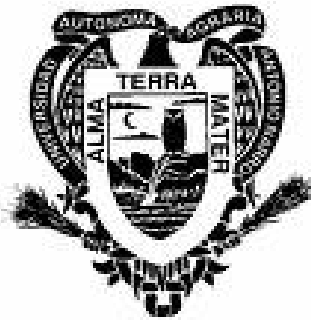


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



CONSERVACIÓN DE SEMEN CANINO

POR:

JOSÉ ALEJANDRO VALDEZ VELÁZQUEZ

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA MÉXICO MARZO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"CONSERVACIÓN DE SEMEN CANINO"

POR:

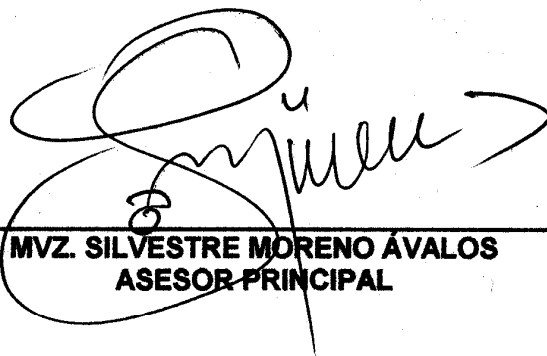
JOSÉ ALEJANDRO VALDEZ VELÁZQUEZ

MONOGRAFÍA

**MONOGRAFÍA DEL C. JOSÉ ALEJANDRO VALDEZ VELÁZQUEZ QUE SE
SOMETERÁ A CONSIDERACIÓN DEL ASESOR COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**


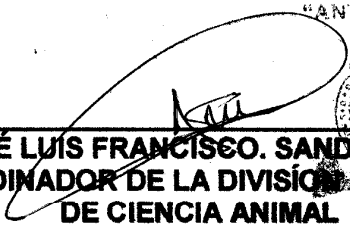
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR:



**MVZ. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
ASESOR PRINCIPAL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA



**MC. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"CONSERVACIÓN DE SEMEN CANINO"

POR:

JOSÉ ALEJANDRO VALDEZ VELÁZQUEZ

MONOGRAFÍA

**QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR:



**MVZ. SILVESTRE MORENO ÁVALOS
ASESOR PRINCIPAL**



**MC. DAVID VILLAREAL REYES
VOCAL**




**MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
VOCAL**



**MVZ. CUAUHTÉMOC FÉLIX ZORRILLA
VOCAL SUPLENTE**



**MC. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**


**COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL**

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Roberto Valdez Santana y Maria Magdalena Velázquez Gonzáles. Gracias ya que a través de su apoyo, confianza y sobre todo a sus consejos he logrado llegar hasta donde hoy me encuentro les debo lo que tengo y lo que soy. Por haberme apoyado en mis decisiones y nunca darme la espalda. Gracias por hacer mi sueño realidad y por ser los mejores padres.

A MIS HERMANOS

Oliva Primavera Valdez Velázquez y Omar Valdez Velázquez. Gracias por que siempre me han estado apoyando, y por los buenos momentos que pasamos juntos y por los que nos faltan.

A MI ESPOSA

Jessica Yazmín Valdes Barbosa Gracias por tu apoyo por tu comprensión y por tus consejos gracias por estar a mi lado y darme fuerzas para seguir adelante, por estar conmigo en las buenas y en las malas y apoyarme en mis metas que me he propuesto.

A MI HIJA

Alexandra Yunuen Valdez Valdes. Gracias por inyectarme tu energía, por darme fuerzas para seguir adelante ya que tú eres la razón por la que nunca me daré por vencido, ya que tu eres mi inspiración.

A MIS TIOS: Francisco Valdez Santana, Leonardo Valdez Santana y Pedro Valdez Santana. Gracias por sus consejos, por brindarme y ofrecerme todo su apoyo en la elaboración de este documento para obtener mi título y por ser los mejores tíos.

“GRACIAS A TODOS”
AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por ponerme en el camino correcto por haberme dado a unos excelentes padres, hermanos esposa y sobre todo hija. Ya que gracias a ellos soy muy feliz gracias por todo.

.

A MI ALMA TERRA MATER:

Por haberme permitido concluir mis estudios y por darme las armas para seguir adelante **U. A. A. A. N. U-L.**

A MI ASESOR:

MVZ. Silvestre Moreno Ávalos por el apoyo brindado en la realización de esta monografía y por ser un excelente maestro y amigo.

A MIS MAESTROS:

Por brindarme sus conocimientos durante el tiempo que permanecí en la Universidad, por sus consejos y por todo lo que hicieron por mí.

AMIS COMPAÑEROS:

Con los cuales compartí buenos y malos momentos y siempre estuvimos juntos por sus consejos y por apoyarme siempre.

“GRACIAS A TODOS”

Resumen.

En la presente monografía se tratan los procedimientos para la conservación de semen canino. Lo que comprende, la anatomía del macho. La evaluación seminal (volumen, color, pH, motilidad, concentración y morfología). Las diferentes técnicas de extracción de semen (manual, vagina artificial, cono látex, electroeyaculador, fármacos y directamente del epidídimo). Los aspectos más importantes de la evolución y desarrollo de la criopreservación de semen en el perro. Esta biotecnología puede ser de moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado) utilizado. La fertilidad del semen criopreservado es inferior a la del semen fresco. Este hecho está relacionado con los daños subletales instaurados en la población espermática que sobrevive al proceso de congelación. Diversos factores (shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico) que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad en el semen congelado.

Palabras clave. Canino Semen espermatozoide diluyente semen congelado semen refrigerado semen fresco TRIS Tipos de recolección seminal

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	1
INDICE DE FIGURAS	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. JUSTIFICACION.....	7
3. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN LA ESPECIE CANINA.....	8
2.1 Testículos.....	8
2.1.1 Epidídimo	9
2.1.2 Cordón espermático.....	10
2.2 Glándulas accesorias	11
2.2.1 Próstata	11
2.2.2 Ampolla	12
2.3 Uretra, Pene y Prepucio.....	12
2.3.1 Uretra.....	12
2.3.2 Pene	12
2.3.3 Prepucio.....	14
3 GAMETOGÉNESIS EN EL PERRO	15
3.1 Espermatogénesis	15
3.2 Espermatocitogénesis	15
3.3 Espermiogénesis	16
3.4 Espermiación	16
3.5 Morfología del espermatozoide.....	16
3.6 Transporte del semen.....	18
3.7 Motilidad	18
3.8 Evaluación de las membranas espermáticas.....	19
4 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN SEMINAL.....	20
4.1 Recogida manual o digital	20
4.2 Vagina artificial	21
4.3 Cono de látex.....	23
4.4.- Electroeyaculador	23
4.5.- Recogida seminal utilizando fármacos.....	24
4.6.- Obtención del semen del epidídimo	24

5.-	CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EN LA ESPECIE CANINA	25
5.1.-	Fracciones espermáticas	25
5.1.1.-	Primera fracción, preespermática o uretral.....	25
S.....		25
5.1.2.-	Segunda fracción o espermática	25
5.1.3.-	Tercera fracción o prostática	25
5.2.-	Características macroscópicas	26
5.2.1.-	Color	26
5.2.2.-	Volumen	26
5.3.-	Características microscópicas.....	26
5.3.1.-	Concentración.....	26
5.3.2.-	Motilidad	28
5.3.3.-	Vitalidad	30
5.3.4.-	Morfología.....	31
5.4.-	Características bioquímicas	31
5.4.1.-	pH	31
5.4.2.-	Osmolaridad	32
6.-	FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES.....	33
6.1.-	Individuo y raza.....	33
6.2.-	Estado de ánimo y ambiente.....	33
6.3.-	Edad.....	34
7.-	DILUCIÓN DE EYACULADOS	35
7.1.-	Composición de los diluyentes	35
7.2.-	Tipos de diluyentes.....	36
8.-	CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO	38
8.1.-	Semen fresco	38
8.2.-	Semen refrigerado.....	38
8.3.-	Semen congelado.....	39
8.4.-	Congelación en nitrógeno líquido	40
8.5.-	Congelación en ultracongeladores.....	41
9.-	DESCONGELACIÓN.....	44
9.1.-	Procedimiento.....	44
9.2.-	Contrastación del semen congelado-descongelado	44

9.3.- Estimulación de la motilidad espermática post-descongelación	45
10.- CONCLUSIONES	47
11.- BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Sistema reproductor del macho.....	9
Figura N° 2 Espermatozoide	17
Figura N° 3 Espermatozoide teñido de color rosa	19
Figura N° 4 Recolección de semen manualmente	20
Figura N° 5 Vagina artificial	22
Figura N° 6 Electroeyaculador	23
Figura N° 7 Espermatozoides vivos y muertos (color rosa)	30
Figura N° 8 Ultracongelador de 152 °C viciación frontal	42
Figura N° 9 Ultracongelador de 152 °C distribución y alojamiento de pajuelas	43

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial han causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. (16)

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie. (12, 15)

La Inseminación Artificial (IA) en caninos es una práctica que brinda grandes beneficios en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede ser de moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado). (17)

