

# Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido *versus* ultracongeladores de $-152^{\circ}\text{C}$ ) y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario

Batista M, Alamo D, González F, Rodríguez N, Cabrera F, Gracia A

Obstetricia y Reproducción, Facultad de Veterinaria, ULPGC, 35416 Arucas, Las Palmas

Tel. +34 928 454356. Fax. +34 928 457430

E-mail: mbatista@dpat.ulpgc.es

**Influence of the freezing technique (nitrogen liquid *versus* ultrafreezer of  $-152^{\circ}\text{C}$ ) and male-to-male variation over the semen quality in dogs of the Canarian mastiff breed**

**Palabras clave:** semen, perro, criopreservación, ultracongeladores, variación individual.

**Keywords:** semen, dog, cryopreservation, ultra-low temperature freezer, male-to-male variability

**RESUMEN:** Este trabajo experimental pretendía valorar la calidad *in vitro* del semen canino congelado por un ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 12 meses, así como para evaluar la variación individual en la calidad seminal en 5 perros de la raza Dogo Canario. Cuatro eyaculados de cada perro se procesaron de manera individual hasta alcanzar una dilución final con una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, glicerol al 5% y Equex al 0.5%. Posteriormente, se testaron dos técnicas de congelación para evaluar la calidad seminal (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de células con morfoanomalías) a los 1, 30, 60, 120 y 360 días tras la congelación: (I) el semen era congelado y almacenado en nitrógeno líquido; (II) el semen era congelado y almacenado en un ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ . Tras la congelación, se observó que la motilidad, la vitalidad espermática y el porcentaje de células con morfoanomalías con la técnica de nitrógeno líquido no eran significativamente diferentes de las obtenidas con el protocolo del ultracongelador. Por otro lado, las características microscópicas en el semen fresco fueron prácticamente similares entre machos; sin embargo, tras el procesado y la posterior congelación del semen, se observaron diferencias entre individuos en la calidad seminal, especialmente en la motilidad espermática. Esta variabilidad individual se detectó en ambas técnicas de congelación, demostrando que la variación entre individuos era independiente del procedimiento de congelación utilizado. Los resultados *in vitro* obtenidos en el Dogo Canario confirmaron que el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  es una alternativa potencial frente al nitrógeno líquido para congelar y conservar semen canino durante largos periodos de tiempo.

**SUMMARY:** This experimental work was carried out to assess the *in vitro* quality of canine semen frozen by an ultrafreezer of  $-152^{\circ}\text{C}$  for a time of 12 months and to evaluate the male-to-male variation of frozen semen in 5 males of the Canarian Mastiff race. Four ejaculates of each dog were processed separately to reach a final dilution with a concentration of  $100 \times 10^6$  spermatozoa/mL, glycerol at 5% and Equex at 0.5%. Then, two freezing techniques were tested to evaluate the seminal quality (motility, percent live sperm and the percentage of sperm cells with abnormal morphology) at 1, 30, 60, 120 and 360 days after freezing, (I) semen was frozen and stored in liquid nitrogen; (II) semen was frozen and stored in the ultra-low freezer at  $-152^{\circ}\text{C}$ . After freezing, the sperm motility, the percentage live sperm and the percentage of abnormal spermatic cells in the liquid nitrogen technique were not significantly different from that observed in the ultrafreezer protocol. On the other hand, the microscopic characteristics in fresh semen were practically similar among males; however, after the semen processing and freezing, it was observed significant differences ( $p < 0.05$ ) among males in the seminal quality, especially in the sperm motility. This inter-individual variability was detected in both freezing protocols, showing that the male-to-male variation in the seminal quality post-freezing was independently of the freezing technique used. The *in vitro* results obtained in the Canarian Mastiff race confirmed that the use of ultra-freezers at  $-152^{\circ}\text{C}$  is a potential alternative to liquid nitrogen to freeze and store canine semen for long periods of time.

