



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**EFFECTO DE RETIRAR EL PLASMA SEMINAL
CANINO POR CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA
MOTILIDAD ESPERMÁTICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
CÉSAR GARZÓN PÉREZ

ASESOR: M.en C. ARTURO ANGEL TREJO GONZÁLEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2005

m 344919



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A dios por brindarnos la existencia y la conciencia de ella, además de su amor incondicional.

A mis padres que sin escatimar esfuerzos han sacrificado sus vidas para darme una formación y educación con el firme propósito de hacer de mí una persona de provecho, ya que a pesar de las adversidades siempre han sabido guiarme y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis hermanas Miriam y Sandra ya que hemos sabido comprendernos y apoyarnos cuando lo hemos necesitado.

A Rosario por estar siempre presente en los buenos y malos momentos, gracias por tu apoyo, comprensión y amor, parte de este logro es tuyo.

A la señora Berta Amador[†] por que siempre tuvo para con su hija Rosario y para conmigo comprensión, ayuda y apoyo incondicional. Siempre la recordaremos.

A todos los profesores que de alguna manera intervinieron en mi formación, gracias por su dedicación y esfuerzo por seguir formando profesionistas.

A todos mis compañeros, familiares y amigos que contribuyeron en mi formación, gracias por su amistad y apoyo.

A Kelly[†] y Pinka[†] por darnos a mi familia y a mi tantos años de compañía y amor, porque siempre fueron voluntaria o involuntariamente mis compañeras de estudio y práctica, estoy seguro que se encuentran felices en el cielo de los perros.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Arturo Trejo González por su asesoría, disposición y paciencia para la realización del presente trabajo, sin su ayuda, conocimientos y consejos no habría sido posible la conclusión de éste.

A la M.V.Z. Yolanda Pérez por su apoyo y las palabras de aliento que siempre recibí de ella, además de su comprensión y consejos.

A los profesores sinodales por su paciencia y disponibilidad para la revisión del presente trabajo, utilizando un poco de su tiempo libre para llevarla a cabo.

Al M.V.Z. Marcos Pérez y familia, por el apoyo incondicional que siempre recibí de ellos, sin su ayuda el presente trabajo no se hubiera llevado a cabo, gracias por sacrificar su tiempo y sus actividades por apoyarme durante la realización de éste.

Al señor Pedro Maya gracias por ofrecerme su ayuda en los momentos que más lo necesité, además de sus palabras de apoyo para seguir adelante y culminar éste trabajo.

Al M.V.Z. Cruz Arellano por su apoyo y disposición a ayudar a todo el que lo necesita, incluyéndome a mi, gracias.

A los dueños de los caninos utilizados en éste trabajo, gracias por su apoyo y cooperación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO.....	6
FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO.....	11
CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO.....	20
TÉCNICAS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN.....	25
EVALUACIÓN DEL EYACULADO.....	29
PRINCIPIOS GENERALES DE CRIOPRESERVACIÓN.....	34
OBJETIVO.....	45
MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN

La centrifugación es un procedimiento común en la manipulación de suspensiones espermáticas, el semen canino es centrifugado para remover el fluido prostático durante el proceso de congelación, de tal manera que el proceso de centrifugación puede dañar al espermatozoide y consecuentemente influenciar su capacidad de fertilización, especialmente después de la criopreservación.

Con el objetivo de evaluar el efecto de retirar el plasma seminal por centrifugación sobre la motilidad espermática, se utilizaron seis caninos machos, clínicamente sanos. De cada uno de los animales se obtuvieron tres eyaculados por estimulación manual, cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales; una de las partes fue diluida en una proporción de 1:1; la segunda parte fue centrifugada a 800 x g durante 15 minutos y le fue retirado el sobrenadante, el paquete de espermatozoides fue diluido en proporción de 1:1 de acuerdo al contenido inicial del tubo (antes de la centrifugación). Ambas partes fueron sometidas a un proceso de enfriamiento y equilibrio de los 35° C a los 5° C en un lapso de dos horas. Pasado el tiempo establecido se obtuvieron 5 pajillas de plástico de 0.5 mL c/u de cada parte, se colocaron en gobeletes de plástico bajo el efecto de los vapores del nitrógeno líquido durante 15 minutos y posteriormente se sumergieron totalmente en el nitrógeno líquido.

Se obtuvieron 15 pajillas de semen centrifugado y 15 de semen sin centrifugar de cada perro, teniendo como total 90 pajillas de semen centrifugado y 90 pajillas de semen sin centrifugar.

Un mes después del proceso las pajillas se descongelaron en un baño María a una temperatura de entre 37 y 40° C durante 1 minuto para proceder a la valoración de la motilidad post-descongelación.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza con covariable. La motilidad progresiva no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con semen centrifugado y sin centrifugar, por lo que se concluye que el semen puede ser centrifugado a 800 x g durante 15 minutos sin afectar considerablemente la motilidad espermática. En cuanto a la congelación a -196° C y la posterior descongelación redujo drásticamente la motilidad del semen de perros, por lo que éste no es útil para su aplicación en la inseminación artificial.

INTRODUCCIÓN

Muchos han sido las investigaciones que sobre diferentes aspectos de la reproducción en las especies domésticas se han llevado a cabo con el fin de acrecentar su producción. Contando ya con la invención del microscopio tanto Ham como Leeuwenhoek (1677) observaron el semen y los espermatozoides y los denominaron “animalitos del semen” (Joyce, 1994).

Spallanzani en 1776 fue el primero en observar que al bajar la temperatura disminuye la actividad metabólica del espermatozoide, permitiendo así su almacenamiento (England, 1993).

El primer dato que se recuerda sobre la congelación de células espermáticas ocurre en el año 1897 a partir de las investigaciones de Davenbort, usando para las mismas esperma humano que llegó a congelar a -17° C. Jhanel en 1938 repitió la prueba descendiendo la temperatura de congelación a -79° C y observó que algunas células presentaban motilidad. En 1938 Luyet y Hodrop pusieron en práctica un método de congelación a base de nitrógeno líquido con resultados muy poco satisfactorios (Pérez, 1985).

A partir de la segunda guerra mundial se empezó a tener mayor interés en la especie canina, ya que la crianza del perro se convirtió en un buen negocio y por lo tanto la eficiencia reproductiva adquirió importancia (Lacroix, 1990).

Corresponde el mérito de haber descubierto la principal metodología para la congelación del esperma a los investigadores ingleses Polge y Rowson. El descubrimiento casual de Rowson, Polge, Smith y Parkes, demostrando que el glicerol representaba un protector ideal de los espermatozoides ante el efecto de las bajas temperaturas, abrió un porvenir insospechado a las técnicas de congelación de productos biológicos, naciendo así la “criobiología” (Pérez, 1985).

Stephen Seager en 1969 de la University of Oregon Medical School informó que había obtenido una preñez con semen canino congelado, preparado en pellets sobre hielo seco y luego puesto en nitrógeno líquido (England, 1993; Bonadonna, 1989).

En principio la conservación del espermatozoides del perro, puede hacerse con una gran variedad de conservadores, entre los que se encuentran: la glucosa y yema de huevo, citrato y yema de huevo, leche descremada hervida y yema de huevo, o simplemente leche descremada. La congelación del espermatozoides constituye una técnica muy superior a las antes señaladas, ya que esta intenta conservar a los espermatozoides a largo plazo, fenómeno indispensable en los bancos de espermatozoides. La congelación ha sido utilizada en Inglaterra, Alemania y en muchos otros países de Europa (Payró, 1981).

Los pasos que se requieren para congelar semen que se utilizará en inseminación artificial incluyen: recolección de semen, dilución en un extensor, equilibrio en refrigeración, congelación en volúmenes convenientes, almacenamiento, descongelación e inseminación de la perra durante el punto máximo de su período fértil (Smith, 1984; Concannon y Battista, 1989).

El haber logrado la satisfactoria congelación del semen, significó un enorme avance en el campo de la inseminación y la reproducción, ya que permite la preservación durante tiempo indefinido del semen de animales que tienen alta calidad genética. Por desgracia, el criador aún no tiene la posibilidad de adquirir comercialmente el semen congelado (Joyce, 1994).

Durante muchos años los programas de inseminación artificial se basaron fundamentalmente en el uso de semen no congelado (Hafez, 2002).

Las ventajas de usar semen congelado incluyen dispersión más amplia de los rasgos genéticos deseables, prevención de enfermedades, menor número de sementales en una colonia de investigación, preservación de semen de perros con enfermedades que son modelos de trastornos humanos y eliminación de la necesidad de transportar perras (Edward, 2000; Concannon y Battista, 1989).

Desde el punto de vista biológico, el esperma de perro se caracteriza por una elevada concentración electrolítica, cierta acción tampón y selectiva concentración de azúcares. El problema de su conservación *in vitro* por más de 12 horas radica en la acción marcadamente tóxica de los electrolitos procedentes de la próstata. Es evidente que el eyaculado se encuentra en óptimas condiciones de conservación cuando se eliminan las dos últimas emisiones líquidas (Pérez y Pérez, 1985).

El semen canino es eyaculado en 3 fracciones, la primera y la tercera fracción se origina de la glándula próstata y no son colectados debido a que el fluido prostático a mostrado ser inadecuado para la preservación a 4° C, ya que tiene un efecto detrimental en la congelación del espermatozoide. Normalmente, sólo la segunda fracción que es rica en espermatozoides, es recolectada y usada para la inseminación artificial, pero no siempre es posible evitar la mezcla de las fracciones, ya que la colección de semen en algunos caninos puede ser complicada. (Rota et al., 1995 y Rijsselaere et al., 2002).

Por otra parte, toda técnica de preparación espermática no solamente debe separar espermatozoides viables de espermatozoides viejos y muertos, sino que también debe remover leucocitos, células de línea germinal, masas de residuos citoplasmáticos y plasma seminal. Un método ideal de separación es el que permite los más grandes números y mayor funcionalidad de

los espermatozoides competentes (por ejemplo estos deben ser capaces de fertilizar al ovocito) al ser recolectados (Moohan y Lindsay, 1995).

Un número de técnicas para la manipulación del semen son generalmente útiles para los espermatozoides frescos, congelados y/o descongelados, esto para aumentar la calidad espermática antes de la aplicación de otras técnicas reproductivas (Valcárcel et al., 1996).

La separación celular puede ser realizada por métodos físicos y utilizando equipo convencional, en base, al peso absoluto de cada estructura celular, es decir en base, a su respuesta a la fuerza de gravedad (Freshney, 1987).

Centrifugación

El semen canino es centrifugado para remover el fluido prostático, y es uno de los pasos en el proceso de congelación, de tal manera que el proceso de centrifugación puede dañar al espermatozoide y consecuentemente influenciar su capacidad de fertilización, especialmente después de la criopreservación (Sharma et al., 1997 y Katkov et al., 1998).

Es bien conocido que los espermatozoides de ratón, rata y humano son muy sensibles a las fuerzas de centrifugación ya que podría provocar una considerable pérdida de motilidad (Alvarez, 1993; Sharma, 1997) además de provocar daño estructural en la membrana y el acrosoma. Los espermatozoides equinos y bovinos son menos sensibles a este procedimiento, indicando que la especificidad de especie es muy importante (Coetzee, 1992).

Después de una centrifugación, la motilidad espermática es recobrada de la fracción inferior, mientras los espermatozoides muertos, el plasma seminal, el diluyente y el resto están situados en la fracción superior (Avery y Grevet, 1995; Ortiz Reyes, 1999).

La tendencia en el porcentaje de espermatozoides perdidos en la remoción del supernadante después de la centrifugación, declina con el incremento de la velocidad de centrifugación e incrementa la concentración espermática inicial. La influencia de la velocidad de centrifugación es más marcada en concentraciones espermáticas bajas (Rijsselaere et al., 2002).

López y Papa (1998) compararon los efectos de la centrifugación en los diluyentes glicina y Tris sobre la motilidad y vigor del semen canino. Estos autores verificaron que hubo una interacción positiva entre la centrifugación y la congelación, concluyeron que el grupo centrifugado y congelado en un medio glicina presentó mejores resultados.

El uso limitado de semen congelado en la especie canina, se debe principalmente a los bajos índices de fertilidad presentados (England, 1993). La mayoría de los investigadores han congelado semen canino, utilizando la metodología descrita para otras especies. Esos estudios han demostrado que el semen congelado canino es de baja calidad, con tasas de concepción inferiores a las de otras especies. De acuerdo con Concannon y Battista (1989) y Silva y Verstegen (1995) la baja fertilidad del semen congelado canino se debe principalmente a su baja viabilidad post-descongelación para fertilizar óvulos, la identificación del momento ideal de la ovulación en las hembras y el lugar de depósito del semen en el tracto genital femenino.

La meta final de la preservación de semen es obtener preñeces por inseminación artificial de manera tan eficaz como después de apareamiento natural (Hafez, 2002).

ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Testículos

El desarrollo de los testículos es similar en todas las especies. En el feto, las células germinales primordiales migran a una localización próxima a los riñones. En este estado resulta imposible diferenciar entre un ovario y un testículo. En el momento en que podemos identificarlo como un testículo, tiene lugar el desarrollo del epidídimo y del conducto deferente. Un gubernáculo se desarrolla en el polo caudal del testículo. Este se extiende y mientras lo hace arrastra el testículo hacia el canal inguinal. Una vez que el desplazamiento ha tenido lugar, el gubernáculo degenera y el testículo se sitúa en el escroto donde se localizaba el gubernáculo. En la mayoría de las especies domésticas el descenso testicular es completo en el momento del nacimiento. Los testículos descienden al interior de una bolsa de peritoneo, la túnica vaginal, que se forma en el escroto. En el perro, el descenso de los testículos generalmente se produce en estado fetal, así pues el cachorro nace con los testículos escrotales. Aun así, hay constancia de descensos tardíos (6-8 meses después del nacimiento) (England et al., 2000).

Los testículos son de forma redonda a ovalada, están situados en el escroto con el eje longitudinal oblicuo dirigido dorsocaudalmente. (Figura 1) (Christiansen, 1989).

Los testículos del perro varían de tamaño en relación con el tamaño del animal, pero la media es de 3 x 2 x 1.5 cm. En el perro se ha demostrado una correlación entre la masa corporal y la masa testicular. Los testículos se componen de dos tipos de tejido, los túbulos seminíferos y el tejido intersticial. Los túbulos seminíferos se abren en conductos colectores llamados vasos eferentes los cuales, a su vez, se abren en el epidídimo (England and Harvey et al., 2000).

Epidídimo

Es un conducto muy largo estrechamente enrollado sobre sí mismo para formar una estructura que puede describirse como formada por cabeza, cuerpo y cola. La cabeza del epidídimo se sitúa sobre el borde craneo lateral del testículo y no puede palparse con facilidad, el cuerpo del epidídimo se sitúa sobre la superficie dorso lateral del testículo y no puede ser palpado, la cola del epidídimo se encuentra sobre el polo dorso caudal del testículo; puede palparse fácilmente en el animal normal y aparece como una protuberancia consistente con el tamaño de un “guisante” que no parece ser contigua con el cuerpo. El epidídimo se continúa formando un tubo recto llamado conducto (vaso) deferente (Figura 1) (Allen, 1992).

Conducto deferente

Este conducto transporta espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra, se dirige hacia arriba y penetra en el abdomen con el cordón espermático, en el abdomen lleva una posición craneal con respecto al uréter y vierte al interior de la uretra en la glándula próstata craneal. Los conductos deferentes tienen un diámetro de 1 mm aproximadamente y son rígidos. (Figura 1) (Allen, 1992).

Cordón espermático

Es un conjunto de varios tejidos que va entre el testículo y la pared abdominal. El cordón espermático se compone de:

° Conducto deferente.

° Músculo cremaster. Este músculo procede del oblicuo abdominal interno cerca del anillo inguinal externo y se une a la túnica vaginal a nivel del testículo; puede modificar la distancia entre el testículo y la pared abdominal, regulando así la temperatura del testículo.

° Arteria espermática (testicular). Transporta sangre desde la aorta al testículo y va a través del plexo pampiniforme.

° Vena espermática (testicular). Transporta sangre desde el testículo hasta la vena cava; en el cordón espermático la vena se divide en un complejo de pequeñas venas (el plexo pampiniforme) que rodea a la arteria espermática. La sangre fría que retorna del testículo reduce la temperatura de la sangre arterial para asegurar que el testículo no experimenta un calentamiento excesivo.

° Vasos linfáticos

° Nervios (Allen, 1992; Feldman-Nelson, 2000).

Próstata

La próstata es la única glándula sexual accesoria en el perro. En condiciones normales se localiza cerca del borde craneal de la pelvis, aunque puede ocurrir desplazamiento craneal hacia el abdomen conforme la vejiga se distiende por la presencia de orina. La glándula prostática rodea el cuello de la vejiga, la porción proximal de la uretra y la terminal del conducto deferente. Un tabique medio divide la glándula en dos lóbulos firmes, lisos y de igual tamaño, que suelen palpase a través del recto. En perros grandes sólo es posible palpar el extremo caudal de la próstata. El tamaño y peso de la próstata son variables y dependen de la edad, la raza y el peso corporal del perro. (Figura 1) (Feldman-Nelson, 2000).

Uretra

Este conducto tiene la misión de transportar tanto la orina como el semen hasta el extremo del pene. Se inicia en el cuello de la vejiga y va caudalmente sobre el suelo de la pelvis atravesando la glándula próstata; aquí se abren los conductos deferentes sobre su superficie dorsal. En el límite caudal del isquión la uretra penetra en el pene y va sobre su cara caudoventral penetrando en el surco ventral del hueso peniano (Figura 1) (Allen, 1992).

Pene

El pene consta de dos cuerpos cavernosos distintos. La parte posterior está separada por el tabique medio del pene. Anteriormente un hueso, el *os penis*, llega desde el bulbo del glande hasta casi la extremidad del glande dentro del cual se prolonga mediante una proyección cónica de fibrocartílago de aproximadamente 0.5 cm. de largo. En los perros grandes el *os penis* puede tener una longitud de 10 cm. o más. Las tres cuartas partes caudales son acanaladas para la uretra y su cuerpo esponjoso, y la superficie cóncava dorsolateral se une al tejido eréctil de la *pars longa* del pene. El glande del pene comprende dos partes: el bulbo del glande, constituido por tejido eréctil que rodea por completo el *os penis* y la uretra, y la *pars longa* del pene, compuesta por tejido eréctil que los rodean solo dorsal y lateralmente. (Figura 1) (Christiansen, 1989).

Prepucio

Forma una vaina completa alrededor de la parte anterior del pene, la capa externa es de ordinario integumentario, la capa interna es delgada, de color rojizo y desprovista de glándulas, la capa peneal está firmemente adherida en la porción larga del glande, más laxamente en el bulbo del glande, existen en estas capas numerosos nódulos linfáticos, que son grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Payró, 1981).

Escroto

Es una bolsa de piel cubierta de pelo fino. Abarca la porción comprendida entre la región inguinal y el ano. Su superficie está dividida en dos por una línea media llamada rafé, conteniendo en cada división un testículo (England and Harvey et al., 2000).

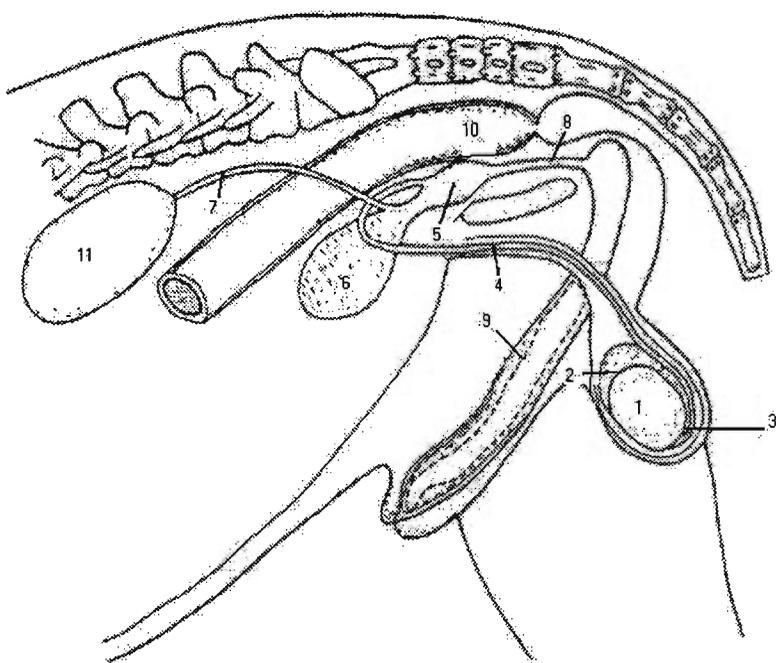


Figura 1. Estructura reproductiva, *in situ*, del perro. 1) Testículos. 2) Cabeza del epidídimo. 3) Cola del epidídimo. 4) Conducto deferente. 5) Glándula prostática. 6) Vejiga. 7) Uréter. 8) Uretra. 9) Pene. 10) Recto. 11) Riñón. (Christiansen, 1989).

FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

Los procesos de la espermatogénesis (producción de espermatozoides) y de la esteroidogénesis (secreción de hormonas) están muy relacionados pero se realizan en áreas separadas del testículo. Este hecho se ha denominado “compartimentalización funcional”.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es la suma de transformaciones que finalizan con la formación de espermatozoides a partir de espermatogonias manteniéndose, no obstante, el número de éstas. La espermatogénesis tiene lugar en el compartimento de túbulos seminíferos, que se divide en sección basal y sección adluminal, y contiene dos tipos celulares, las células de Sertoli (células somáticas) y las células germinales.

En el feto macho, las células primordiales se diferencian en gonocitos que padecerán mitosis durante la vida fetal y prepuberal y se diferenciarán a su vez en espermatogonias. El desarrollo de las células germinales es entonces detenido en los túbulos seminíferos hasta el inicio de la pubertad. (Figura 2)(Foote et al., 1972).

Espermatocitogénesis. Inicialmente, las espermatogonias, células madre relativamente indiferenciadas que se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos, se multiplican por mitosis en el compartimento basal de los túbulos seminíferos. La espermatocitogénesis supone la producción cíclica de espermatozoides primarios y el mantenimiento del número de células madre. Además de estas células en proliferación existe una reserva de espermatogonias que no proliferan y son extremadamente resistentes a las agresiones por radiaciones y toxinas, siendo posible que sobrevivan incluso después de un trauma severo en los testículos. El resto del proceso se produce en el compartimento adluminal donde los espermatozoides primarios padecen

meiosis para generar espermaticitos secundarios. Estos últimos sufren una posterior meiosis generando las espermátidas.

Espermiogénesis. La última transformación morfológica se denomina espermiogénesis e implica la diferenciación de las espermátidas esféricas en espermátidas maduras, que se liberarán al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides.

Como la espermatogénesis se compone de todos estos diferentes estadios, los gametos en desarrollo van migrando desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hacia el lumen.

Espermiación. El proceso que consiste en la liberación de las células germinales al lumen del tubo después de la espermatocitogénesis y espermiogénesis se denomina espermiación. Las células germinales liberadas se consideran ya espermatozoides (England and Harvey et al., 2000).

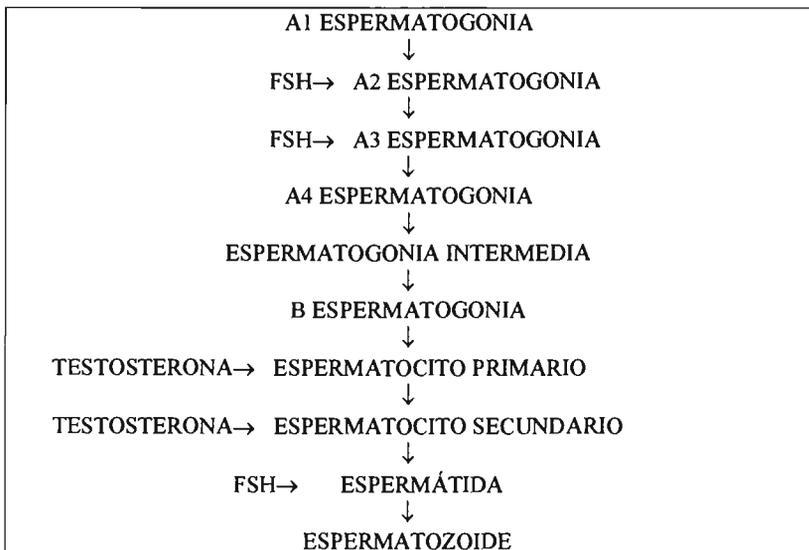


Figura 2. Resumen de la espermatogénesis.

Durante la espermatogénesis las células de Sertoli proporcionan soporte y nutrición, fagocitan los detritus y productos y secretan fluidos lumbales esenciales.

Las células de Leydig tienen también un papel en la espermatogénesis. El compartimento de células intersticiales rodea el compartimento de túbulos seminíferos que, como consecuencia de ello, queda bañado en un medio rico en testosterona.

En cualquier punto del túbulo seminífero las asociaciones de células germinales de cada tipo aparecen en secuencia. La serie completa de estas asociaciones se denomina ciclo espermatogénico y el intervalo entre cada ciclo, duración del ciclo espermatogénico. Corresponde al período entre dos liberaciones consecutivas de espermatozoides. En el perro este período es de 13.8 días, y se requiere una media de 62 días para la espermatogénesis.

El orden secuencial espacial del desarrollo de las células germinales a lo largo de la longitud de los túbulos seminíferos en cualquier momento dado se conoce como onda espermatogénica. Esta disposición espacial podría servir para permitir una liberación constante de espermatozoides, reducir la competencia por las hormonas y metabolitos en un estadio determinado del desarrollo, disminuir la congestión que de otra forma ocurriría si la espermiación fuese simultánea a lo largo de toda la longitud del túbulo, y generalmente facilita la maduración y transporte del espermatozoide en el interior del túbulo (Foote et al., 1972).

