

Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector*

Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector

Avaliação do sêmen canino, sujeito a congelamento com diferentes concentrações de glicerol como crioprotetor

Rubén Uribe Valderrama^{1*}, MV, MSc; María Elena Arango Rodríguez², MV; Laura Rendón Álvarez², MV; Carlos Mauricio Acevedo Naranjo³, MV.

* Autor para correspondencia: Rubén Darío Valderrama. Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad CES Carrera 51 # 118 sur-57 Caldas. Antioquia. Colombia. Correo electrónico: rubendario10@hotmail.com

^{1, 2} Grupo de investigación INCA - CES, Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Calle 10A No 22-04, Medellín, Colombia.

³ Grupo de investigación INCA - CES, Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES. Práctica privada

(Recibido: 5 de mayo, 2010; aceptado: 6 de mayo, 2011)

Abstract

The study of biotechnology used in canines for reproductive purposes, is a of the principal research study points to the area of Veterinary Medicine in last years²⁸. In the objective to evaluate the effect of three different concentrations of glycerol on canine semen, to subjected cryo-preservation process, were obtained using manual manipulation, 12 semen samples of male Labrador clinically healthy and subject to the same driving conditions. Each sample was divided in four treatments (T1: control, T2: 4%, T3: T4 6% and 8% glycerol), to which they evaluated the volume, pH, motility, concentration, morphology and vitality, respectively. Then in the analysis were determined after thawing seminal differences and its relationship to the concentration of cryoprotectant. From the results obtained in this project are significant differences between the variables morphology, mortality and concentration, also established that T2 (4% glycerol) and T3 (6% glycerol) provide better results for freezing semen canines.

Key words

Canine semen, cryopreservation, glycerol, seminal viability.

*Para citar este artículo: Valderrama RD, Arango ME, Rendón L, Acevedo Naranjo CM. 2011. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 21-30

Resumen

El estudio de las biotecnologías usadas con fines reproductivos en caninos, constituye uno de los principales puntos de estudio investigativo para el campo de la Medicina Veterinaria y la Zootecnia en los últimos años²⁸. Con el objetivo de evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de glicerol sobre el semen canino sometido a procesos de criopreservación, se obtuvieron por medio de manipulación manual, 12 muestras seminales de machos de la raza labrador, clínicamente sanos y sometidos a las mismas condiciones de manejo. Cada muestra se dividió en cuatro tratamientos (T1: control, T2: 4%, T3: 6% y T4: 8% de glicerol); a los cuales se les evaluó el volumen, pH, movilidad, concentración, morfología y vitalidad, respectivamente. Luego en el análisis pos descongelación se determinaron las diferencias seminales y se estableció su relación con la concentración del crioprotector. De los resultados obtenidos en este proyecto se encontraron diferencias significativas entre las variables morfología, mortalidad y concentración, igualmente se estableció que los tratamientos T2 (4% de glicerol) y T3 (6% de glicerol) presentaron mejores resultados para la congelación de semen en caninos.

Palabras clave

Criopreservación, glicerol, semen canino, viabilidad seminal.

Resumo

O estudo da biotecnologia utilizada em cães para fins reprodutivos constitui um dos principais pontos de pesquisa para o campo da medicina veterinária e zootecnia nos últimos anos²⁸. Com o objetivo de se avaliar o efeito de três diferentes concentrações de glicerol sobre sêmen canino submetidos a processos de criopreservação, foram obtidas por meio de manipulação manual 12 amostras de sêmen de Labrador macho, clinicamente saudáveis e submetidas às mesmas condições de manejo. Cada amostra foi dividida em quatro tratamentos (T1: controle, T2: 4%, T3: 6% e T4: 8% de glicerol), os quais foram avaliados quanto ao volume, pH, mobilidade, concentração, morfologia e vitalidade, respectivamente. Nas análises pós descongelamento foram determinadas as diferenças entre os semens e se estabeleceu uma relação com a concentração do crioprotetor. A partir dos resultados obtidos neste trabalho foram encontradas diferenças significativas entre a variável morfologia, mortalidade e concentração e também ficou estabelecido que T2 (4% de glicerol) e T3 (6% de glicerol) apresentaram os melhores resultados para o congelamento de sêmen em caninos.

Palavras-chave

Criopreservação, glicerol, sêmen canino, viabilidade seminal.

