



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## **“Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado”**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista

### **Autores:**

Diana Isabel Jara Jimbo

CI: 0106640402

Correo electrónico: isabel.24112907@gmail.com

Efraín Bernardo Paredes Quito

CI: 0350007753

Correo electrónico: efrainparedes1@gmail.com

### **Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero PhD., Mgs., M.V.Z.

CI: 0103912846

**Cuenca, Ecuador**

17-Septiembre-2021



## RESUMEN

El presente estudio evaluó dos métodos de selección de espermatozoides epididimarios de perros, uno por centrifugación en gradientes de densidad usando BoviPure® (CGD-BoviPure®), y otro por Swim-up. Se recuperaron muestras espermáticas de sesenta epidídimos mediante flujo retrógrado usando el diluyente TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa + 20% de yema de huevo) y se conformaron veinte pools (3 muestras/pool). La selección espermática se realizó en muestras frescas individuales (n=60) o muestras agrupadas (n=20), ya sea frescas, refrigeradas (24 h) o congeladas-descongeladas (C/D). En cada muestra, un grupo control (sin seleccionar) fue incluido. Todas las muestras fueron evaluadas su cinética-morfometría y la integridad de las membranas espermáticas mediante el sistema CASA, (SCA®) y la prueba de fluorescencia PI/PNA-FITC, respectivamente. Los resultados demostraron que CGD-BoviPure® fue más efectivo en seleccionar espermatozoides de perro que el Swim-up y control, basado en incremento de la cinética e integridad de membranas plasmática (IMP) y acrosomal (IMA). En muestras individuales, la selección por CGD-BoviPure® incrementó ( $P < 0,05$ ) la motilidad total y progresiva (MP), velocidades curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL), linealidad (LIN), oscilación (WOB), frecuencia de batida de flagelo (BCF), IMP e IMA. Sin embargo, en muestras agrupadas, la selección por CGD-BoviPure® mostró ser efectiva sólo en muestras refrigeradas y C/D, incrementando ( $P < 0,01$ ) la MP, VCL, WOB e IMP. Eficientemente, la selección de los espermatozoides C/D mediante CGD-BoviPure® no varió ( $P > 0,05$ ) las dimensiones morfométricas de la cabeza comparados con sus valores antes y después de la congelación. En conclusión, la selección mediante CGD-BoviPure® fue exitosa debido a que mejoró la calidad de los espermatozoides epididimarios caninos frescos y criopreservados.

**Palabras clave:** Perros. Espermatozoides epididimarios. CGD-BoviPure®. Swim-up



## ABSTRACT

The present study evaluated two dog epididymal sperm selection methods, one by BoviPure® density-gradients centrifugation, and the other by conventional swim-up. Sperm samples from sixty epididymides were recovered by retrograde flushing using TCG-EY extender (tris, citric acid, glucose + 20% egg yolk), and twenty pools were conformed (3 samples/pool). The sperm selection procedures were performed on individual fresh samples (n=60) or pooled samples (n=20), either fresh, chilled (24 h), or frozen-thawed (F/T). In each sample, a non-selected control group was included. In all samples, the kinetic-morphometry and sperm membranes integrity were evaluated by the CASA system (SCA®) and PI/PNA-FITC fluorescence test, respectively. The results showed that BoviPure®-DGC was more effective in selecting canine sperm than Swim-up and control, based on improving kinetics and integrity of plasma (IPM) and acrosomal (IAM) membranes. In individual samples, the selection by BoviPure®-DGC increased ( $P < 0.05$ ) the total and progressive motility (PM), curvilinear (VCL), and rectilinear (VSL) velocities, linearity (LIN), oscillation (WOB), beat-cross frequency (BCF), IPM, and IAM. In pooled samples, the sperm selection by BoviPure BoviPure®-DGC, however, was more effective only in chilled and F/T samples, increasing ( $P < 0.01$ ) the PM, VCL, WOB, and IPM values. Efficiently, the selection of F/T sperm samples by BoviPure®-DGC did not vary ( $P > 0.05$ ) the morphometric dimensions of the head compared with its values before and after freezing. In conclusion, the sperm selection by BoviPure®-DGC was successful in improving the quality of fresh and cryopreserved dog epididymal sperm.

**Key words:** Dogs. Epididymal sperm. CGD-BoviPure®. Swim-up.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
Índice de Figuras .....	6
Índice de Tablas .....	7
Índice de Anexos .....	8
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	13
<b>DEDICATORIA</b> .....	14
<b>ACRÓNIMOS</b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1. Objetivo General.....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>4. REVISIÓN DE LA LITERATURA</b> .....	21
4.1. Anatomía del aparato reproductor del perro.....	21
4.1.1. Testículos .....	21
4.1.2. Epidídimo.....	21
4.2. Morfología del espermatozoide .....	22
a) Cabeza:.....	22
b) Segmento o pieza intermedia.....	22
c) Cola:.....	22
4.3. Características macroscópicas del semen .....	22
4.3.1. Volumen.....	22
4.3.2. pH .....	23
4.4. Características microscópicas del semen .....	23
4.4.1. Concentración.....	23
4.4.2. Motilidad .....	23
4.4.3. Vitalidad .....	23
4.5. Diluyentes.....	24
4.6. Recolección espermática .....	24



4.7.	Medios.....	25
4.7.1.	Sperm talp .....	25
4.7.2.	Solución coloidal de BoviPure®.....	25
4.8.	Conservación del semen .....	26
4.8.1.	Semen fresco.....	26
4.8.2.	Semen refrigerado .....	26
4.8.3.	Semen congelado.....	26
4.9.	Descongelación de semen .....	27
4.10.	Técnicas de selección espermática .....	27
4.10.1.	Migración espermática vertical o Swim-up .....	27
4.10.2.	Centrifugación Simple.....	28
4.10.3.	Centrifugación en gradientes de densidad o Centrifugación coloidal	28
4.11.	Evaluación de la calidad espermática .....	29
4.11.1.	Motilidad .....	29
4.11.2.	Integridad de la membrana plasmática.....	30
4.11.3.	Integridad del acrosoma .....	31
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
5.1.	Materiales.....	32
5.1.1.	Materiales Físicos .....	32
5.1.2.	Materiales Biológicos .....	32
5.1.3.	Materiales Químicos .....	32
5.1.4.	Materiales de Laboratorio .....	33
5.2.	Metodología.....	34
5.2.1.	Área de Estudio .....	34
5.2.1.1.	Ubicación política–geográfica.....	34
5.2.2.	Unidad experimental y Diseño Experimental .....	35
5.2.3.	Metodología para la investigación.....	36
5.2.3.1.	Preparación de diluyentes y medios.....	36
5.2.3.2.	Recolección de testículos.....	37
5.2.3.3.	Recuperación espermática.....	38
5.2.3.4.	Análisis de concentración espermática de muestras frescas .....	39
5.2.3.5.	Selección espermática en muestras epididimarias frescas .....	39