Transporte, maduración y almacenamiento en el epidídimo. Desde los túbulos seminíferos, los espermatozoides pasan a través de la *rete testis* y los vasos eferentes hacia el epidídimo, donde se someten a los últimos estadios de maduración; que son: la capacidad de volverse móviles, los cambios de membrana, la pérdida de la gota citoplasmática. Los espermatozoides maduros se almacenan en la cola del epidídimo, y en el momento de la eyaculación, pasan por

los conductos deferentes y la glándula próstata le añade varias secreciones. Los cambios posteriores del espermatozoide tienen lugar en el tracto femenino, con la capacitación y la reacción acrosómica que posibilitan la fertilización del ovocito (England and Harvey et al., 2000).

El espermatozoide

Estructuralmente el espermatozoide se divide en: cabeza, que contiene el núcleo y el acrosoma con las enzimas acrosómicas; segmento intermedio, que contiene las mitocondrias para el metabolismo del espermatozoide; y la cola, cuyo movimiento flagelar posibilita el desplazamiento del espermatozoide. Los espermatozoides del perro tienen la cabeza aplanada y en forma de espada; son similares a los humanos, a los del toro y los del conejo. En el perro el espermatozoide tiene las siguientes dimensiones (\pm DE) longitud total 68 ± 0.3 micrómetros; longitud de la cabeza 7 ± 0 micrómetros; ancho de la cabeza 5 ± 0 micrómetros; longitud del segmento intermedio 11 ± 0.2 micrómetros; y longitud de la cola 50 ± 0.3 micrómetros. (Figura 3) (Woodall Johnstone, 1988).

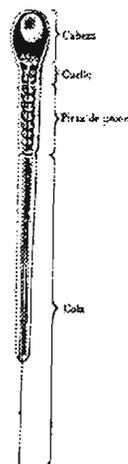


Figura 3. Vista anteroposterior del espermatozoide.

Esteroidogénesis

La síntesis de esteroides se produce en el compartimento de tejido intersticial formado por células de Leydig que mantienen estrechas relaciones con vasos sanguíneos y linfáticos. Las células de Leydig son las únicas células testiculares que poseen receptores para la LH, la cual se une al receptor en la célula de Leydig y, en respuesta, se produce la síntesis de diferentes esteroides incluida la testosterona, esencial para el desarrollo de las características sexuales secundarias, comportamiento normal, función de las glándulas accesorias, producción de espermatozoides y mantenimiento del sistema masculino de conductos. El compartimento de células intersticiales rodea el de los túbulos seminíferos, el cual, por lo tanto, está bañado por un fluido rico en testosterona (Amann, R.P., 1986).

Control de la temperatura

La espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos. Los mecanismos que mantienen los testículos del perro más fríos que el resto del organismo son:

- a) Los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal.
- b) El músculo cremaster puede influir sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo.
- c) El músculo dartos en la pared escrotal puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia, sobre la posición de los testículos.
- d) La disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retorno sanguíneo en el plexo pampiniforme.

Las condiciones que provocan una elevación de la temperatura corporal, por ejemplo fiebre y golpe de calor, pueden no ser compensadas por estos mecanismos y alterar la espermatogénesis (Edward, 1992).

Erección

Durante esta fase tiene lugar la erección completa, que comporta la elongación del glande del pene; el bulbo del glande se mantiene sujeto al hueso peneano, la *pars longa glandis* se desliza por delante del hueso peneano y el bulbo del glande se hincha (requisito para la unión y el acoplamiento del pene en la vulva). La erección se estimula mediante la vista, el olfato y la presencia de una hembra en estro. La erección se produce por estímulos del *nervi erigentes*, compuesto por fibras parasimpáticas que proceden de los nervios pélvicos y sacros. Los impulsos nerviosos provocan la vasodilatación de las arterias pudendas interna y externa del cuerpo cavernoso del pene, mediante la contracción de los músculos isquiocavernosos, y de esta forma queda bloqueado el flujo venoso. La sangre que queda retenida en los sinusoides del tejido cavernoso del bulbo del glande hace que éste se hinche. Las contracciones de los músculos del pene, bulboesponjoso e isquiocavernoso, y las contracciones vulvares durante la fase de unión también incrementan la intensidad de la erección. Durante esta fase se libera la primera fracción del eyaculado (Amann, 1986).

El proceso de erección peneana es en gran parte un evento hemodinámica que involucra la relajación del músculo liso de los cuerpos cavernosos y arteriolas, el resultado es un incremento en el flujo sanguíneo hacia los espacios trabeculares de los cuerpos cavernosos (Vallance, 2003). Los neurotransmisores que juegan un papel importante en la regulación del tono de los cuerpos cavernosos bajo condiciones fisiológicas son noradrenalina (NA), acetilcolina (Ach) y Oxido nítrico (NO). La NA contrae los cuerpos cavernosos por acción en los adrenerorreceptores α ; la Ach relaja los cuerpos cavernosos, estos efectos son bloqueados por inhibición de la Oxido nítrico sintetasa (NOS), sugiriendo que está involucrada una interacción con el sistema NO/GMP cíclico (cGMP) (Taylor, 1998).

El NO es una sustancia lábil sintetizada de la l-arginina por la enzima NOS. Las acciones relajantes del NO en los cuerpos cavernosos son causados por la activación de la guanilataciclase soluble y la subsiguiente producción de cGMP el cual actúa como segundo mensajero, lo que resulta en una disminución del calcio intracelular produciéndose así la relajación del músculo liso. La actividad del cGMP es regulada por la enzima nucleótido fosfodiesterasa cíclica (PDEs) presente en los cuerpos cavernosos (Vallance, 2003).

Eyacuación

Cuando el pene está en erección completa, se libera la segunda fracción del eyaculado que consiste en una secreción rica en espermatozoides. La eyacuación se debe a estímulos de los nervios simpáticos del pene. El semen y el líquido prostático se liberan mediante las contracciones de los músculos que rodean la uretra, en concreto los músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso. Los movimientos pélvicos en general cesan cuando empieza la eyacuación (Allen and England, 1990b).

Control hormonal del aparato reproductor del macho

La fisiología de la reproducción del macho se controla desde el punto de vista endocrinológico por dos gonadotropinas, la hormona luteotrópica (LH) y la hormona estimulante de folículos (FSH), secretadas en la hipófisis anterior. La secreción de gonadotropinas está sometida a un control positivo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que se secreta en forma episódica desde el hipotálamo. La GnRH se une a receptores específicos en la membrana plasmática de las células gonadotropas de la hipófisis y estimula la liberación de LH y FSH. La GnRH está sometida a un control negativo de la testosterona y de sus metabolitos activos estradiol y dihidrotestosterona.

A pesar de esto, las concentraciones de LH y FSH no siempre aumentan de forma proporcional, y por ello se ha propuesto la existencia de un factor inhibidor adicional llamado inhibina, que sería el responsable del control de la secreción de FSH a nivel hipofisiario. Puede también haber otros productos de las células de Sertoli que causen el efecto contrario y estimulen la secreción de FSH (activinas).

La liberación de testosterona se produce a dos niveles, a nivel local y a nivel de circulación general. En circulación periférica la testosterona es importante para el mantenimiento de las características sexuales secundarias, el comportamiento sexual y la retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas, mientras que sus funciones locales en el testículo son relevantes en la espermatogénesis. Las altas concentraciones de testosterona en los testículos se mantienen, en parte, mediante la unión de la testosterona a la proteína ligadora de andrógenos (ABP) que se sintetiza en las células de Sertoli.

La FSH actúa junto con la testosterona endógena sobre los túbulos seminíferos para estimular a las células de Sertoli a mantener las células germinales, lo que favorece la espermatogénesis, en particular el desarrollo de las espermátidas. Las células de Sertoli, y posiblemente las espermátidas en el interior de los túbulos seminíferos, tienen receptores para la FSH. Cuando ésta se une a su receptor, estimula la actividad de la adenilciclase, incrementando la síntesis de proteínas que posiblemente son importantes en la regulación de la espermatogénesis por la ABP y la transferrina, en el mecanismo de feedback de la FSH por la inhibina y, probablemente, en la función de las células de Leydig.

Se cree que la prolactina actúa de forma sinérgica con la LH en la regulación de la producción de testosterona por las células de Leydig, que tienen receptores para la prolactina. Cuando la

espermatogénesis llega al estadio de producción de espermátidas, se produce la síntesis de inhibina para crear la retroalimentación negativa para la secreción de FSH (England, 2000). La actividad y sitio de liberación de cada hormona se pueden consultar en el cuadro 1.

Concentraciones hormonales en el perro

La naturaleza pulsátil de la liberación de LH hace que su medición sea difícil, y una sola muestra resulta virtualmente insignificante. Sólo mediante una serie de muestras se obtiene un perfil que refleja realmente la secreción de esta gonadotropina. Las concentraciones basales en suero de LH en el perro son aproximadamente 1.0 - 1.2 ng / ml, con picos que llegan hasta 3.8 – 10 ng / ml. La testosterona basal se encuentra normalmente entre 1.7 y 5.2 mmol / l (0.5 – 1.5 ng / ml) alcanzando en sus picos los 12.1 – 20.8 mmol / l (3.5 – 6.0 ng / ml). Se han descrito cambios estacionales en las concentraciones de LH y testosterona, y a pesar de que existe una relación entre la secreción de las dos hormonas, los cambios estacionales son independientes (England, 2000).

HORMONA	LUGAR DE LIBERACIÓN	FUNCIÓN
GnRH	Hipotálamo	En la hipófisis anterior para la liberación de LH y FSH
LH	Hipófisis anterior	En las células de Leydig para estimular la síntesis de esteroides
FSH	Hipófisis anterior	En las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis
Testosterona	Células de Leydig	En las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis, feedback negativo en el hipotálamo y en la hipófisis anterior para el control de la liberación de GnRH y gonadotropinas respectivamente.
Inhibina	Células de Sertoli	Feedback negativo en la hipófisis anterior para el control de la liberación de FSH
Activina	Células de Sertoli	Feedback positivo en la hipófisis anterior para el control de la liberación de FSH.
Prolactina	Células de Leydig	Regula la producción de testosterona por las células de Leydig.
Proteína ligadora de andrógenos	Células de sertoli	Aumenta la testosterona en los túbulos seminíferos o en el epidídimo.

Cuadro 1. Las hormonas reproductivas y sus funciones.

CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO

El eyaculado está compuesto por tres porciones que tienen origen anatómico diferente, por lo que sus características son distintas en cuanto a cantidad y composición, siendo estas:

1a. Porción. Es transparente, líquida, no viscosa y se origina en la próstata (Joyce, 1994) no contiene espermatozoides, su emisión dura de 30 a 50 segundos, forma el 2-3% del volumen total (0.1 a 2 mL) Se considera que su función es limpiar de orina la uretra. (Allen, 1992; England and Allen, 1990a; Lacroix, 1990; Wright and Parry, 1989).

2a. Porción. Esta es de color blanco lechoso a grisáceo, contiene espermatozoides que provienen del epidídimo, la duración de su emisión es de 50 a 80 segundos, constituye el 6 a 7% del volumen total, el cual es de 0.1 a 4 mL. (Allen, 1992; Wright and Parry, 1989)

3a. Porción. Es de color transparente, proviene de la próstata, no contiene espermatozoides, duración de 3 a 30 minutos, constituye el 90% del volumen total que es de 1 a 25 mL. (Allen, 1992; Wright and Parry, 1989). Su función se considera que es la de fluir la segunda fracción a través del cervix de la hembra y que la presencia de adrenalina y noradrenalina en esta porción puede sugerir un papel estimulante en el tracto reproductor de la hembra (England and Allen, 1992).

En general el semen es el líquido o suspensión celular semigelatinosa que contiene los gametos masculinos o espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de esta suspensión, formada durante la eyaculación, se llama plasma seminal, su composición se presenta en el cuadro 2 (Hafez, 2000).

AGUA.....	97.560%
Materia seca.....	2.450%
Cenizas.....	0.687%
Materia orgánica.....	1.763%
Proteínas.....	1.259%
Lipoides.....	0.182
Colesterina.....	0.00075%
Varias sustancias orgánicas.....	0.312%

Cuadro 2. Análisis del semen canino según Slow-Kyoff (Payró, 1984).

