen de 6 perros, constituyendo un *pool* que se distribuía en 6 alícuotas. La alícuota A se procesó siguiendo el método de congelación tradicional, es decir, un primer diluyente con un 20% de yema de huevo, un 3% de glicerol y 1 hora en cámara a 4°C, mientras las otras cinco alícuotas (R1, R6, R12, R24, R48) eran destinadas a refrigerarse con diluyente de refrigeración (20% yema de huevo, sin glicerol) durante 1, 6, 12, 24 y 48 horas antes de criopreservarse. Transcurrido estos intervalos de tiempo, se continuaba con el proceso de dilución, adicionando los correspondientes diluyentes 2 (con un 7% de glicerol para la alícuota A y con un 10% de glicerol para el resto) y la congelación en NL. Finalmente el semen era descongelado y se valoraban los parámetros de motilidad espermática, anomalías morfológicas y acrosomías. Los resultados de este ensayo mostraron que no existía ningún tipo de detrimento en la calidad seminal cuando el semen era congelado tras refrigerarse por periodos de hasta 48 horas (con registros de motilidad total superiores al 60% en todos los periodos evaluados), ni incremento en los valores de morfoanomalías y acrosomías; por tanto, este protocolo se puede considerar igualmente efectivo que la congelación tradicional.

La **experiencia 5** pretendía analizar las características del semen congelado cuando se combinan diferentes periodos de tiempo de equilibrado y de exposición a vapores de nitrógeno líquido. A partir del semen de 5 perros de distintas razas, se constituyó un *pool* que, inicialmente, fue procesado con un diluyente con un 20% de yema de huevo y un 3% de glicerol. El semen diluido se distribuía en 4 alícuotas (Alícuotas A, B, C y D) que serían equilibradas a 4°C durante diferentes periodos de tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente). Pasados estos tiempos de equilibrado, se adicionaba el diluyente 2 (20% yema de huevo, 7% glicerol, 0.5 % Equex) y el semen era empajuelado; las pajuelas se distribuían en 3 grupos que se expusieron distintos tiempos (5, 10 y 15 minutos) a vapores de nitrógeno líquido antes de conservarse en NL. Tras la descongelación, los parámetros seminales valorados fueron la motilidad espermática, las anomalías morfológicas y acrosomías. Los resultados sugieren que la combinación de diferentes tiempos de equilibrado y de exposición a vapores de nitrógeno líquido, para diseñar un protocolo de congelación no se traduce en una diferencia evidente de la calidad seminal post-congelación. No obstante, entre ellos, el protocolo más rápido y suficientemente viable es aquel constituido por un tiempo de equilibrado a 4°C de 30 minutos y, posteriormente, 15 minutos de vapores de NL, con los que se pueden alcanzar valores del 69% y 57% de motilidad espermática total y progresiva, respectivamente.

La **experiencia 6** se realizó con objeto de valorar las características del semen canino congelado y posteriormente almacenado en criocontenedores de nitrógeno seco a lo largo de una semana. A partir de 5 machos mestizos, se generó un *pool* seminal que se procesó siguiendo el protocolo habitual hasta obtener una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml, 20% yema de huevo, 5% glicerol y 0.5% Equex, para ser finalmente congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente, las pajuelas fueron distribuidas en 2 grupos: grupo NL, pajuelas que continuaron almacenadas en nitrógeno líquido y grupo NS, pajuelas que fueron depositadas en un criocontenedor en nitrógeno seco. La descongelación y evaluación del semen se llevo a cabo los días 1, 2, 3, 5 y 7 tras el almacenamiento en NS. Los resultados demostraron que la calidad de las dosis seminales congeladas y almacenadas en los criocontenedores de NS era similar a la existente en muestras criopreservadas en NL, posibilitando el uso de este tipo de dispositivos cuando el transporte se prolongue por periodo inferior a 7 días.

La **experiencia 7** se desarrolló con la finalidad de determinar las posibles variaciones en los niveles plasmáticos de testosterona alrededor de la estimulación sexual. Se utilizaron 4 perros de la raza Beagle, a los que se le extrajeron 5 muestras de sangre durante un periodo de 2 horas (0, 10, 30, 60 y 120 minutos); este protocolo de extracción sanguínea se repitió un total de 9 veces, distribuidas en 3 ciclos: Ciclo 1 (control), 3 repeticiones sin estimulación sexual, para determinar los niveles plasmáticos de testosterona basal en ausencia de estímulo; Ciclo 2 (estimulación hormonal), 3 repeticiones con estimulación mediante la aplicación SC de 1000 UI de hCG; Ciclo 3 (estimulación manual), 3 repeticiones con recogida seminal mediante estimulación manual. Una vez obtenido el plasma, se almacenó a -80°C y finalmente, se determinaron las concentraciones plasmáticas de testosterona mediante quimioluminiscencia. La administración de hCG produjo un incremento notable de las concentraciones de testosterona 30 minutos tras la misma, efecto que se prolongó, al menos, hasta pasadas 2 horas desde el inicio de la administración. No obstante, los resultados de esta experiencia evidenciaron que la estimulación sexual asociada a la recogida seminal (durante las primeras 2 horas tras la recogida) no produce modificaciones en los niveles plasmáticos de testosterona, con valores siempre por debajo de los 6 ng/ml.