La inseminación artificial en caninos ha tenido un auge en las últimas dos décadas especialmente en el área de semen criopreservado, en la cual se han desarrollado diversos protocolos de investigación para estudiar diferentes técnicas de congelación y diluyentes del material seminal. Las inseminaciones realizadas con semen congelado tienen una mayor tasa de preñez cuando el material seminal es depositado intrauterinamente en comparación a la manera tradicional vaginal. (3, 4)

La razón fundamental para que las tasas de preñez sean más bajas es debido a que el semen canino luego de la descongelación presenta una vida útil muy corta. Se han probado muchos diluyentes para realizar el proceso de congelación seminal, siendo uno de los componentes más comunes el tris hidroximetilaminometano (TRIS). A su vez se agregan porcentajes diferentes de glicerol, carbohidratos y otras sustancias para aumentar la vida del semen. (3, 4)

En la actualidad, la crianza de perros es una afición de distribución mundial; consecuentemente, la conservación de semen y la inseminación artificial se han constituido en temas de alta relevancia en la actividad médico veterinaria. Si bien la inseminación artificial en las especies de interés zootécnico representa un instrumento fundamental para la mejora genética, en la especie canina presenta, además, aplicaciones clínicas para solucionar problemas de apareamiento; por lo que la adecuada preservación, con la consiguiente posibilidad de transportar el semen, resultan de gran utilidad. (12)

2. JUSTIFICACION

Esta monografía ha sido escrita con el fin de ayudar a todas esas personas que de una u otra forma están involucradas en el conocimiento de la reproducción en la especie canina.

En la actualidad se sabe muy poco sobre la conservación de semen en caninos ya que no hay información disponible sobre el tema.

Hay por lo menos 6 diferentes formas de obtener el semen de los caninos.

Para que los dueños de caninos agresivos puedan tener crías de sus mascotas sin ningún problema.

Para que los M. V. Z. tengan más información y puedan conservar el semen de caninos campeones.

3. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN LA ESPECIE CANINA

2.1 Testículos

Los testículos representan el órgano reproductivo principal del macho (figura N° 1). Su función es doble, porque además de producir los gametos masculinos (espermatozoides), generan una serie de hormonas esteroideas. La principal diferencia con los órganos genitales femeninos es que todos los gametos potenciales no están presentes desde el nacimiento, sino que las células germinales masculinas sufren continuas divisiones durante toda la vida reproductiva del animal. (8)

En todas las especies animales, con independencia del sexo final del embrión, en el feto las gónadas primitivas migran hasta situarse cerca de los riñones. En este estado es imposible diferenciar un testículo de un ovario, y sólo cuando puede establecerse esta diferenciación es cuando empieza a desarrollarse el epidídimo y el conducto deferente. (8, 18)

En las diferentes especies domésticas está perfectamente establecido que los testículos descienden hasta el escroto a una determinada edad; sin embargo, en la especie canina no hay unanimidad a la hora de determinar cuáles son las condiciones necesarias para que los testículos se sitúen en el escroto. La teoría más ampliamente aceptada es que los testículos atraviesan el canal inguinal alrededor del cuarto día de vida y se localizan en el interior del escroto entre los 10-14 días tras el nacimiento. No obstante, en otros estudios se defiende que el descenso testicular puede completarse durante el estado fetal y prolongarse hasta los 6-8 meses de edad sin que ello represente una patología. (1, 5, 8)

El testículo debe migrar por el canal inguinal hasta el escroto; este fenómeno se produce cuando se desarrolla en el polo caudal del testículo un cordón mesenquimatoso, de apariencia gelatinosa, que se extiende desde la pared inguinal del feto hasta el testículo del lado correspondiente y que recibe el

nombre de *gubernáculum*. Cuando se termina el desplazamiento del testículo, el *gubernáculum* sufre una degeneración. La finalidad de esta migración es depositar al testículo en el interior del escroto envuelto por una bolsa de peritoneo que es la túnica vaginal, para finalmente adquirir una posición intraescrotal normal. (1, 8, 11)

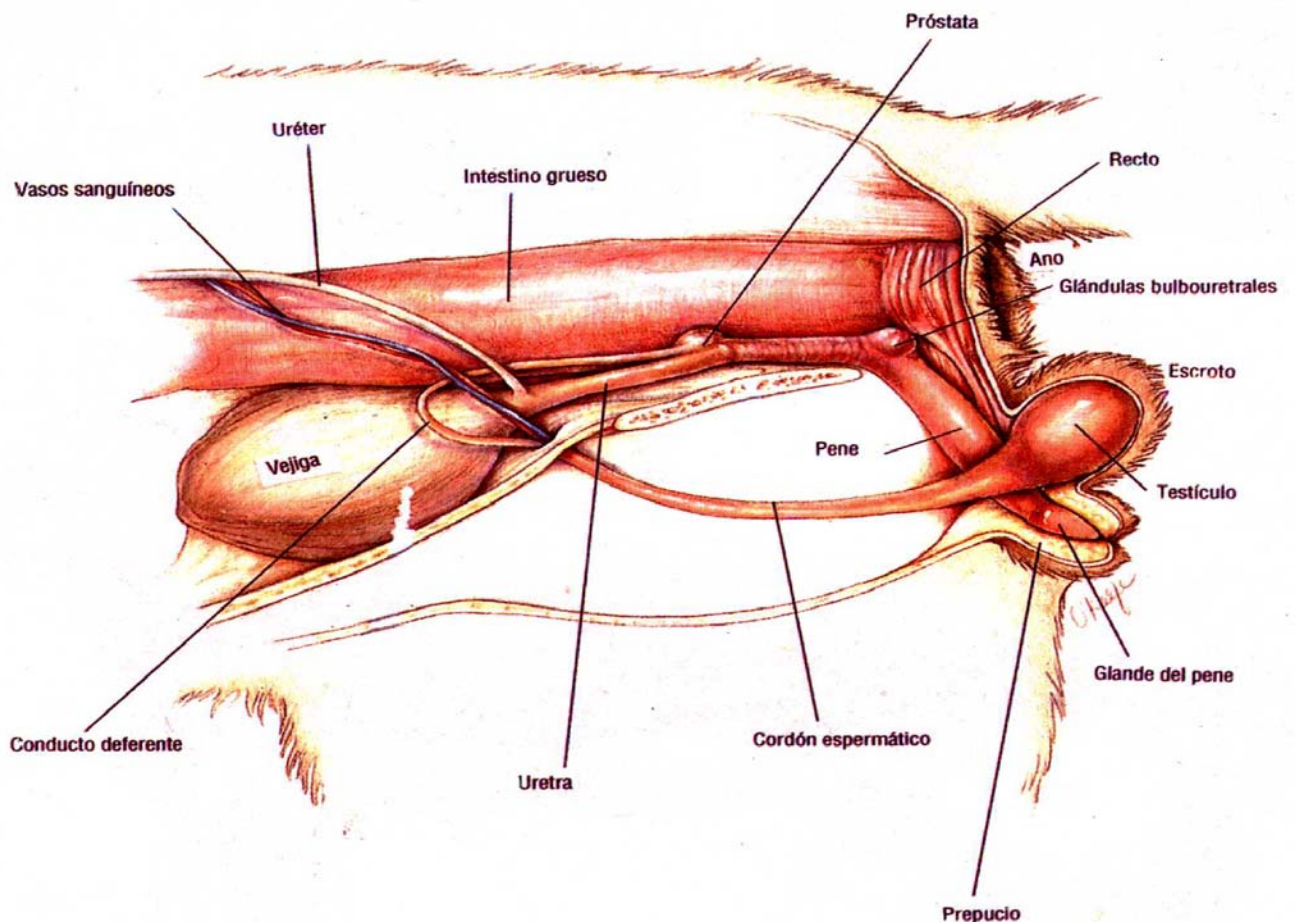


Figura N° 1.- Sistema reproductivo del macho

2.1.1 Epidídimo

Es un conducto de gran longitud que se encuentra fuertemente enrollado sobre sí mismo. Se estructura de tal forma que pueden distinguirse tres porciones perfectamente diferenciadas entre sí: (1)

Cabeza: situada en el borde cráneo-lateral del testículo y difícilmente puede palpase.

Cuerpo: se sitúa sobre la superficie dorso-lateral y tampoco es posible su palpación.

Cola: se localiza sobre el polo dorso-caudal, se palpa fácilmente en un perro sano normal y es una pequeña protuberancia.