Análisis bioquímico

CONSTITUYENTE O PROPIEDAD	FRACCIÓN PREESPERMÁTICA	FRACCIÓN ESPERMÁTICA	FLUIDO PROSTÁTICO
Recuento de espermatozoides (10 ⁶ mL.)	-	505± 206 (16)	
pH	-	6.3± 0.2 (17)	6.8± 0.3 (8)
Sodio (mEq/l); fluido centrifugado	145± 6 (5)	122± 8 (5)	156± 11 (5)
Potasio (mEq/l); fluido centrifugado	14.6± 2.1 (5)	12.9± 1.8 (5)	7.0± 3.2 (5)
Magnesio (mEq/l); fluido centrifugado	0.62± 0.20 (5)	0.46± 0.26 (5)	0.17± 0.09 (5)
Calcio (mEq/l); fluido centrifugado	0.63± 0.37 (5)	0.37± 0.07 (5)	0.24± 0.07 (5)
Cloro (mEq/l); fluido centrifugado	141± 2 (4)	125± 3 (4)	148± 4 (4)
Carbohidrato react. Orcinol total (mg %)	97± 52 (20)	341± 109 (20)	189± 67 (20)
Azúcar reducido total (mg%)	14± 7 (5)	9± 11 (10)	4± 2 (6)
Fructosa (mg%)	2 (5)	1 (14)	1 (10)
Acido láctico (mg%)	7± 3 (4)	5± 1 (4)	8± 6 (5)
Acido cítrico (mg%)	3± 4 (5)	4± 2 (5)	1± 0.02 (5)
Proteínas totales (mg%), precip. De etanol	1.3± 0.7 (6)	3.7± 1.4 (16)	2.8± 1.1 (21)
Urea (mg%), fluido centrifugado	68.8± 24.2 (3)	69.4± 25.1 (3)	72.0± 17.3 (3)
Amoniaco(mg%), fluido centrifugado	9.8± 2.1 (3)	14.7± 1.0 (3)	18.6± 5.1 (3)
Fósforo total(mg%), fluido total	17.9± 16.9 (5)	154.6± 34.2 (5)	7.8± 2.8 (5)
Fósforo total(mg%), fluido centrifugado	18.8± 3.2 (4)	92.7± 14.8 (4)	7.8± 2.0 (4)
Fósforo insol. En ácido (mg%) fluido tot.	9.4± 9.8 (4)	53.6± 21.2 (4)	5.5± 1.6 (4)
Fósf. Insol. En ácido (mg%) fluido centr.	1.7± 0.8 (4)	7.8± 0.8 (4)	4.8± 1.3 (4)
Fósf. Lipídico(mg%), fluido total	0.5± 0.4 (4)	5.4± 1.2 (4)	0.2± 0.2 (4)
Fósf. Lipídico(mg%), fluido centrif.	0.4± 0.2 (4)	0.5± 0.2 (4)	0.1± 0.2 (4)
Fósforo inorgánico (mg%)	3.9± 2.4 (4)	6.5± 1.5 (4)	1.6± 0.5 (4)
Fósf. Soluble en ácido (mg%), fluido cent.	16.2± 3.0 (4)	82.3± 22.0 (4)	5.4± 3.9 (4)
Glicerilfosforilcolina (mg%)	5± 6 (5)	176± 31 (8)	20± 9 (8)

Cuadro 3. La composición del semen del perro. (Según wales y white) Los valores promedio ± el desvío estándar están dados con el número de repeticiones entre paréntesis. Excepto para el azúcar reducido, la fructosa, el ácido láctico, la glicerilfosforilcolina y las proteínas totales, los valores se obtuvieron por un análisis de las tres fracciones del mismo eyaculado en cada ocasión. Todas las estimaciones de fósforo en el fluido centrifugado se realizaron en todas las fracciones de los mismos cuatro eyaculados.

Como se observa en el cuadro 3, el sodio es el catión más importante. Tanto en el eyaculado no fraccionado como en las fracciones separadas. El potasio, el magnesio y el calcio se presentan en concentraciones mucho más bajas. El anión más importante es el cloruro, y en todas las fracciones hay una concentración baja de azúcar total reducido, fructosa y ácidos láctico y cítrico. Posterior a la vasectomía se observa una caída significativa del contenido de calcio debido a la ausencia de espermatozoides y fluido testicular (Christiansen, 1989).

Factores que afectan las características del semen

Edad. Los eyaculados iniciales de un perro después de que alcanza la pubertad a menudo contienen espermatozoides anormales y muertos. En los eyaculados subsiguientes, la concentración de espermatozoides aumenta, el número de anormales disminuye y el semen, a la postre, tiene cifras normales de espermatozoides maduros. En la vejez se presenta la degeneración testicular dándose un aumento de espermatozoides inmaduros y anormales con movilidad normal; el eyaculado es escaso y acuoso debido a la reducción en la concentración de espermatozoides, puede haber azoospermia y necrozoospermia (Olar et al., 1983; Hafez, 2000).

Frecuencia de la eyaculación. La frecuencia de la eyaculación tiene un efecto directo sobre el volumen del semen y la concentración de espermatozoides. Se ha demostrado un leve decremento en la cifra espermática total por eyaculado cuando se obtienen muestras una o dos veces por día, en comparación con dos o tres veces por semana. Este decremento es atribuible a una disminución en la reserva de espermatozoides del epidídimo. Cuando se agota ésta, la declinación en la cifra de espermatozoides se estabiliza y las subsecuentes son representativas de la velocidad de producción dentro de los testículos. De este modo aunque la cifra espermática por eyaculado disminuye conforme aumenta el uso, los espermatozoides totales producidos por

semana son relativamente constantes e incluso pueden aumentar con una mayor actividad sexual. La cifra total de espermatozoides por eyaculado puede aumentar después de unos cuantos días de reposo. al parecer porque vuelve a llenarse la reserva del epidídimo. La libido se mantiene normal incluso cuando se hace eyacular a diario a los perros (Olar et al., 1983)

Estación del año. La estación de año puede tener cierto efecto sobre la concentración de espermatozoides por eyaculado, que es mayor en la primavera y las primeras etapas del verano y menor en las etapas tardías del verano y el otoño. Los investigadores han especulado que los cambios en la cifra de espermatozoides pueden vincularse con la fotoperiodicidad, la temperatura ambiental o ambas. Aunque la concentración de espermatozoides fluctuó, el número total por eyaculado se mantuvo normal (es decir, más de 200×10^6) en la mayor parte de los perros. Puede suponerse que el perro normal es fecundo sin importar la temporada o la temperatura ambiental. (Edward and Fieldman, 2000).

Tamaño y enfermedades de la próstata. Se ha sugerido una relación entre el volumen de semen por eyaculado y el tamaño prostático en perros con próstata normal. El volumen de eyaculado del semen recolectado de manera natural aumentó en forma lineal con respecto al tamaño y peso prostáticos. En contraste, los perros con hiperplasia quística de la próstata tenían una disminución notoria del volumen de semen en comparación con aquellos que muestran glándulas prostáticas normales de tamaño comparable (Edward and Fieldman, 2000).

Tamaño testicular. Se ha demostrado que el tamaño del parénquima testicular y, por tanto, las dimensiones de la glándula tienen correlación directa con la producción diaria de espermatozoides (Olar et al., 1983). En un grupo de 11 perros normales a quienes se hizo eyacular diariamente durante dos intervalos de 10 días, la producción promedio fue de $11.7 \pm$

0.5×10^6 espermatozoides por gramo de parénquima testicular. En otro grupo de siete perros normales a quienes se hizo eyacular a diario por dos períodos de 20 días, la producción diaria promedio fue de $16.7 \pm 1.4 \times 10^6$ espermatozoides por gramo de parénquima testicular. Estos datos sugieren que conforme aumenta el peso testicular (tamaño), también lo hace la producción diaria de espermatozoides y, por tanto, el número de éstos por eyaculado (Edward and Fieldman, 2000).

TÉCNICAS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN

Existen diferencias individuales en la forma en que los perros reaccionan ante la recolección de semen. Algunos pueden eyacular en cualquier ambiente, mientras que otros solo lo hacen en lugares familiares, en el hogar, en presencia de su dueño, etc. Ciertos perros tendrán una erección y eyacularán sin el estímulo de una perra en estro, mientras que otros solo lo harán ante la presencia de una perra en estro. Determinados perros no eyacularán en el primer intento, y la recolección también será dificultosa en un perro mimoso. No se aconsejan la conversación fuerte ni las ordenes repetidas: los presentes deben actuar con calma e ignorar por completo la conducta del perro. En ocasiones, se requieren varios intentos antes de la recolección exitosa (Christiansen, 1989).

Para recolectar el semen en caninos se conocen tres métodos:

a) Estimulación manual

Esta técnica es la que se utiliza con mayor frecuencia ya que es sencilla de realizar, es barata, no afecta la calidad y la cantidad del eyaculado y es indolora e inocua para el animal. Puede hacerse de dos formas:

1. En presencia de una perra en celo, con lo cual se favorece la excitación del macho.
2. Sin la utilización de una perra, esto por lo general no es un problema para colectar el semen. Sin embargo, en algunas ocasiones puede ser más difícil la colección que cuando se tiene a la perra.

Se aplica un masaje suave con la mano enguantada sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empieza a aumentar de tamaño, esta es la fase de erección. Posteriormente se descorre el

prepucio para dejar expuesto el pene y el bulbo, posteriormente se gira el pene 180 grados hacia atrás, aplicando estímulos pulsátiles alrededor y por detrás del bulbo peneano con el objeto de simular el abotonamiento que ocurre en una monta natural dando como resultado la excitación del macho. El pene se dirige hacia el embudo de vidrio el cual tiene en la parte inferior un tubo colector, se puede usar un cono de látex en lugar del embudo de vidrio, lo que facilita la recolección y el semen se mantiene húmedo (Lacroix, 1990; Smith, 1989).

b) Vagina artificial

Tiene su fundamento en provocar los mismos estímulos en el aparato genital masculino que la cópula natural, la vagina artificial en este caso sustituye a la perra. Los perros ofrecen una particular fisiología en el acto de la cópula y el mecanismo de eyaculación que consiste en la dilatación del bulbo. El descubrimiento de la vagina artificial, por la cual el coito se obtiene el máximo rendimiento, consta de un tubo cilíndrico de 17 cm. de largo por 7 cm. de diámetro, dentro del cual va otro tubo de goma de 24 cm. de largo por 7 cm. de diámetro; el cilindro externo de la vagina artificial presenta dos orificios, uno para la entrada de agua y otro para la inyección de aire, de tal forma que mediante una pera de goma, se pueda pasar el aire a la cavidad vaginal aumentando así la presión interna, lo que contribuye a la excitación de las zonas erógenas del pene en el momento de la síntesis genital de la cópula (Payró, 1981).

c) Electroeyaculación

El principio en el que se basa este método consiste en estimular eléctricamente por vía rectal a los centros nerviosos que controlan la eyaculación; este estímulo no provoca en el macho respuesta sexual. Sin embargo aún cuando se utiliza en otras especies sin preparativos previos,

en el canino es necesario anestesiar al animal, por lo que en esta especie no se considera práctica ni humana su aplicación (Joyce, 1994).

La eyaculación se consigue mediante un aparato que está integrado por dos electrodos, uno que tiene una forma cilíndrica, se sitúa en el recto a una profundidad de 10 cm. y el otro que tiene forma de pinza, debe ser fijado en la región escrotal; a continuación se hace pasar una corriente de 30 voltios mediante un interruptor, se regula el paso de aquella a un intervalo de 3 a 5 segundos y de excitaciones que irán separadas entre 9 y 10 segundos, después de tres excitaciones. se obtiene la descarga eyaculatoria, que por lo general es completa (Payró, 1981).

Motivos de fracaso en la obtención de una muestra de semen

Aunque hay numerosos motivos para que fracase la obtención de una muestra adecuada de semen, los más frecuentes incluyen una técnica deficiente de recolección, un macho con nerviosismo o agitación inusual, interferencia por parte del propietario y anomalías en el macho. Los errores comunes en la técnica incluyen falta de exposición del glande, momento inadecuado de exteriorización del pene, fuerza o presión excesivas sobre el pene, uso de dispositivos de recolección fríos y contacto con el pene. Con la práctica es posible resolver la mayor parte de estos problemas técnicos. Otro motivo frecuente de fracaso es colocar al perro en un ambiente no familiar, como el hospital veterinario. No es raro que los machos no muestren interés sexual, incluso ante una perra en estro, cuando se acaban de colocar en un ambiente atemorizante. Dejar al perro en un ambiente nuevo durante unas cuantas horas a menudo alivia el temor. Cuando se intenta recolectar una muestra de semen, es necesario evitar todas las distracciones posibles. El cuarto de recolección debe estar tranquilo y contar con un piso adecuado para que el macho pueda tener tracción. Sólo deben encontrarse en cuarto aquellas personas absolutamente

necesarias para la recolección. Hay que evitar las aglomeraciones, la plática excesiva, las risas y las fotografías con flash. Deben estar presentes los propietarios del macho, no es raro que éste se rehúse a participar si no está presente una persona conocida. Algunos machos solo pueden ser objeto de recolección por sus propietarios, otros solamente eyaculan en su casa y un pequeño número no puede ser objeto de recolección seminal en presencia de su dueño.

Un problema reproductor subyacente puede evitar la recolección de una muestra de semen. Esto ocurre más a menudo en perros con libido escasa, dolor (por ejemplo, orquitis o prostatitis aguda, artritis degenerativa) o anomalías conductuales adquiridas por una experiencia sexual negativa previa (Feldman and Nelson, 2000).

EVALUACIÓN DEL EYACULADO

El análisis del semen es necesario para evaluar la calidad de un semental. El espermatozoide o gameto masculino es una célula sensible a los cambios de temperatura y a la exposición a la luz, por lo que se debe trabajar en forma cuidadosa en la extracción y manejo del semen para evitar el daño o la muerte de los espermatozoides. La evaluación debe ser macroscópica y microscópica (Sorribas, 1999).

Evaluación Macroscópica

Volumen. El volumen de semen obtenido es muy variable y depende de la edad, la talla, la frecuencia del procedimiento y la cantidad de líquido prostático recolectado del perro. El volumen normal puede variar de 1 a 40 ml. por eyaculado. Es importante recolectar toda la fracción rica en espermatozoides (segunda) cuando se estudia el semen del perro. El volumen no está relacionado con la fertilidad del animal (Feldman and Nelson, 2000; Sorribas, 1999).