Introducción

La conservación de gametos de caninos genéticamente valiosos es uno de los puntos importantes en biotecnología animal¹⁶. Por esto el desarrollo de técnicas de criopreservación espermática exitosas se convierten en un aspecto crucial para investigaciones en reproducción de pequeñas especies. Durante los procesos de congelación y descongelación del semen, las células se exponen a un medio hiperosmótico lo que genera cambios morfológicos en éstas. Al exponerse las células a este medio hiperosmótico se genera una contracción celular inicial; la cual puede revertirse al añadir crioprotectores que ingresan o recubren las células favoreciendo la protección de las mismas²⁷.

Los crioprotectores son solutos que favorecen la protección celular contra el enfriamiento extremo, algunos penetran y otros no penetran a la célula y su citotoxicidad depende directamente de la temperatura y el tiempo de exposición de las células a ellos²⁴.

En el grupo de los crioprotectores penetrantes, se encuentra el glicerol, el cual es un alcohol con tres grupos hidroxilos ($C_3H_8O_3$) de alta permeabilidad^{24,25} este es el más utilizado en la congelación de semen canino, ya que posee la capacidad de reemplazar osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento, disminuyendo el punto de congelación del agua lo cual combinado con una lenta tasa de enfriamiento, disminuye la formación de cristales de hielo^{1,18,25}.

Los parámetros seminales de movilidad del 70%, morfología del 70% de espermatozoides normales, y espermatozoides vivos 80%³⁰, deben tratar de conservarse lo mejor posible en el semen congelado, por tal motivo varios estudios muestran que concentraciones entre el 2% y el 10% han sido usadas con el fin de preservar las características fecundantes de muestras seminales sometidas a procesos de congelación y descongelación. Se ha reportado que las muestras sometidas a procesos de congelación con glicerol al 4% y 6% han mostrado mejores resultados. Se debe señalar

que la primera preñez exitosa por inseminación artificial con semen criopreservado utilizando glicerol, se obtuvo al utilizar una concentración del 8%^{23,24}.

La determinación de la concentración ideal de glicerol como criopreservante ha sido un punto crítico en el establecimiento de protocolos de criopreservación seminal en caninos^{6,24}. Este trabajo presenta los resultados obtenidos al comparar tres diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6% y 8%) en procesos de congelación y descongelación de semen canino utilizando un extendido a base de tris y yema de huevo.

Materiales y métodos

Animales

Se tomaron muestras seminales de 12 machos de la raza labrador sometidos a iguales condiciones de manejo y alimentación, los cuales se tenían un rango de edad entre los 1.5 - 7 años. Se les realizó un examen físico completo teniendo en cuenta su historia reproductiva. De cada eyaculado se tomó una fracción que fue destinada a cada uno de los tratamientos (T1: 4%, T2: 6%, T3: 8% y T4: Control) dando un total de 48 muestras, de las cuales se congelaron 36, correspondientes a las tres diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6%, 8%) y las 12 restantes (control) se refrigeraron sin criopreservante durante 24 horas.

Recolección seminal, dilución, evaluación y congelación

Todas las muestras fueron obtenidas mediante manipulación digital y sólo se colectó la segunda fracción seminal^{1,2,16}. Las muestras fueron evaluadas al momento de tomar la muestra y las que presentaron espermatozoides vivos móviles, se diluyeron utilizando un diluyente a base de TRIS y yema de huevo (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los diluyentes utilizados para el proceso de congelación^{18, 20}.

<i>Ingrediente</i>	<i>Diluyente 1 4%</i>	<i>Diluyente 2 6%</i>	<i>Diluyente 3 8%</i>
<i>TRIS (trizma base)</i>	<i>3.028g</i>	<i>3.028g</i>	<i>3.028g</i>
<i>Ácido cítrico</i>	<i>1.25g</i>	<i>1.25g</i>	<i>1.25g</i>
<i>Glucosa</i>	<i>0.8 g</i>	<i>0.8g</i>	<i>0.8g</i>
<i>Penicilina benzatínica</i>	<i>100mg</i>	<i>100mg</i>	<i>100mg</i>
<i>Sulfato de estreptomicina</i>	<i>0.1g</i>	<i>0.1g</i>	<i>0.1g</i>
<i>Yema de huevo</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>
<i>Glicerol</i>	<i>4 ml</i>	<i>6 ml</i>	<i>8 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>Hasta completar 100mL</i>	<i>Hasta completar 100mL</i>	<i>Hasta completar 100ML</i>