5.2.3.6. Métodos de selección espermática .....	40
5.2.3.6.1. Swim-up.....	40
5.2.3.6.2. CGD-BoviPure® .....	40
5.2.3.7. Análisis de selección espermática en muestras epididimarias agrupadas (pools) frescas y criopreservadas. ....	41
5.2.3.7.1. Refrigeración de las muestras de pool .....	42
5.2.3.7.2. Congelación y descongelación de las muestras de pool .....	42
5.2.3.8. Análisis de la calidad espermática .....	43
5.2.3.8.1. Cinética espermática .....	43
5.2.3.8.2. Integridad de membranas plasmática y acrosomal.....	43
5.2.3.8.3. Morfometría de la cabeza espermática.....	44
5.3. Diseño estadístico .....	45
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
6.1. Selección espermática en muestras individuales frescas – diluidas .....	46
6.2. Selección espermática en muestras agrupadas (pools), frescas – diluidas y criopreservadas. ....	50
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>10. ANEXOS.. .....</b>	<b>74</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Órganos externos del perro. ....	21
<b>Figura 2.</b> Morfología del espermatozoide.....	22
<b>Figura 3.</b> Ubicación del área de estudio .....	34
<b>Figura 4.</b> Cuadro de Diseño Experimental.....	35
<b>Figura 5.</b> Lectura de los espermatozoides en la cámara de Neubauer.....	39
<b>Figura 6.</b> MT y MP de muestras espermáticas individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. ....	47
<b>Figura 7.</b> Velocidades, VCL, VAP y VSL de muestras individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	47
<b>Figura 8.</b> Parámetros de relación: STR, LIN y WOB de muestras individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. ....	48
<b>Figura 9.</b> ALH y BCF de muestras espermáticas individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. ....	48
<b>Figura 10.</b> MT y MP de muestras espermáticas agrupadas, frescas - diluidas y criopreservadas (refrigeradas y C/D) y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	51
<b>Figura 11.</b> Velocidades, VCL, VAP y VSL de muestras espermáticas agrupadas frescas - diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	53
<b>Figura 12.</b> Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras espermáticas agrupadas frescas – diluidas y criopreservadas (refrigeradas durante 24 h y congeladas-descongeladas) y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	54
<b>Figura 13.</b> ALH y BCF de muestras espermáticas agrupadas frescas – diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	55
<b>Figura 14.</b> Estado de las membranas plasmática y acrosomal evaluados simultáneamente de muestras espermáticas agrupadas frescas-diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. IPIA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto, IPDA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado, DPIA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto, y DPDA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. ....	56
<b>Figura 15.</b> IMP e IMA de muestras espermáticas agrupadas frescas-diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	57



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diluyente sintético TCG.....	36
<b>Tabla 2.</b> Diluyente para congelación convencional (CC).....	36
<b>Tabla 3.</b> HEPES para fluorescencia.....	36
<b>Tabla 4.</b> Yoduro de propidio .....	36
<b>Tabla 5.</b> Aglutinina .....	37
<b>Tabla 6.</b> Componentes del medio Sperm-Talp.....	37
<b>Tabla 7.</b> Gradientes de densidad de BoviPure®.....	37
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de espermatozoides caninos de origen epididimario en las diversas categorías de integridad de las membranas plasmáticas y acrosomal (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) en las muestras individuales frescas-diluidas.....	49
<b>Tabla 9.</b> Dimensiones de la cabeza de espermatozoides caninos de origen epididimario de muestras agrupadas, frescas-diluidas y congeladas/descongeladas, y seleccionadas mediante CGD-BoviPure® y Swim-up. ....	60





## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA, SCA®) de muestras espermáticas individuales frescas-diluidas y seleccionados mediante CGD-BoviPure® y con Swim-up. ....	74
<b>Anexo 2.</b> Parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA, SCA®) resultantes de la evaluación de espermatozoides caninos epididimarios frescos-diluidos, refrigerados durante 24 horas y congelados-descongelados (C/D) y seleccionados o no con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	75
<b>Anexo 3.</b> Porcentajes de espermatozoides caninos de origen epididimario en las diversas categorías de integridad de la membranas plasmáticas y acrosomal (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) en las muestras frescas-diluidas, refrigeradas durante 24 horas y congeladas / descongeladas y seleccionadas o no con CGD-BoviPure® y Swim-up.....	76
<b>Anexo 4.</b> Paciente canino previo a orquiectomía.....	77
<b>Anexo 5.</b> Fichas de autorización para orquiectomía.....	77
<b>Anexo 6.</b> Muestra de testículo recolectado.....	77
<b>Anexo 7.</b> Muestra de epidídimo recuperado.....	77
<b>Anexo 8.</b> Flujo retrógrado.....	77
<b>Anexo 9.</b> Recuperación espermática.....	77
<b>Anexo 10.</b> Análisis de concentración espermática de muestras frescas.....	77
<b>Anexo 11.</b> Método de selección espermática Swim up en muestras frescas.....	77
<b>Anexo 12.</b> Método de selección espermática CGD-BoviPure® en muestras frescas.....	77
<b>Anexo 13.</b> Análisis de selección espermática en pools frescos y criopreservados..	77
<b>Anexo 14.</b> Congelación y descongelación de las muestras pools.....	77
<b>Anexo 15.</b> Análisis de Cinética espermática (CASA).....	77
<b>Anexo 16.</b> Integridad de membranas plasmática y acrosomal.....	77
<b>Anexo 17.</b> Morfometría de la cabeza espermática.....	77



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Diana Isabel Jara Jimbo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Septiembre de 2021.

---

Diana Isabel Jara Jimbo

C.I: 0106640402



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Efrain Bernardo Paredes Quito en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Septiembre del 2021.

Efrain Bernardo Paredes Quito

C.I: 0350007753



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Diana Isabel Jara Jimbo, autor/a del trabajo de titulación “Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 Septiembre de 2021.

---

Diana Isabel Jara Jimbo

C.I: 0106640402



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Efrain Bernardo Paredes Quito, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de Septiembre del 2021.

