

INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN (NITRÓGENO LÍQUIDO VERSUS ULTRACONGELADORES DE -152 °C) Y VARIACIÓN INDIVIDUAL SOBRE LA CALIDAD SEMINAL EN EL DOGO CANARIO

Desirée Álamo Santana

En este estudio, se pretende valorar la calidad *in vitro* del semen canino congelado por un ultracongelador de -152 °C, así como evaluar la variación individual en la calidad seminal en Dogos Canarios. Se testaron dos técnicas: (I) el semen era congelado y almacenado en nitrógeno líquido; (II) el semen era congelado y almacenado en un ultracongelador de -152 °C. Tras la congelación, la motilidad, la vitalidad espermática y el porcentaje de morfoanomalías espermáticas no eran diferentes entre la técnica de nitrógeno líquido y el protocolo del ultracongelador. Por otro lado, la calidad seminal en fresco era similar entre machos; no obstante, en la calidad seminal post-congelación se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre individuos, independientemente del procedimiento de congelación utilizado. Los resultados *in vitro* confirman que el ultracongelador de -152 °C es una alternativa potencial frente al nitrógeno líquido para congelar y conservar semen canino.

*This study was carried out to assess the *in vitro* quality of canine semen frozen by an ultrafreezer of -152 °C and to evaluate the male-to-male variation of frozen semen in Canarian Mastiff males. Two freezing techniques were tested: (I) semen was frozen and stored in liquid nitrogen; (II) semen was frozen and stored in the ultrafreezer at -152 °C. After freeze-thawed, both freezing protocols showed not significant differences in sperm motility and the percentages of live and abnormal spermatozoa. On the other hand, the seminal quality in fresh was similar among males; however, after the semen processing and freezing, significant differences were observed ($p < 0.05$) among males, independently of the freezing technique used. The *in vitro* results obtained in the Canarian Mastiff confirmed that the ultra-freezer at -152 °C is a potential alternative to liquid nitrogen to freeze and store canine semen.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, las técnicas de inseminación artificial y criopreservación seminal en la especie canina han experimentado un enorme desarrollo. El porcentaje de gestaciones obtenido en perras inseminadas con semen en fresco es muy elevado, tanto si se realiza una inseminación intravaginal profunda [1-3] como si se utiliza una técnica de inseminación intrauterina [3,4]. Cuando se utiliza semen congelado, el porcentaje de gestaciones obtenido es menor, particular-

mente si se realiza una técnica de inseminación intravaginal [2,5-6]. De manera general, se asume que el semen canino congelado puede ver reducida su capacidad fértil [7].

La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino congelado mediante cualquier protocolo de criopreservación es comparar el porcentaje de gestaciones que se obtiene tras la inseminación artificial [8]. No obstante, en la mayoría de los estudios, la calidad seminal del semen congelado-descongelado se valora mediante la determinación de

diferentes parámetros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las



Dogo o Presa Canario

acrosomías y las morfoanomalías [9-14]. Diferentes autores han intentado establecer una correlación entre la fertilidad obtenida con una muestra de semen y la valoración seminal in vitro de los diferentes parámetros mencionados anteriormente [8,15]. Por otro lado, en la mayoría de estudios desarrollados en la especie canina, antes del procesado del semen, se realiza un *pool* seminal de los eyaculados de machos diferentes [11-13], por lo que resulta imposible establecer si existe variación individual.

La congelación en nitrógeno líquido es la técnica más utilizada para congelar y conservar semen canino durante largos periodos de tiempo [6,11,16,17]. En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal con nitrógeno

líquido, utilizando diferentes tipos de diluyentes [5-7,15-19]. El porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen congelado mediante nitrógeno líquido varía entre un 50-60% [3,4]. Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado. Un estudio reciente [14] desarrollado en perros mestizos, propone el uso de ultracongeladores de -152 °C como una técnica alternativa para la congelación y conservación de semen en la especie canina.

Los objetivos de nuestra experiencia consistían en valorar la calidad seminal in vitro de semen conservado en un ultracongelador de -152 °C durante 12 meses, así como evaluar el grado de variabilidad individual en la calidad seminal post-congelación de 5 machos de la raza Dogo Canario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 5 ejemplares de la raza Dogo Canario, con edades entre 2-4 años y un peso medio de 48 kg. Un mes antes de comenzar el estudio, los perros fueron entrenados para la obtención de semen mediante estimulación manual.