Al semen se le adicionó la primera mitad del diluyente preparado cuando se encontraba a una temperatura entre 37 – 25 °C (posterior a la recolección)^{11, 18, 25}. Luego fue equilibrado durante 40 minutos hasta alcanzar una temperatura de 15 °C^{11, 18, 25}, con una velocidad de congelación de 0.30 °C/min^{23, 24}. Posteriormente se refrigeró durante 30 minutos llevándolo a una temperatura cercana a los 4 °C^{1, 11, 25} con una tasa de disminución de temperatura de 0.37 °C/min²³. Antes de realizar la congelación del semen se añadió la segunda mitad del diluyente la cual contenía el glicerol al 4%¹⁸, 6%¹⁸ y 8%^{24, 25}. Una vez terminada la segunda dilución, el semen se empacó en pajillas de 0.5 mL^{1, 18}.

Luego de la obtención de la muestra, se continuo con la evaluación macroscópica del semen de la siguiente manera: 1) el volumen colectado al momento de colecta,

2) el color por observación, 3) el pH utilizando tiras reactivas de orina. Posteriormente, se realizó la evaluación microscópica, utilizando un microscopio binocular Olympus CX21 de contraste de fases; en esta evaluación se tuvieron en cuenta parámetros como la motilidad masal e individual, la concentración espermática por eyaculado, y finalmente se realizaron tinciones de eosina tinta china para evaluar la mortalidad (% de espermatozoides muertos en el citología seminal, estos se tiñen con la eosina) y la morfología espermática. Las 48 muestras de semen fueron evaluadas, según los parámetros de viabilidad consignados en la tabla 2 y todas las muestras que cumplieron con dichas condiciones, se utilizaron para la congelación.

La congelación del semen se realizó utilizando nitrógeno líquido, para ello, la muestra fue colocada a 5 centímetros

sobre el nivel del nitrógeno líquido durante 5 minutos, hasta alcanzar una temperatura promedio de -70 °C; y trascurrido este tiempo se sumergió en el mismo ^{18, 24, 25}.

Descongelación y evaluación post descongelación

Las muestras fueron descongeladas introduciendo las pajillas en un termo con agua a 37 °C durante un minuto ^{9, 10, 21}. Se realizó la evaluación del semen post descongelación y se valoró el pH, la movilidad, la vitalidad y la morfología utilizando métodos similares a los usados durante la evaluación pre congelación.

Análisis estadístico

Se utilizó para la evaluación y análisis de las variables movilidad, pH, mortalidad y morfología la prueba de Análisis de Varianza Simple (ANOVA) (p<0,05). La prueba-F en la tabla ANOVA determinó si hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables mencionadas. La Prueba de Rangos Múltiples y de (LSD) Fisher se utilizaron para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras, con una confiabilidad del 95%, y el registro de los datos y su desarrollo se realizó en el Software estadístico Statgraphics centurión versión XV.

Tabla 2. Parámetros para establecer la viabilidad del semen para procesos de congelación ⁵.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor de referencia</i>
<i>Concentración espermática</i>	<i>> 200 millones de espermatozoides/ml</i>
<i>Movilidad</i>	<i>> 70% con avance progresivo</i>
<i>Morfología</i>	<i>> 70% de formas normales</i>
<i>Anomalías primarias:</i>	<i>< 10% de los espermatozoides</i>
<i>Cabeza: cabezas dobles, en pera, ahusada, microcefalismo, sin cabeza o con cabeza amorfa.</i>	
<i>Pieza intermedia: cola doblada a nivel de la pieza intermedia, pieza intermedia doble e inclusiones citoplasmáticas</i>	
<i>Duplicación de pieza intermedia, cabeza o cola.</i>	
<i>Delgadez a nivel de cabeza, cola o pieza intermedia</i>	
<i>Gotas citoplasmáticas proximales</i>	
<i>Cola: calas enrolladas</i>	
<i>Anomalías secundarias</i>	<i>< 20% de los espermatozoides</i>
<i>Cabezas o colas normales separadas; acrosoma separado; curvatura de la pieza media; curvatura de la cola; gota citoplasmática distal</i>	
<i>Mortalidad</i>	<i>< 20% de los espermatozoides</i>
<i>Volumen</i>	<i>Variable</i>
<i>Color</i>	<i>Blanco a opalescente y opaco</i>
<i>Ph</i>	<i>6.3 a 6.7</i>

Resultados

En la tabla 3 se presentan las variables vitalidad, movilidad como las de mayor importancia debido a su resultado estadístico, sin embargo aunque no es estadísticamente significativa la variable formas primarias es de importancia en los resultados de criopreservación de semen observados en este estudio.