---

Efrain Bernardo Paredes Quito

C.I: 0350007753



## **AGRADECIMIENTOS**

Primero queremos agradecer a Dios por darnos sabiduría durante toda nuestra carrera universitaria y permitirnos culminar una meta más en nuestras vidas.

De manera especial, queremos expresar nuestro agradecimiento al director de tesis Dr. Andrés Galarza, principal colaborador durante este proceso, quien, con su conocimiento, apoyo, confianza y sobre todo paciencia permitió el desarrollo exitoso de esta investigación.

De igual manera nuestros agradecimientos a los docentes de las campañas de esterilización y a los técnicos del laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, quienes colaboraron durante la práctica de nuestro estudio.

A los doctores Jhonny Narváez, Luis Ayala y Guillermo Guevara, revisores de nuestra tesis, gracias por su tiempo y recomendaciones para la realización de esta investigación.

***Diana Jara y Bernardo Paredes***



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi familia, en especial a mi querida madre, Carmita, por su amor y apoyo para poder lograr esta meta, sobre todo en las situaciones más difíciles. A Magaly, por confiar en mí y brindarme sus consejos para seguir en adelante.

Al Dr. Andrés Galarza por su excelente apoyo académico y paciencia durante todo el proceso para la realización exitosa de esta investigación.

A mis compañeros Gabriela, Bernardo y Edison, gracias por su amistad y colaboración para la realización de este trabajo.

***Diana Jara Jimbo***

A Dios y a la Virgen, por regalarme sabiduría, entendimiento y conocimiento. A mi familia, hermanos, sobrinos, en especial a mis padres Luis y Rosario, quienes con sus palabras de aliento hicieron que siga adelante siempre siendo perseverante y me han enseñado a desafiar las dificultades de la vida para alcanzar cada una de mis metas.

A mis maestros, de manera especial al Dr. Andrés Galarza por su dedicación, su experiencia, sus conocimientos y su motivación.

A mis amigos, a mis compañeros de tesis Diana y Edison quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y experiencia, y a todas aquellas personas que estuvieron estos años de mi vida universitaria apoyándome para que este sueño se haga realidad.

***Bernardo Paredes Quito***

**ACRÓNIMOS**

TRA	Técnicas de reproducción asistida
IA	Inseminación artificial
FIV	Fecundación in vitro
ICSI	Inyección intra-citoplasmática
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LPO	Peroxidación lipídica
TCG	Tris, ácido cítrico, glucosa
CGD	Centrifugación por gradientes de densidad
C/D	Congelados/Descongelados
YH	Yema de huevo
PI	Yoduro de propidio
PNA-FITC	Aglutinina
µl	Microlitros
ml	Mililitros
g/ml	Gramo por mililitro
mM	Milimolar
mOsm/kg	Miliosmoles por kilogramo
NL <sub>2</sub>	Nitrógeno líquido
MT	Motilidad total
MP	Motilidad progresiva
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
VAP	Velocidad promedio
LIN	Linealidad
STR	Rectitud





WOB	Oscilación
BCF	Frecuencia del batido del flagelo
ALH	Amplitud del movimiento lateral de la cabeza
IPIA	Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto
IPDA	Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado
DPIA	Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto
DPDA	Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado
IMP	Membrana plasmática intacta
IMA	Membrana acrosomal intacta
AQP	Acuaporinas



## 1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides tiene un interés, tanto desde el punto de vista de conservación de especies y razas bajo amenazas latentes de extinción, como para uso del material criopreservado en programas de mejora genética en animales domésticos y silvestres (Santiago-Moreno y Galarza, 2019). La criopreservación abre la posibilidad de uso de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida (TRA) como la inseminación artificial (IA), la fecundación *in vitro* (FIV) o la inyección intracitoplasmática (ICSI) (Isachenko y col., 2012). Sin embargo, la eficacia de esas TRAs dependen directamente del porcentaje de criosupervivencia celular (Watson, 2000), y de los procedimientos que se desarrollen después de la criopreservación para mantener y/o mejorar la calidad espermática. Uno de los procedimientos más usados en las TRAs es la purificación o selección espermática de eyaculados o de muestras criopreservadas para su uso en la IA (Morrell y col., 2018).

La crioconservación de espermatozoides incluye la refrigeración (a corto, mediano o largo plazo), la congelación y vitrificación (Holt y col., 2014). Los procesos de criopreservación permiten detener la actividad metabólica y funcional de los espermatozoides indefinidamente, usando bajas temperaturas de almacenamiento. Estos protocolos de criopreservación se orientan a intentar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular (González y col., 2013).

El proceso de criopreservación produce una serie de cambios ultraestructurales, bioquímicos, mecánicos y osmóticos (Maxwell y col., 1993), que provocan daños severos e incluso la muerte de algunos espermatozoides, reduciendo la supervivencia celular (Hewitt y col., 2001). Estos daños incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (Ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial y acrosoma (reacción acrosómica) (Watson, 1995; Grötter y col., 2019). Igualmente, los procesos de congelación y descongelación determinan una desestructuración de los microtúbulos



que conforman el flagelo del espermatozoide. Las alteraciones de membrana y de microtúbulos están determinadas por el daño osmótico que se producen durante el proceso de congelación y descongelación, asimismo, el estrés osmótico también determina variaciones en las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide (O'Brien y col., 2019).

En resumen, la presencia de células muertas, indeseables, morfológicamente anormales, así como desechos celulares pueden afectar a los espermatozoides vivos y morfológicamente íntegros, debido probablemente, a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se acumulan en concentraciones deletéreas y que se han informado como inductores de apoptosis (Wang y col., 2003).

De igual manera sucede en el caso de espermatozoides caninos que provienen de eyaculaciones. Los eyaculados contienen, a más de los espermatozoides, componentes proteicos, fuentes de energía (azúcares) y enzimas (antioxidantes naturales) disueltos en el plasma seminal que les proporciona una serie de beneficios a los espermatozoides (Olivera y col. 2006). Los espermatozoides epididimarios, al no tener interacción con estos componentes, les convierte en células más sensibles al choque de frío pudiendo causar la degeneración de la membrana espermática y reducción drástica de la motilidad. A pesar de ello, se ha determinado que los espermatozoides epididimarios parecen ser más crio-resistentes que los espermatozoides eyaculados, con diferencias en la composición de la membrana (Eddy y O'Brien, 1994; Jones, 1998; Varisli y col., 2009) que influyen en el tiempo de equilibrio requerido (Rath y Niemann, 1997) previo a su criopreservación.