Recogida y evaluación seminal

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo peneano, depositando el eyaculado en un tubo de cristal calibrado y atemperado [11,20]. Se obtenía un eyaculado semanal de cada perro, durante un total de cuatro semanas consecutivas.

Inmediatamente tras la recogida, la fracción espermática era analizada para determinar su

volumen, concentración y motilidad, así como el porcentaje de vitalidad y de morfoanomalías. El volumen seminal se determinaba directamente en el tubo calibrado de recogida [21]. Para calcular la concentración, una alícuota de semen se diluyó (1:40) en solución salina formolada y tras colocar una gota en un hemocitómetro, se determinaba la concentración con un microscopio óptico [7,22]. El porcentaje de motilidad se calculaba por valoración de una muestra de semen, usando un microscopio de contraste de fases, provisto de una placa calentadora (37 °C) [6,13,14].

El porcentaje de vitalidad y de morfoanomalías se determinó mediante una extensión de eosina-nigrosina [6, 23], utilizando un microscopio de contraste de fases a 1.000 aumentos; valorando un mínimo de 200 espermatozoides por eyaculado. Los espermatozoides se clasificaron en vivos (membrana intacta y ausencia de coloración) y muertos (membrana dañada y teñidos); además, las morfoanomalías se contabilizaron en función de su localización (cabeza, cuello, pieza intermedia o cola).

Procesado del semen

Los eyaculados de cada animal fueron procesados de forma individual. Cada eyaculado era centrifugado a 700 g. durante 5 minutos y el plasma seminal fue retirado. A continuación, los espermatozoides se resuspendieron con 2 ml. de Diluyente-1 (20% yema de huevo, 3% glicerol). Posteriormente, se determinó la concentración espermática y el volumen era ajustado para conseguir una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml. Esta primera dilución se sometía durante una hora a un periodo de equilibrado en el interior de una cámara frigorífica a 4 °C.

Tras el equilibrado, se añadió el Diluyente-2 (20% yema de huevo, 1% Equex STM paste, 7% glicerol) a 4 °C, obteniendo una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. Finalmente, la dilución final de la muestra de semen se empaquetaba en pajuelas de 0.5 ml., antes de someterse al proceso de congelación propiamente dicho. El tiempo total transcurrido desde la extracción de la muestra de semen y el inicio del protocolo de congelación era de aproximadamente 2 horas.

Congelación seminal

Se utilizaron dos protocolos diferentes 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 (protocolo NL).

2.- Las pajuelas se trasladaron directamente desde la cámara frigorífica hasta el ultracongelador de -152 °C en una caja de poliestireno a 4 °C (protocolo UF).

Descongelación del semen

Las descongelaciones se llevaron a cabo los días 1, 30, 60, 120 y 360 tras la congelación. La descongelación se realizaba sumergiendo las pajuelas en un baño María a 70 °C durante 8 segundos [11,14]. Una vez descongeladas, las muestras se colocaban en el interior de un tubo de plástico que contenía 2 ml. de TRIS buffer y se mantenía a 37 °C durante toda la valoración. Inmediatamente tras la descongelación, se valoraba subjetivamente el porcentaje de motilidad, así como los porcentajes de vitalidad y morfoanomalías. El número de pajuelas valoradas cada día y para cada protocolo

Perros	Eyaculados por perro	Volumen (ml)	Concentración (x 10 ⁶ células/ml)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Morfoanomalías (%)
1	4	2.6 ± 0.3 ^a	1379.4 ^a ± 214.6	90.0 ± 0.9	95.0 ± 0.6	6.0 ± 1.0
2	4	4.2 ± 0.4 ^b	889.7 ^{ab} ± 183.4	91.1 ± 1.3	95.3 ± 0.3	4.3 ± 0.3
3	4	3.9 ± 0.3 ^b	1091.9 ^{ab} ± 99.3	90.5 ± 1.0	92.6 ± 0.3	4.7 ± 0.9
4	4	3.0 ± 1.0 ^{ab}	770.7 ^b ± 31.1	90.7 ± 1.1	93.6 ± 0.4	3.7 ± 0.7
5	4	3.5 ± 0.2 ^{ab}	728.1 ^b ± 40.1	91.0 ± 0.9	94.3 ± 0.3	3.8 ± 0.7
Media	4	3.5 ± 0.3	899.9 ± 114.4	90.6 ± 0.3	94.2 ± 0.3	4.4 ± 0.6