Color. La tonalidad del color del eyaculado resulta de la mezcla del color correspondiente de cada una de las fracciones líquidas que lo integran, las secreciones provenientes de las glándulas paragenitales son transparentes y sin color, mientras que la fracción espermática es de color grisáceo. Existen variaciones en el tono de color relacionados con el régimen alimenticio al que han sido sometidos los sementales, la segunda emisión, o sea la prostática es de color gris amarillento y por lo que respecta a la emisión espermática de origen testicular es de color blanco en tonalidad mate, la intensidad de ese tono siempre está muy relacionado con el contenido de espermatozoides de la eyaculación (Payró, 1981).

Por lo general, el semen de perro es blanco a opalescente y opaco. La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un semen claro e incoloro sugiere azoospermia. Se encuentra un tinte amarillo por contaminación con orina o pus. Un tinte verde, con o sin cúmulos, coágulos o escamas, sugiere pus e infección en el aparato reproductor. Un tinte rojo sugiere la presencia de sangre, que suele provenir de la próstata o de un pene traumatizado y lleno. La hemorragia no necesariamente indica enfermedad, algunos perros que experimentan anticipación sexual prolongada antes de que se les permita copular pueden tener hemorragia transitoria hacia el semen a partir de la próstata (Feldman and Nelson, 2000).

En algunas razas como el Doberman Pinscher, Pastor Alemán, Schnauzer Miniatura y Cobrador Dorado es frecuente ver sangre en el eyaculado, que puede deberse a fallas de la coagulación del factor XVIII (enfermedad de Von Willebrand) (Feldman, 1987).

Olor. El eyaculado del perro tiene un olor típico de su especie tomando en cuenta que gran parte de este olor procede de las glándulas prepuciales, del saco prepucial y sobre todo de las glándulas perianales, por lo que el esperma del perro tiene un olor muy intenso, el cual también está relacionado con el régimen alimenticio (Payró, 1981).

Densidad. La densidad del eyaculado se refiere a la del líquido que lo integra, que debe estar perfectamente homogeneizado, en el perro la densidad en general es de 1.011 a 1.018, estando relacionado con el volumen (Payro, 1981).

pH. El pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido. Este tiene un rango de pH de 6.0 a 7.4 con una media normal de 6.8. Se cree que la naturaleza alcalina del líquido prostático favorece el aumento de la motilidad espermática y la neutralización del ambiente ácido de la cópula vaginal durante la cópula. Una

disminución en el pH del semen se vincula con una eyaculación incompleta o inflamación de testículos, epidídimos o próstata (Feldman and Nelson, 2000).

Evaluación Microscópica

Motilidad. Este examen mide la motilidad progresiva de los espermatozoides. Debe realizarse inmediatamente después de la recolección del semen para evitar que variaciones de temperatura o de la exposición a la luz puedan alterarla. Se coloca una gota del semen colectado sobre un portaobjetos calentado a temperatura corporal media y se observa bajo microscopio la motilidad de los espermatozoides. De ella depende su capacidad para alcanzar el óvulo y fecundarlo. Un semen normal debe tener como mínimo un 70% de movimiento progresivo. La presencia de orina, pus, sangre, variaciones de temperatura, desinfectantes o lubricantes altera la motilidad espermática (Sorribas, 1999).

Morfología. La valoración de la morfología espermática debe concluirse al microscopio mediante inmersión en aceite. Se valoran los espermatozoides individuales en cuanto a anomalías que ocurren en la cabeza, la pieza media y la cola. Estas anomalías pueden subclasificarse en primarias y secundarias (Cuadro 4). Se cree que las anomalías primarias representan alteraciones de la espermatogénesis, en tanto que las anomalías secundarias son inespecíficas y pueden ocurrir durante el tránsito por el sistema de conductos (es decir, dentro del epidídimo), durante el manejo del semen o después de infecciones, traumatismos o fiebre. Sólo se contabilizan las cabezas libres no las colas. Los machos normales suelen tener más del 70% de espermatozoides con morfología normal (Figura 4) (Edward, 2000).

Anomalías primarias

Cabeza

Todas las desviaciones

Pieza intermedia

Inserciones abaxiales

Duplicación

Delgadez, rasgadura

Tumefacción

Gotas citoplasmáticas proximales

Cola

Espiral

Múltiple

Anomalías secundarias

Cabezas o colas normales separadas

Acrosoma separado

Curvatura de la pieza media

Curvatura de la cola

Gota citoplasmática distal

Cuadro 4 . Defectos primarios y secundarios de los espermatozoides en el perro

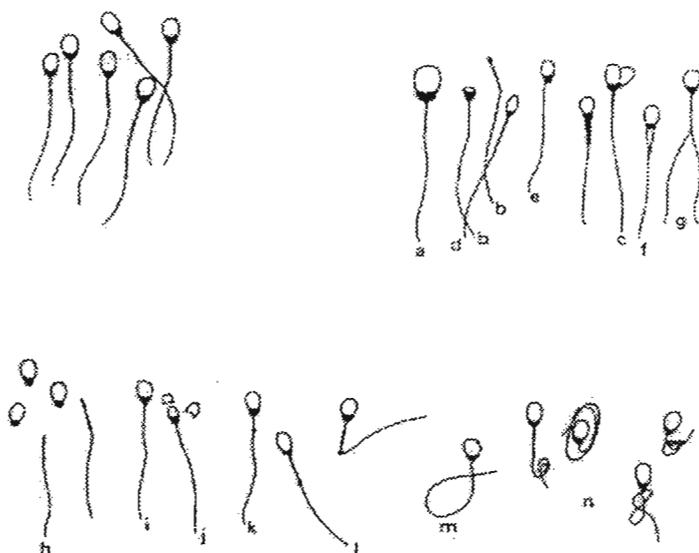


Figura 4. Ejemplos de anomalías espermáticas primarias y secundarias. a) Macrocefalia. b) Microcefalia. c) Cabezas dobles. d) Cabezas puntiagudas. e) Inserción excéntrica. f) Pieza intermedia doble. g) Cola doble. h) Cabezas libres. i) Acrosomas hinchados. j) Acrosomas separados. k) Gotas citoplasmáticas medias. l) Gotas citoplasmáticas distales. m) Cola espiralada. n) Cola rizada (Christiansen, 1989).

Concentración. La concentración es el número de espermatozoides por mL de semen. El número total de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la concentración por el volumen total colectado. Los espermatozoides se cuentan mediante un hemocitómetro. Primero en una pipeta cuentaglóbulos se hace una dilución de formol al 10% de 1:100 ó 1:200, después se llena la cámara del hemocitómetro y se cuentan los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. El hemocitómetro tiene dos cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se dividen entre dos para sacar el promedio y el resultado (No. de espermatozoides) se multiplica por 5×10^6 ó 10^7 según el factor de dilución (1:100 es por 5×10^6 y 1:200 es por 10^7), obteniéndose así la concentración espermática por mL de eyaculado. Por último se multiplica la concentración por mL. por el volumen colectado dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado(Calderón,1984;Feldman,1987).

PRINCIPIOS GENERALES DE CRIOPRESERVACIÓN

El estado líquido del agua es considerado esencial para la estructura y función de células vivas, no es de sorprenderse que su solidificación, durante el proceso de congelación, sea generalmente letal para la célula. Paradójicamente la congelación también puede preservar células por largos períodos de tiempo, y tal vez algún día el almacenamiento por largos períodos de tiempo de tejidos y órganos. La congelación puede ser usada para preservar constituyentes de ultraestructura celular, pero también es usada para el rompimiento de organelos celulares para aislar constituyentes. La congelación puede cesar algunas reacciones bioquímicas y acelerar otras (Mazur, 1984).

Los principios biofísicos que se aplican a la criopreservación de tejidos y células vivas también son válidos para la criopreservación de espermatozoides. Estos últimos pueden ser dañados durante la criopreservación, el descongelamiento o ambos procesos, ya sea por la formación de grandes cristales intracelulares de hielo o por el aumento en la concentración intracelular de solutos y los cambios que resultan de la deshidratación de las células durante la criopreservación (efectos de disolución). Si bien el descongelamiento rápido minimiza el daño por efectos de la disolución, tal proceso hace que se formen grandes cristales de hielo que causan daño mecánico grave. Por otro lado, mientras que el descongelamiento lento impide la formación de grandes cristales de hielo, también provoca mayores daños por efectos de la disolución. De este modo, la rapidez de descongelamiento óptima para un tejido dado depende de su tolerancia relativa al daño por cristales de hielo y a la toxicidad por efectos de disolución. Cuando una suspensión de células se enfría a menos de 0° C, se forman cristales de hielo extracelulares, lo cual hace que los solutos se concentren en el agua líquida restante. La membrana celular actúa como una barrera

que impide la diseminación de los cristales de hielo hacia el interior de los compartimientos intracelulares (Hafez, 2002).

Un proceso de criopreservación representa una interrupción artificial del proceso de maduración del espermatozoide post-eyaculado en una fertilización. El mayor problema con relación a la criopreservación de semen es que aún utilizando las mejores técnicas, el porcentaje de sobrevivencia post-descongelación es de cerca del 50% de la población espermática (Watson, 1995).

De acuerdo con Mazur (1984), los cambios celulares que ocurren durante la congelación no están asociados a su habilidad de sobrevivir a temperaturas muy bajas, más sí en la letalidad de una zona intermedia de temperatura (-15 –60° C) misma por la que pasa la célula en dos ocasiones, una durante la congelación y otra durante la descongelación. Ninguna reacción térmica ocurre en un sistema acuoso a la temperatura del nitrógeno líquido (-196° C) una explicación a esto, es que no existe agua en estado líquido a una temperatura de -130° C, el único estado en el que se encuentra el agua es el sólido en forma de cristales, y en ese estado la viscosidad es alta y la difusión insignificante; por lo tanto a -196° C no hay energía térmica para que se lleven a cabo reacciones químicas (Mc Gee et al., 1962).

La muerte de los zoospermos por la congelación puede radicar en desequilibrios dentro de la misma célula; de modo que con la formación de cristales en su interior (congelación del agua), los electrolitos quedarían libres para desencadenar su acción tóxica. Por otra parte, la congelación de las proteínas daría como consecuencia la floculación del coloide protoplasmático, alterándose al mismo tiempo las estructuras moleculares en la célula, determinándose su inactivación. El problema ha de plantearse en los siguientes términos: las moléculas de agua

tienen una capacidad energética para integrar el estado cristalino solo a temperaturas superiores a -130°C . Por debajo de esta temperatura, las células no disponen de energía suficiente para la vitrificación y, en consecuencia, por debajo de -130°C , el fenómeno no tiene lugar. La congelación, además de un daño físico para los zoospermos, representado por los cristales de agua formados dentro y fuera de la célula, significa la liberación de sales, grasas y una serie de compuestos que ya no podrán integrar la materia viva, desencadenando la muerte o como mínimo, la pérdida de la capacidad fecundante en los zoospermos (Pérez, 1985).

Las únicas reacciones que se pueden llevar a cabo en un sistema acuoso congelado a -196°C son eventos fotofísicos como la formación de radicales libres y la producción de macromoléculas que se fraccionan como resultado directo del impacto de las radiaciones ionizantes. Por lo tanto, la dosis de radiación ionizante requerida para causar daño a las células, llevaría de 2000 a 4000 años para causar este efecto (Watson, 2000).

En definitiva, dos son los métodos que podemos utilizar con el menor peligro posible en la congelación del esperma: a) congelación ultrarrápida y, b) adición de sustancias protectoras. El primer método es interesante teniendo en cuenta que la vitrificación necesita un tiempo para establecerse; de modo que, antes de que se produzca dicho fenómeno, podemos situar el material espermático a -130°C , en cuyo caso las moléculas de agua ya no cuentan con la energía suficiente para formar cristales, evitándose el fenómeno de la vitrificación; si bien esta circunstancia hay que tenerla en cuenta tanto en la congelación como en el deshielo. El segundo método disponible para evitar la acción nociva de la congelación se basa en añadir glicerina, glucosa, sacarosa, etc; en la práctica es particularmente interesante el uso de la glicerina (Pérez, 1985).

Dilución del semen

Independientemente de la especie, el uso de medios diluidores tanto para enfriar como para congelar semen, son de extrema importancia. Un medio diluidor debe presentar:

- 1) Nutrientes que son usados como fuente de energía;
- 2) Tampones que impidan los cambios nocivos de pH;
- 3) Presión osmótica fisiológica y concentración de electrolitos;
- 4) Prevención del crecimiento de bacterias;
- 5) Sustancias protectoras contra el choque térmico o enfriamiento;
- 6) Crioprotectores para reducir los daños por congelación (Concannon y Battista, 1989).

La mayoría de los protocolos de diluyentes son el resultado de modificaciones hechas con éxito, a partir de diluyentes básicos para bovinos (Bateman, 2001).