Tabla 3. Variables evaluadas en las muestras seminales luego de la descongelación, con sus valores absolutos y su respectivo valor p.

Variable	Valores absolutos	Efecto tratamiento (p-valor)
Ph	6,8 ± 0,5	0,6058
Mortalidad	17% ± 2%	0,0000 a
Movilidad	90% ± 5%	0,0000 b
Formas normales	90 ± 2%	0,1225
Anomalías primarias	4% ± 2%	0,0644
Anomalías secundarias	7% ± 3%	0,7125

Letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas entre las variables evaluadas $p < 0,05$, con un nivel de confianza de 95%.

Para la variable mortalidad se obtuvo un valor menor de 0,05, enseñando que existen diferencias estadísticamente significativas (Figura 1), sin embargo la prueba de Fisher indica que hay no se encontraron diferencias entre los grupos control, T1 y T2, pero hallándose diferencias con el grupo de precongelación y el T3. Según los resultados obtenidos se puede decir que para este trabajo el porcentaje de espermatozoides muertos fue mayor en el grupo T3.

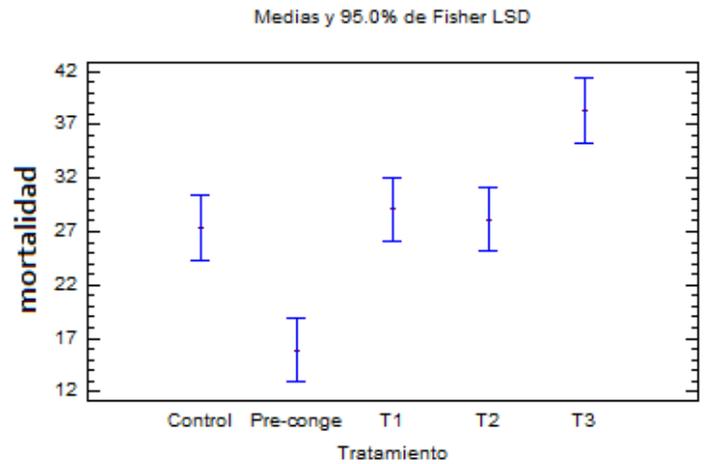


Figura 1. Determinación de la mortalidad con los tratamientos evaluados. Control: semen refrigerado. Pre- congelación: semen evaluado antes de congelar sin glicerol. T1: 4% de glicerol. T2: 6% de glicerol. T3: 8% de glicerol

Para la variable movilidad no existieron diferencias significativas entre T2 y T3, ni entre T2 con T1; pero si se observaron diferencias significativas entre T1, T3, control y pre-congelación. Según los resultados obtenidos se puede decir que la movilidad está directamente relacionada con el nivel de glicerol y que está se ve influenciada por la refrigeración como se observa en el grupo control. Los niveles de movilidad más altos fueron los del grupo control seguidos por el grupo T1. Es razonable que el grupo control haya tenido niveles de movilidad más altos debido a que este no fue sometido al proceso de congelación y no se le adicionó glicerol. Los valores de movilidad más bajos se encontraron en el T3 como se observa en el figura 2.