La estructura anatómica más relevante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, ya que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que se produce la eyaculación y desemboca en una estructura tubular recta que es el conducto deferente que también cumple funciones de almacenamiento de espermatozoides. (8)

Los espermatozoides maduran a lo largo de su paso por el epidídimo; en la especie canina, este período es de aproximadamente 14 días. (1)

2.1.2 Cordón espermático

Es una estructura que discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por cuatro componentes (figura N° 1): (1, 8)

Conducto deferente: esta estructura discurre por el interior del saco vaginal y se encarga del transporte espermático desde el epidídimo hasta la uretra. Se dirige dorsalmente y penetra en la cavidad abdominal junto con el cordón espermático; a partir de aquí se sitúa cranealmente al uréter y desemboca en la uretra a nivel de la próstata craneal. (1,8)

Músculo cremaster: procede del músculo oblicuo abdominal interno situado cerca del anillo inguinal externo y se une a la túnica vaginal en el testículo. Se encarga de modificar la distancia desde los testículos al abdomen para producir una correcta termorregulación. (1, 8)

Arteria espermática o testicular: discurre a través del plexo pampiniforme y se encarga de transportar sangre desde la aorta hasta el testículo. (1, 8)

Vena espermática o testicular: esta vena se divide en un complejo de pequeñas venas (plexo pampiniforme) en el interior del cordón espermático, rodeando en este nivel a la arteria espermática. Su función es la de garantizar el retorno sanguíneo desde el testículo a la vena cava y secundariamente, como la

sangre que regresa es fría, se garantiza una reducción de la temperatura de la sangre arterial que evita un calentamiento excesivo del testículo. (1, 8)

2.2 Glándulas accesorias

2.2.1 Próstata

Es una glándula simétrica, bilobulada mediante un septo intermedio (figura N°1). Representa la única glándula que anatómicamente es significativa en el perro y se localiza en el borde craneal de la pelvis. La uretra atraviesa completamente la pelvis para llegar a la base del pene, sin embargo, los conductos deferentes únicamente atraviesan una pequeña porción de la glándula antes de penetrar dorsalmente en la uretra. El tamaño prostático es tremendamente variable en función del peso, raza y edad del animal. (1, 8)

En los perros, la próstata es la encargada de producir tanto la primera como la tercera fracción del eyaculado; para un perro de raza mediana, el volumen medio de secreción es de 1-2 ml para la primera fracción y de 2-4 ml la tercera. No obstante, en función de las razas caninas, se describen volúmenes de 0.1-2 ml para la primera fracción y de 1-30 ml para la tercera. (5)

El tiempo que tarda en expulsarse la primera fracción oscila entre 30 segundos y 1 minuto, mientras que la tercera tiene un tiempo de eliminación que varía en torno a los 3-30 minutos, debido a su mayor aportación al eyaculado. (1)

La función de la primera fracción es la de limpiar la uretra de los posibles restos de orina, mientras que la tercera es la encargada de aportar volumen al eyaculado asegurando de esta forma el ascenso de los espermatozoides por la vagina; asimismo, ambas fracciones cumplen una función bactericida. (1)

2.2.2 Ampolla

Aunque no tiene significado anatómico en el perro, cabe destacar que actúa como reservorio de espermatozoides en el conducto deferente antes de desembocar en la uretra. (8)

2.3 Uretra, Pene y Prepucio

2.3.1 Uretra

Es un conducto cuya misión es la de transportar tanto la orina como el semen (figura Nº 1). Se inicia en el cuello de la vejiga urinaria y se dirige caudalmente por el suelo de la pelvis atravesando la próstata; en este nivel, desembocan los conductos deferentes sobre su superficie dorsal. Caudalmente al isquion, la uretra penetra en el pene y discurre sobre su cara caudoventral, introduciéndose por el surco ventral del hueso peneano. (1)

2.3.2 Pene

El pene posee un sustrato vascular de tejido eréctil (cavernoso y esponjoso) (figura Nº 1) que garantiza la erección necesaria para la cópula. Además, también es el responsable de la forma y del grado de desarrollo del órgano genital; concretamente, en el perro presenta una gran cantidad de tejido eréctil. (1, 8, 11) En el pene se distinguen tres porciones bien definidas:

Raíz del pene: es el extremo proximal del pene. Presenta dos pilares que se insertan en la superficie caudal del arco isquiático a cada lado de la sínfisis. Cada uno de los pilares se continúa con un cuerpo cavernoso que rápidamente confluye entre sí para formar el cuerpo del pene. La uretra se localiza centralmente al cuerpo, rodeada por el cuerpo esponjoso del pene que es una continuación del bulbo uretral que se sitúa entre los pilares (11)

Cuerpo del pene: se sitúa entre la convergencia de los pilares y el glande. Su base anatómica son los cuerpos cavernosos. En el perro es corto, cilíndrico y poco aparente debido al escaso desarrollo de los cuerpos cavernosos. (11)

Glande del pene o *glans penis* comienza en la unión con la mucosa prepucial y consta de: (1, 11)

Bulbo peneano: es difícil de observar si no hay erección. Está constituido por tejido esponjoso, siendo una característica de la especie canina que la mayor cantidad de cuerpo esponjoso se encuentre formando parte del bulbo. En el momento de la erección, el bulbo adopta una forma más o menos esférica que se localiza en el cuarto proximal del pene cerca de la región testicular, siendo el responsable del acoplamiento del pene en el interior de la vagina en el momento del coito. (10)

Porción larga del pene: es cilíndrica en todo su trayecto y constituye las tres cuartas partes distales del glande. Termina de forma acuminada en la abertura de la uretra, pero previamente presenta un rudimento de corona.

Hueso peneano: es una osificación del extremo distal del cuerpo cavernoso. Se sitúa en el interior del glande, es ancho proximalmente y más estrecho distalmente, presentando un surco ventral donde se aloja la uretra. Junto al tejido esponjoso que lo rodea, es el que determina el tamaño del glande del pene en el perro. (10)

La erección en el perro, ocurre fundamentalmente por un aumento en la turgencia debido a que existe más entrada que salida de sangre, generando un aumento de la presión dentro del sistema circulatorio peneano. Para que este fenómeno ocurra se genera una vasodilatación arterial por estímulo de los nervios erectores del plexo pélvico y una reducción del drenaje venoso, motivado en parte por la compresión de las venas dorsales del pene entre el arco isquiático y el pene al contraerse los músculos isquiocavernosos. (10)

En el momento de la erección, el pene aumenta de diámetro y de longitud debido a la gran cantidad de tejido eréctil que posee. El bulbo del pene finaliza su erección completa después que la del glande debido a que es necesario la presión que ejercen los músculos de la vulva y la vagina sobre el bulbo del

pene, evitando así que los animales puedan separarse durante el coito hasta que el pene vuelva a ponerse flácido tras la eyaculación. (10)

2.3.3 Prepucio

El prepucio cubre completamente al pene cuando no se encuentra erecto (figura N° 1). Su cara externa se encuentra revestida por la piel e internamente está formado por una mucosa que se continúa con la mucosa del glande peneano o glans penis_(1)

3 GAMETOGENESIS EN EL PERRO

3.1 Espermatogénesis

La gametogénesis comienza ya en el estado fetal donde las células primordiales se diferencian en gonocitos que sufrirán procesos de mitosis tanto durante la vida fetal como en la prepuberal; a este nivel, es cuando se diferenciarán en espermatogonias, momento en el cual se detiene el desarrollo de las células germinales a nivel de los túbulos seminíferos, hasta que comience la pubertad. (1, 8)

El proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos comienza aproximadamente a los 4 meses de edad y dura unas 8 semanas, si bien, la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado no se define hasta los 10-12 meses de edad. No obstante, hay autores que definen que las células de Leydig no completan su maduración hasta los 5 meses, pudiendo encontrar espermatozoides en los túbulos seminíferos sobre los 6-7 meses de edad. (8)

La espermatogénesis se ve alterada cuando la temperatura testicular es muy alta, por lo que se dispone de una serie de estructuras (saco escrotal, músculo cremaster, músculo dartos, vasos sanguíneos en el cordón espermático) que garantizan la temperatura idónea para que este proceso pueda tener lugar, ya que a la temperatura fisiológica del animal es imposible. (1, 8)

3.2 Espermatocitogénesis

Representa la primera fase de la espermatogénesis y consiste en la producción cíclica de espermatoцитos primarios. Aparte de las células en división, hay presente una reserva de espermatogonias en estado de latencia que son extremadamente resistentes a las agresiones por radiaciones y toxinas, pudiendo incluso sobrevivir a traumatismos graves en los testículos. (1,8)

Está descrito que en la especie canina, cada espermatogonia es capaz de producir un total de 64-96 espermatozoides.

Estas espermatogonias, que son las células precursoras de los espermatozoides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y sufren procesos de mitosis para generar los espermaticitos primarios que, posteriormente, sufrirán procesos de meiosis para dar lugar a los espermaticitos secundarios. Finalmente, los espermaticitos secundarios se convertirán en espermátides esféricas que ya contienen la mitad de cromosomas. (1, 8)

3.3 Espermiogénesis

En esta fase, las espermátidas esféricas se transforman en espermátidas maduras que serán liberadas al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides. (1). Para que ocurra la transformación es necesario que ocurra un complejo reagrupamiento de los orgánulos de la espermátidas maduras que darán lugar a los espermatozoides. Básicamente, el núcleo pasa a ser la cabeza, el aparato de Golgi generaría el acrosoma y por último, las mitocondrias y los centriolos darán lugar al desarrollo de la cola. Las células de Sertoli, que se sitúan sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, retienen la mayor parte del citoplasma; de esta forma, participan en la regulación del paso de espermátidas maduras a espermatozoides. (1, 8)

3.4 Espermiación

Esta fase simplemente consiste en la liberación de los espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen. (1, 8)

3.5 Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para desarrollar una única función: fecundar al óvulo (figura N° 2). Presenta a nivel de la cabeza una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y transmitirle así el material genético; por otro lado, la cola posee una maquinaria metabólica encargada de dotar de movimiento al espermatozoide.