La necesidad de mejorar la viabilidad, motilidad e integridad morfológica de los espermatozoides caninos epididimarios antes y después del proceso de congelación-descongelación, ha conducido a intensificar y/o innovar procedimientos de selección espermática (Hewitt y col., 2001). En la última década se han desarrollado una variedad de métodos para la selección de espermatozoides caninos como Swim-up (Bukowska y col., 2011; Dorado y col., 2016), filtración con columnas de Sephadex (Mogas y col., 1998) y filtro de vidrio (glass wool) o su combinación (Kim y col., 2010),



y centrifugación coloidal mediante gradientes de densidad como Percoll® (Phillips y col., 2012; Ayala y col., 2019) o PureSperm® (Dorado y col., 2011a; 2011b).

La centrifugación de gradientes de densidad (CGD) ha mostrado cierta ventaja al momento de la manipulación debido a su uso en dos capas simples (Ej. 45 y 90%; 40 y 80%). Sin embargo, se ha asociado efectos iatrogénicos adversos relacionados con el daño mecánico propio de la centrifugación que puede provocar daños en la integridad celular (Ej. colas enrolladas) e incrementar la producción de ROS y LPO (Sbracia y col., 1996). Además, se ha relacionado un incremento de las fuerzas de centrifugación ( $> 700 \times g$ ) con un mayor daño en la integridad morfológica y disminución de la motilidad (Beydola y col., 2013).

BoviPure® es una solución salina isosmótica que contiene partículas de sílice coloidal recubiertas con silano que se utiliza para seleccionar espermatozoides de toro para su uso en TRAs (Samardzija y col., 2006). También se ha propuesto que los medios de sílice recubiertos de silano se utilicen en una centrifugación de una sola capa o dos (Martinez-Alborcia y col., 2013). BoviPure® ha resultado muy eficaz al momento de seleccionar espermatozoides ovinos tanto frescos como criopreservados, en gradientes de 40% (*Top Layer*) y 80% (*Bottom layer*), y a una fuerza de centrifugación baja de  $300 \times g$  (Galarza y col., 2018a; 2018b) mejorando la motilidad, cinética e integridad de la membrana plasmática y acrosomal. Para nuestro mejor conocimiento, no existe evidencia del uso de BoviPure® en dos capas para seleccionar espermatozoides epididimarios de perro, ni frescos, ni criopreservados.

En consecuencia, nuestra investigación intentó demostrar la eficacia de dos métodos de selección de espermatozoides epididimarios caninos tanto frescos-diluidos, refrigerados durante 24 horas y congelados–descongelados mediante vapores de  $NL_2$ . El método de selección alternativo propuesto fue basado en la centrifugación de gradientes de densidad CGD-BoviPure® de dos capas: 40 y 80%, respectivamente, con una fuerza de centrifugación baja ( $300 \times g$ ) para evitar efectos iatrogénicos, frente a un segundo método convencional basado en la técnica de flotación espermática, conocido como Swim-up.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la selección espermática mediante el uso de centrifugación por gradientes de densidad de dos capas (BoviPure®) y por flotación (Swim-up) en esperma canino epididimario fresco y criopreservado.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar dos métodos de selección de esperma canino fresco recuperado de epidídimos refrigerados por más de 72 horas mediante CGD-BoviPure® y Swim-up sobre las características cinéticas e integridad de las membranas espermáticas.
- Determinar el efecto de proceso de selección espermática sobre esperma canino epididimario fresco, refrigerado y congelado-descongelado.

## **3. HIPÓTESIS**

El uso de CGD-BoviPure® permite mejorar la calidad de espermatozoides caninos epididimarios frescos y criopreservados en comparación con el método Swim-up.

## 4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 4.1. Anatomía del aparato reproductor del perro

#### 4.1.1. Testículos

Los testículos caninos son relativamente pequeños, de forma elipsoidal y alojados en el escroto (Sisson y James, 2002). Están conformados por túbulos seminíferos, en donde se producen los espermatozoides. Su función principal es la producción y maduración de espermatozoides (exocrina) y la producción de hormonas esteroides (endocrina) (Páramo y Balcazár, 2013).

#### 4.1.2. Epidídimo

Es un conducto enrollado sobre sí mismo, unido a lo largo de la parte dorso lateral del testículo. Está compuesto por: cabeza, cuerpo y cola. Su función es el almacenamiento, transporte y maduración de los espermatozoides (Sisson y James, 2002).

- a) **Cabeza:** Involucra las partes terminales de los conductos eferentes y el primer tracto del conducto epididimario.
- b) **Cuerpo:** Conecta la cabeza con la cola (Varesi, 2012a).
- c) **Cola:** Actúa como reservorio de los espermatozoides maduros. Se continúa distalmente con el conducto deferente, el cual transporta el semen hacia la uretra durante el proceso de la eyaculación (Páramo y Balcazár, 2013).



**Figura 1.** Órganos externos del perro (Páramo, 2015).

## 4.2. Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula especializada para desarrollar una única función: fecundar al óvulo. Estructuralmente se diferencia:

- a) **Cabeza:** presenta una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y la transmisión del material genético. En su interior se sitúa el núcleo y recubriendo su polo craneal se encuentra el acrosoma.
- b) **Segmento o pieza intermedia:** formado por mitocondrias que se alinean extremo con extremo en banda, cuya función es favorecer el metabolismo del espermatozoide y garantizar su movilidad (Hewitt y col., 2001).
- c) **Cola:** tiene movimiento flagelar que permite el desplazamiento y movimiento del espermatozoide (Frandsen y Spurgeon, 1995).

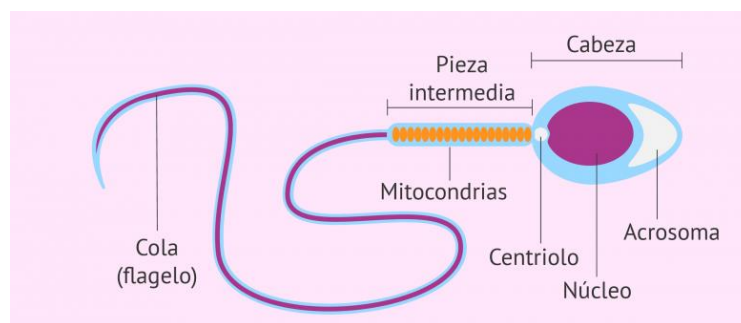


Figura 2. Morfología del espermatozoide (Olivera y col., 2006).