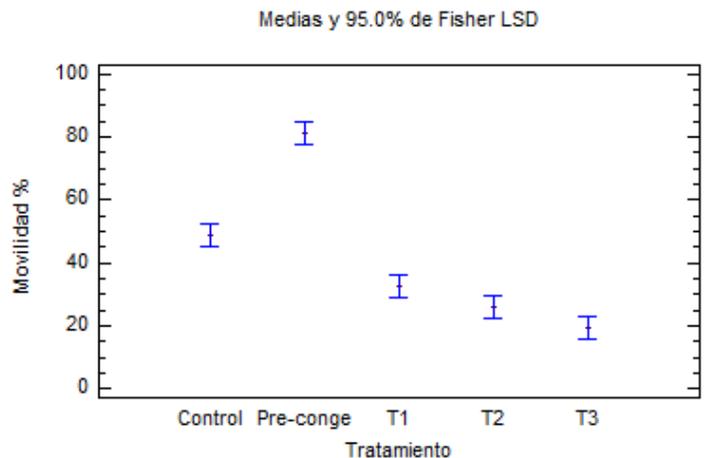


Figura 2. % movilidad en los tratamientos evaluados. Control: semen refrigerado. Pre- congelación: semen evaluado antes de congelar, sin glicerol. T1: 4% de glicerol. T2: 6% de glicerol. T3: 8% de glicerol

Para las variables, pH, morfología, formas normales, anormalidades primarias y secundarias, se obtuvo un valor de $p > 0,05$; indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Discusión

La concentración óptima de glicerol para realizar procesos de criopreservación seminal en perros depende de muchos factores, entre los que vale la pena resaltar el tipo de diluyente, la velocidad de congelación-descongelación y los métodos utilizados para estos procesos. Por las interacciones existentes entre estos factores no se ha logrado establecer un índice claro de concentración adecuada de glicerol para realizar procesos de congelación de semen canino con buenos resultados en la criopreservación ^{1, 3}.

Los resultados obtenidos durante el presente estudio muestran que no hay estadísticamente significativas $p > 0.05$ entre los grupos evaluados y la variable PH. En la literatura se reporta poca información de pH post-descongelación, aunque teóricamente el pH del diluyente puede disminuir debido a la actividad metabólica de los espermatozoides ¹³. Adicionalmente, es sabido que altas variaciones del pH durante procesos de criopreservación conllevan a un aumento en la mortalidad ¹³.

La tasa de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos, que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en el mismo ¹³. De acuerdo a esto, se puede inferir que la tasa de congelación seminal, utilizada en el presente estudio es adecuada desde el punto de vista del pH.

Estudios similares han mostrado que disminuciones del pH son observadas luego de 3-4 días de la refrigeración del semen canino diluido en Tris-yema de huevo ¹⁹ lo cual puede explicar por qué en el presente estudio no se observaron variaciones de pH en el grupo control debido a que el semen fue refrigerado sólo durante 24 horas, adicionalmente algunos autores han reportado que este diluyente ofrece una alta estabilidad en el pH

de la muestra ¹⁹.

Al observar los resultados de mortalidad; los mejores resultados obtenidos para esta variable se le atribuyen a los menores valores (4% y 6%) ^{18, 25}. En el presente estudio se encontró que el menor porcentaje de mortalidad, excluyendo el control, se obtuvo en aquellas muestras que fueron sometidas a concentraciones del 6% de glicerol (28,16%) aunque estadísticamente no se encontró diferencias significativas entre el control y las muestras sometidas a 6% y 4% glicerol. Según lo anterior se puede decir que concentraciones de glicerol entre el 4% y el 6% no presentan variaciones estadísticamente significativas con respecto al control, para este estudio; mientras que con una concentración de 8% de glicerol se observó un aumento en el número de espermatozoides muertos. Además, es importante mencionar que aunque hubo un alto deterioro en la vitalidad del semen sometido a procesos de criopreservación, en relación con el control y la pre congelación, los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados para procesos de congelación de semen canino, además los resultados son compatibles con fertilizaciones exitosas realizadas con semen criopreservado ⁸.

La movilidad es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores utilizan este parámetro como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores ^{12, 25, 27}. En el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones del 4% y 6% de glicerol. Este resultado concuerda con el de otros autores ¹⁷ quienes también encontraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la movilidad para semen congelado y posteriormente descongelado con glicerol al 4% y al 6% como criopreservante.

La presente investigación manifestó que los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 4% y 6%, similar a lo encontrado por otros investigadores quienes sugieren que la mejor concentración de glicerol es 6% ^{3, 18}, y 4% ^{18, 27}. Por otra parte los resultados difieren de los obtenidos por Peña ¹⁷, quien encontró que los mejores resultados de movilidad se obtuvieron para concentraciones del 8%.