Figura N° 2 Espermatzoide

Estructuralmente se diferencian en el espermatozoide: (8)

a) **Cabeza:** en su interior se sitúa el núcleo y recubriendo su polo craneal se encuentra el acrosoma con las enzimas acrosómicas (8). La extensión del núcleo es de un tercio de la longitud total de la cabeza. El acrosoma es un saco membranoso invertido que contiene un complejo lipoglicoprotéico específico que incluye una serie de enzimas, tales como la hialuronidasa y acrosina. La primera de ellas se encarga de degradar los mucopolisacáridos y es posible que provoque la dispersión del cúmulus oóforos del ovocito. En cambio, la segunda facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito. (8)

b) **Segmento o pieza intermedia:** formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice y cuya función es la de garantizar el metabolismo del espermatozoide y asegurar su movilidad. (8)

c) **Cola:** gracias a su movimiento flagelar permite el movimiento del espermatozoide (8).

3.6 Transporte del semen

A su llegada a la cabeza del epidídimo los espermatozoides son inmaduros y símbolo de ello es la gota citoplasmática residual que presentan en el cuello. La maduración ocurre durante el avance a través del cuerpo y la cola del epidídimo. No está claro cómo se produce este avance, parece ser que está propiciado posiblemente por la constante producción de espermatozoides por parte del testículo, aunque otros autores sostienen que es resultado del peristaltismo existente a lo largo del epidídimo. (1, 8)

La maduración es un proceso que dura unas 2 semanas, incluidas dentro de las 8 semanas que dura la espermatogénesis. En el momento en que el espermatozoide penetra en el conducto deferente, la gota citoplasmática se desplaza hacia el extremo distal de la pieza intermedia o bien es expulsada considerándose en este momento al espermatozoide como maduro. (1, 8)

3.7 Motilidad

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la criopreservación. Los espermatozoides necesitan ser motiles y capaces de sufrir hiperactivación para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito cuando ambas células se encuentran en el oviducto. La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. (4, 15)

El sistema de análisis computarizado de semen (CASA, Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. (15)

3.8 Evaluación de las membranas espermáticas

Existen variadas metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Una de estas metodologías está representada por tinciones que permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos (figura N° 3) en base a la permeabilidad de membrana a los colorantes vitales.



Figura N° 3 Espermatozoide teñido de color rosa

La triple tinción utilizando azul tripán, marrón bismark y rosa de bengala permite observar si la membrana plasmática de la célula conserva la permeabilidad selectiva no permitiendo el paso del azul tripán así como también la integridad del acrosoma el cual si está presente en la célula se teñirá con rosa de bengala pudiendo observarse si está íntegro o si está dañado Una prueba sencilla, poco costosa y que posee buena correlación con la capacidad fecundante del semen es la prueba de endósmosis positiva (EP). En esta prueba los espermatozoides son expuestos a una solución hipotónica la cual produce el hinchamiento celular por entrada de agua a la célula, induciendo de esta manera el enrollamiento de la cola de los espermatozoides que poseen membrana plasmática intacta. (4, 15)

4 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN SEMINAL

4.1 Recogida manual o digital

Es el método más utilizado en la especie canina y consiste en la estimulación manual del bulbo del pene (figura N° 4).



Figura N° 4 Recolección de semen manualmente

En la mayoría de los trabajos se recomienda la presencia de una hembra en celo, perfectamente inmovilizada para permitir que el macho olfatee la región vulvar y conseguir una estimulación que facilite la recogida. Cuando no se dispone de esta hembra, muchos autores recomiendan el uso de gasas o algodón impregnados en secreciones vaginales de una hembra en celo, ya que pueden congelarse y descongelarse 15 minutos antes de su uso. En el caso de que tampoco tengamos esta última posibilidad, se puede recurrir a disponer de una hembra sumisa e incluso de un macho castrado y, si fuese posible, se les impregna la cola con secreciones de hembra en celo. Finalmente, si no resulta posible disponer de monturas vivas, se puede llevar a cabo una estimulación manual del bulbo del pene aunque el macho no esté previamente excitado, consiguiendo en machos entrenados que el bulbo se estimule con bastante facilidad aunque no contemos con la presencia de una hembra en celo (1, 3, 4, 5, 9)

En cualquier caso, el procedimiento consiste en estimular el bulbo del pene y una vez que se haya conseguido aumentar su tamaño en un 40-50%, se exterioriza el bulbo fuera del prepucio para garantizar una rotación del pene de 180°. Una vez alcanzado un tamaño suficiente, se realizan sobre el bulbo ligeras contracciones, simulando las que se producen de forma fisiológica en la vagina de la hembra. (3, 9)

La erección del pene se produce porque los impulsos nerviosos generan una dilatación de las arterias pudendas interna y externa del cuerpo cavernoso del pene. La contracción de los músculos isquiouretrales impide el retorno venoso a través de los cuerpos cavernosos. Por lo tanto, la erección ocurre debido a la retención sanguínea que genera el aumento de volumen del bulbo del pene, el alargamiento del glande y el incremento de tamaño de la porción larga del glande alrededor del hueso peneano. (9)

La eyaculación acontece por la estimulación de los nervios simpáticos y, una vez que comienza, se rota el pene en sentido caudal; con esta rotación se consigue, además de simular lo que sucede en una monta natural, una oclusión de la vena emisaria del glande que impide que se genere una disminución de la erección. Se recomienda no realizar la rotación antes de este momento porque se podría generar una detumescencia del pene y por consiguiente una pérdida de la erección. Las tres fracciones del eyaculado se recogen por separado en tubos calibrados de plástico o de cristal a 37 °C. (1, 5, 9)

4.2 Vagina artificial

Está formada básicamente por un cilindro rígido de unos 15 cm de longitud que se encuentra rodeado por una camisa de caucho donde se deposita agua a 40 °C a través de una válvula; en algunos casos también es posible insuflar aire para aumentar la presión (figura N° 5). En un extremo del cilindro se coloca un embudo de caucho que está unido a un tubo colector graduado a 37 °C, que se va cambiando conforme se van recogiendo las diferentes fracciones del eyaculado. (1, 9)



Figura N° 5 Vagina artificial

Aunque es una técnica válida de recogida, en la especie canina hay estudios que han demostrado que la cantidad y la calidad del semen recogido mediante estimulación manual es mucho mejor, además de que es una técnica más complicada de aplicar y que el contacto prolongado del semen con el látex puede resultar tóxico para los espermatozoides e incluso provocar su completa inmovilidad. (1, 9)

Como el látex resulta tóxico, hay autores que recomiendan utilizar guantes de vinilo o incluso polvos de talco que afectan escasamente a la motilidad.

La técnica consiste en introducir el pene dentro de la vagina artificial cuando haya alcanzado más de un 50% de erección. El pene se coloca en el interior de la vagina una vez que está erecto y que se haya exteriorizado el bulbo, colocando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la vagina artificial hasta conseguir la eyaculación. (1, 5, 9)

Es posible retirar el pene sin que se haya eliminado completamente la tercera fracción, pero debe hacerse con cuidado para evitar provocar laceraciones e infecciones. Otra complicación que puede ocurrir es el hecho de que se produzcan quemaduras en el pene debido a agua excesivamente caliente en la vagina. Todos estos inconvenientes pueden provocar un detrimento de la libido para recogidas sucesivas. (5, 9)

4.3 Cono de látex

Es una variante de la técnica anterior, pero en la que solamente se utiliza un embudo o cono de látex al que se encuentra unido un tubo colector graduado a 37 °C cubierto de una envoltura protectora. El cono se sitúa justo encima del bulbo del pene para conseguir una compresión enérgica y provocar así la eyaculación. Este método dificulta la separación de las tres fracciones del eyaculado y, además, el látex puede ser tóxico para los espermatozoides. (1, 9)

4.4.- Electroeyaculador

El equipo está constituido por un electrodo bipolar y una fuente variable de corriente alterna (Figura N° 6). Su funcionamiento consiste en colocar el electrodo en el recto justo encima de las glándulas accesorias y conseguir estimular de esta forma a los nervios que controlan el sistema reproductivo. (1)



Figura N° 6 Electroeyaculador

Generalmente las sesiones constan de tres series de 30-40 estímulos/serie. Los estímulos se aplican siguiendo un patrón de 3 segundos de estímulo seguido de 3 segundos de parada, aumentando el voltaje desde 0-10 voltios, situándose el rango normal entre 2-5 voltios. Este método se cita como una

técnica eficaz para la obtención de semen en cánidos salvajes como el lobo o el zorro, pero no se considera un método óptimo de recogida habitual en perro porque se desconoce hasta que punto afecta a la libido del animal. Sin embargo, en algunos trabajos se ha comprobado que la concentración y la motilidad espermática no difiere entre semen obtenido por estimulación manual y mediante electroeyaculación. (6, 7, 9)