8. SUMMARY

SUMMARY

The first experiment assessed the sperm viability of semen samples preserved in different freezing methods in the Canarian Mastiff dog. Semen was collected from 8 males and then processed to reach a first dilution of glycerol at 3% and egg-yolk at 20% (sperm concentration: 200×10^6 spermatozoa/mL). Then, three freezing techniques were tested: LN group, semen was frozen and stored in liquid nitrogen (final concentration: 20% egg yolk, 5% glycerol) with 0.5% of Equex; UF-0.5 group, semen was frozen and stored in the ultrafreezer at -152°C (final concentration: 5% glycerol, 20% egg yolk) with 0.5% of Equex; UF-1 group, semen was frozen and stored in the ultrafreezer at -152°C (final concentration: 5% glycerol, 20% egg yolk) with 1.0% of Equex. Seminal quality (sperm motility, abnormal morphology and abnormal acrosomes) was evaluated at 1, 30 and 90 days after freezing in the UF-0.5 and UF-1 protocols, while samples preserved in LN were assessed at 1 day, 1, 3, 12 and 18 months after cryopreservation. In the LN group, no variation of the seminal quality was observed throughout the first 12 months of storing, however, 18 months after cryopreservation, the spermatoc motility significantly decreased and the abnormal sperm cells percentage increased. On the other hand, when the freezing protocols were compared, the spermatoc motility and the percentages of abnormal spermatozoa and acrosome integrity were quite similar between the UF-0.5 and UF-1 protocols, and no evident differences were detected when were compared with the LN samples. Our results confirmed that the ultra-freezer at -152°C is a potential alternative to freeze and store canine semen, showing a comparable seminal quality to those obtained in semen samples preserved in liquid nitrogen.

The second experiment assessed the sperm quality and longevity of semen samples preserved at different temperatures. After collection, the ejaculates of 5 dogs were processed individually. The ejaculate volume was assigned to 5 experimental procedures: **A**, incubation at 37°C ; **B**, preservation at room temperature (25°C); **C**, chilling from room temperature to 4°C ; **D**, freezing in liquid nitrogen; **P**, pooling of individual semen and the pooled semen was divided into four samples: **PA**, **PB**, **PC** and **PD** processed in a similar way that described in the A, B, C and D procedures, respectively. Then, the A, B, C, PA, PB and PC aliquots were diluted in Tris-yolk extender (198 mM TRIS, 73 mM citric acid, 44 mM glucose, 20% egg yolk, and distilled water to 100 mL) and were maintained in the respective preservation temperatures. D and PD samples were processed as usually (final concentration 100×10^6 sp/mL, 0.5% Equex, glycerol at 5%, egg-yolk at 20%) and finally frozen in liquid nitrogen. Sperm motility of fresh semen (37°C , 25°C),

chilled semen (4°C) and frozen-thawed semen was assessed at 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours; in addition, the percentages of abnormal spermatozoa and intact membrane acrosome were defined at 1, 8 and 12 hours. This experiment showed that seminal samples diluted in a Tris-glucose-yolk diluents were able to keep acceptable levels of spermatic motility (> 50%) for 4, 24 and 96 hours when samples were stored at 37°C, 25°C and 4°C, respectively. In addition the seminal viability was better when the samples preserved at 4°C were pooled; by contrast, the incubation at 37°C caused a faster depletion of sperm viability resulting in lower sperm motility and higher abnormal spermatozoa percentages with increasing preservation time.

The influence of the preservation temperatures over the seminal quality of frozen-thawed samples was evaluated in the third experiment. After evaluation, the ejaculates of 5 dogs were pooled and processed to reach a final concentration of 100×10^6 spermatozoa/mL, glycerol at 5%, egg-yolk at 20% and Equex at 0.5%. Semen was packaged in 0.5 mL plastic straws and it was frozen and stored in the liquid nitrogen. Later, semen straws were thawed (70°C, 8 seconds) and the semen was preserved at different temperatures: 37°C, 20°C, 15°C and 4°C. Sperm motility (CASA) was assessed at 1, 2, 4 and 6 hours after thawing, and the percentages of sperm abnormalities and acrosome membrane integrity were determined at 1 hour after thawing. The results showed that the spermatic motility decreased uniformly after 1 hour of storage at 37°C, 25°C, 15°C or 4°C, showing mean values lower 30-40%; however, the acrosome integrity and abnormal sperm cells did not present evident changes after 1 hour of preservation at the different temperatures. Therefore, independently of storage temperature, the spermatic motility of the frozen-thawed samples decrease very quickly after thawed; so, the frozen semen must be used immediately after thawing.