## 4.3. Características macroscópicas del semen

### 4.3.1. Volumen

Varía de acuerdo al tamaño del animal, con un rango de 1-30 ml (Pontón y Lagos, 2014). En el eyaculado se puede observar tres porciones:

- a) **Preespermática o uretral:** es acuosa y transparente, se elimina de forma muy rápida entre 30 segundos a 1 minuto.
- b) **Espermática:** es rica en espermatozoides, con aspecto denso y color blanco lechoso a blanco opalescente en función de la concentración, con un tiempo de emisión entre 1 a 2 minutos. Su procedencia es del epidídimo y de los conductos deferentes (Peña, 2004).



- c) Prostática:** no contiene espermatozoides o están en bajo número. Es acuosa, transparente o ligeramente amarilla y su eliminación se prolonga de 3 a 30 minutos (Threlfall, 2005).

#### **4.3.2. pH**

El pH del semen canino es de 6.3, su variación disminuye la motilidad, por lo que hay que considerar estas características en el uso de los diluyentes y las sustancias tampón (Ochoa y Torres, 2012).

### **4.4. Características microscópicas del semen**

#### **4.4.1. Concentración**

Es un importante parámetro a tener en cuenta, sobre todo si se va a congelar semen, pudiendo indicar la fertilidad del material (Pontón y Lagos, 2014). En el perro se han descrito valores de concentración que oscilan entre  $300-2000 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Farstad, 2001).

#### **4.4.2. Motilidad**

Se mide por el porcentaje de espermatozoides en movimiento, siendo el movimiento flagelar productivo en progresión rápida y lineal. Para la valoración se considera la motilidad masal y la individual. En perros el parámetro normal en semen fresco es del 85-95%. En semen post-congelación se describe valores superiores a 50% para considerarlo de buena calidad (Alamo, 2007).

#### **4.4.3. Vitalidad**

Se determina mediante técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos, debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes; por lo tanto, una célula con una membrana plasmática





funcional no permite el paso del colorante, mientras que si está alterada, el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida (Peña, 2004).

Un semen de buena calidad es cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco, mientras que en semen congelado, el valor mínimo aceptable es del 80% (Ochoa y Torres, 2012).

#### **4.5. Diluyentes**

Se definen como la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado, preservar las características funcionales de los espermatozoides y mantener el nivel de fertilidad. El diluyente que se añade para la congelación comúnmente es del tipo tris (buffer). Debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad del medio, una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada), una fuente de energía como fructuosa o glucosa, y un crioprotector (Carpio, 2015).

#### **4.6. Recolección espermática**

Se ha descrito que tras una orquiectomía rutinaria, se puede obtener semen a partir del epidídimo. Una técnica de recuperación es el flujo retrógrado de la cola del epidídimo, que consiste en insertar una aguja en el conducto deferente, para luego aplicar soluciones tamponadas a la suspensión espermática, con la finalidad de conseguir un volumen y nutrientes necesarios para que los espermatozoides puedan moverse (Hewitt y col., 2001).

La aplicación de esta técnica está condicionada por el tamaño de los testículos, pero las muestras obtenidas no sufren contaminación por parte de otros objetos (Varesi, 2012).



## **4.7. Medios**

### **4.7.1. Sperm talp**

El medio de Tyrode modificado, Sperm-Talp, originalmente formulado por Parrish y col. (1995) y modificado por Galarza y col (2018a), es una solución electrolítica que presenta beneficios para la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides, ya que puede inducir la capacitación en esperma. Se ha demostrado que la regulación de la capacidad espermática y la reacción del acrosoma se logran principalmente mediante acciones de calcio, bicarbonato, y albumina (Buranaamnuay, 2013).

Se puede emplear como un medio alternativo en caninos para recuperar y diluir esperma epididimario, sobre todo, para la purificación en la técnica de Swim-up, colocando 100  $\mu$ l de semen canino bajo una capa (1 ml de medio TALP de esperma suplementado con albumina de suero bovino libre de ácidos grasos (6 mg/ml) y piruvato de sodio (1 mM)) (Bukowska y col., 2011).

### **4.7.2. Solución coloidal de BoviPure®**

Es una solución de sal isosmótica que contiene partículas de sílice coloidal recubiertas con silano. Se utiliza para seleccionar esperma de toro en técnicas de reproducción artificial (Samardzija y Karadjole, 2006). Para ello se ha propuesto que estas partículas se utilicen en una centrifugación de capa única (Martinez-Alborcia y col., 2013).

Este medio forma gradientes continuos en donde se da un incremento gradual de la densidad desde la parte superior hasta la parte inferior, o gradientes discontinuos utilizando dos cámaras, con los medios densos y la aplicación de fuerza gravitacional por centrifugación (Samardzija y Karadjole, 2006).

Los gradientes de BoviPure® se realizan con su solución buffer llamada BoviDulite®, de tal modo que, investigaciones en esperma de rumiantes domésticos han logrado incrementar la calidad espermática en semen refrigerado y congelado-descongelado al usar gradientes de 80 y 40% respectivamente (Martinez-Alborcia y col., 2013).



(Santiago-Moreno y Galarza, 2019), usaron la solución BoviPure® y diluyó con solución BoviDilute® para obtener el medio de la capa inferior y la capa superior, a una concentración del 80 y 40%, respectivamente. Las columnas BoviPure® para seleccionar espermatozoides con CGD se realiza en tubos Falcon® de 15 ml en volúmenes iguales de capa y en la capa superior se coloca la muestra del semen utilizando un volumen total de columna de 1 ml por 333 millones de espermatozoides presentes en los 200 µl muestra de esperma.

#### **4.8. Conservación del semen**

##### **4.8.1. Semen fresco**

En la especie canina el semen fresco puede mantener su viabilidad hasta 24 horas post obtención. En el caso de que se suplemente un diluyente a base de yema de huevo o leche homogeneizada, junto con antibióticos, puede aumentar su vida media hasta 4-5 días siempre que se conserve a 37°C (Arthur y col., 1991).

##### **4.8.2. Semen refrigerado**

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock de frío. Diversos estudios en perros han demostrado que, añadiendo a la muestra seminal un diluyente a base de yema de huevo es posible mantener la viabilidad hasta 10 días a 4°C, sin alterar su viabilidad (Verstegen y col., 2005).

##### **4.8.3. Semen congelado**

La crioconservación seminal es una valiosa herramienta a la hora de distribuir la calidad genética tanto espacial como temporalmente. En cabras, estudios demuestran que, conforme se incrementa el tiempo de conservación se produce una reducción significativa de la motilidad espermática y un incremento de las morfo anomalías y, en consecuencia, una disminución de la fertilidad. No obstante, en vacunos se ha



conseguido gestaciones tras inseminar utilizando semen almacenado en nitrógeno líquido durante 20 años (Arthur y col., 1991).