**Tabla 1.** Media  $\pm$  SEM de volumen, concentración, y porcentaje de motilidad, vitalidad y morfoanomalías en los eyaculados de los ejemplares donantes

PERROS	EYACULADOS POR PERRO	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN (x 10 <sup>6</sup> células/ml)	MOTILIDAD (%)	VITALIDAD (%)	MORFOANOMALÍAS (%)
1	4	2.60 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	1379.4 <sup>a</sup> $\pm$ 214.6	90.0 $\pm$ 0.9	95.0 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 1.0
2	4	4.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	889.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 183.4	91.1 $\pm$ 1.3	95.3 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3
3	4	3.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1091.9 <sup>ab</sup> $\pm$ 99.3	90.5 $\pm$ 1.0	92.6 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.9
4	4	3.0 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	770.7 <sup>b</sup> $\pm$ 31.1	90.7 $\pm$ 1.1	93.6 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.7
5	4	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	728.1 <sup>b</sup> $\pm$ 40.1	91.0 $\pm$ 0.9	94.3 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.7
Media	4	3.5 $\pm$ 0.3	899.9 $\pm$ 114.4	90.6 $\pm$ 0.3	94.2 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.6

<sup>ab</sup>: Diferentes letras dentro de una misma columna implican diferencias significativas (  $p < 0.05$  )

### 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, particularmente si se realiza una técnica de inseminación intravaginal [2, 5-6]. De manera general, se asume

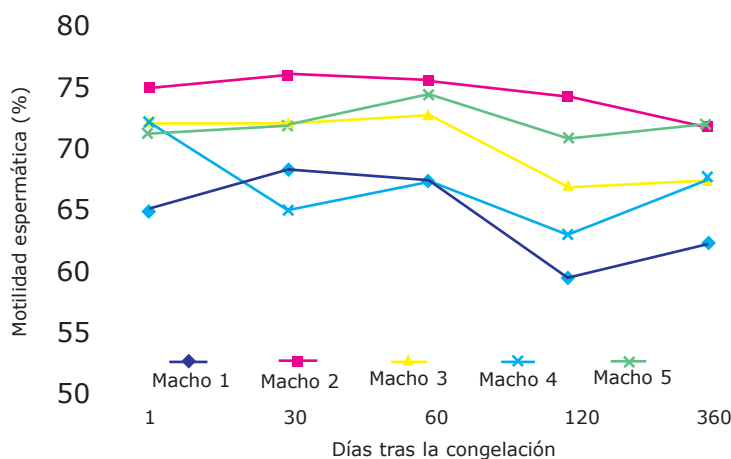
que el semen canino congelado puede ver reducida su capacidad fértil [7].

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]. Sin embargo, es difícil llevar a cabo una comprobación experimental, ya que es necesario el uso de un gran número de animales para obtener conclusiones definitivas. En muchos estudios realizados *in vitro*, la calidad seminal del semen congelado-descongelado se valora mediante la determinación de diferentes paráme-

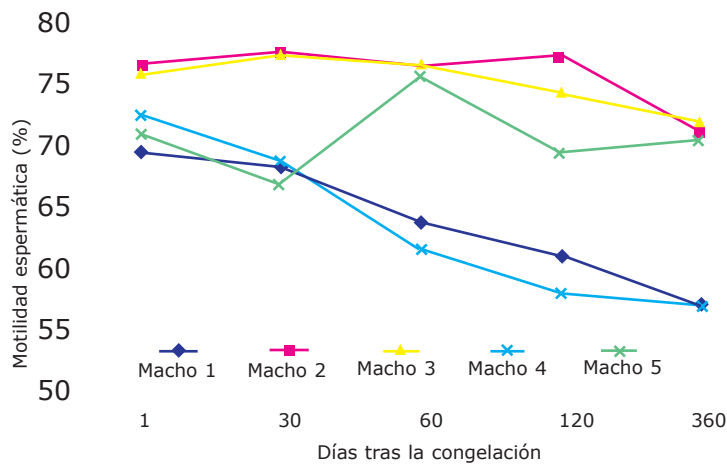
tros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las acrosomías y las morfoanomalías [9-14]. Diferentes autores han intentado establecer una correlación entre la fertilidad obtenida con una muestra de semen y la valoración seminal *in vitro* de los diferentes parámetros mencionados anteriormente [8, 15]. La motilidad post-congelación parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal [6]. 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, 15], 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