The fourth experiment was carried out to study the influence of chill semen (for different periods) before freezing. Semen was collected from six dogs, pooled and divided in 6 groups. In group A (control), semen was frozen by the traditional method, reaching a final dilution of glycerol at 5%, egg-yolk at 20% and Equex at 0.5%. First at all, in groups R1, R6, R12, R24 and R48, the semen samples were diluted with a Tris-yolk extender (egg-yolk at 20%, no glycerol was present) and then were chilled (4 °C) for 1, 6, 12, 24 and 48 hours before cryopreservation, respectively. After the chilled period (groups R1, R6, R12, R24 and R48), a second dilution (extender with glycerol at 10%, egg-yolk at 20% and Equex at 1.0%) was performed, and finally, the samples were frozen in liquid nitrogen. After thawing, the spermatic parameters (motility, abnormal morphology and abnormal acrosomes) were evaluated in the different groups. The chilling of

semen (until 48 hours) before freezing did not show changes over the sperm quality when it was compared with semen samples preserved by the traditional freezing method. Indeed, the sperm motility was around 60% in all experimental groups, and no variations of the percentages of abnormal spermatid cells and acrosome integrity was detected. In conclusion, chilling of semen (until 48 hours) before freezing could be considered as effective as the traditional freezing protocol.

The fifth experiment tried to determine the semen characteristic of frozen-thawed samples when several equilibration periods and different times of exposition at liquid nitrogen vapors were combined. Semen of five dogs was collected, pooled and processed to reach a first dilution with glycerol at 3% and egg-yolk at 20%. Then, the diluted semen was divided in 4 aliquots: A, B, C and D, samples equilibrated (4°C) for different periods of times (30, 60, 90 and 120 minutes, respectively). After equilibration, the second extender (glycerol at 7%, egg-yolk at 20%, 1% Equex) was added and the semen was packed in straws; afterwards, the straws were assigned at 3 different groups exposed to liquid nitrogen vapors for different periods of time (5, 10 and 15 minutes) before freezing in LN. Finally, after thawing, sperm motility, abnormal morphology and acrosome integrity were evaluated. The results of sperm quality after freezing did not allow define a protocol as better than another. In this way, some protocols showed best values of sperm motility, but others had lower rates of abnormal sperm cells. However, among different protocols, the faster (and adequately viable) protocol was the combination of 30 minutes of equilibration (4°C) followed by 15 minutes of exposition to liquid nitrogen LN vapors.

The sixth experiment assessed the efficacy of a dry shipper (DS) to preserve canine semen samples. Semen was collected from 5 dogs and after pooled, semen was processed and the semen straws were frozen and stored in liquid nitrogen (LN). Then, half of the frozen straws were transferred from LN to a dry shipper (DS) and thawing was performed after 1, 2, 3, 5 and 7 days; percentages of motile spermatozoa, acrosome intact spermatozoa and abnormal spermatozoa were determined. Sperm motility (total and progressive) of canine semen samples preserved with DS were quite similar to those preserved in LN, and no significant differences were observed throughout the experimental period. In addition, no differences were observed in the number of abnormal spermatozoa (range: 13.2-21.0%) or intact acrosome (range 90.3-97.0%) between both preservation protocols. The present study confirmed that seminal quality did not show modifications for the preservation period (7 days), confirming the efficacy of the dry

shipper to preserve frozen samples for a short time, showing a practical application to ship semen samples.