^{ab} Diferentes letras dentro de una misma columna implican diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 1. Media ± SEM de volumen, concentración y porcentaje de motilidad, vitalidad y morfoanomalías en los eyaculados de los ejemplares donantes

de congelación fue de 8 muestras/perro.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media ± SEM. Los datos de motilidad, vitalidad y morfoanomalías fueron analizados utilizando un análisis de varianza repetido, de acuerdo con un modelo lineal que considera el efecto de los animales (cinco animales), los protocolos de congelación (dos protocolos), el tiempo (1, 30, 60, 120 y 360 días) y las interacciones entre ellos. Se determinó que existían diferencias significativas cuando P<0.05.

La mayor concentración seminal observada en el Dogo Canario parece ser una característica específica de esta raza

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la calidad seminal en fresco de los donantes. Al valorar el volumen y la concentración seminal, se observaba que el macho 1 presentaba un menor volumen (p<0.05) que los machos 2 y 3, y una concentración significativamente mayor (p<0.05) que los machos 4 y 5. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de motilidad y vitalidad cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares; la motilidad tenía un valor alrededor del 90% (rango individual: 85-95%) mientras que la vitalidad media era superior al 94% (rango individual: 88-97%). El número de morfoanomalías era inferior al 10% en todos los perros.

El porcentaje de motilidad (media ± SEM) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en las Figuras 1 y 2. Con el protocolo NL (Fig. 1), la motilidad se situaba alrededor del 60-70%, no existiendo diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental; sin embargo, sí se observaban diferencias significativas cuando los machos se comparaban entre sí: a los 120 y 360 días post-congelación, los machos 1 y 4 presentaban una motilidad significativamente más baja (p<0.05)

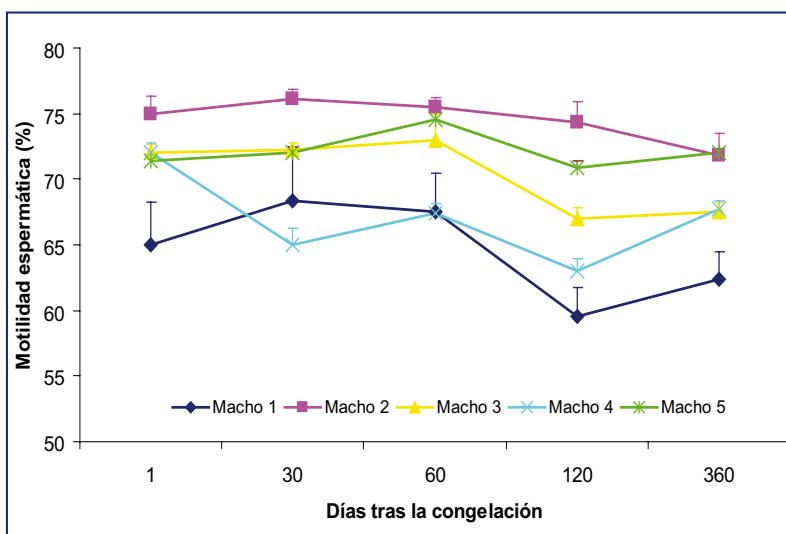


Figura 1. Motilidad espermática a lo largo del periodo experimental en nitrógeno líquido

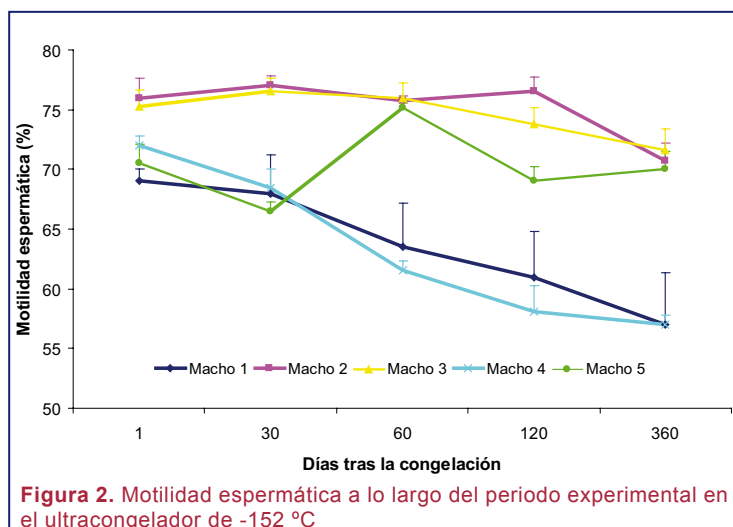


Figura 2. Motilidad espermática a lo largo del periodo experimental en el ultracongelador de -152 °C

significativas en los cinco periodos valorados.