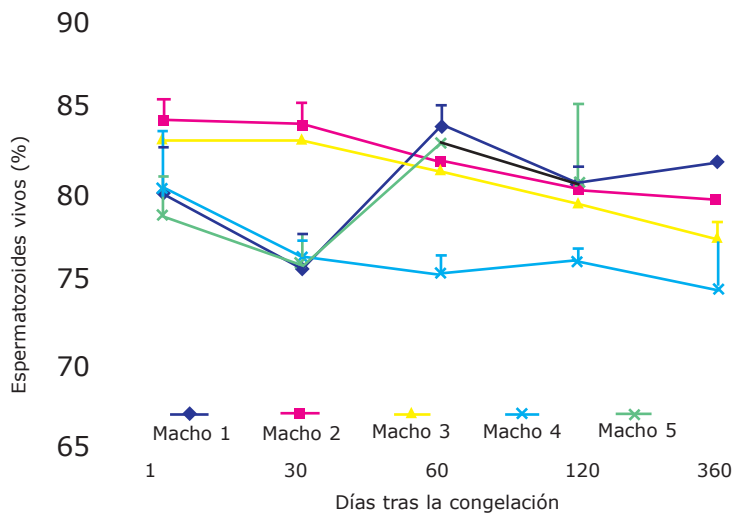
**Figura 1.** Motilidad espermática a lo largo del periodo experimental en nitrógeno líquido



**Figura 2.** Motilidad espermática a lo largo del periodo experimental en el ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$



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



inseminación artificial con semen congelado.

Un estudio reciente [14] desarrollado en perros mestizos, propone el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  como una técnica alternativa para la congelación y conservación de semen en la especie canina. Los resultados de este estudio preliminar mostraron que la calidad seminal *in vitro*, cuatro meses post-congelación, era similar que la obtenida con nitrógeno líquido, indicando que el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  puede ser una técnica alternativa para la criopreservación seminal en la espe-

cie canina. Sin embargo, el bajo número de animales utilizados en este trabajo, hace necesario completar esta investigación utilizando un mayor número de animales y conservando las muestras durante periodos de tiempo más largos.

Los objetivos de nuestra experiencia consistían en valorar la calidad seminal *in vitro* de semen criopreservado en un ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$  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

### 1) Animales

Los animales utilizados pertenecían a diferentes propietarios, que nos cedían periódicamente sus perros para la obtención del semen. 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.

### 2) Recogida y evaluación seminal

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo penenano, 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. Por tanto, en esta experiencia se utilizaron cuatro eyaculados de cada uno de los cinco machos.

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 ( $37^{\circ}\text{C}$ ), a 100 y 200 aumentos [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 1000 aumentos; valorando un mínimo de 200 espermatozoides por eyaculado. Los espermato-

zoides 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).

### 3) Procesado del semen

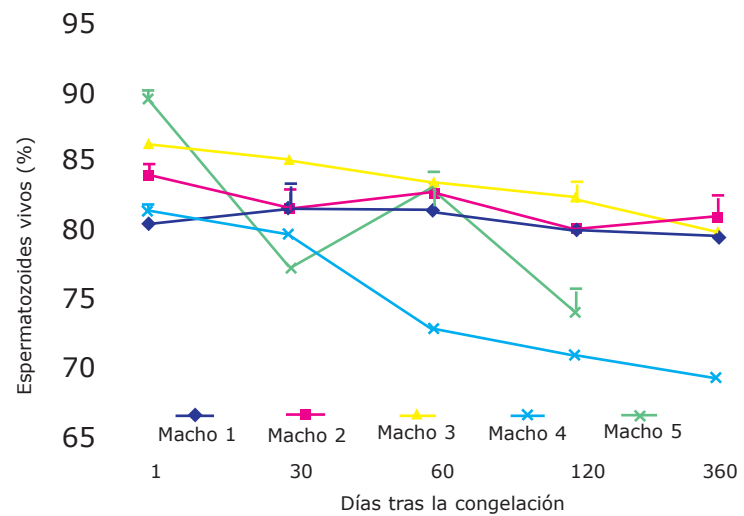
Los eyaculados de cada animal fueron procesados de forma individual. Cada eyaculado era centrifugado a 700 g durante 5 minutos y el plasma seminal fue retirado. A continuación, los espermatozoides se resuspendieron con 2 ml de Diluyente-1 (DIL-1: 2.4 g TRIS, 1.4 g ácido cítrico, 0.8 g glucosa, 0.06 Na bencilpenicilina, 20 ml de yema de huevo, 3% glicerol y agua destilada hasta 100 ml, pH 6.5); posteriormente, se determinó la concentración espermática y el volumen era ajustado con el mismo DIL-1 a temperatura de nuestro laboratorio (20°C), para conseguir una concentración final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Esta primera dilución se sometía durante una hora a un periodo de equilibrio en el interior de una cámara frigorífica a 4°C.