Los diluyentes básicos utilizados para la congelación de semen, incluyen los siguientes componentes: 1) Agua bidestilada o ultrapura, usada como solvente; 2) sustancias iónicas y no iónicas para manutención de osmolaridad y pH del medio; 3) materiales orgánicos para prevenir o atenuar el choque térmico (yema de huevo); 4) agentes crioprotectores, como el glicerol o DMSO; 5) Azúcares simples, como fuente de energía y di o trisacáridos, como crioprotectores adicionales; 6) aditivos como enzimas, detergentes y aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad; 7) antibióticos para controlar el crecimiento microbiano (Salisbury et al., 1978).

El uso de una amplia variedad de medios diluyentes para la congelación de semen canino han sido citados. La composición correcta del medio diluyente es vital para la criopreservación del semen y debe ser determinada para cada especie. Foote (1964) y Foote y Leonard (1964) fueron

los primeros en investigar sistemáticamente la combinación y la cantidad de varios componentes de los diluyentes para la criopreservación del semen canino.

Yema de huevo. La yema de huevo, especialmente los fosfolípidos que son fracciones lipoproteicas de baja densidad han mostrado ser protectores de membrana al choque térmico. Los mecanismos de protección de la yema de huevo están relacionados a su acción en la superficie de la membrana plasmática induciendo posiblemente una alteración no permanente en la composición de la membrana; también previene el rompimiento de ésta (Watson, 1990; Parks y Graham, 1992; England, 1993).

Una gran variedad de información sobre la concentración de yema de huevo es descrita en la preservación de semen canino. Foote y Leonard (1964), reportaron el uso de diluyentes con 20% de yema de huevo, este porcentaje ha sido el usado por otros investigadores con buenos resultados (Fontbonne y Badinand, 1993; Rodríguez y Martínez et al, 1993; Nothling et al, 1995; Silva et al., 1996).

Una fracción lipoproteica de baja densidad contenida en la yema de huevo está formada por esferas de lipoproteínas que contienen lípidos neutros de tamaño variable, rodeado de una capa de lipoproteína compuesta principalmente de glicoproteínas y fosfolípidos, cuyos grupos hidrófobos se orientan hacia el interior y los grupos hidrófilos hacia la superficie (Evans et al., 1973). Las lipoproteínas de baja densidad se unen firmemente a la membrana espermática (Watson, 1979). Davies (1982) obtuvo mejores tasas de sobrevivencia post-descongelación incluyendo 20% de yema de huevo, frente a 5% (v/v). No encontró diferencias significativas en la motilidad post-descongelación cuando comparó tasas de 10 y de 20% (v/v), los resultados absolutos de la motilidad post-descongelación fueron superiores cuando utilizó un 20%.

Fuente de energía. La mayoría de los extensores utilizados en la criopreservación de semen canino contienen glucosa y fructosa (Silva et al., 1996; Hay et al., 1997; Rota, 1998). Investigaciones hechas sobre el metabolismo energético del semen fresco incubado en glucosa 10mM o fructosa, indicó que la fructosa es más eficiente que la glucosa en la obtención de niveles energéticos. Además, existen indicios que la fructosa posiblemente tenga una relación como factor activador del espermatozoide después de la eyaculación (Rigau et al., 2000).

Tampón. La actividad metabólica del espermatozoide provoca un almacenamiento de iones de hidrógeno, por lo tanto un buffer es necesario para remover esos iones. Sin ese buffer el aumento de los iones de hidrógeno producidos por el metabolismo espermático, causarían un cambio de pH en el medio, con una subsecuente disminución en la longevidad y fertilidad espermática (Smith, 1984).

pH. El pH de la segunda fracción del eyaculado canino es de aproximadamente 6.2 (Rota et al., 1995) y la tercera fracción, o fluido prostático, es ligeramente más básico 6.8. El pH óptimo de un medio diluyente puede ser diferente en cada una de las etapas del procesamiento del semen. Salisbury et al. (1978), observaron que las alteraciones pre-congelación eran menores cuando el pH del diluyente era de 6.5, la menor pérdida de motilidad espermática durante la congelación fue observada con un pH de 7.5.

El pH de las soluciones tamponadas depende de la temperatura que a su vez sufre varias oscilaciones durante el proceso de congelación. Durante el descenso de la temperatura, los diferentes componentes del buffer alcanzan sus respectivos puntos de corte y la solución se va cristalizando (Van Den Berg y Rose, 1959). Algunos investigadores han titulado sus extensores a

un pH de 6.8 (Foote, 1964), 6.7 (Rota et al., 1995), 7.0 (Smith y Graham, 1984), 7.1 (Thomas et al., 1993) y 7.4 (Hay et al., 1997).

Antibióticos. Los eyaculados son estériles, pero su contaminación a partir del prepucio, uretra y pene es inevitable durante el proceso de colección. Esta contaminación puede disminuirse con el uso de técnicas asépticas y medidas de higiene antes y durante la colección. La contaminación bacteriana puede afectar negativamente la fertilidad, pero la propia presencia de bacterias, por la producción de toxinas, por la degradación de componentes del medio, por la utilización de sustratos metabólicos, determina la necesidad de incorporar a los diluyentes sustancias de efectos antimicrobianos (Watson, 1990).

La asociación clásica de penicilina y estreptomina resulta en una preparación antibiótica eficaz y posiblemente la más utilizada en la elaboración de diluyentes seminales (Watson, 1979).

Crioprotector. La adición de glicerol a los medios extensores reduce sustancialmente los daños de la criopreservación, en tanto que, esa adición y su remoción también causan alteraciones a las células espermáticas (Fahy, 1986; Parks y Graham, 1992; Gao et al, 1993 : Watson, 1995; Rota, 1998). El glicerol es osmóticamente activo y su adición temporal causa cambios en el volumen y pérdida de agua de la célula. El glicerol altera las propiedades coagulativas del agua, disminuyendo el punto de congelación proporcionando un tiempo mayor para la salida de agua de la célula antes de la congelación y formación de cristales de hielo, que pueden modificar los organelos intracelulares (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995)

Los crioprotectores incluidos el glicerol, causan inicialmente una deshidratación celular induciendo la salida de agua. Inicialmente se pensaba que el glicerol penetraba lentamente a través de las membranas permeables, por consecuencia, era necesario un tiempo de equilibrio

relativamente largo, para que ese compuesto ejerciera sus efectos antes de la congelación., se postula la idea de que el glicerol penetra la célula rápidamente y un tiempo de equilibrio no es necesario (Watson, 1995).

Desde que Polge et al. (1949) demostraron la eficacia del glicerol como crioprotector universal, ésta sustancia ha sido utilizada ampliamente. Durante el procesamiento del semen ocurren cambios bruscos de agua y del crioprotector en las células espermáticas, siendo posible que ocurran inclusive movimientos similares en cada subcompartimiento celular (Hammerstedt et al., 1990). El movimiento de agua a través de las membranas es influenciado por: la existencia de defectos en la membrana (Verkman y Masur, 1998), la composición lipídica y las preferencias de fase de los distintos lípidos (Carruthers y Melchior, 1988).

Peña et al., (1998), también verificaron que la temperatura de glicerolización no afectó la calidad espermática post-descongelación, por lo tanto, observaron que tanto la motilidad post-descongelación como la integridad del acrosoma, fueron superiores después del uso de un medio diluyente que contenía 8% de glicerol comparado con 2.4 y 6%.

Enfriamiento

Los primeros cambios en la temperatura durante el proceso de criopreservación, esto es, durante el enfriamiento, son conocidos por alterar las propiedades físicas de todas las membranas celulares (Hammerstedt et al., 1990). Hasta ahora no está totalmente esclarecido, pero al parecer hay una reacción de relación lipídico-proteica que provoca la pérdida de la permeabilidad selectiva, que una de las características de las membranas biológicas (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995).

Las proteínas integrales de la membrana se encuentran entre los lípidos, una modificación de los lípidos puede alterar la posición y función de las proteínas, como un canal proteico para iones (Watson, 2000). Por ejemplo, el flujo de calcio a través de la membrana sometida a refrigeración, tiene serias consecuencias para la función celular. La regulación de calcio es esencial para el control de la capacitación (Dragileva et al., 1999, Parrish et al., 1999). Características semejantes a la capacitación (hiperactivación) son observadas en los espermatozoides congelados y descongelados de varias especies (Rota, 1998; Bailey et al., 2000), puede provocar la regulación de calcio en las células sometidas al descenso de temperatura. La prevención de la alteración entre los lípidos y proteínas por tasas de refrigeración más lenta o dilución de células espermáticas en medios extensores pueden ser infructíferas. Cabe la posibilidad de que elementos del citoesqueleto de las células puedan ser sensibles a la fusión desorganizada de las membranas celulares, después de la criopreservación (Watson, 2000).

Varios periodos de refrigeración y equilibrio (de 45 minutos a 5 horas) han sido descritos para los canideos (Fontbonne y Badinand, 1993; Silva et al., 1996). De acuerdo con Watson (1979) y Jasko (1994), antes de la congelación, los espermatozoides deben permanecer un determinado período de tiempo a una temperatura de equilibrio, para que se lleve a cabo la disminución del metabolismo espermático y para que inicien las interacciones con los componentes del medio diluyente antes del estrés por congelamiento, disminuyendo de esa forma los riesgos de un choque térmico.

Congelación

Desde que el crioprotector es adicionado y equilibrado, el semen diluido es envasado y la congelación se inicia. Las tasas de congelación varían de acuerdo a la especie y el método de

almacenamiento. La congelación se inicia hasta disminuir la temperatura de 5 a 15 C°, que corresponde a un super-enfriamiento, definido por el inicio de la formación de cristales de hielo en la solución que rodea a las células, mientras que los componentes celulares permanecen descongelados. Probablemente, los poros de la membrana plasmática son pequeños para la difusión de cristales de hielo, por ese motivo, la formación de cristales de hielo en esa fase son bloqueados (Hammstedt et al., 1990). El agua enfriada intracelularmente, debido a una diferencia en el potencial químico, con el agua extracelular, favorece la salida de agua de la célula que se congela externamente. Como la temperatura continúa disminuyendo, el agua extracelular ya se encuentra congelada, la célula expuesta a condiciones hipertónicas y a altas concentraciones de sales extracelularmente, causando aún más la salida de agua. Los movimientos del agua hacia afuera de la célula disminuyen la posibilidad de formación de cristales de hielo dentro de la célula. Por lo tanto, una tasa de congelación se torna importante en el control de la formación de cristales de hielo intracelular (Mazur, 1984).

Descongelación

Durante la descongelación, los procesos anteriormente mencionados ocurren de forma inversa, el ingreso de agua ocurre al interior de la célula. La descongelación de los cristales de hielo intracelulares (pequeños la mayoría de las veces) presentan una tendencia a agregarse para la formación de cristales de hielo mayores (recristalización). Las células deben, por lo tanto, ser descongeladas de una manera rápida capaz de prevenir la recristalización y las consecuentes alteraciones de membrana, pero no tan rápida de tal manera que el ingreso de agua provoque alteraciones a las membranas celulares. La remoción de los crioprotectores inmediatamente posterior a la descongelación es aconsejada debido a la toxicidad del crioprotector sobre las células espermáticas y la temperatura de descongelación. La remoción del crioprotector también

devuelve a la solución las condiciones isotónicas requeridas para la función espermática (Fahy, 1986).

El beneficio de tasas de congelaciones rápidas o lentas en la calidad espermática canina no está claro. Varios autores han sugerido que la descongelación de semen canino a altas temperaturas con períodos cortos de exposición proporciona mejores resultados de viabilidad y fertilidad; este factor se debe probablemente a la disminución de riesgos de recristalización de microcristales intracelulares que pueden ocurrir durante una descongelación lenta (Olar, 1989; Ivanova-Kicheva et al., 1995; Peña, 1998).

OBJETIVO

Evaluar el efecto del lavado del plasma seminal en el semen fresco de perro por centrifugación, sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides después de la congelación.

MATERIAL Y METODOS

Localización

Este trabajo se realizó en un consultorio veterinario, ubicado en Villa de las Flores, Coacalco. Estado de México y en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en el km 2.5 de la carretera Cuautitlán – Teoloyucan, Estado de México.

Animales

Se utilizaron 6 machos caninos, clínicamente sanos, de entre 2 y 5 años de edad; 4 animales pertenecían a la raza Pastor Alemán, 1 Bull-Terrier y 1 canino de raza indefinida. Se obtuvieron 3 eyaculados por perro.

Preparación del diluyente

Se preparo el diluyente de Andersen (Sorribas, 1999)

TRIS (hidrximetil-metilamina)	2.9 g
Fructosa.....	1.25 g
Ácido cítrico.....	1.32 g
Agua destilada.....	100 ml
Glicerol.....	8%
Yema de huevo.....	20% v/v
Sulfato de estreptomícina.....	100 mg
Bencilpenicilina sódica cristalina.....	100,000 UI

La solución base de TRIS con glicerol se preparó en una probeta y se almacenó en tubos para congelarse. cada tubo contenía 8 mL. Justo antes de cada recolección de semen la solución se descongeló a una temperatura de 37 ° C., por otro lado una yema de huevo se separó de la clara y se colocó en un vaso de precipitado donde se removió vigorosamente con un bastoncillo de

número de cabezas de espermatozoides que se unen a los glóbulos de la yema de huevo. A continuación se agregó un 20% de yema de huevo (2 mL) al tubo que contenía la solución de TRIS, la cual se homogenizó bien y se calentó de igual forma a 37° C. (England and Harvey, 2000).