The seventh experiment assessed the influence of semen collection and hCG (human Chorionic Gonadotrophin) administration on plasma testosterone concentrations in Beagle males (n=4). Each dog was exposed to three experimental treatments: C treatment (Control, no stimulation), hCG treatment (dogs were SC injected with 1000 IU of hCG) and SS (sexually stimulated) treatment where semen was collected from the males. All dogs were exposed to all treatments, with a 1 week of rest between treatments. Blood samples were taken with the same time intervals (0, 10, 30, 60 and 120 min) relative to treatments. In the control treatment, the testosterone plasma levels did not show significant changes throughout the tested period; however, the hCG group presented a significant increase ($p<0.05$) in plasma testosterone levels 30 minutes after hCG administration and it had the highest value (10.2 ng/mL) at 120 minutes post-hCG. Finally, the SS group revealed a slight reduction in testosterone concentration immediately after ejaculation, but the values remained nearly unaltered until 120 minutes after semen collection. When the groups were compared, the hCG group showed higher plasma testosterone values ($p<0.05$) than did the C and SS groups, starting at 30 minutes and continuing until the end of sampling period. This study demonstrates that sexual stimulation associated with semen collection does not produce transitory modifications in plasma testosterone concentrations.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Álamo D (2003):** Congelación y Conservación del Semen en la Especie Canina: Utilización de Ultracongeladores como Técnica Alternativa al Nitrógeno Líquido. *Tesina de Grado, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.*
2. **Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A (2005):** Cryopreservation of semen in the dog use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63: 72-82.
3. **Álamo D (2007):** Crioconservación y Viabilidad Espermática en la Especie Canina: Utilización de Nitrógeno Líquido vs Ultracongeladores de -152°C. *Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas.*
4. **Albarracín JL, Mogas T, Palomo MJ, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004):** *In vitro* capacitation and acrosome reaction of dogs spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucosa. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 129-135.
5. **Alderton D (1994):** Manual de Identificación de perros. Ed. Ediciones Omega, Barcelona, pp: 6-15.
6. **Alhaider AK, Watson PF (2006):** Cryopreservation of dog semen: The use of Equex STM Paste and its effect on plasma membrane fluidity. *Cryobiology*, 53: 367-446.
7. **Alhaider AK, Watson PF (2009):** Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim. Reprod. Sci.*, 110: 147-161.
8. **Allen WE (1992):** Fertility and Obstetrics in the Dog. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 33-55; 136-140.
9. **Althouse GC, Ko JC, Hopkins SM, Evans LE (1991):** Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2: 227-229.
10. **Andersen K (1975):** Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, 10: 1-4, referido por Thomassen y cols., (2009): Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, 71: 190-199.
11. **Anderson WD, Anderson BG (1994):** Atlas of Canine Anatomy. Ed. Ediciones Lea & Febiger, Philadelphia, pp: 757-811.
12. **Andrade AMB (2005):** Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*
13. **Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1991):** Reproducción y Obstetricia Veterinaria. Ed. Interamericana McGraw-Hills, Méjico, pp: 563-579.
14. **Bacha WJ y Bacha LM (2001):** Atlas Color de Histología Veterinaria. Ed. Intermédica, Méjico, pp: 205-208.

15. **Bartlett DJ (1962):** Studies on dog semen. II. Biochemical characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 3, 190-205.
16. **Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon GM, Magistrini M (2001):** Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 181-190.
17. **Batista M, Gonzalez F, Cabrera F, Calero P and Gracia A (2000):** Morphologic and endocrinologic characteristics of retained canine testes. *Canine Practice*, 25: 12-15.
18. **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.
19. **Batista M, Niño T, Alamo D, Castro N, Santana M, González F, Cabrera F, Gracia A (2009):** Insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*, 71 (8): 1307-1315.
20. **Batista M, Niño T, Santana M, Alamo D, Castro N, Reyes R, González F, Cabrera F, Gracia A (2011):** Mixing of Semen over Sperm Quality of Majorera Bucks. *Reprod. Dom. Anim.*, 46 (2): 281-288.
21. **Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M, Barrière P, Destrumell 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.
22. **Bielanski A (2005):** Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers. *Cryobiology*, 50 (2): 206-210.
23. **Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS (1990):** Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, 34 (1): 147-157.
24. **Cabrera F (1999):** Producción y Congelación Seminal en la Variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria. *Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*.
25. **Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni EF, Harvey BJ (2003):** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63 (2): 472-489.
26. **Celma L (2004):** Diseño de un diluyente de refrigeración seminal en la especie ovina. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza*.
27. **Cheng F-P, Wu J-T, Tsai P-S, Chang C L-T, Lee S-L, Lee W-M, Fazeli A (2005):** Effects of cryo-injury on progesterone receptor of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology*, 64: 844-854.
28. **Colin, M (2004):** Reproduction des animaux domestiques, Guide Pratique ASV. *Ed. Éditions du Point Vétérinaire*.

29. Couto Uchoa D, Rodrigues Silva A, Soares Cardoso R, Sucupira Pereira B, Machado da Silva LD (2002): Canine semen conservation at 37°C in coconut water based extenders *Ciência Rural, Santa Maria*, 32 (1): 91-95.
30. Dahlbom M, Andersson M, Vierula M, Alanko M (1997): Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*, 48: 687-698.
31. DePalatis L, Moore J, Falvo RE (1978): Plasma concentrations of testosterone and LH in the male dog. *J Reprod. Fertil.*, 52: 201-207.
32. Dvorkin MA y Cardinali DP (2003): Best y Taylor: Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. Treceava edición, pp: 659-700.
33. Eilts BE (2005): Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 64: 692-697.
34. England GC, Allen WE, Middleton DJ (1990): An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res. Vet. Sci.*, 49 (1): 66-70.
35. England GCW (1991): Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 32: 306-311.
36. England GC, Plummer JM (1993): Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 261-70.
37. England GCW, Ponzio (1996): Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46: 165-171.
38. England GCW (1999): Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52: 981-986.
39. Evans HE (1993): Miller's Anatomy of the dog. Ed. Editorial W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 504-531.
40. Fahrig B (2003): Cryopreservation by Pellet Freezing of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa from Male Dogs. *Tesis. B.S. Louisiana State University*, pp: 17.
41. Farstad W (1984): Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Anim. Pract.*, 25: 561-5, referido por Thomassen y cols., (2009): Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, 71: 190-199.
42. Farstad W (1996): Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 251-260.
43. Farstad W (2000): Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53: 175-186.
44. Farstad W (2009): Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Anim. Reprod. Sci.*, 44 (2), 336-341.
45. Feldman E, Nelson R (2007): Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter-médica, Buenos Aires, pp: 1038-1134.
46. Fogle Bruce (1996): Enciclopedia del perro. Ed. Omega, Barcelona, pp: 6-35.
47. Fontbonne A, Badinand F (1993): Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 325-7.