Tras el equilibrio, se añadió el Diluyente-2 (DIL-2: 2.4 g TRIS, 1.4 g ácido cítrico, 0.8 g glucosa, 0.06 Na bencilpenicilina, 20 ml de yema de huevo, 1% Equex STM paste, 7% de glicerol y agua destilada hasta 100 ml, pH 6.5) a 4°C, obteniendo una concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml, 5% de glicerol y 0.5% de Equex. 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.

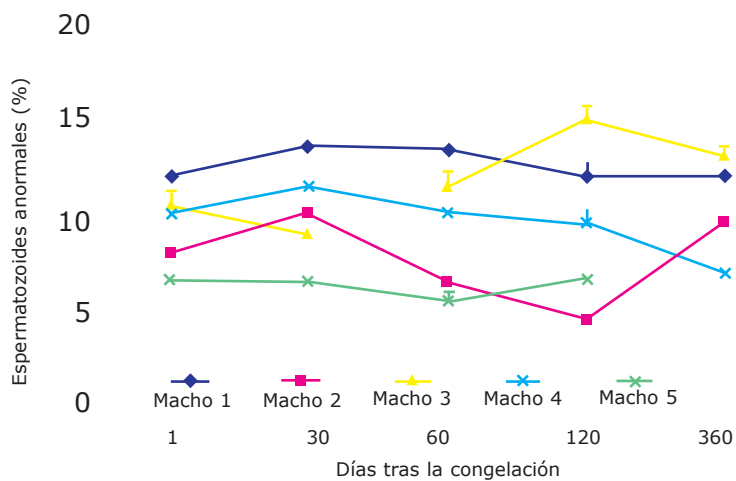
### 4) Congelación seminal

Se utilizaron dos protocolos diferentes de congelación: (1) Las pajuelas

**Figura 4.** Vitalidad espermática en el protocolo de congelación con ultracongeladores de  $-152^\circ\text{C}$



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



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  $-152^\circ\text{C}$  en una caja de poliestireno a  $4^\circ\text{C}$  (protocolo UF). El modelo de ultracongelador

empleado fue el Sanyo  $-152^\circ\text{C}$  (MDF-1155 ATN, Sanyo Electric Co. Japan) equipado con un monitor de temperatura en el interior del congelador. Antes de comenzar la experiencia, la curva de descenso de temperatura del ultracongelador de  $-152^\circ\text{C}$  fue monitorizada para comprobar que ocurría un descenso lento de temperatura ( $-5^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ) desde  $5^\circ\text{C}$  a  $-10^\circ\text{C}$ , y un descenso rápido ( $-30^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ) desde  $-10^\circ\text{C}$  a  $-100^\circ\text{C}$ ; por debajo de esta  $t^\circ$ , la curva de congelación era de  $-10^\circ\text{C}/\text{minuto}$  desde  $-100^\circ\text{C}$  a  $-130^\circ\text{C}$ .

### 5) 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 (2.4 g TRIS, 1.4 g ácido cítrico, 0.8 g glucosa, 0.06 g Na-Bencilpenicilina y hasta 100 ml de agua destilada, pH 6.51) y se mantenía a 37°C durante toda la valoración. Inmediatamente tras la descongelación, se valoraba subjetivamente el porcentaje de motilidad utilizando un microscopio de contraste de fases, con una placa calentadora (37°C), a 100 y 200 aumentos [14, 20]. El porcentaje de vitalidad y morfoanomalías se determinaba utilizando una extensión de eosina-nigrosina [14, 20] en un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos. El número de pajuelas valoradas cada día y para cada protocolo de congelación fue de 8 muestras/perro.