Finalmente, las Figuras 5 y 6 muestran el porcentaje de morfoanomalías en cada macho durante el periodo experimental. Con ambos métodos (protocolos NL y

con respecto a los machos 2 y 5. Con la técnica de UF (Fig. 2) se observaban porcentajes similares de motilidad dentro de cada macho, no obstante, cuando se comparaban los ejemplares, existía un porcentaje de motilidad significativamente superior ($p < 0.05$) en los machos 2, 3 y 5 que en los perros 1 y 4, a los 60, 120 y 360 días post-congelación. Por último, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon las dos técnicas de congelación.

Las Figuras 3 y 4 muestran los valores (media \pm SEM) de vitalidad observados durante toda la experiencia. Con el protocolo NL, la media de vitalidad individual obtenida era superior al 70% en todos los machos, no observándose diferencias significativas entre perros a lo largo de todo el periodo experimental. Con el protocolo UF, la media de vitalidad oscilaba entre 69 y 89%. Cuando se realizaba la comparación entre perros, se observaba que los machos 2 y 3 presentaban un mayor porcentaje ($p < 0.05$) de espermatozoides vivos que el macho 4 a los 60, 120 y 360 días post-congelación. Cuando se comparaban ambas técnicas de congelación, no se observaban diferencias

UF), no se observaron diferencias significativas, mostrando valores medios similares durante todo el periodo experimental. Cuando se comparaba a los ejemplares individualmente, se comprobaba que existía un

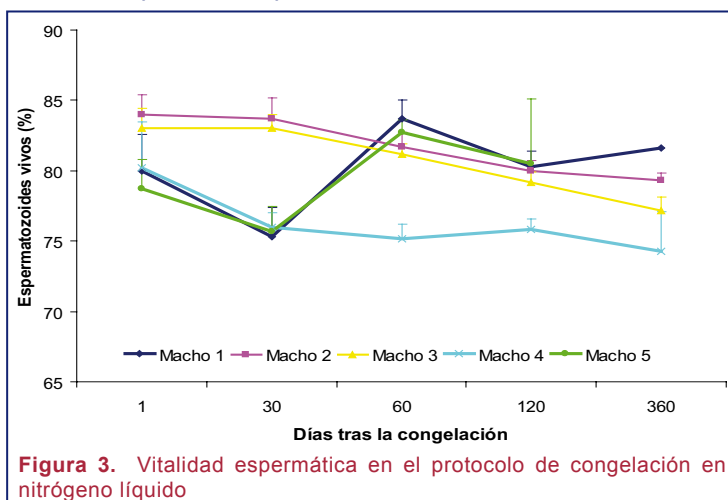


Figura 3. Vitalidad espermática en el protocolo de congelación en nitrógeno líquido

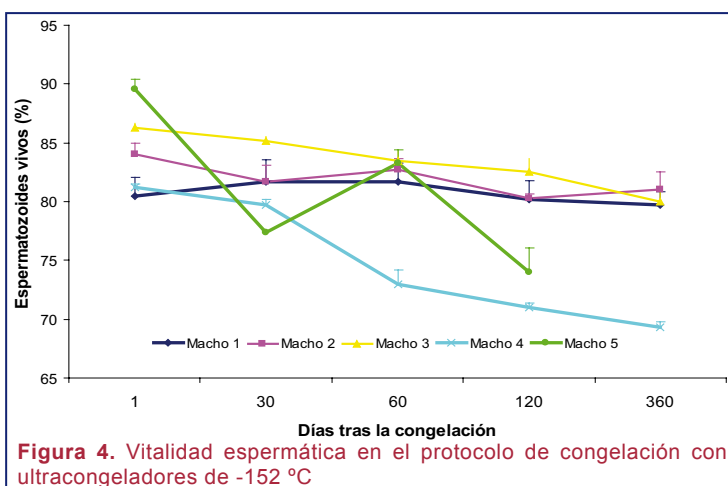


Figura 4. Vitalidad espermática en el protocolo de congelación con ultracongeladores de -152 °C