En la especie canina se han constatado el nacimiento de camadas a partir de semen congelado, pero hasta el momento no hay estudios que determinen el tiempo máximo de almacenamiento que garantice altos porcentajes de fertilidad (Silva y col., 1996).

#### **4.9. Descongelación de semen**

Existe unanimidad entre los autores en que las pajuelas de 0,5 ml deben descongelarse mediante baño maría, aunque existen diferentes opciones en cuanto a tiempo y temperatura. Así, hay autores que describen temperaturas de 37°C durante 15 seg, 37°C durante 30 seg, 39°C durante 30 seg, 50°C durante 30 seg y 70°C durante 6 seg (Hewitt y col., 2001).

Si se utilizan pajuelas de 0,25 ml, hay autores que descongelan a 37°C durante 30 seg o bien a 39°C durante 30 seg, mientras que si se envasa en pajuelas de 2,5 ml se descongela a 50°C durante 45 seg. En el caso de los pellets, se sumergen en 0,5 ml de una solución con 0.9% de cloruro sódico a 55°C durante 5 seg y, finalmente, el semen congelado en tubos de aluminio se descongela a 65°C durante 15 seg, agitando vigorosamente el envase (Hewitt, 2000).

#### **4.10. Técnicas de selección espermática**

##### **4.10.1. Migración espermática vertical o Swim-up**

Se emplea frecuentemente para la selección de espermatozoides móviles del eyaculado, es decir la migración separa la fracción móvil de la fracción inmóvil, para esto, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (J. Parrish, 1986), permitiendo así la separación de espermatozoides con morfología normal y alta motilidad (Cabrera y col., 2014).



Este método recientemente, se ha empleado para la selección de espermatozoides caninos como paso previo al proceso de vitrificación. Estudios demuestran que su uso en muestras de semen fresco mejora la viabilidad espermática. Sin embargo, el protocolo estándar emplea uno o varios pasos de centrifugación lo que hace que la calidad seminal de la muestra disminuya (Morrell y col., 2008).

#### **4.10.2. Centrifugación Simple**

Se emplea para eliminar la fracción prostática del eyaculado, la cual afecta negativamente a la preservación del semen a 4°C. Sin embargo, es un proceso que puede causar daños estructurales en el acrosoma y en la membrana plasmática del espermatozoide, lo que puede producir una considerable reducción de la motilidad espermática (Gálvez, 2015).

En este método, se obtiene un pellet que contiene espermatozoides muertos, moribundos y anormales, así como espermatozoides viables que pueden ser eliminados con el sobrenadante, ya que todos los espermatozoides de la muestra original se concentran en el pellet (Garay, 2019).

#### **4.10.3. Centrifugación en gradientes de densidad o Centrifugación coloidal**

Separa diferentes tipos de células de suspensiones heterogéneas, útil para dilucidar los mecanismos que ocurren en los espermatozoides durante la maduración, la capacitación y la reacción del acrosoma, eventos necesarios para que puedan fertilizar un ovocito (Morrell y col., 2008).

Técnica utilizada para aumentar la calidad seminal (Varela y col., 2015), incrementando la supervivencia, es decir separa los espermatozoides de acuerdo con la densidad del medio, seleccionando los espermatozoides móviles y por su morfología (Morrell y col., 2008). Emplea dos o más capas de coloide para seleccionar aquellos espermatozoides de mejor calidad (Morell y Rodriguez, 2016).



La centrifugación a través de capas de coloide se ha utilizado satisfactoriamente para enriquecer la población de espermatozoides viables y funcionales, separar espermatozoides móviles, de cromatina intacta y morfológicamente normales. Además, separa el espermatozoide normal de los linfocitos, células epiteliales, espermatozoides anormal o inmaduro, desechos celulares, bacterias y el plasma seminal (Garay, 2019).

#### 4.11. Evaluación de la calidad espermática

##### 4.11.1. Motilidad

La motilidad es necesaria para el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra y para atravesar todas las cubiertas del ovocito. Se puede evaluar subjetivamente (motilidad masal y motilidad individual) u objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis, como el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), pero la más utilizada y simple a la vez, es la valoración visual de la motilidad masal que refleja el movimiento de las células espermáticas en su conjunto (Aisen y col., 2002).

El sistema CASA se establece mediante los siguientes parámetros:

**Motilidad Total (MT):** no diferencia entre movimiento rectilíneo o circular de los espermatozoides.

**Motilidad Progresiva (MP):** Es el porcentaje de espermatozoides capacitados para alcanzar el óvulo y fecundar (Anchatuña, 2017). En función de su progresividad, los espermatozoides se clasifican en estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos (Miró, 2015).

**Velocidad Curvilínea (VCL):** Es la distancia total recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo ( $\mu\text{m/s}$ ).

**Velocidad Rectilínea (VSL):** Es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria por unidad de tiempo ( $\mu\text{m/s}$ ).



**Velocidad Media (VAP):** Es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media (Vallvé, 2017).

**Porcentaje de linealidad (LIN):** Es la relación entre la velocidad rectilínea y la curvilínea ( $LIN = VSL / VCL \times 100$ ).

**Porcentaje de rectitud (STR):** Es la relación entre la velocidad rectilínea y lineal ( $STR = VSL / VAP \times 100$ ).

**Porcentaje de oscilación (WOB):** Es la relación entre la velocidad lineal y rectilínea ( $WOB = VAP / VCL \times 100$ ) (Valverde y col., 2019).

**Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu m$ ):** Es el desplazamiento que realiza la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.

**Frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz):** Es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria medial o lineal en función del tiempo (Muiño, 2008).

#### 4.11.2. Integridad de la membrana plasmática

En el proceso de congelación-descongelación se afecta las membranas: plasmática y acrosomal. La proporción de daño acrosomal varía con el método de congelación sin exceder el 70%. El test de endósmosis positiva (HOST), evalúa la integridad de la membrana plasmática, y el test de resistencia osmótica (ORT), evalúa la integridad del acrosoma (Rubio, 2009).

La tinción con Eosina-Nigrosina (EN) permite diferenciar entre los espermatozoides muertos que se tiñen debido a alteraciones en la membrana plasmática lo que permite el paso del colorante, a diferencia de los vivos que al mantener la integridad de la membrana no logran teñirse debido a que no permiten el paso del colorante al interior de la célula (Brito, 2003).