### 6) Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media  $\pm$  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  $P < 0.05$ .

### 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, sólo el macho 1 mostraba un porcentaje superior ( $p > 0.1$ ) de células anormales.

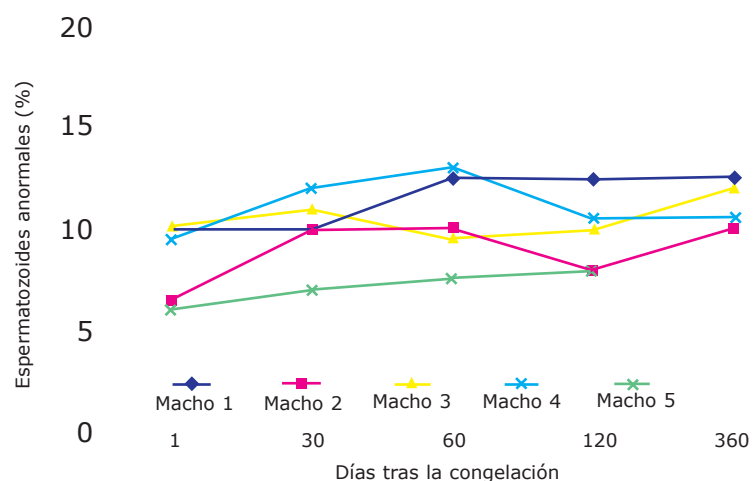
El porcentaje de motilidad (media  $\pm$  SEM) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en las Figuras 1 y 2. Con el protocolo NL (Fig. 1), la motilidad se situaba alrededor del 60-70% (rango: 59.5-76.1%), no existiendo diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental; sin embargo, si 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 ( $p < 0.05$ ) con respecto a los machos 2 y 5. Con la técnica de UF (Fig. 2) se observaban porcentajes similares de motilidad (rango: 57-75.5%) dentro de cada macho, no observándose diferencias significativas en los cinco periodos valorados; no obstante, cuando se comparaban

los ejemplares, existía un porcentaje de motilidad 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 (rango: 74.3-84%), no observándose diferencias significativas entre perros a lo largo de todo el periodo experimental. Con el protocolo UF, la media de vitalidad oscilaba entre un 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 significativas en los cinco periodos valorados, con valores medios similares para cada uno de los machos estudiados.

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

**Figura 6.** Porcentaje de morfoanomalías espermáticas en el protocolo de congelación en ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$



(protocolos NL y 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 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, en primer lugar, que los resultados obtenidos *in vitro* después de congelar y conservar el semen canino con un ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ , confirman plenamente los resultados obtenidos en el estudio preliminar desarrollado sobre un menor número de donantes y durante un periodo de tiempo más corto [14]. 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 [25-27]. En nuestro estudio, en fresco, los valores medios de motilidad y vitalidad eran similares o ligeramente superiores que los descritos para otras razas caninas [25-27] o tras la realización del pool seminal de perros de razas diferentes [7,8, 28,29]. 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:  $900 \times 10^6$  esp/ml) era superior que los descritos 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 la producción seminal es dependiente de la cantidad de tejido testicular, por lo 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 permanece 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. Antes del presente estudio, sólo un trabajo previo había valorado la calidad seminal de muestras congeladas y conservadas con un UF durante 4 meses [14]; en ese estudio, la motilidad espermática presentaba valores medios en torno al 70%; los resultados de nuestro estudio confirmaron

que, un año tras la congelación, la motilidad seminal presentaba valores similares a los observados en el estudio preliminar [14]. Por otro lado, cuando se comparaba entre ejemplares, se observaba que en tres de los machos (machos 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 protocolo 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 (79% *versus* 80%, en los protocolos NL y UF, respectivamente). En la mayoría de estudios, tras la congelación, el porcentaje de vitalidad del semen canino variaba entre 50 y 80% [3, 4, 12-14, 17]. Además, cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares, sólo en el protocolo UF, uno de los machos mostró un número mayor de células muertas 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  $-152^{\circ}\text{C}$  [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 procesamiento y congelación seminal, se observaron diferencias en la calidad seminal entre machos, especialmente en la motilidad. En la especie porcina y en rumiantes [32-34] ya se ha constatado una variabilidad en la calidad seminal post-congelación; sin embargo, en la especie canina, cuando se procesa el semen para ser congelado, muchos 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 (NL y UF), por lo que la variabilidad seminal post-congelación era independiente de la técnica de congelación empleada.