Recolección del semen

El semen fue recolectado en el hogar del propietario del perro. El eyaculado fue colectado por estimulación manual sin presencia de una hembra en estro, según la técnica descrita por Lacroix (1990). El semen se recolectó por medio de la técnica manual aplicando un masaje suave con la mano enguantada sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empezó a aumentar de tamaño. posteriormente se descorrió el prepucio para dejar expuesto el pene y el bulbo, se giró el pene 180 grados hacia atrás, aplicando estímulos pulsátiles alrededor y por detrás del bulbo peneano con el objeto de simular el abotonamiento que ocurre en una monta natural, el pene se dirigió hacia el recipiente colector tomándose la segunda fracción rica en espermatozoides.

Evaluación de motilidad

Para determinar la motilidad se realizó una dilución isotónica conteniendo 2.9 g de citrato de sodio y aforando con agua destilada a 100 ml en una probeta graduada, teniendo así una solución al 2.9%.

Posteriormente se tomó una muestra del eyaculado de 0.1 mL y se agregó a un tubo de ensayo con 9.9 mL de la solución de citrato de sodio al 2.9%, teniendo así un volumen total de 10 mL. Estos tubos fueron mantenidos a una temperatura de 37 C en baño maría, con la finalidad de evitar el choque térmico. De estos tubos se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos tibio

que se encontraba en una platina térmica; posteriormente se evaluó esta muestra al microscopio en un aumento de 10x, expresando el resultado en porcentaje utilizando múltiplos de 10.

Evaluación de morfología

Utilizando espermatozoides fijados y teñidos se realizó un frotis, el cual fue examinado al microscopio con objetivo de 100 aumentos. Se examinaron 100 espermatozoides que se clasificaron como: espermatozoides normales; espermatozoides con anomalías primarias y espermatozoides con anomalías secundarias (England, 1993)

Procesamiento del semen

Después de obtener el eyaculado, fue dividido en dos partes iguales y estas fueron colocadas en dos tubos de ensayo.

El contenido del primer tubo fue diluido con el diluyente de Andersen en una proporción de 1:1. El contenido del segundo tubo fue centrifugado a 800 x g durante 15 minutos, al cual posteriormente le fue retirado el sobrenadante y el paquete de espermatozoides fue diluido con el diluyente de Andersen en proporción de 1:1 de acuerdo a la cantidad inicial del eyaculado (antes de la centrifugación).

Enfriamiento y equilibrado

Después de la dilución, se introdujeron ambos tubos en un vaso de precipitados con agua a 35° C, a continuación se colocó el vaso de precipitados en una nevera a 5° C durante 2 horas. En este

tiempo el semen se enfrió hasta los 5° C y el glicerol penetró a través de la membrana del espermatozoide (England, 2000).

Envasado

Pasadas las dos horas en las que se produjeron el enfriamiento y el equilibrado, se removió el semen con suavidad y se colocaron inmediatamente en pajillas de plástico de 0.5 mL (se obtuvieron 5 pajillas de semen sin centrifugar y 5 pajillas de semen centrifugado por eyaculado de cada perro) las cuales se llenaron por aspiración, dejando un espacio de aire para que el semen pueda expandirse sin dañar el envase cuando se congela. Una vez llenas, las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico. Cuando las pajillas estuvieron llenas se colocaron en govelets de plástico bajo el efecto de los vapores del nitrógeno líquido, después de 15 minutos se sumergieron en el nitrógeno líquido a una temperatura de -196° C (England, 2000). Como se obtuvieron tres eyaculados por perro dejando pasar mínimo una semana de tiempo entre obtenciones. al final obtuvimos 15 pajillas de semen centrifugado y 15 de semen sin centrifugar de cada perro, teniendo un total final de 90 pajillas de semen centrifugado y 90 pajillas de semen sin centrifugar, obtenidas de los seis animales.

Descongelación

Un mes después del proceso las pajillas se descongelaron en un baño María a una temperatura de 37 a 40° C durante 1 minuto. La pajilla se cortó por el extremo sellado y se vació el contenido en un tubo de ensayo al cual se le agregó 0.5 mL. de solución de citrato de sodio, y permaneció en baño maría por 10 minutos. Posteriormente se colocó una gota en un portaobjetos previamente calentado para proceder a la valoración de motilidad (England, 2000).

Tratamientos

1. Eyaculado ---- Centrifugación --- Dilución --- Congelación --- descongelación
2. Eyaculado --- Dilución --- Congelación --- descongelación

Análisis de covarianza

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza con covariable (Snedecor y Cochran (1971)), utilizando el programa estadístico SAS con el siguiente modelo:

$$\text{Motilidad Progresiva } ijK = \mu + \text{Tratt} + \text{Perro } j + \beta_1 (V_n - V_{\tilde{n}}) + \beta_2 (C_n - C_{\tilde{n}}) + \beta_3 (MP_n - MP_{\tilde{n}}) + \beta_4 (N_n - N_{\tilde{n}}) + \beta_5 (PrR_n - PrR_{\tilde{n}}) + \beta_6 (S_n - S_{\tilde{n}}) + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = Media poblacional constante.

Tratt = es el efecto del iésimo tratamiento (1,2).

Perro j = es el efecto del iésimo perro analizado como bloque.

$\beta_1 (V_n - V_{\tilde{n}})$ = es el volumen del semen fresco utilizado como covariable.

$\beta_2 (C_n - C_{\tilde{n}})$ = es la concentración del semen fresco utilizado como covariable.

$\beta_3 (MP_n - MP_{\tilde{n}})$ = es la motilidad progresiva del semen fresco utilizada como covariable.

$\beta_4 (N_n - N_{\tilde{n}})$ = son los espermatozoides normales del semen fresco utilizadas como covariable.

$\beta_5 (PrR_n - PrR_{\tilde{n}})$ = son los espermatozoides con anomalías primarias del semen fresco utilizadas como covariable.

$\beta_6 (S_n - S_{\tilde{n}})$ = son los espermatozoides con anomalías secundarias del semen fresco utilizadas como covariable.

ϵ_{ijk} = es el error aleatorio asociado a cada observación

RESULTADOS

En el cuadro 5, aparecen los cuadrados medios del análisis de covarianza y se aprecia que los efectos significativos estuvieron en los siguientes factores: El perro analizado como bloque * ($P < 0.0001$); la covariable de anomalías primarias ** ($P < 0.03$).

Cuadro 5. Cuadrados Medios del Análisis de Covarianza para Semen Canino Congelado en un Diluyente a Base de TRIS con y sin Centrifugación.

Fuente de variación	gl	Cuadrado Medio	F	Probabilidad
Tratamiento	1	25.00	1.13	0.29
Perro (Bloque)	5	225.00	10.13	0.0001*
Volumen seminal (covariable)	1	18.93	0.85	0.36
Concentración espermática (covariable)	1	9.49	0.43	0.51
Motilidad progresiva semen fresco (covariable)	1	66.77	3.01	0.09
Espermatozoides normales (covariable)	1	0.05	0.00	0.96
Anomalías primarias (covariable)	1	117.21	5.28	0.03**
Anomalías secundarias (covariable)	1	1.72	0.08	0.78
Error	23	22.20	-	-

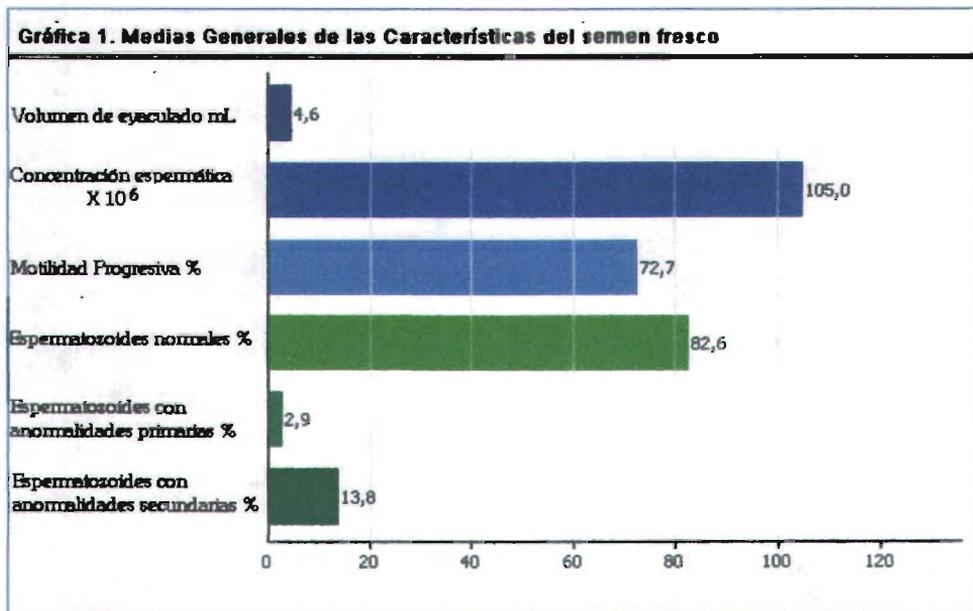
En el cuadro 6, se presentan los promedios para la motilidad progresiva y la recuperación de la motilidad progresiva de los espermatozoides y se observa que no existieron diferencias significativas.

Cuadro 6. Medias Mínimo Cuadráticas para Motilidad Progresiva en Semen de Canino Congelado en un Medio a Base de TRIS.

Tratamiento	Motilidad Progresiva %	Recuperación de Motilidad Progresiva %
Centrifugado	16.66 ± 1.73	23.21 ± 1.56
Sin Centrifugar	15.00 ± 1.73	20.93 ± 1.56

No se encontraron diferencias significativas $P > 0.05$

En la gráfica 1 se representan los valores obtenidos de las medias generales para las características del semen fresco de los caninos utilizados.



DISCUSIÓN

Cada vez es más frecuente el encontrarse en los consultorios pacientes caninos masculinos que llegan para resolverles problemas reproductivos y en muchos de los casos se requiere aplicar técnicas de reproducción asistida, por lo que la centrifugación es un paso común en la manipulación de suspensiones espermáticas. El semen canino es centrifugado para remover el fluido prostático, y es uno de los pasos en el proceso de congelación, de tal manera que el proceso de centrifugación puede dañar al espermatozoide y consecuentemente influenciar su capacidad de fertilización, especialmente después de la criopreservación. (Sharma et al, 1997 y Katkov et al, 1998)

El uso limitado de semen congelado en los caninos, se debe principalmente a los bajos índices de fertilidad presentados (England, 1993). La mayoría de los investigadores han congelado semen canino, utilizando la metodología descrita para otras especies, en el caso de este trabajo se realizó lo mismo con la finalidad de iniciar una línea de trabajo con semen de perro, y se eligió la variable de centrifugación. Esos estudios han demostrado que el semen congelado canino es de baja calidad, con tasas de concepción inferiores a las de otras especies. De acuerdo con Concannon y Battista (1989) y Silva y Verstegen (1996) la baja fertilidad del semen congelado canino se debe principalmente a su baja viabilidad post-descongelación para fertilizar ovocitos, lo cual coincide con lo obtenido en este trabajo. Por lo cual aparte de mejorar la calidad del semen, se requiere mejorar la identificación del momento ideal de la ovulación en las hembras y el lugar de depósito del semen en el tracto genital femenino.

Es bien conocido que los espermatozoides de ratón, rata y humano son muy sensibles a las fuerzas de centrifugación y que este procedimiento podría provocar una considerable pérdida de motilidad (Alvarez et al, 1993 y Sharma et al, 1997) y provocar daño estructural de la membrana

y del acrosoma (Coetzee et al. 1992). El espermatozoide equino y bovino son menos sensibles a este procedimiento, indicando que la especificidad de especie es muy importante con respecto al daño del espermatozoide por centrifugación, en este caso y en base a los resultados obtenidos, se puede decir que los espermatozoides de caninos, se sitúan dentro del grupo de espermatozoides no sensibles a la manipulación (Pickett, 1975 y Rijsselaere et al, 2002).

En el presente trabajo la motilidad progresiva no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con semen centrifugado y sin centrifugar, esto no coincide con López y Papa, (1998) quienes si encontraron mejoría en el semen centrifugado y contrasta con lo reportado por Alvarez et. al.(1993), quién reportó pérdida casi completa de la motilidad del espermatozoide humano 48 horas después de una centrifugación a 600 x g por 8 minutos, el efecto no fue inmediato a la centrifugación, indicando que este procedimiento causó daño subletal, que a menudo provoca una disminución lenta a largo plazo durante la congelación de la proporción de células móviles. Sin embargo aunque los espermatozoides no se murieron en su totalidad con la centrifugación, es evidente que el proceso de congelación los dañó severamente.

Katkov y Mazur,(1998) mencionan que en estudios de centrifugación a 200, 400, 600 y 800 x g por 5, 10 y 15 minutos. valoraron el número de células, el número de células móviles, porcentaje de motilidad y longevidad. La centrifugación a 200 y 400 x g por un tiempo corto (5 min.) causa solo una pérdida pequeña en la motilidad inmediatamente ó 2.5 horas después, pero la centrifugación a 600 y 800 x g por 15 minutos produjo una disminución cinco veces mayor, lo que sugiere que velocidades menores conservan mejor a los espermatozoides. En el presente trabajo se utilizaron 800 x g. durante 15 minutos, lo cual es dañino para las células espermáticas.