48. **Fukuda S, Nagashima H, Morioka K, Aoki J (1988):** Fluctuations in peripheral serum testosterone levels within a day, with age and by sexual stimulation in male beagle dogs bred indoors. *Jikken Dobutsu*, 37: 381-386.
49. **García Sacristán A, Castejón Montijano F, Cruz LF, Gonzalez J, Murillo MD y Salido G (1996):** Fisiología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill. Interamericana, Madrid. Parte IX, Sistema Reprodutor, pp: 827-840.
50. **Guérin P, Ferrer M, Fontbonne A, Bénigni L, Jacquet M, Ménéz Y (1999):** In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 52: 617-628.
51. **Guyton AC y Hall JE (1996):** Tratado de Fisiología Médica. McGraw-Hill. Interamericana-España, Madrid. Novena edición. Unidad XIV, Endocrinología y Reproducción, pp: 1005-1030.
52. **Hay MA, King WA, Gartley, CJ, Leibo SP, Goodrowe KL (1997):** Canine spermatozoa - cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48 (8): 1329-1342.
53. **Hegstad-Davies RL (2006):** A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. *Theriogenology*, 66:592-598.
54. **Hermansson U, Linde-Forsberg (2006):** Freezing of stored, chilled dogs spermatozoa. *Theriogenology*, 65: 584-593.
55. **Hess M (2002):** The Effects of Prostaglandin F 2-A, Oxytocin and Gonadotropin Releasing Hormone on Ejaculate Characteristics in the Dog. *Tesis, Master de Ciencia en Virginia Polytechnic Institute and State University*.
56. **Hess M (2006):** Document and anecdotal effects of certain pharmaceutical agents used to enhance semen quality in the dog. *Theriogenology*, 66: 613-617.
57. **Hewitt DA, England GCW (1997):** The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 50: 123-139.
58. **Hewitt DA (2000):** Fisiología y endocrinología del macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 79-118.
59. **Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW (2001):** Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67: 101-111.
60. **Hill RW, Wyse GA, Anderson M (2006):** Fisiología Animal. Ed. Médica Panamericana, Madrid, pp: 513.
61. **Holt WV (2000):** Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.
62. **Hori T, Odaka S, Oba H, Mizutani T, Kawakami E, Tsutsui T (2006):** Effects of liquid nitrogen Vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (10): 1055-1061.

63. **Howard J, Bush M, Wildt DE (1986):** Semen collection analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. En: Current Therapy in Theriogenology (Morrow DA). *WB Saunders Company*, Philadelphia, pp: 1047-1053.
64. **Iguer-ouada M (2001):** Procréation Medicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4°C du Sperme. *Tesis Doctoral, Universidad de Liège*. Bélgica, referenciado por **Álamo D (2007):** Crioconservación y Viabilidad Espermática en la Especie Canina: Utilización de Nitrógeno Líquido vs Ultracongeladores de -152°C. *Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas*.
65. **Iguer-Ouada M, Verstegen JP (2001, a):** Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology*, 55: 1143-1158.
66. **Iguer-Ouada M, Verstegen JP (2001, b):** Evaluation of the "Hamilton thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55: 733-749.
67. **Iguer-Ouada M, Verstegen JP (2001, c):** Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55: 671-684.
68. **Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N, Somley B (1997):** Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48: 1343-1349.
69. **Ivanova M, Mollova M, Ivanova - Kicheva MG, Petrov M, Djarkova TS, Somlev B (1999):** Effect of cryopreservation on zona - binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*, 52 (1): 163-170.
70. **Johnston SD, Root KMV, Olso PNS (2001):** Canine and feline Theriogenology. Section II, The Dog. Ed. *WB Saunders Company*, Philadelphia, pp: 278-326.
71. **Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Blackberry MA, Cummins JM and Trigg TE (2009):** Dose-Response Studies for Pituitary and Testicular Function in Male Dogs Treated with the GnRH Superagonist, Deslorelin. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 725-734.
72. **Juniewicz PE, Lemp BM, Batzold FH, Rell JR (1989):** Transrectal ultrasonography as a method to monitor canine prostatic size in situ: measurements following endocrine manipulation and ejaculation. *The Prostate*, 14: 265-277.
73. **Katongole CB, Naftolin F and Short RV (1971):** Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in bulls, and the effects of sexual stimulation. *Journal Endocrinology*, 50: 457-466.
74. **Kawakami E, Hori T, Tsutsui T (1997):** Changes in plasma luteinizing hormone, testosterone and estradiol-17 β levels and semen quality after injections of gonadotropin releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin in three dogs with oligozoospermia and two dogs with azoospermia. *Anim. Reprod. Sci.*, 47: 157-167.
75. **Kawakami E, Hori T, Tsutsui T (1998):** Changes in plasma LH and testosterone levels and semen quality after a single injection of hCG in two dogs with spermatogenic dysfunction. *J. Vet. Med. Sci.*, 60 (6): 765-767.