4.5.- Recogida seminal utilizando fármacos

Si bien se ha comprobado que el uso combinado de xilacina e imipramina es capaz de generar una recogida seminal, presenta el inconveniente de ser una eyaculación de tipo pasivo por lo que gran cantidad de espermatozoides pasan a la vejiga urinaria y cuando se eyaculan están muertos, probablemente porque las muestras se contaminan con la orina. (9)

4.6.- Obtención del semen del epidídimo

Se ha descrito que tras una orquidectomía rutinaria, se puede obtener semen a partir del epidídimo. Los testículos se introducen en solución de tampón de fosfato sódico (PBS) a temperatura ambiente; posteriormente se procede a la disección y apertura de la cola del epidídimo y de los conductos deferentes, y finalmente se añade suero salino y soluciones tamponadas a la suspensión espermática para conseguir un volumen y unos nutrientes necesarios para que los espermatozoides puedan moverse. Asimismo, los espermatozoides presentes en el epidídimo pueden obtenerse realizando un lavado y una separación en dos pasos mediante un gradiente de Percoll discontinuo. (8)

5.- CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EN LA ESPECIE CANINA

5.1.- Fracciones espermáticas

En el perro, el eyaculado se divide en tres fracciones bien diferenciadas entre sí, cuya eliminación ocurre progresivamente durante la eyaculación, si bien en animales muy entrenados es posible observar un periodo de latencia entre cada una de las fracciones. Las características de estas tres fracciones son las siguientes:

5.1.1.- Primera fracción, preespermática o uretral

Se elimina de forma muy rápida, oscilando el tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Presenta un aspecto acuoso y transparente, debido a la ausencia de espermatozoides o a su escaso número. En otras especies, es sabido que esta fracción procede de las *glándulas de Littré* que se localizan en la mucosa uretral; sin embargo, la especie canina no presenta estas glándulas por lo que, se deduce que, al igual que la tercera fracción, esta primera procede de la actividad secretora de la próstata. Su función principal se considera que es la eliminación de orina residual y la posible contaminación presente en la uretra (1)

5.1.2.- Segunda fracción o espermática

Su tiempo de emisión oscila entre 1-2 minutos, siendo la fracción rica en espermatozoides. Su aspecto es más o menos denso y su color oscila de blanco lechoso a blanco opalescente en función de la concentración. La procedencia es del epidídimo y de los conductos deferentes. (1, 4)

5.1.3.- Tercera fracción o prostática

Su eliminación se prolonga en el tiempo entre 3-30 minutos. El aspecto que presenta es acuoso, transparente o ligeramente amarillento y no contiene espermatozoides o están presentes en un bajo número. Como su nombre

indica, procede de la próstata y se considera que facilita la ascensión de los espermatozoides en su camino al útero.

En general, los valores totales de un eyaculado normal en perro (valores medios) serían de un volumen entre 4-25 ml, una osmolaridad de 320mOsm y un pH de 6.5-6.6 (1)

5.2.- Características macroscópicas

5.2.1.- Color

Un semen de buena calidad presenta un color blanco lechoso. Si se observara un color amarillento denotaría la presencia de orina, mientras que si es rojo o marrón sería indicativo de presencia de sangre fresca o hemolizada.

Este parámetro se evalúa mediante la observación directa del semen en el tubo graduado (vidrio o plástico) utilizado para la recogida. (5)

5.2.2.- Volumen

Al igual que el parámetro anterior, el volumen del eyaculado se valora mediante observación directa en el tubo colector graduado. (1, 5)

Los valores medios para un perro de raza mediana serían de 1-2 ml para la primera fracción, la segunda presentaría de 1-2 ml y finalmente unos 4-8 ml para la tercera.

Sin embargo, lo más frecuente es que en función de la raza y el perro, se obtengan volúmenes de 0.1-2 ml de primera fracción, 0.2-4 ml para la segunda y 1-30 ml de tercera fracción. (5)

5.3.- Características microscópicas

5.3.1.- Concentración

Para la determinación de la concentración, se toma una muestra de esta dilución y se coloca en un hemocitómetro o cámara de Thoma-Neubauer, para

finalmente observarse en un microscopio óptico a 40x. El número total de espermatozoides se calcula en función de la concentración y el volumen. (1)

En el perro hay descritos valores de concentración que oscilan entre 300-2000 x 10⁶ espermatozoides/ml (esp/ml), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10⁶ esp/ml. Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000 x 10⁶ esp/ml. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco sería de 100 x 10⁶ esp/ml. (5)

La observación de una baja concentración espermática puede deberse a una eyaculación incompleta generada frecuentemente por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos (1). También se puede observar este descenso en la concentración espermática en aquellos individuos tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos; esta situación suele tener carácter transitorio, volviendo el eyaculado a la normalidad 2 meses tras la supresión del tratamiento (1).

Asimismo, se debe tener en cuenta que valores bajos de concentración se deben en muchas ocasiones a que se recoge un excesivo volumen de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal. Además, también es posible observar una disminución de la concentración cuando la eyaculación es incompleta. Es posible también que se presente una baja concentración espermática en aquellos individuos que hayan desarrollado una aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes o que algunas estructuras testiculares se hayan fibrosado como consecuencia de traumatismos o infecciones. (1)

Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal (dermatitis, heridas, infecciones) también genera un descenso de la concentración del eyaculado así como la presencia de inflamaciones como orquitis o epididimitis (5). Otras posibles causas son la presencia de anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc. (1)

5.3.2.- Motilidad

El método tradicional para determinar la motilidad espermática consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubre para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar de forma más o menos precisa el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico con contraste de fases a 200-400 aumentos. Como todo el material debe encontrarse atemperado a 37-39° C, se debe disponer de una placa térmica y el microscopio debe poseer una platina calentadora o una cámara con bulbos de luz incandescente. (2)

En muestras muy concentradas es recomendable realizar una dilución del semen en suero salino o un tampón de TRIS-fructosa. La motilidad puede verse alterada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección. Actualmente, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra. Este sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra. (2)

Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado, refrigerado o capacitado y también determina la concentración espermática. No obstante, presenta una serie de inconvenientes debido a que es necesario diluir las muestras hasta obtener concentraciones de 50-100 x 10⁶ esp/ml y no permite realizar una distinción entre espermatozoides y las partículas de yema de huevo de los diluyentes. Asimismo, es necesario realizar estudios más concienzudos y establecer comparaciones entre laboratorios. (1, 5, 6)

El valor normal de la motilidad del semen fresco en la especie canina oscila entre 85-95%. Se considera que un valor por debajo del 80% de motilidad en semen fresco sería indicativo de una reducción de la fertilidad. No obstante, la

mayoría de los autores considera que un semen presenta una buena motilidad cuando presenta valores entre 70-90%. Cuando el semen ha sido sometido a un procedimiento de refrigeración, se considera que la motilidad puede oscilar entre 20-80%, aunque en otros trabajos se obtienen valores del 79-93%. Como norma general, se acepta que la motilidad seminal post-refrigeración es aceptable cuando alcanza valores del 60-70%. (1, 6)

En referencia a la motilidad seminal post-congelación se describen valores entre 10-80%, pero la calidad seminal se considera como buena cuando el valor de motilidad se sitúa por encima del 60%; aún así en algunos trabajos se describe que, para considerarse de buena calidad, el valor mínimo de motilidad del semen descongelado debe ser del 50%. Finalmente, algunos autores hacen referencia a inseminaciones realizadas con semen congelado que presentaba una motilidad ligeramente por encima del 35%. (1, 6)

Para la realización de inseminación artificial no se encuentra completamente definido el número mínimo de espermatozoides móviles necesarios para obtener óptimos resultados de fertilidad. Sin embargo, en algunos estudios se ha comprobado que es necesario disponer, en fresco, de 200 x 10⁶ espermatozoides móviles para obtener valores de fertilidad comparables a los obtenidos mediante monta natural. Si se utiliza semen congelado y se realiza una inseminación intrauterina se recomiendan que entre 150-200 x 10⁶ espermatozoides sean móviles, aunque se han obtenido camadas con muestras de menor motilidad, se ha definido que el único parámetro seminal que tenía relación con el rango de implantación era la motilidad progresiva que mostraban los espermatozoides. (1)

Recientemente se han realizado estudios que establecen una correlación entre la calidad *in vitro* que presenta una muestra seminal y la tasa de fertilidad que se obtiene *in vivo*. Asimismo, en estos estudios se establecen las similitudes o diferencias entre el porcentaje de fertilidad entre monta natural e inseminación artificial. (1)

5.3.3.-Vitalidad

El procedimiento más habitualmente utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales (figura N° 7); por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida. (3)



Figura N° 7 Espermatozoides vivos y muertos (color Rosa)

El método más tradicional es la tinción con eosina-nigrosina, que también se utiliza para la valoración de las morfoanomalías; pero algunos autores describen el uso de otras tinciones como la eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test -HOST-. En el caso concreto del HOST, algunos autores han encontrado una correlación entre motilidad y vitalidad espermáticas, pero no existe correlación entre la motilidad, vitalidad y las morfoanomalías. No obstante, no se ha podido establecer fehacientemente una relación entre el HOST y la fertilidad en el perro. (3)

El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas. El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada

químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola. (3)