#### **4.11.3. Integridad del acrosoma**

Para la evaluación de las lesiones celulares como consecuencia del proceso de criopreservación es importante emplear diferentes métodos de tinción que permitan diferenciar, células viables con reacción acrosómica de las células que se encuentran muertas y que por lo tanto han perdido la integridad de la membrana (Wa y col., 1995).

La prueba de doble fluorescencia PI IFITC-PSA o PNA permite la evaluación del porcentaje de células que han perdido sus acrosomas pero que mantienen intacta la membrana sobre el núcleo, o sea, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica “verdadera” (Berger, 1990).

La asociación PI / FITC-PNA permite la detección de 4 sub-categorías de células: I) viable, acrosoma intacto; II) viable, reacción acrosómica “verdadera”; III) muerto, acrosoma intacto; IV) muerto, reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular (Centola y col., 1990).





## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Materiales Físicos

- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Nevera portátil con bloques de hielo (gel)
- Papel secante
- Jeringas 1 ml
- Hojas de bisturí N° 15
- Equipo de disección
- Pajuelas de 0,25 ml
- Fundas Ziploc
- Caja poliestireno de 31 x 29 x 30 cm (largo, ancho y alto)
- Rampa de enfriamiento doble (de 24 y 10 cm de altura)

#### 5.1.2. Materiales Biológicos

- Testículos de perros con epidídimo con porción inicial de conducto deferente intactos
- Espermatozoides

#### 5.1.3. Materiales Químicos

- Tris (Sigma, 252859)
- Ácido cítrico (Sigma, C0759)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicilin G-sodium salt (Sigma, P3032)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma G9012),
- BoviPure® (BP-100, Nidacon, Mölndal, Sweden)
- BoviDilute® (BD-100, Nidacon, Mölndal, Sweden)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)



- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutunina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Bovine serum albumin, BSA (Sigma, A9418)
- Sperm-Blue® stain (SB-250-N)
- Nitrógeno Líquido

#### 5.1.4. Materiales de Laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas de 0 – 20 µl, 20 – 200 µl y de 200 – 1000 µl
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Micro Centrífuga Hettich® MIKRO 200/200R centrifuge (Ref: Z652091; MIKRO 200, AC/DC input 240 V AC; Germany) para tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Incubadora Memmert
- Filtro de jeringa Minisart® NML 16555 (tamaño de poro 0,45 µm) (Sartorius, Alemania).
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution®* 2018, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast)
- Cajas cuadrículadas para búsqueda
- Refrigerador
- Porta agujas
- Cubre objetos cortos
- Cubre objetos largos
- Termómetro para pajuelas
- Baño María
- Pinzas
- Guantes de nitrilo
- Tubos Falcón de 15 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml

## 5.2. Metodología

### 5.2.1. Área de Estudio



**Figura 3.** Ubicación del área de estudio (Cuenca-Azuay).

**Fuente:** (Directorio cartográfico de Google Maps, 2020).

#### 5.2.1.1. Ubicación política–geográfica

Los testículos (con sus epidídimos íntegros) fueron recolectados en las campañas de esterilización de mascotas realizadas por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en distintos sectores de la ciudad de Cuenca, y de Clínicas Veterinarias particulares.

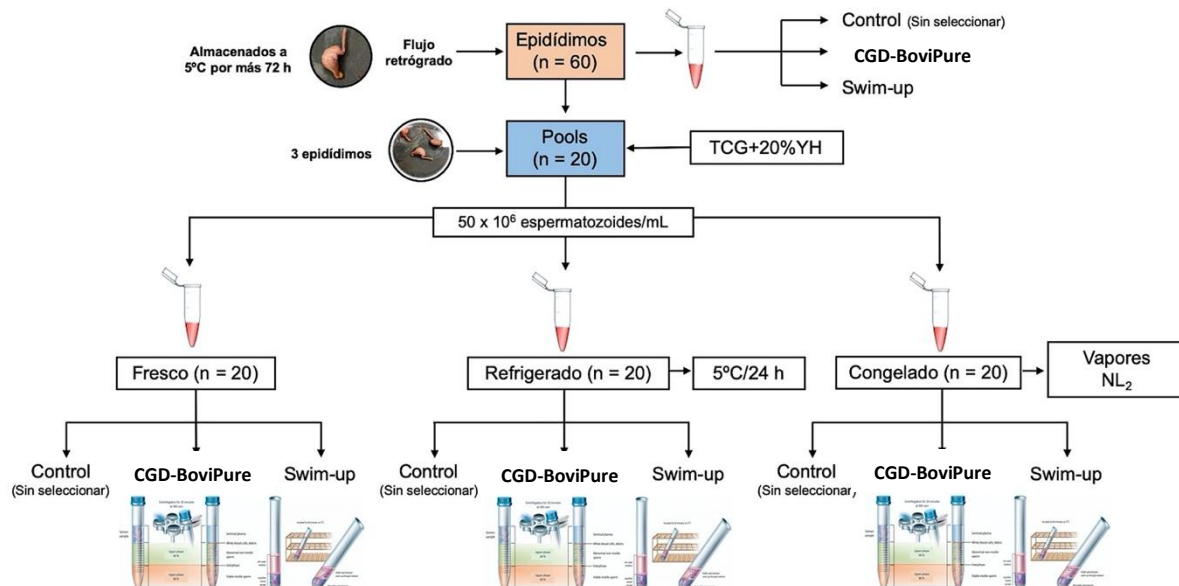
Posterior a esto, el trabajo experimental con respecto a los procesos de recuperación, procesamiento, congelación, descongelación y análisis espermático se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicado en la Granja Irquis, cantón Cuenca, provincia del Azuay ( $3^{\circ}04'48.1''S$   $79^{\circ}04'31.0''W$ , altitud 2.648 metros sobre el nivel del mar).

### 5.2.2. Unidad Experimental y Diseño Experimental

Se consideraron 30 perros domésticos machos sometidos a Orquiectomía para la obtención de 60 epidídimos.

La investigación incluyó el análisis de dos métodos de selección espermática (CGD-BoviPure® y Swim-up) aplicados a espermatozoides caninos epididimarios frescos - diluidos, refrigerados 24 h y congelados-descongelados, procedentes de 30 perros machos. Además, se consideró un grupo control (sin seleccionar) en cada muestra espermática fresca, refrigerada, congelada-descongelada.

El primer análisis de selección espermática se realizó con muestras frescas – diluidas recuperadas de los epidídimos (n = 60) provenientes de testículos almacenados a 5°C por más de 72 horas. El segundo análisis incluyó muestras agrupadas (pools). Para este efecto, se conformaron 20 pools (3 muestras / pool) de las muestras espermáticas recuperadas en el primer análisis y, por lo tanto, el segundo análisis de selección espermática se realizó con el pool de muestras frescas, refrigeradas (5°C / 24 h) y congeladas-descongeladas (vapores de NL<sub>2</sub>) (Ver **Fig. 4**).