La adición de Diluyente TRJS – yema de huevo mejora significativamente la longevidad espermática y el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (Rota et al, 1995). Particularmente la adición de yema de huevo tiene un efecto benéfico en la preservación de motilidad espermática y podría tener efectos de resistencia al estrés (Iguer-ouada, 2001).

La centrifugación debilita la membrana afectando la barrera de permeabilidad (Alvarez et al, 1993). Hasta ahora no está definida una explicación para este efecto, ha sido postulado que el daño al espermatozoide es causado por la exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) , la centrifugación incrementa la formación en semen del ROS de manera que niveles altos de ROS están asociados con el daño a la membrana espermática por causa de peroxidación lipídica espontánea, la cual puede alterar la función espermática, el espermatozoide tiene su principal proceso metabólico para producir energía en la degradación de la fructuosa, lo cual implica un mecanismo bioquímico de anaerobiosis, al liberarse en el medio oxígeno por la centrifugación, el medio se vuelve aeróbico y se modifica la fisiología espermática (Shekarriz et al, 1995; Garner y Hafez. 2002).

CONCLUSIONES

El semen canino puede ser centrifugado a $800 \times g$ (1500 rpm) durante 15 minutos sin afectar considerablemente la motilidad espermática.

La congelación a $-196^{\circ} C$ y la posterior descongelación, redujo drásticamente la motilidad del semen de perros.

El semen canino congelado, redujo su motilidad considerablemente, por lo que éste no es útil para su aplicación en la inseminación artificial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, W. E., and England, G.C.W. (1990a) An investigation in to the origen of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet. Sci.* 49 (1): 66-70.
2. Allen, W. E. and England, G.C.W. (1990b) Reproductive endocrinology of the dog. *Manual of small Animal Endocrinology*, ed. M. Hutchinson. Bsava, Cheltenham, p. 121-126.
3. Allen, W. E. and England, G.C.W. (1992) Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 37 (2): 373-381.
4. Allen, W.E. (1992) *Fertilidad y Obstetricia canina*. Editorial acribia, S.A. Zaragoza, España, by Blackwell Scientific Publications.
5. Alvarez, J.G., Lasso, J. L., Blasco, L., Nuez, R.C., Heer, S. and Caballero P. (1993) Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation procedure without centrifugat extends their motile life. *Reprod.* 8pp 1087-1092.
6. Amann, R.P. (1986) *Reproductive endocrinology and physiology or the dog, in current therapy in theriogenology 2. Diagnosis, treatment and prevention of Reproductive diseases in small and large animals*, Ed. D.A. Morrow, W.B. Saunders, philadelphia, p. 532-538.
7. Avery B. and Grevet M.(1995) Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology.* 44: 871-878.
8. Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cornier, N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v.21, p. 1-7.
9. Bateman, H.L. (2001) *Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival*. Guelp. Thesis (master). University of Guelp.
10. Bonadonna T. (1989) *Reproducción animal e inseminación artificial*. Editorial Hemisferio sur, S.A. Argentina
11. Calderón, Y. A. (1984) *Investigation of dog semen with particular reference to freezing techniques*. Tesis de maestria. Fac. Vet. Med. University of Glasgow, Scotland.
12. Christiansen, B.J. (1989) *Reproducción en el perro y en el gato*. Editorial Inter-Vet. Buenos Aires, Argentina.
13. Carruthers, A. and Melchior, D.L. (1988) Effects of lipid enviroment en membrane transport. The human erythrocyte sugar trasport protein/lipid bilayer sistem. *Am. Rev. Physiol.* v. 50, p. 557-571
14. Coetzee, K., Fran Ken, D.R., Kruger, T.F. and Lombore, C.J. (1992). Effect of multiple centrifugations on the evaluation of the acrosoma reaction in human spermatozoa. *Andrologia* 24 pp. 331-334.

15. Concannon P.W. and Battista M. (1989) Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy*. Philadelphia WB Saunders Co. P 1247
16. Davies, P.R. (1982) *A study of spermatogenesis, rates of sperm-production and methods of preserving the semen of dogs*. PhD. Thesis, University of Sidney, Australia.
17. Dragileva, E., Rubinstein, S., Breitbart, H. (1999) Intracellular Ca²⁺ -Mg²⁺ -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 61, p. 1226-1234.
18. England, G.C.W. (1993) Cryopreservation of dog semen; a review. *Journal of reproduction and Fertility*. Supplement No. 47 p. 243-255
19. England, G.C.W. and Harvey, M.J. (2000) *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños animales*. H. Arcourt. Madrid España.
20. Evans, R.J., Bauer, D.H., Bandemer, S.L., Veghefi, S.S. and Flegal, C.L. (1973) Structure of egg yolk very lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure. *Archs. Biochem. Biophys.*, v. 154, p. 493-500.
21. Fahy, G.M. (1986) The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. v. 23, p. 1-13.
22. Feldman, E.C. and Nelson, R.W. (1987) *Canine and Feline endocrinology and reproduction*. W.B. Saunders, Philadelphia.
23. Feldman, E. (2000). *Endocrinología y Reproducción en Perros y Gatos*. Segunda edición Mc Graw-Hill Interamericana.
24. Foote, R.H. (1964) Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.* V. 25 p. 32-36.
25. Foote, R.H. and Leonard, E.P. (1964) The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog semen in buffered-yolk extenders. *Cornell Vet.* V. 54, p. 78-89.
26. Foote, R.H., Swierstra, E.E. and Hunt, W.L. (1972) Spermatogenesis in the dog. *Anatomical record*, 173, p. 341-351.
27. Fontbonne, A. and Badinand, F. (1993) Studies on freezing dog spermatozoa, effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, v. 25, p. 32-36.
28. Freshney R. (1987) *Culture of animal cells*. Ed. Willey-Liss. U.S.A.
29. Garner, D.L. and Hafez, E.S.E. (2000). *Spermatozoa and seminal plasma. En. Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincot Williams & Wilkins. U.S.A.:96-
30. Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P. and Crist, J.K. (1993) Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* V. 49, p. 112-123.

31. Hafez, E.S.E. (2002) *Reproducción e inseminación Artificial en animales*. Séptima edición. Editorial Mc-Graw Hill Interamericana. México.
32. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K. and Nolan, J.P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: GAT we ask them to survive. *J. Androl.*, v.11, p. 73-88.
33. Hay, M.A., King, W.A., Gartley, C.J., Leibo, S.P. and Goodrowe, K.L. (1997) Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 51, p. 99-108.
34. Iguer-ouvada, M. and Verstegen, J.P. (2001) Long- term preservation of chilled canine semen: effect of comercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55 pp. 671-684.
35. Ivanova-Kicheva, M.G., Subey, M.S., Bobadov, D.P. and Rouseva, I.A. (1995) Effects of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 563-569.
36. Jasko, D.J. (1994) Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.* 65, v. 10, p. 156-165.
37. Joyce B. H. (1994) *El maravillosos mundo de los perros*. Segunda edición. Editorial trillas.
38. Katkov and Mazur P. (1998). Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *J. Androl.* 19. pp. 232-242.
39. Lacroix, E.C.F. (1990) *Inseminación Artificial en caninos*. Estudio recapitulativo. Tesis de Licenciatura. México, Med.Vet Zoot. UNAM.
40. Lopes, M.D. and Papa, F.O. (1998) Effects of different diluents and method of centrifugation for canine semen congelation. In: *Congress of the world small animal veterinary association*, v. 23, Buenos Aires, p. 799.
41. Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiology.* v. 247, p. 125-142.
42. Mc Gee, H.A. and Martin, W.J. (1962) *Cryochemistry Cryogenics*, v.2, p. 1-11.
43. Moohan J.M. and Lindsay K.S. (1995): Spermatozoa selected by a discontinuos percoll density gradients exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swin-up. *Fertil steril* 64: 160-165.
44. Nöthling, J.O. and Volkmann, D.H. (1995) Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* v. 66, p. 49-55.
45. Olar, T.T., Bowen, R. A. and Pickett, B. W. (1989) Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 31, p. 451-461.

46. Ortiz R. J.L. y Reyes Maldonado S. (1999) *Efecto de la separación de espermatozoides a través de gradientes de percoll antes y después de la congelación, sobre la motilidad progresiva y la morfología espermática de semen caprino*. Tesis de Licenciatura. México. FES Cuautitlán. UNAM.
47. Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222.
48. Parrish, J.J., Susku-Parrish, J.L. and Graham, J.K. (1999) In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. *Theriogenology*, v.51, p. 461-472.
49. Parry, W. and Wright, P.J. (1989) Cytology of the canine reproductive system. *Vet. Clin. North. Ame: Small ani. Pract.* 19(5): 851-873.
50. Payró J. L. (1981) *El perro y su mundo. Tratados de zootecnia canina*. Loera Chávez Hermanos. Compañía editorial, S.A. México.
51. Peña, A.I. Barrio, F., Quintela, L.A. and Herradon, P.G. (1998) Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog semen longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, v.50, p. 163-174.
52. Pérez F. (1985) *Reproducción animal: Inseminación Artificial y Trasplante de embriones*. Editorial científico-Médica. Barcelona, España.
53. Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Byers, M.S., Pace, M.M. and Remmenga, E.E. (1975). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fert. Steril.* 26 2 pp. 107-173.
54. Rigau, T., Camprubi, M., Badia, J., Ballester, J., Jesús Palomo, M., Rivera, M., Izquierdo, D., Peña, A. and Rodríguez-Gil, J.E. (2000) Different effects of glucose and fructose on energy metabolism in dog sperm from fresh ejaculates. In: *Intern study of reproduction*, p. 24.
55. Rijsselaere, A., Van Soom, D. Maes and A de Kruif, (2002). Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. Volume 57, Issue 6 Pages 1669-1681.
56. Rodríguez-Martínez, H., Ekwall, H. and Linde-Forsberg, C. (1993) Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 47, p. 279-285.
57. Rota, B Strom and C. Lind- Forsberg (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44 pp. 885-900.
58. Rota, A. (1998) *Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa*. Thesis (Doctoral)-Uppsala Sweden. SLU Service/Reprod. p. 1-42.
59. Salisbury, G.W., Vandemark, N.L. and Lodge, J.R. (1978) *Physiology of Reproduction and artificial Insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa*. Freeman and Company. 2 Ed. San Francisco, p. 494-554.

60. Sharma, R.K., Vemulapalli, S., Khon and Agarwal, S. (1997). Effect of speed centrifuge, refrigeration medium, and sperm washing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. *Arch. Androl.* 39 pp. 33-38.
61. Shekarriz, M., De Wire, D.M., Thomas, A.J. Jr. and Agarwal, A. (1995). A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol.* 28 1 pp. 31-35.
62. Silva, L.D.M., Onclin, K. Lejeune, B. and Verstegeem, J.P. (1996) Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* v. 138, p. 154-157.
63. Smith, F.O. (1984). Update on freezing canine semen. Proceedings of the *annual Society for theriogenology.* Denver p.61.
64. Smith, F.O. and Graham, E.F. (1984) Cryopreservation of canine semen: Techniques and performance, In: *International Congress Animal Reproduction*, Champaign-Urbana, v. 2, p. 216.
65. Snedecor, W.G. y Cochran, G.W. (1971). *Métodos Estadísticos.* Compañía Editorial Continental. México, D.F.
66. Sorribas, C. E. (1999) *Reproducción de animales pequeños.* 2ª. Edición. Editorial Interamericana, S.A.
67. Taylor M.(1988) Review. *Endogenous neurotransmitters mediating penile erection.* Volume 8I Issue 3 page 424.
68. Thomas, P.G.A., Larsen, R.E., Burns, J.M. and Hahn, C.N. (1993) A comparison of three packing techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v. 40, p. 1199-1205.
69. Vallance P. (2003). Nitric Oxide: Therapeutic opportunities. *Fundamental and clinical pharmacology.* volume 17, Issue 1, Page 1-10
70. Valcárcel A., Moses D.F., Pérez L.J. and Baldassarre H. (1996) Comparison between sephadex g-10 and percoll for preparation of normospermic, asthennospermic and frozen/thawed ram semen. *Anim. Reprod.Sci* 41. 215-224.
71. Verkman, A.S. and Masur, S.K.(1988) Very low osmotic water permeability and membrane fluidity in isolated toad bladder granules. *J. Membr. Biol.*, v. 104, p. 241-251.
72. Watson, P.F. (1979) The preservation of semen in mammals. *Rev. Reprod. biol.* v.1, p. 283-350.
73. Watson, P.F. (1990) Artificial Insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G.E. (Ed). *Marshall's physiology of reproduction.* 4 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, v.2, p. 747-869.

74. Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in cryopreservation of sperm and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 7, p. 871-892.
75. Watson, P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reprod. Sci.*, v. 60/61, p. 481-492.
76. Woodall, P.F., and Johnstone, I.P. (1988) Dimensions and allometry of testes, epididymis and spermatozoa in the domestic dog (*canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 82, p. 603-609.