La extensión se valora en un microscopio provisto de contrastes de fases a 100-400 aumentos, y se deben contar un mínimo de 200 células y, a partir de ahí, extrapolar el porcentaje de células vivas. (3)

5.3.4.-Morfología

Como se ha señalado en el apartado anterior, la tinción habitualmente utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. La realización de esta técnica puede afectar a la morfología, por lo que las extensiones no deben realizarse de forma brusca para evitar roturas en las cabezas y colas, así como provocar la aparición de posturas anormales de los espermatozoides que enmascaran el resultado real, generando un número anormalmente alto de morfoanomalías. Además hay que asegurar que la muestra no ha sufrido ninguna modificación tras la recolección. (1, 5)

Otras causas que pueden provocar la aparición de morfoanomalías son el estrés asociado a inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de LH y testosterona o alteraciones iatrogénicas. (1)

5.4.- Características bioquímicas

5.4.1.-pH

El pH de semen canino es más ácido que el de los rumiantes con un valor de 6.3. La motilidad seminal se ve disminuida por variaciones en el pH, tanto con pH ácidos como básicos. Por lo tanto, este aspecto debe valorarse especialmente a la hora de preparar los diluyentes y las sustancias tampón que se utilizarán en los procesos de diluyo-conservación seminal, obteniendo los mejores resultados con rangos de pH de 6.9-7.1 (7)

5.4.2.- Osmolaridad

La osmolaridad influye sobre la presión osmótica y en el punto crioscópico de una solución. El semen canino presenta un punto crioscópico de $-0.55\text{ }^{\circ}\text{C}$, que equivale a una concentración de 300mOsm. Las tres fracciones del eyaculado presentan valores de osmolaridad diferentes, siendo el valor medio para la primera fracción de 315mOsm, 308 para la segunda y 301 en la tercera. Las observaciones que se han realizado denotan que los diluyentes hipertónicos son menos perjudiciales que los hipotónicos, ya que actúan reduciendo el contenido de agua intracelular antes de la congelación, por lo que disminuyen la formación de hielo intracelular. (7)

6.- FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES

6.1.- Individuo y raza

En los rumiantes se han establecido una serie de variantes que afectan a la congelabilidad del semen. No se conocen las causas, pero parece muy probable que la predisposición a la congelación oscile tanto con el individuo, como con la raza, ya que en carneros y machos cabríos se ha establecido que existen estas diferencias. (7)

Hay autores que han conseguido demostrar una aparente relación entre la raza y la calidad del segundo eyaculado. En el Pastor Alemán se obtiene un mayor volumen seminal y una mayor concentración total cuando se realiza una segunda recogida, en comparación con otras razas. (7)

Sin embargo, el resto de los parámetros no se ven afectados y la motilidad y la concentración/ml presentan valores inferiores a otras razas. Asimismo, las reservas espermáticas del epidídimo están influidas por el tamaño del animal. Más recientemente, diferentes trabajos en la especie canina, han establecido diferencias individuales en la calidad seminal post-congelación, partiendo de individuos que en fresco presentaban similares parámetros seminales (3, 7, 14)

6.2.- Estado de ánimo y ambiente

En la especie canina, se ha demostrado que el miedo y el pánico a determinadas situaciones y ambientes impiden que se produzca una erección completa y por consiguiente que se pueda producir la eyaculación.

Asimismo, los ejemplares excesivamente juguetones, tanto con la hembra en celo como con todas las personas presentes en el momento de la recogida, suelen presentar una incapacidad para conseguir que se produzca la erección. (9, 14)

6.3.- Edad

En algunos trabajos se ha comprobado que la calidad seminal en animales menores de 6 meses no es muy buena, describiendo que la motilidad, morfología y la concentración mejoran a partir de esa edad. Asimismo, otros autores afirman que la pubertad en la especie canina se alcanza a los 9 meses, siendo a partir de esta edad cuando la calidad seminal es mejor. (8)

Por otro lado, hay estudios donde se ha determinado que la concentración seminal es peor en animales mayores de 4 años, siendo este efecto más marcado a partir de los 5 años; sin embargo, no parece que el resto de parámetros seminales sufra alteración alguna. (14)

7.- DILUCIÓN DE EYACULADOS

7.1.- Composición de los diluyentes

El semen de cada especie tiene unas características especiales que impide que se desarrolle un diluyente universal. A pesar de esto, el diluyente debe reunir una serie de componentes que impida el deterioro de la muestra de semen y que básicamente son los siguientes: (2, 12, 13)

Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente para el resto de componentes.

Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio. En el semen canino, las más usadas son: citrato sódico, leche desnatada en polvo, leche desnatada uperizada, lactosa, ácido cítrico, TRIS (tris hidroximetil aminometano), TES (N-TRIS hidroximetil-2-aminometano ácido sulfónico), PIPES (piperazina etano ácido sulfónico) e hidróxido potásico. (2, 12, 13)

Sustancias orgánicas que prevengan o amortigüen el shock frío, como la yema de huevo o leche. (2, 12, 13)

Agentes crioprotectores que garanticen la integridad celular ante los cambios de estado del agua principalmente. Presentan un doble mecanismo de acción; por un lado, disminuyen el punto crioscópico intracelular, con lo que disminuyen la concentración intracelular de solutos a bajas temperaturas al aumentar la cantidad de agua que permanece en estado líquido amortiguando así la toxicidad del medio y, por otro lado, provocan la deshidratación celular mediante mecanismos de ósmosis que disminuye la formación de cristales de hielo intracelular y extracelular durante la congelación, evitando poner en peligro la integridad de las membranas celulares. (2, 12, 13)

Los mejores resultados se han obtenido con el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol. La concentración final de glicerol para la crioconservación del semen

canino oscila entre 3-8%. Si se añade únicamente DMSO no se observa una marcada mejoría con respecto a los resultados obtenidos con el glicerol. (6,13)

Azúcares simples como fuente de energía para los espermatozoides, o bien di- o trisacáridos como crioprotectores adicionales. (6, 13)

Aditivos, como enzimas (á y â-amilasa, â-glucuronidasa, catalasa), detergentes (SDS-dodecil sulfato sódico, STLS-trietanolamina laurel sulfato sódico), aminoácidos (alanina, prolina, glicina-betaína, glicina-betaína+prolina) y otros compuestos (cafeína, prostaglandinas) que pueden mejorar la fertilidad. (2)

Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano. (2)

7.2.- Tipos de diluyentes

Para la criopreservación de semen en la especie canina se han utilizado diversos diluyentes, algunos de los más habituales serían:

Diluyente de Andersen: 240 mM TRIS, 63 mM ácido cítrico, 70mM fructosa, 8% glicerol, 20% yema de huevo y hasta 100 ml de agua destilada. (2, 12, 13)

Diluyente Upssala: integrado por dos diluyentes; diluyente 1: 2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na bencilpenicilina, 0.1 g de estreptomina sulfato, 20 mL de yema de huevo, 3 mL de glicerol y hasta 100 mL de agua destilada; diluyente 2: igual al diluyente 1, pero con 7% (v/v) de glicerol y un 1% (v/v) de Equex STM Paste. El uso del Equex STM Paste genera que los espermatozoides vivos tras la descongelación presenten una elevada concentración de calcio intracelular, siendo probable que este hecho sea un signo de criocapacitación y de funcionalidad espermática, manteniendo la motilidad y la vitalidad durante largos periodos de tiempo. (2, 12, 13)

Diluyente TRIS-fructosa: 2.4 g de TRIS, 0.36 g de ácido cítrico, 1.06 g de fructosa, 20% de yema de huevo, 8.8 mL de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomina y hasta 100 ml de agua destilada. Este diluyente ha

proporcionado buenos resultados cuando se congela en pajuelas de 0.5 ml. (2, 12)

Diluyente TRIS-glucosa: 2.24 g de TRIS, 1.15 g de ácido cítrico, 0.96 g de glucosa, 20% de yema de huevo, 6.0 ml de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomicina y hasta 100 ml de agua destilada. Se han observado buenos resultados cuando se emplea este diluyente en semen envasado en tubos de aluminio de 5 ml. (2, 12)

Diluyente a base de Lactosa: 11.5 g de lactosa, 20% de yema de huevo, 5 ml de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomicina y hasta 100 ml de agua destilada. Con este diluyente se ha envasado con éxito el semen tanto en pellets como en pajuelas. (2, 12)

Diluyente TRIS-citrato: 2.11 g TRIS, 0.98 g glucosa, 1.253 g ácido cítrico, 20 % yema de huevo, 50000 UI penicilina, 50 mg estreptomicina y hasta 100 ml de agua destilada. (2, 12)

Diluyente Laiciphos: 10 g Laiciphos, 20 ml yema de huevo, 8 ml glicerol y hasta 100 ml de agua destilada. (2, 12)

8.- CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO

El semen puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica. La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío. (15, 16)

8.1.- Semen fresco

En la especie canina, el semen obtenido tras estimulación manual se suele conservar en tubos calibrados de plástico o cristal hasta el momento de su utilización. Si la muestra se mantiene en un baño María a 37 °C, el semen fresco puede mantener su viabilidad hasta 24 horas tras la recogida. En el caso de que se suplemente con un diluyente a base de yema de huevo o leche homogeneizada a la que se le ha eliminado el albumen, junto con antibióticos, puede aumentar su vida media hasta 4-5 días siempre que se conserve a 37 °C (9).