76. **Kawakami E, Masaoka Y, Hirano TI, Hori T, Tsutsui T (2005):** Changes in plasma testosterone levels and semen quality after 3 injections of a GnRH analogue in 3 dogs with spermatogenic dysfunction. *J. Vet. Med. Sci.*, 67 (12): 1249-1252.
77. **Knol BW, Dieleman SJ, Bevers MM, van den Brom WE (1993):** GnRH in the male dog: dose-response relationships with LH and testosterone. *J. Reprod Fertil.*, 98 (1): 159-161.
78. **Kojima E, Tsuruga H, Komatsu T, Murase T, Tsubota T, Kita I (2001):** Characterization of semen collected from breagles and captive Japanese black bears (*ursus thibetanus japonicus*). *Theriogenology*, 55: 717-731.
79. **Koutsarova N, Todorov P, Koutsarov G (1997):** Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 117-21.
80. **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 (7): 1355-1366.
81. **Kumi-Diaka J (1993):** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39 (6): 1279-1289.
82. **Kutzler MA (2005a):** Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64: 747-754.
83. **Lange K, Cordes EK, Hoppen H-O, Günzel-Apel AR (2001):** Determination of concentrations of sex steroids in blood plasma and semen of male dogs treated with delmadinone acetate or finasteride. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 57: 83-91.
84. **Layne SA, Pinto CRF, Kozink DM, Holland BE (2008):** Post-thaw quality of canine semen cryopreserved with commercial canine and equine semen extenders. *Theriogenology*, 70: 576-591.
85. **Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000):** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 113-141.
86. **Linde-Forberg C (1991):** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, 21 (3): 467-85.
87. **Linde-Forsberg C (1995):** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, 10: 48-58.
88. **Linde-Forsberg C, Strom Holst B, Govette G (1999):** Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology*, 52:11-23.
89. **Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, A Rocha (2009):** Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim. Reprod. Sci.*, 112: 158-163.
90. **López-Gatiusa F, Sancesb G, Sanchoc M, Yánizd J, Santolariad P, Gutiérrezc R, Núñezc M, Núñezc J, Solerc C (2005):** Effect of solid storage at 15 °C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64 (2): 252-260.

91. **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.
92. **Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A (2007):** Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology*, 68: 1088-1096.
93. **Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A (2009):** Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 71: 248-253.
94. **Medrano A, Cabrera F, González F, Batista M, Gracia A (2002):** Is sperm cryopreservation at -150°C a feasible alternative?. *Cryoletters*, 23: 167-172.
95. **Mello Martins MI, Ferreira de Souza F, Oba E, Denise Lopes M (2006):** The effect of season on serum testosterone concentrations in dogs. *Theriogenology*, 66:1603-1605.
96. **Memon MA (2007):** Common causes of male dog infertility. *Theriogenology*, 68: 322-328.
97. **Milani C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Gerard O, Romagnoli S (2010):** Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 74: 153-156.
98. **Money CT, Peterson ME (2007):** Manual de endocrinología en pequeños animales. Colección British Small Animal Veterinary Association. Ed. Ediciones S, pp: 1-15.
99. **Moore RW, Whyman D and Wilson PR (1978):** Effects of sexual stimulation on plasma levels of LH and testosterone in rams from high- and low-fertility flocks. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53: 67-70.
100. **Nizánski 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 (2), 363-365.
101. **Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH (1995):** Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen--a retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66 (2):49-55.
102. **Nöthling JO, Shuttleworth R (2005):** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63: 1469-1480.
103. **Nöthling JO, Dolieslager SMJ, Fillekes R, Colenbrander B (2007):** Thawing dog spermatozoa in just-boiled water: submersion time and effect on sperm quality compared to thawing in water at 70°C. *Theriogenology*, 68: 530-537.
104. **Nuñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ (2005):** Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa?. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 537-543.
105. **Oettlé EE (1993):** Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 257-260.
106. **Ohi DA, Denil J, Cummins C, Menge AC, Seager SW (1994):** Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina. *The Journal of Urology*, 152: 1034-1037.