La motilidad progresiva es el parámetro más frecuentemente determinado para la evaluación de la calidad seminal del semen canino congelado-descongelado [6, 8, 15]. Además, otros estudios muestran una correlación positiva entre el porcentaje de motilidad progresiva del semen canino y el porcentaje de morfoanomalías [14, 35]. Se puede afirmar que la motilidad podría ser un buen indicador de la calidad seminal post-congelación, y por tanto, ser un parámetro básico para determinar la capacidad fértil del semen canino tras la congelación.

Los resultados obtenidos *in vitro* en el Dogo Canario confirman que el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  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 (comunicación personal). Este hecho confirma por

primera vez, que el semen canino congelado con el método de UF sigue siendo fértil. No obstante, el nº de perras usadas es evidentemente bajo y resulta esencial desarrollar experiencias con un mayor nº de hembras, para definir la tasa de fertilización tras inseminación con semen congelado con el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$ .

### Bibliografía

1. Farstad W, Andersen-Berg K. (1989): Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47: 243-245.
2. Linde-Forsberg C, Forsberg M. (1989): 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.* 39: 299-310.
3. Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP. (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 138:154-157.
4. Silva LD, Verstegen JP. (1995): Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44:571-9.
5. Fontbonne A, Badinand F. (1993): Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47: 325-327.
6. Nöthling J, Gerstenberg C, Volkman D. (1997): Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh quality in dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51:109-116.
7. Rijsselaere T, Van Soom, Maes D, Kruif A. (2002): Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh canine spermatozoa. *Theriogenology* 57: 1669-1681.

8. Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. (1995): Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology* 44: 885-900.
9. Thomas PG, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN. (1993): A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 40:1199-1205.
10. Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N, Somlev B. (1997): Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology* 48: 1343-1349.
11. Peña A, Linde-Forsberg C. (2000): Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
12. Peña A, Linde-Forsberg C. (2000): Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859-875.
13. Peña A, Lugalde L, Barrio M, Herradón P, Quintela L. (2003): Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1725-1739.
14. Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A. (2005): Cryopreservation of semen in the dog: use of ultrafreezers of  $-152^{\circ}\text{C}$  as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63:72-82.
15. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL. (1997): Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 51: 99-108.
16. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-

- thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 31: 451-461.
17. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo S, Goodrowe K. (1997): Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48: 1329-1342.
  18. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. (1993): Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 291-296.
  19. Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C. (1999): *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.
  20. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. (2000): Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.
  21. Rota A, Peña A, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H. (1999): *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57:199-215.
  22. Mickelsen WD, Memon MA, Anderson PB, Freeman DA. (1993): The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology* 39:553-560.
  23. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon I, England GC. (2001): Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 101-111.
  24. Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil J. (2001): Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56:801-815.
  25. Iguer-ouada M, Verstegen JP. (2001): Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
  26. Schubert C, Seager SW. (1991): Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male dalmatian. *Canine Pract.* 16: 17-21.
  27. Seager SW, Schubert C. (1997): Semen collection and evaluation for the clinical assessment of fertility parameters in the male rottweiler. *Canine Pract.* 21:30-34.
  28. England GC, Allen WE. (1992): Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology* 37: 363-371.
  29. Oettle EE. (1993): Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 257-260.
  30. Johnston S, Kustritz M, Olson P. (2001): En *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia: 287-306.
  31. Watson PF. (1997): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.
  32. Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. (2005): The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63: 370-82
  33. Cabrera F. (1999): Producción y congelación seminal en la variedad majorera de la Agrupación Caprina Canaria. PhD Tesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
  34. Singh MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. (1996): Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of back spermatozoa. *Theriogenology* 45: 405-416.
  35. Ellington J, Scarlett J, Meyers-Wallen V, Mohammed T, Surman V. (1993): Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology* 40: 725-733.