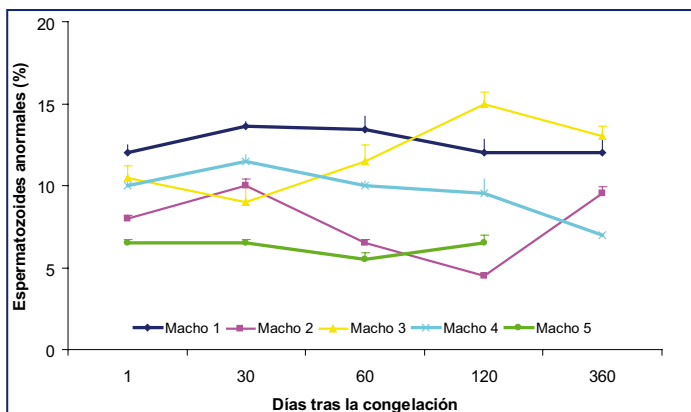


Figura 5. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas en el protocolo de congelación con nitrógeno líquido

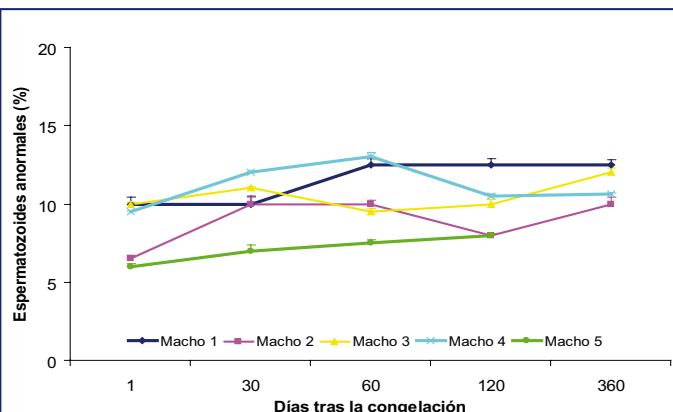


Figura 6. Porcentaje de morfoanomalías espermáticas en el protocolo de congelación en ultracongelador de -152 °C

mayor porcentaje de morfoanomalías los días 60 y 120 post-congelación ($p < 0.05$, machos 1, 3 y 4 versus machos 2 y 5) con la técnica de NL.

DISCUSIÓN

Este trabajo experimental muestra, por primera vez, los resultados obtenidos in vitro después de congelar y conservar el semen canino con un ultracongelador de -152 °C durante un largo periodo de tiempo (1 año). Además, los resultados de este estudio demuestran claramente que existen variaciones individuales significativas en la calidad seminal post-congelación.

Existe un gran número de trabajos que han tratado de establecer la calidad del semen canino, antes y después de la congelación [3,6,16,24]. La mayoría de esos trabajos de investigación han sido desarrollados utilizando machos de diferentes razas [9,11,13,21] y sólo existen unos pocos trabajos donde la calidad seminal se ha definido en una raza concreta. En nuestro estudio, en fresco, los valores medios de motilidad y vitalidad eran similares o ligeramente superiores que los descritos para otras razas caninas, con o sin *pool* seminal [25-29]. Además, el número de morfoanomalías

era inferior al 10%, siendo comparable con los resultados descritos por la mayoría de los autores [3,7,25,28]. Sin embargo, la concentración seminal de nuestros machos (valor medio: 900×10^6 esp/ml) era superior que la descrita en otros estudios [11,15, 25-27]. Es probable que la mayor concentración seminal observada en el Dogo Canario sea una característica específica de esta raza; en diversos estudios, se muestra que los ejemplares de razas grandes producen mayor número de espermatozoides que los de razas pequeñas que tienen testículos más pequeños [30].