107. Ohi DA, Sønksen J, Wedemeyer GC, Dam TN, Menge AC, Putzi MJ, Papadopoulos SM (2001): Canine model of infertility after spinal cord injury: Time course of acute changes in semen quality and spermatogenesis. *The Journal of Urology*, 166 (3): 1181-1184.
108. Okano T, Murase T, Asano M, Tsubota T (2004): Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.*, 66 (11): 1359-1364.
109. Olar TT, Amann RP, Pickett BW (1983): Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, 29 (5): 1114-1120.
110. Olar TT (1984): Cryopreservation of Dog Spermatozoa. *Ph.D. Dissertation. Colorado State University, Fort Collins, CO.*, referenciado por Feldman E, Nelson R (2007): Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter-médica, Sección 8, Reproducción del macho canino, pp: 1038-1134.
111. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen straws. *Theriogenology*, 31: 451-461.
112. Oliveira ECS, Juliani GC, Marques AP, Henry M (2006): In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58 (6), pp: 1116-1122.
113. Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, Bolio-Gonzalez ME, Jiménez-Coello M, Linde Forsberg C (2006): Reproductive patterns of stray male dogs in the tropics. *Theriogenology*, 66: 2084-2090.
114. Peña A (1997): Supervivencia y Fertilidad del Semen Canino sometido a Congelación-Descongelación. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela*.
115. Peña A, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG (1998a): Effects of Sodium Dodecyl Sulphate on Post-thaw Dog Semen Quality during in vitro Incubation at 39°C and 22°C. *Reprod. Dom. Anim.*, 33: 393-398.
116. Peña A, Barrio M, Quintela LA, Herradón PG (1998b): Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50: 163-174.
117. Peña AI, Quintela LA, Herradón PG (1998c): Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, 50: 1211-1220.
118. Peña A, Johnnisson A, Linde-Forsberg C (1999): Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52: 965-980.
119. Peña A, Linde-Forsberg C (2000a): Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 703-718.
120. Peña A, Linde-Forsberg C (2000b): Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 859-875.
121. Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C (2001): Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 57: 371-376.

122. **Peña A, Lugilde L, Barrio M, Herradón P, Quintela L (2003):** Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59: 1725-1739.
123. **Peña Martínez AI (2004):** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83: 209-224.
124. **Peña FJ, Núñez-Martínez I and Morán JM (2006):** Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reprod. Dom. Anim.*, 41 (2), 21-29.
125. **Pérez-Marín CC, López R, Domínguez JM and Zafra R (2006):** Clinical and Pathological Findings in Testis, Epididymis, Deferens Duct and Prostate following Vasectomy in a Dog. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 169-174.
126. **Peters MAJ, de Rooij DG, Teerds KJ, van der Gaag I, van Sluijs FJ (2000):** Spermatogenesis and testicular tumours in ageing dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 120 (2): 443-452.
127. **Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Peterson E (2003):** Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 455-463.
128. **Pinto D (2005):** Diseño de un Diluyente para la Congelación Seminal en la Especie Ovina. *Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.*
129. **Pinto CRF, Paccamonti DL, Eilts BE (1999):** Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52: 609-616.
130. **Ponglowhapan S, Chatdarong K (2008):** Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*, 69: 666-672.
131. **Post K (1982):** Effects of Human Chorionic Gonadotrophin and Castration on Plasma Gonadal Steroid Hormones of the Dog. *Can. Vet. J.*, 23 (3): 98-101.
132. **Pozuelos Jiménez de Cisneros Antonio (2009).** AEPE: Asociacion para el Estudio del Perro y su Entorno. www.etologiacanina.net
133. **Purswell BJ, Wilcke JR (1993):** Response to gonadotrophin-releasing hormone by the intact male dog: serum testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47:335-41.
134. **Rabb MH, Thompson DL, Barry BE, Colborn DR, Garza F and Hehnke K E (1989):** Effects of sexual stimulation, with and without ejaculation, on serum concentrations of LH, FSH, testosterone, cortisol and prolactin in stallions. *Journal Animal of Science*, 67: 2724-2729.
135. **Rigau T, Farré M, Balleste J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2001):** Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh eyaculates. *Theriogenology*, 56: 801-815.
136. **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.

137. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-1568.
138. Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A (2004): Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*, 62: 1292-1306.
139. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A (2004): Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1589-1602.
140. 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.
141. Risopatrón J, Catalán S, Sepúlveda N y Sánchez R (2005): Effect of Different Concentrations of Heparin on Canine Sperm Capacitation In Vitro. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XV (6): 528-535.
142. Roca J, Martínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martínez EA (2000): Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*, 64: 103-112.
143. Rodríguez-Gila JE, Montserrat A and Rigau T (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa *Theriogenology*, 42 (5), pp: 815-829.
144. Roth T, Bush LM, Wildt DF, Weise EB (1999): Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine in vitro fertilization system cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapour. *Biol. Reprod*, 60: 493-498.
145. Root Kustritz MV (2005, a): Manual de Reproducción del perro y del gato. Ed. *Multimédica Ediciones Veterinarias*, pp: 203.
146. Root Kustritz MV (2005, b): Reproductive behaviour of small animals. *Theriogenology*, 64: 734-746.
147. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C (1995): Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44: 665-900.
148. Rota A, Strom 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 3 8°C. *Theriogenology*, 47: 1093-1101.
149. Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1999): In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed spermatozoa assessed by the chlortetracyclin assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, 57: 199-215.
150. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M (2006): Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 1848-1858.
151. Rota A, Milani C, Romagnoli S. (2007): Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology*, 67 (2007) 520-525.

152. **Ruberte J, Sautet J (1998):** Atlas de Anatomía del Perro y del Gato (3): Abdomen, Pelvis y Miembro Pelviano. Ed. Multimédica, Barcelona, pp: 112-119.
153. **Sandoval J (2000):** Tratado de Anatomía Veterinaria. Tomo III: Cabeza y Sistemas Viscerales. Ed. Facultad de Veterinaria-Universidad de León, León, pp: 359-387.
154. **Santana CM (2009):** Características Testiculares (Morfológicas, Seminales y Endocrinas) en Perros con Diferente Peso Corporal. *Tesina de Grado. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas*.
155. **Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C (2006):** Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 173-182.
156. **Schäfer-Somi S, Aurich C (2007):** Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim. Reprod. Sci.*, 102: 1-13.
157. **Schubert CL, Seager SWJ (1991):** Semen collection and evaluation for the assement of fertility parameters in the male Dalmatian. *Canine pract.*, 16: 17-21.
158. **Seager SW (1969):** Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *Artific. Insem. Digest.*, 17: 6-7, referido por Thomassen y cols., (2009): Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, 71: 190-199.
159. **Seager SWJ, Schubert CL (1996):** Semen collection and evaluation for the clinical assement of fertility parameters in the male Rottweiler. *Canine pract.*, 21: 30-34.
160. **Shahiduzzaman AKM, Linde-Forsberg C (2007):** Induced immotility during long-term storage at +5°C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 68: 920-933.
161. **Silva LDM, Verstegen JP (1995):** Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
162. **Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP (1996):** Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Veterinary Record*, 17: 154-157.
163. **Silva AR, Cardoso RCS, Uchos DC, Silva LDM (2003):** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59: 821-829.
164. **Silva AR, Cardoso RCS and Silva LDM (2006):** Influence of Temperature during Glycerol Addition and Post-thaw Dilution on the Quality of Canine Frozen Semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 74-78.
165. **Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM (2000):** Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, 53 (3): 789-802.
166. **Stornelli MA, de la Sota RL (2006):** Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 25 (2): 29-38.
167. **Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C (1997):** In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 48: 247-256.

168. 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 (3): 325-333.
169. Taha MB, Noakes DE And Edward Allen W (1981): The effect of some exogenous hormones on seminal characteristics, libido and peripheral plasma testosterone concentrations in the male Beagle. *J. Small Anim. Pract.*, 22: 587-595.
170. Taha M, Noakes D (1982): The effect of age and season of the year on testicular function in the dog, as determined by histological examination of the seminiferous tubules and the estimation of peripheral plasma testosterone concentrations. *J. Small Anim. Pract.*, 23: 351-357.
171. Thomas PG, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN (1993): A comparison of three packaging techniques using two extenders for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40: 1199-1205.
172. Thomassen R, Farstad W (2009): Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, 71: 190-199.
173. Tremblay Y, Belanger A (1985): Changes in plasma steroid levels after single administration of hCG or LHRH agonist analogue in dog and rat. *Journal of steroid biochemistry*, 22 (3): 315-320.
174. Tsutsui T, Tsuji J, Kawakami E, Yamada Y, Amano T, Yamauchi M (1987): Peripheral plasma androgen levels in the male dog from birth to sexual maturity. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 177-179.
175. Verstegen JP, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
176. 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.
177. Verstegen JP, Iguer-ouada M (2005): Oestrous cycle stage dependent effects of male and female blood plasma and vaginal fluid on dog semen motility parameters. *Theriogenology*, 64: 810, referenciado por Álamo D (2007): Crioconservación y Viabilidad Espermática en la Especie Canina: Utilización de Nitrógeno Líquido vs Ultracongeladores de -152°C. *Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas*.
178. 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.
179. Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP (2002): Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, 44 (1): 62-78.
180. www.elmundodelperro.net/noticia/739/Raza-del-mes/dogo-canario-o-presa-canario.html (2008): “¿Dogo Canario o Presa Canario?”
181. www.wikipedia.org/wiki/Presa_canario