Si no es posible mantener la muestra a temperatura ambiente, otros autores recomiendan que se deberá utilizar en un plazo máximo de 15 minutos, para evitar que se enfríe con demasiada rapidez, ya que se produce un detrimento importante de su calidad. (1)

8.2.- Semen refrigerado

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen canino y se le mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C o 15°C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante

las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente. (15, 14, 16)

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío, observándose que los mejores resultados se obtienen con la yema de huevo. Generalmente, se almacena el semen en tubos calibrados de cristal o plástico, aunque en ocasiones se utilizan envases menos convencionales como frascos calibrados de cristal o plástico. La reactivación y prolongación de los parámetros de motilidad parece ser que se ve influenciada por la suplementación de glucosa, la adición de yema de huevo fresco y la eliminación de productos de degradación presentes en el medio. (1,7).

Se ha comprobado que la baja motilidad espermática puede ser reactivada mediante la suplementación *in vitro* o *in vivo* de secreciones vagino-útero-oviductales. (1,7).

En diversos estudios realizados en la especie canina se ha demostrado que añadiendo a la muestra de semen un diluyente a base de yema de huevo es posible mantener la viabilidad hasta 10 días a 4 °C, sin alterar su viabilidad. Aunque se desconoce exactamente cuál es el mecanismo de reactivación de la yema de huevo, se sabe que el sustrato energético de los espermatozoides lo aporta la adición de fosfolípidos y, probablemente, la yema de huevo se encuentre involucrada en la producción de estos cambios. No obstante, también existen otros trabajos donde se afirma que la viabilidad del semen de perro refrigerado es de 4-5 días como máximo (1,7).

8.3.- Semen congelado

La principal ventaja de la crioconservación seminal es que ha supuesto una valiosa herramienta a la hora de distribuir la calidad genética tanto espacial como temporalmente. En las especies de abasto, la congelación del semen interesa básicamente por la capacidad productiva que se pueda obtener del animal. (3, 12, 16)

No obstante, en la especie canina junto con la conservación de muestras seminales de perros con un alto valor genético, se encuentra la circunstancia que en el perro, debido a su condición de animal de compañía y al enorme valor afectivo para su propietario, la crioconservación seminal se encuentra indicada porque brinda al propietario la posibilidad de obtener descendencia de su mascota, incluso una vez que ésta haya fallecido. (3, 12, 16)

El principal inconveniente de la crioconservación seminal es que durante los procesos previos a la congelación, los espermatozoides se ven sometidos a multitud de agresiones físicoquímicas que provocan un detrimento de su capacidad fecundante; por esta razón, se siguen desarrollando numerosos trabajos encaminados a obtener mayores tasas de supervivencia post-congelación que proporcionen mejores resultados de fertilidad. Con respecto a la longevidad del semen congelado, en diferentes especies se ha valorado la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad del semen. Parece evidente que el metabolismo celular se ralentiza con el descenso de la temperatura, hasta casi detenerse a temperaturas de congelación. (3, 12, 16)

Diferentes tipos de congelación: (1) Las pajuelas se congelaban en el interior de una caja de poliestireno, situándolas en un estante metálico a 4 cm. por encima de la superficie de nitrógeno líquido durante 15 minutos, permitiendo que fuesen congeladas por acción de los vapores de nitrógeno líquido finalmente las pajuelas se sumergieron y conservaron en nitrógeno líquido (NL). (2) Las pajuelas se trasladaron directamente desde la cámara frigorífica hasta el ultracongelador de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una caja de poliestireno a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (UF). (3)

8.4.- Congelación en nitrógeno líquido

Este protocolo es el más estandarizado y utilizado para la congelación de semen. La mayoría de los autores disponen, para la congelación en nitrógeno líquido, de una caja de poliestireno con un estante de metal extraíble colocado a unos 4-8 cm. de la superficie del nitrógeno líquido. Las pajuelas se colocan horizontalmente en el estante y se dejan entre 8-15 minutos bajo los efectos de los vapores de nitrógeno líquido cuya temperatura oscila entre -110 y $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$,

para finalmente sumergir las pajuelas en el nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Otros autores depositan las pajuelas en un estante de metal, dejando el semen durante 15 minutos expuesto a los vapores de nitrógeno líquido que se encuentra a $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, para sumergirlas y conservarlas posteriormente en nitrógeno líquido. Asimismo, en otros estudios, donde previamente se había descendido lentamente la temperatura desde $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ colocando las muestras en hielo picado, se utiliza un congelador de alcohol que se encuentra programado para que ocurra un descenso paulatino de la temperatura hasta alcanzar $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, sumergiendo finalmente las muestras en nitrógeno líquido. (3)

En el caso de congelación en pellets, el método de descenso de temperatura que utilizan la mayor parte de los autores es el hielo seco, depositando la muestra durante 30 minutos antes de introducirla en nitrógeno líquido. (3)

En general, la velocidad óptima de congelación depende en gran medida del tipo de crioprotector y su concentración, del diluyente y de la geometría del envase. El aumento de la concentración del crioprotector permite disminuir la velocidad de congelación. No se ha definido con exactitud un modelo definitivo sobre el efecto de la velocidad de congelación sobre la supervivencia del semen canino. Se han desarrollado diversos estudios comparando velocidades de descenso de temperatura diferentes y, aunque no son concluyentes, se ha visto que se obtiene mayor supervivencia cuando se emplean velocidades lentas; en general, se obtienen buenos resultados cuando se utiliza una velocidad de congelación moderada $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 5 a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -15 a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. (3)

8.5.- Congelación en ultracongeladores

Recientemente se han realizado varios estudios que describen el uso de ultracongeladores (figura N° 8, 9) como técnica alternativa al uso de nitrógeno líquido. El primer estudio, realizado en la especie caprina, demostró la eficacia de los ultracongeladores de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ como un método eficaz de criopreservación seminal hasta 2 meses post-congelación.



Figura N° 8 Ultracongelador de 152°C: visión frontal

Posteriormente, se han realizado dos experiencias en semen canino; en la primera de ellas se utilizó un *pool* de semen de 3 ejemplares mestizos, comprobando la calidad seminal hasta 4 meses post-congelación. En el segundo estudio, realizado en la raza Dogo Canario, se crioconservó semen de manera individual, valorando las características seminales post-congelación hasta 8 meses tras la congelación (3)

El procedimiento descrito por estos autores consistía en que una vez sometidos los eyaculados a los procesos de contrastación y dilución, el semen se envasaba en pajuelas de 0.5 ml, y en este momento se realizaban tres tratamientos:

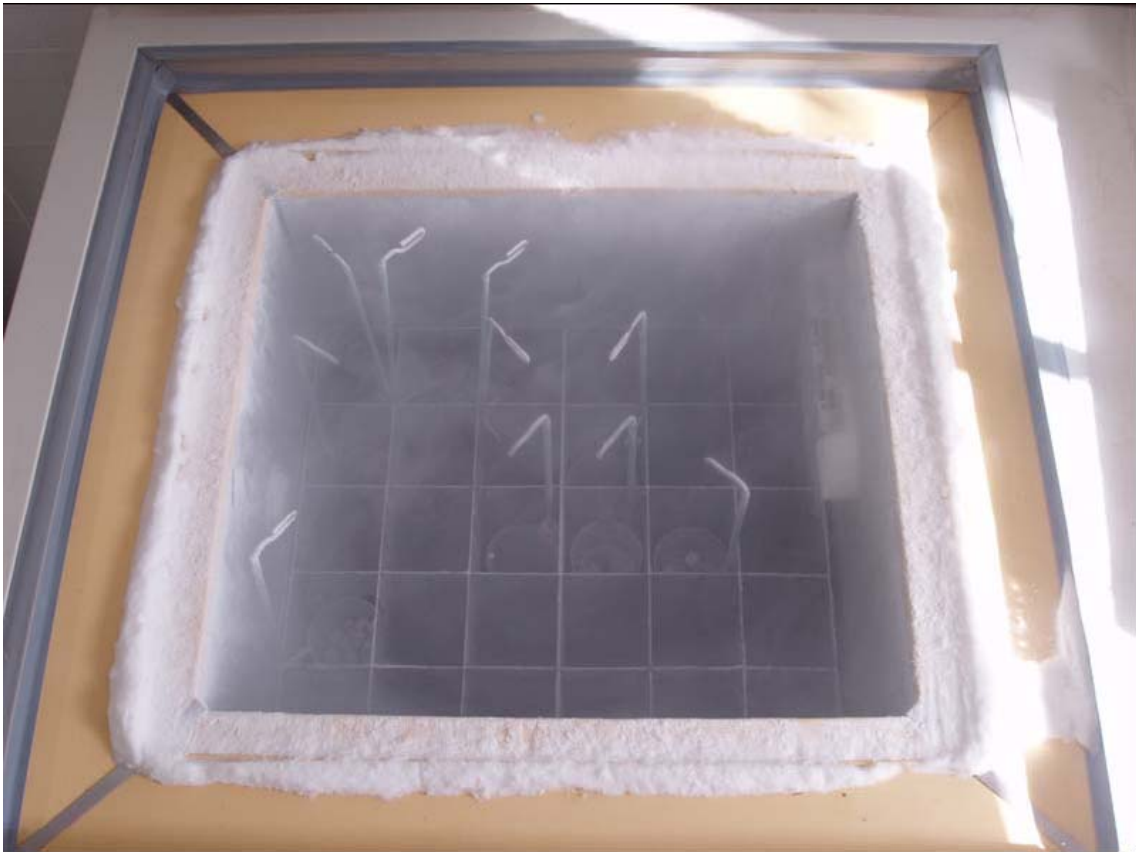


Figura Nº 9 Ultracongelador de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$: distribución y almacenamiento de pajuelas