Es importante resaltar que en la literatura existen estudios que reportan que los mejores resultados se obtienen con concentraciones del 2% ¹⁵, además, se han encontrado mayores discordancias en los resultados utilizando mínimas concentraciones de glicerol 1,6%-3% ^{7, 14, 15} o altas concentraciones del mismo, 8-12% ²⁶. Al observar el rango de valores de movilidad obtenidos en este estudio se encuentra que los valores son relativamente bajos ya que las medias fueron de entre 19% y 33%. Al compararlo con los resultados de otras fuentes en la literatura se ve que los resultados caben entre los rangos encontrados, ya que ha habido estudios con medias de movilidad del 14% ¹⁷ hasta 70% ²⁹.

Vale la pena resaltar que para procesos de inseminación artificial se sugiere tener una movilidad espermática entre 40% y 50 % ^{18, 27}, aunque, se ha logrado obtener preñeces con valores de movilidad entre el 20% y el 30% ²⁷; por lo tanto los valores obtenidos durante este estudio se podría inferir que serían suficientes para lograr preñeces exitosas. Probablemente en este estudio la reducción de la movilidad del semen sometido a procesos de congelación- descongelación pudo verse influenciada por largos periodos de transporte desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, lo cual puede reducir las reservas metabólicas de los espermatozoides ¹⁸ haciéndolos más susceptibles a sufrir cambios durante la refrigeración, congelación y descongelación, es posible que comenzando el proceso de criopreservación inmediatamente después de la recolección del semen se obtengan mejores cualidades espermáticas en el semen pos-descongelación.

Con relación al porcentaje de anomalías primarias (4%) y secundarias (7%), los resultados manifestaron que no existe correlación directa entre la concentración de glicerol y un aumento en la incidencia de anomalías morfológicas. Resultados similares fueron encontrados en otros estudios en los cuales se observó un aumento en las anomalías secundarias, pero estas no fueron estadísticamente significativas ²⁵.

De igual forma, se ha reportado que semen con valores porcentuales similares a los obtenidos en este estudio, pueden ser utilizados efectivamente en procesos de

inseminación artificial con semen congelado ²³. Hay que destacar que el porcentaje de anomalías primarias en este estudio fue alto comparativamente con estudios similares ^{22, 23, 25}, sin embargo este porcentaje fue alto incluso en el análisis precongelación. Basando, con lo dicho por Johnston et al (2001), las anomalías primarias se originan durante la producción espermática y la manipulación del semen no tiene influencia en estas.

Con relación a las anomalías secundarias algunos estudios, reportan aumento en estas siendo la anomalía más común colas dobladas ⁴. Aunque en este estudio no se realizó diferenciación porcentual de las anomalías secundarias los investigadores observaron una gran incidencia de colas dobladas. Adicionalmente, la literatura reporta que las anomalías secundarias son generalmente originadas por los cambios de temperatura a los que es sometido el semen durante este tipo de procesos ⁴.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración espermática entre los tratamientos. Hay que aclarar que las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos y la precongelación fue debida a la distribución seminal ya que se usaron pajillas de 0,5 ml con concentraciones espermáticas de 200 millones de espermatozoides/ml. Los resultados obtenidos al relacionar los tratamientos y la precongelación son coherentes ya que no tiene porque existir una relación entre la concentración de glicerol y la concentración espermática, sin embargo la medición de este parámetro ayuda a evaluar el proceso y método empleado para la criopreservación seminal.

Se puede concluir que los procesos de refrigeración y congelación utilizados en esta investigación generaron un alto deterioro de la vitalidad. Sin embargo los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados en la literatura ⁸. Los autores recomiendan la realización de nuevos estudios para establecer procesos de refrigeración que permitan obtener mejores resultados de vitalidad, ya que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un marcado aumento en la mortalidad cuando el semen es sometido a procesos de refrigeración.

Las concentraciones de glicerol del 4% y 6%, no mostraron diferencias con el control, con esto se puede concluir que estas concentración del crioprotector para procesos de congelación seminal son las ideales, evitando en gran medida el daño de las células espermáticas. Concentraciones del 8% de glicerol, generaron un marcado deterioro de las características seminales.

Finalmente se concluye que es importante tener en cuenta que factores como el transporte, la maquinaria y la mano de obra tienen una importante influencia en los resultados obtenidos en el trabajo, por lo tanto sería pertinente continuar la realización de otros estudios similares, minimizando la influencia de los factores previamente mencionados.