La motilidad espermática es un parámetro básico para valorar la calidad espermática tanto antes como después de someter las muestras a un tratamiento de congelación [3,6,9,13]. En nuestro estudio, la motilidad del semen congelado con el protocolo NL oscilaba entre un 60-70% durante todo el periodo experimental, siendo nuestros resultados comparables a los obtenidos en otros trabajos que utilizan el nitrógeno líquido para congelar y conservar semen canino [4,13,21]. Dentro de cada ejemplar, la motilidad espermática se modificaba muy ligeramente a lo largo del periodo experimental, indicando que este parámetro seminal perma-

Nuestro estudio confirma que el semen se comporta de manera diferente frente a la congelación en función del individuo

nece inalterable durante un año tras la congelación. Sin embargo, se detectaron pequeñas diferencias entre machos en la motilidad post-congelación: en fresco, la motilidad seminal no presentaba diferencias entre machos; tras la congelación, los machos 1 y 4 mostraron valores más bajos de motilidad que los otros machos tanto a corto (4 meses) como a largo (12 meses) plazo tras la congelación. Este hecho confirma que, en el Dogo Canario, existe variabilidad individual en la calidad seminal post-congelación.

Con la técnica del UF, todos los machos, salvo el macho 4, mostraron una motilidad seminal prácticamente similar a lo largo del periodo experimental. Por otro lado, cuando la motilidad espermática se comparaba entre ejemplares, se observaba que en tres de los machos (perros 2, 3 y 5) la motilidad seminal presentaba valores superiores a los de los machos 1 y 4. Esta variabilidad individual se detectó en ambas técnicas de congelación, demostrando que la variación entre individuos era independiente del procedimiento de congelación utilizado.

Con respecto a la vitalidad espermática, en ambos protocolos de congelación, los valores medios de espermatozoides vivos eran prácticamente similares en las dos técnicas. En la mayoría de estudios, tras la congelación, el porcentaje de vitalidad del semen canino varía entre 50 y 80% [12-14,17], siendo nuestros resultados comparables a los mejores valores observados en otros estudios. Además, cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares, sólo en el protocolo UF, uno de los machos mostró un número mayor de células

mueras que el resto de perros. Estos resultados indican que la variabilidad individual tiene menos influencia sobre el porcentaje de vitalidad post-congelación que en el porcentaje de motilidad, especialmente en el protocolo NL.

En la mayoría de los estudios, el porcentaje de morfoanomalías alcanza valores entre el 10-25% tras la congelación con nitrógeno líquido [3,17] y en torno al 11% cuando se utilizan ultracongeladores de -152 °C [14]. En nuestro estudio, el porcentaje de morfoanomalías con la técnica NL mostraba un valor medio prácticamente similar al observado cuando se utilizaba el método de UF (9.7% *versus* 10.0%, respectivamente). Con el protocolo de NL, se detectaron diferencias significativas entre los donantes a los 2 y 4 meses. Sin embargo, con la técnica de UF, el porcentaje de morfoanomalías se mantenía prácticamente igual a lo largo de la experiencia en todos los ejemplares.

En nuestro estudio, las características seminales en fresco fueron prácticamente similares entre todos los machos; sin embargo, tras el procesado y congelación seminal, se observaron diferencias en la calidad seminal entre machos, especialmente en la motilidad. En la especie canina, cuando se procesa el semen para ser congelado, la mayoría de estudios realizan un *pool* seminal de diferentes machos y no se suele desarrollar una congelación seminal individual. Nuestro estudio confirma que el semen se comporta de manera diferente frente a la congelación en función del individuo: esta variabilidad individual se detectaba en ambos protocolos, por lo que la variabilidad

Los resultados obtenidos in vitro en el Dogo Canario confirman que el uso de ultracongeladores de -152 °C es una técnica alternativa al nitrógeno líquido para congelar y conservar semen canino.

seminal post-congelación era independiente de la técnica de congelación empleada.

Los resultados obtenidos in vitro en el Dogo Canario confirman que el uso de ultracongeladores de -152 °C es una técnica alternativa al nitrógeno líquido para congelar y conservar semen canino. Por otro lado, actualmente estamos desarrollando un estudio in vivo en nuestro laboratorio, donde 8 hembras de la raza Beagle se han inseminado con semen congelado mediante la utilización de ultracongeladores y se han generado gestaciones positivas. Este hecho confirma por primera vez que el semen canino congelado con el método de UF sigue siendo fértil. No obstante, el número de perras usadas es bajo y resulta esencial desarrollar experiencias con un mayor número de hembras, para definir la tasa de fertilización tras inseminación con semen congelado con el uso de ultracongeladores de -152 °C.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farstad W, Andersen-Berg K. *Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog.* J Reprod Fert Suppl 1989;47:243-5.
2. Linde-Forsberg C, Forsberg M. *Fertility in dogs in semen in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen.* J Reprod Fert Suppl 1989;39:299-310.
3. Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP. *Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen.* Vet Rec 1996;138:154-7.