(1) Las pajuelas tras permanecer 15 minutos bajo los efectos de los vapores de nitrógeno líquido a -110 ó $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ se sumergieron en el nitrógeno líquido (figura Nº 9). (2) similar al tratamiento previo, pero finalmente las pajuelas se retiraban de los vapores del nitrógeno líquido y se conservaban en el ultracongelador de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$. (3) Las pajuelas se introdujeron directamente desde la cámara frigorífica a 4°C al ultracongelador de -152°C . (3)

9.- DESCONGELACIÓN

9.1.- Procedimiento

Existe unanimidad entre los autores en que las pajuelas de 0.5 ml deben descongelarse mediante un baño María, aunque existen diferentes opciones en cuanto a tiempo y temperatura. Así, hay autores que describen temperatura de 37 °C durante 15 seg, 37 °C durante 30 seg, 39 °C durante 30 seg, 50 °C durante 30 seg, 70 °C durante 6 seg y 70 °C durante 8 seg. (3)

Si se utilizan pajuelas de 0.25 mL, hay autores que descongelan a 37 °C durante 30 seg o bien a 39 °C durante 30 seg, mientras que si se envasa en pajuelas de 2.5 ml se descongela a 50° C durante 45 seg. (3)

En el caso de los pellets, se sumergen en 0.5 ml de una solución con 0.9% de cloruro sódico a 55 °C durante 5 seg y, finalmente, el semen congelado en tubos de aluminio se descongela a 65 °C durante 15 seg, agitando vigorosamente el envase. (3)

Las pajuelas descongeladas se diluyen en 1-4 ml de una sustancia tampón para conseguir una mayor motilidad y vitalidad post-descongelación. Esta dilución se realiza independientemente de si el semen va a ser utilizado para la realización de pruebas de valoración y contrastación seminal, como si se destina para la realización de técnicas de inseminación artificial. Hay descritas varias sustancias tampón, así algunos trabajos proponen el uso de 4 ml de *ovine fresh buffer* con gentamicina y en otros se recomienda 1-2 ml de TRIS buffer (2.4g TRIS, 1.4 g ácido cítrico, 0.8 g glucosa, 0.06 g Na bencilpenicilina y 0.1 g estreptomina sulfato en 100 ml de agua destilada). (3,15)

9.2.- Contrastación del semen congelado-descongelado

Los parámetros básicos valorados por la mayoría de los autores para valorar la calidad postdescongelación en el semen canino son la motilidad y la vitalidad. Las técnicas de valoración son las mismas que para el semen en fresco.

Se describen valores muy variables de motilidad post-descongelación en semen canino, pero, en general, se considera que un semen presenta una calidad aceptable cuando el porcentaje de motilidad es superior al 60%. No obstante, en algunos trabajos se han obtenido resultados con un 40% de motilidad. (3, 6, 12)

En el caso de la vitalidad, la mayoría de los autores aceptan como buenas aquellas muestras que presentan una vitalidad superior al 80%. Menos frecuentemente se valora el porcentaje de morfoanomalías y su valor debería situarse en menos de un 20-25%. (3, 6, 12)

9.3.- Estimulación de la motilidad espermática post-descongelación

La criopreservación genera una reducción importante de la motilidad espermática. Por esta razón, se han desarrollado estudios para proponer una serie de componentes moleculares que propicien la reactivación del movimiento de los espermatozoides una vez descongelados. Se ha observado que esta función la realizan compuestos como la cafeína, la teofilina y la pentoxifilina; también se describe el uso de factores endógenos extraídos de la zona pelúcida, de las secreciones oviductales o de los propios testículos. (3, 6)

Se ha observado que cuando la muestra de semen se suplementa con plasma sanguíneo de una hembra, se produce una inhibición inicial de diferentes parámetros de la motilidad para luego ocurrir una estimulación secundaria, independiente del momento del ciclo estral en que se tome la muestra de plasma. La misma evolución ocurre cuando se suplementa con las secreciones uterinas, pero sin que se produzca la inhibición inicial. Otros trabajos obtienen valores elevados de motilidad cuando las muestras se diluyen en el propio fluido prostático, probablemente porque este fluido favorece el ascenso de los espermatozoides por el tracto genital femenino. (3, 6, 15)

En estudios recientes, se ha comprobado que la criopreservación reduce la respuesta del semen a la estimulación con progesterona, cuya misión es propiciar la reacción del acrosoma; esto es debido a que los procesos de

congelación seminal provocan una escasa presencia de receptores de progesterona en los espermatozoides y/o modifican estos receptores, generando un mal funcionamiento de los espermatozoides que conlleva una baja fertilidad seminal. (3, 5, 15)

10.- CONCLUSIONES

La conservación de semen es una técnica muy útil para obtener crías de caninos de otros países, es útil en el uso de perras nerviosas o muy agresivas para poder inseminarlas y obtener crías. Se puede conservar el semen de caninos campeones para poder utilizarlo después y elevar su valor cuando el animal haya fallecido, es útil en animales que sufren de la cadera y que no pueden llevar a cabo la monta natural, para los dueños que quieren cachorros de sus caninos aun cuando el este en una edad avanzada.

Es de un costo elevado y muy pocos Veterinarios cuentan con el equipo necesario. Hay muy poca información sobre la inseminación en caninos por eso su costo se eleva mas.

Después de la descongelación muchos espermatozoides sufren daños en cuanto a la motilidad es una desventaja pero se sigue investigando para que eso no pase. Muchos espermatozoides sufren choque térmico aun cuando la descongelación se haga de manera apropiada.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Allen We (1992): Fertility and Obstetrics in the Dog. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 33-55; 136-140.
- 2.- Andrade Martins de Carvalho Bessa Ana Celeste (2005): Memoria influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Madrid, ISBN: 84-669-2846-4
- 3.- Batista Arteaga M, D Alamo-Santana, F González-Valle, N Rodríguez-Dorta, F Cabrera-Martin, A Gracia-Molina. (2007): Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido versus ultracongeladores de – 152 °C) y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario. Obstetricia y Reproducción, Facultad de Veterinaria, ULPGC, RECVET: Vol. II, Nº 5
- 4.- Bohórquez Corona Rafael, Aitor De Ondiz¹, Roberto Palomares¹ y Fanny Gallardo². (2005). Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XV, Nº 5, 458 - 463,
- 5.- Burke TJ (1986): Small Animal Reproduction and Infertility. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 207-217.
- 6.- England, G., W. Allen. (1992): Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. Theriogenology 37: 363-371
- 7.- England, G.; W. Allen. (1989): Seminal characteristics and fertility in the dog. Vet. Rec. 125: 399.
- 8.- Hewitt Da (2000): Fisiología y endocrinología del macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 79-90.

- 9.- Kutzler MA (2005a): Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64: 747-754.
- 10.- Ruberte J, Sautet J (1998): Atlas de Anatomía del Perro y del Gato (3): Abdomen, Pelvis y Miembro Pelviano. Ed. Multimédica, Barcelona, pp: 112-119
- 11.- Sandoval J (2000): Tratado de Anatomía Veterinaria. Tomo III: Cabeza y Sistemas Viscerales. Ed. Facultad de Veterinaria-Universidad de León, León, pp: 359-387.
- 12.- Sánchez Alfonso, Arlette Cartagena y Marco Berland O. (2006) Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet Perú*; 2006.17 (1): 1-7
- 13.- Sánchez A, M.V., M.Sc., Dr. (c) Cs. Vet.; J. Rubilar, M.V.; R. Gatica, M.V., Ph.D (2002) Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado *Arch. med. vet.* v.34 n.1 Valdivia.
- 14.- Sánchez A. M.V., M.Sc. ; J.Rubilar. M.V (2001) Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile *Arch. med. vet.* v.33 n.1 Valdivia.
- 15.- Stronelli Ma, RL de la Sota. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado (2006) Instituto de Teriogenología Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata *Analecta Veterinaria*
- 16.- Stornelli Mc, CM Tittarelli, CA Savignone, MA Stornelli. (2005) Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*; 25 (2): 28-35
- 17.- Stronelli Ma , M.C. Stornelli, M.S. Arauz, L. De La Sota (2001) Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*; 21, 1: 58 -66

18.- Vázquez JM, Ramírez G, Gil F, Latorre R, Moreno F, López O, Orenes M, Arencibia A (2000): Atlas de Anatomía Clínica del Perro y Gato: Cavidades Torácica, Abdominal y Pelviana. Ed. Novograf SA, Murcia, pp: 119-122.