Agradecimientos

Los investigadores y asesores de este proyecto agradecemos a las siguientes personas quienes hicieron posible la realización del mismo: Al Dr. Carlos Giraldo, por el acompañamiento inicial; Dr. Oscar Sáenz, por realizar el estudio estadístico al laboratorio Clínico Veterinario del Instituto de Medicina Tropical, a la empresa Miro Seguridad y Dr. Julián A. Orozco, por facilitar los ejemplares para la toma de muestras seminales. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, por el apoyo económico brindado, para la consecución de equipos y materiales que hicieron posible, finalmente la ejecución del trabajo.

Referencias

1. Bohórquez CR, De Ondiz A, Palomares R, Gallardo Fanny. 2005. Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. *Rev. cient. (Maracaibo)* 15(5):458-463.
2. Cunningham, JG. 2003. *Fisiología veterinaria*. 3ª ed. Editorial: Mc Graw-Interamericana.
3. Eilts BE. 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*; 64:692-697.
4. Fastard W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*; 42:251-260.
5. Felman EC, Nelson RW. 2004. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3ª ed. Editorial: Mc Graw Hill Interamericana.
6. Fontbonne A, Badinand F. 1993. Studies on dog freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil*; 47 (Suppl):531-532.
7. Fontbonne A, Badinand F. 1993. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil*; 47:531-532.
8. GCW, Ponzio P. 1995. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*; 46:165-171.
9. Gobello C, Corada Y. Actualización en biotecnología reproductiva canina. En: Gobello C. 2004. *Temas de reproducción canina y felina*. 1ª ed. Argentina: Editorial Intermédica S.A. p. 180-194.
10. Gobello C, Wanke MM. 2005. *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. 1ª ed. Argentina: editorial inter-medica S. A. p. 27-31.
11. Hori Tatsuya, Odaka Sanae, et al. 2006. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci*; 68 (10):1055-1061.
12. Ivanova-Kicheva MG, Bovadob ND, Somlev B. 1997. Criopreservación Of canine semen in pellets and in 5 ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*; 48:1343-1349.
13. Minter LJ, De Liberto TJ. 2005. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology*; 64:1898-1912.
14. Olar TT. 1985. Using frozen canine semen: a guide for practitioners. *Veterinary Medicine*; 80 (3):22-30.

15. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. 1999. Influence of extender, cryopreservative and seminal precessing procederes on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*; 31:451-461.
16. Olivera M, Gobello C. 2005. El libro latinoamericano de reproducción canina y felina. 2ª ed. Argentina: Editorial Intermédica. p.335.
17. Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG.1998. Effect of diferent glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*; 50:163-174.
18. Rodríguez AS, Soares CR, Machado Da Silva LD.2002. Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria*; 9 (1): 25- 28.
19. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg. 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*; 44:885-900
20. Sánchez RA, Cartagena PA, Berland OM. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet*; 17 (1):1-7.
21. Savignone CA, Stornelli MC. 2006. Efecto de la concentración de trealosa que no modifique la osmolaridad del diluyente TRIS base sobre la supervivencia espermática pos descongelación del semen canino. Argentina: Décimo congreso argentino de ciencias morfológicas FCV UNICEN. 11-16.
22. Silva AR, De Cássia Soares Cardoso R, Uchoa DC; Macgado De Silva LD.2002. Effect of tris-buffer, Egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Veterinary Journal*; 164:244-246.
23. Silva AR, *et al.* 2000. Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in tris and coconut water extenders. *Ciencia Rural*; 30:1021-1025.
24. Silva AR, *et al.* 2005. Comparation between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. *Arq. Bras. Met.Vet. Zootec*; 57 (6):764-771.
25. Silva AR, *et al.* 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*; 59: 821-829.
26. Smith FO. Update on freezing canine semen. En: Kirk R.W. 1986. *Current veterinary therapy, small animal practice*, Vol 9. Philadelphia: WB Saunders, 1243-1248.
27. Soares Cardoso RC, *et al.* 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogelogy*; 59:743-751.
28. Stornelli MA, De La Sota RL. 2006. Congelación de semen canino. ISSN Facultad de ciencias veterinarias Universidad Nacional de la Plata; 1:10-13.
29. Strom B, Rota A, Linder-Forsberg C.1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*; 48:247-56.
30. Rott M. 2010. *Clinical canine and feline reproduction: evidence-based answers*. USA: Editorial Blackwell. P. 314.