4. Silva LD, Verstegen JP. *Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa.* Theriogenology 1995;44:571-9.
5. Fontbonne A, Badinand F. *Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen.* J Reprod Fert Suppl 1993;47:325-7.
6. Nöthling J, Gerstenberg C, Volkmann D. *Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh quality in dogs.* J Reprod. Fert Suppl 1997;51:109-116.
7. Rijsselaere T, Van Soom, Maes D, Kruif A. *Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh canine spermatozoa.* Theriogenology 2002 57 1669-1681.
8. Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. *Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C.* Theriogenology 1995 44 885-900.
9. Thomas PG, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN. *A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen.* Theriogenology 1993; 40:1199-1205.
10. Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N, Somlev B. *Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders.* Theriogenology 1997;48:1343-9.
11. Peña A, Linde-Forsberg C. *Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog*

spermatozoa. *Theriogenology* 2000;54:703-718.

12. Peña A, Linde-Forsberg C. *Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa*. *Theriogenology* 2000; 54:859-875.

13. Peña A, Lugalde L, Barrio M, Herradón P, Quintela L. *Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa*. *Theriogenology* 2003;59:1725-1739.

14. Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A. *Cryopreservation of semen in the dog: use of ultrafreezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen*. *Theriogenology* 2005;63:72-82.

15. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL. *Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs*. *J Reprod Fert Suppl* 1997; 51:99-108.

16. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. *Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws*. *Theriogenology* 1989;31:451-461.

17. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo S, Goodrowe K. *Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction*. *Theriogenology* 1997;48:1329-1342.

18. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. *Effects of*

four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fert Suppl* 1993; 47:291-6.

19. Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C. *In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation*. *Theriogenology* 1997;48:247-256.

20. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. *Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing*. *Theriogenology* 2000;54:579-585.

21. Rota A, Peña A, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. *In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns*. *Anim Reprod Sci* 1999;57:199-215.

22. Mickelsen WD, Memon MA, Anderson PB, Freeman DA. *The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch*. *Theriogenology* 1993;39:553-560.

23. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon I, England GC. *Cryopreservation of epididymal dog sperm*. *Anim Reprod Sci* 2001;67:101-111.

24. Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil J. *Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates*. *Theriogenology* 2001;56:801-815.

25. Iguer-ouada M, Verstegen JP. *Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders.* Theriogenology 2001;55:671-684.

26. Schubert C, Seager SW. *Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male dalmatian.* Canine Pract 1991;16:17-21.

27. Seager SW, Schubert C. *Semen collection and evaluation for the clinical assessment of fertility parameters in the male rottweiler.* Canine Pract 1996;21:30-34.

28. England GC, Allen WE. *Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination.* Theriogenology 1992;37:363-371.

29. Oettle EE. *Sperm morphology and fertility in the dog.* J Reprod Fertil Suppl 1993;47:257-260.

30. Johnston S, Kustritz M, Olson P. *Semen collection, evaluation and preservation.* In: WB Saunders (Ed), Canine and Feline Theriogenology, Philadelphia 2001, pp. 287-306.

BIOGRAFÍA

DESIRÉE ÁLAMO SANTANA

Licenciada en Veterinaria en 2001 por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Becaria de investigación del Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología, comienza sus estudios de doctorado en 2002 en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Tras realizar una estancia de investigación en la Facultad de Veterinaria de Lugo, defiende en 2003 la tesina titulada "Congelación y conservación de semen en la especie canina: utilización de ultracongeladores de -152° C como técnica alternativa al nitrógeno líquido".

Posteriormente, realiza un periodo de especialización en la Ecole Nationale Veterinaire de Alfort (Francia), bajo la dirección del prestigioso Dr. Alain Fontbonne.

Ha participado en diferentes proyectos de investigación, publicado 5 artículos internacionales y actualmente está finalizando la redacción de una tesis doctoral que se defenderá a finales de 2006 titulada "Criopreservación de semen en la especie canina mediante la utilización de ultracongeladores de -152° C: pruebas in vitro e in vivo".

Patrocinador de esta investigación:

FAMILIA MEGÍAS MARTÍNEZ