**Figura 4.** Cuadro de Diseño Experimental.

**Fuente:** autor



### 5.2.3. Metodología para la investigación

#### 5.2.3.1. Preparación de diluyentes y medios

Los diluyentes y medios que se utilizaron en esta investigación se detallan en las siguientes tablas:

**Tabla 1.** Diluyente sintético TCG

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomina	300 mg
Agua milli Q	300 ml

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

**Tabla 2.** Diluyente para congelación convencional (CC)

<b>Fracción 1. TCG-YH</b>	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ml
Yema de huevo inactivada a 56° por 30 min. <i>*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet</i>	20 ml (v/v)

<b>Fracción 2. TCG-YH-Gly</b>	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	90 ml
Glicerol	10 ml (al 10% v/v)

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

**Tabla 3.** HEPES para fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes sodium salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua milli Q	100 ml

Alicuotar en dosis 250 µl en tubos eppendorf de 1,5 ml y congelar a -20 °C hasta su uso

**Tabla 4.** Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50 µl

**Tabla 5.** Aglutinina

Reactivo	Cantidad
PNA-FITC aglutinina	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50  $\mu$ l

**Tabla 6.** Componentes del medio Sperm-Talp (Galarza y col., 2018).

Componente	MW ( <i>molecular weight</i> )	Concentración mM ( <i>milimolar</i> )	mg/100ml
NaCl (S-9888)	58,45	114,0	666,0
KCl (S-5405)	74,55	3,2	23,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O (S-9638)	138,00	0,3	4,1
Na Lactato (L-7900) (QC)	112,06	10,0	112,0
CaCl 2H <sub>2</sub> O (C-7902)	147,00	2,0	29,0
MgCl 6H <sub>2</sub> O (M-2393)	203,31	0,5	10,1
HEPES (H-644+)	238,30	10,0	238,0
NaHCO <sub>3</sub> (S-5761)	84,00	25,0	210,0

*Alicuotar y congelar a -20°C*

BSA		0,6% o 6 mg/ml	600,0 mg
Piruvato de Sodio	110,04		1,1
Gentamicina			50,0 $\mu$ l

*Adicionar estos componentes al momento de descongelar y filtrar en membranas Minisart® NML 16555 (tamaño de poro 0,45 mm).*

pH: 7,2 Osmolaridad: 300 a 320 mOsmol/kg.

**Tabla 7.** Gradientes de densidad de BoviPure®

Componente	Cantidad
BoviPure® 80%, Botton layer	8ml de BoviPure® + 2 ml BoviDilute®
BoviPure® 40%, Top layer	4ml de BoviPure® + 2 ml BoviDilute®

### 5.2.3.2. Recolección de testículos

Cada uno de los perros machos fue valorado clínicamente antes de ser sometido a Orquiectomía, considerando los siguientes criterios de inclusión:

- Perros clínicamente sanos
- Edad entre 1 y 6 años



- Sexualmente maduros con testículos descendidos a la palpación
- Condición corporal entre 2,5 y 4 según la escala de 1 – 5 (siendo 1 caquético y 5 obeso) (Baldwin y col., 2010).

Fueron excluidos de este experimento:

- Perros con problemas anatómicos de su aparato reproductor.
- Testículos y/o epidídimos con daños post-orquiectomía (cortes, hematomas).

Luego, los testículos fueron recolectados post-orquiectomía sin las tunicas vaginal y albugínea, y su conducto deferente intacto en su porción proximal (aproximadamente 2 cm). Los testículos se colocaron en bolsas plásticas ziploc estériles. Estas muestras fueron selladas, rotuladas (fecha, número y testículo derecho o izquierdo) y almacenadas en una nevera portátil con hielo a una temperatura de 5°C. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas bajo condiciones de refrigeración a una temperatura de 5°C durante al menos 72 horas.

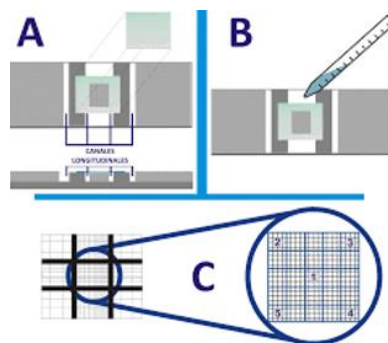
### 5.2.3.3. Recuperación espermática

En el laboratorio, los testículos fueron lavados con suero fisiológico, previamente enfriados y secados. Este procedimiento se hizo bajo condiciones de frío a 5°C en la refrigeradora del laboratorio con la puerta abierta para climatizar un ambiente de refrigeración. Posteriormente se diseccionó cada testículo, hasta dejar descubierto el epidídimo. La recuperación espermática se realizó usando una aguja metálica N° 20 X 1 ½' o 22 X 1 ½' (dependiendo del tamaño del epidídimo) cortadas en su extremo punzante e introducida en el conducto deferente proximal. La recuperación de espermatozoides epididimarios se realizó mediante flujo retrógrado que consistió en administrar 1 ml del diluyente TCG-YH (Fracción 1, **Tabla 2**) previamente refrigerado (5°C). Al aumentar la presión en la cola del epidídimo, se realizó varios cortes transversales y el líquido lechoso obtenido fue recogido en una caja cuadrada para búsqueda, estéril y fría. Inmediatamente, este contenido líquido fue transferido a un tubo éppendorf de 1,5 ml y almacenado en refrigeración hasta su procesamiento. El

volumen recuperado de las 60 muestras fue, en general, aproximadamente de 1000  $\mu\text{l}$ .

#### 5.2.3.4. Análisis de concentración espermática de muestras frescas

La concentración inicial de cada muestra fresca – diluida fue evaluada. Para este propósito se hizo una dilución de 1:200 que consistió en mezclar 600  $\mu\text{l}$  de solución formolada y 3  $\mu\text{l}$  de la muestra fresca recuperada de cada epidídimo. Consecuentemente, se tomó 10  $\mu\text{l}$  de esta solución y se colocó en una cámara de Neubauer con un cubreobjetos previamente colocado y se llevó a conteo espermático bajo un microscopio de campo claro a una magnificación 40X. El conteo se realizó en forma de “L” tomando en referencia los cinco cuadrantes (4 extremos y 1 central); sumamos todos los cuadrantes y el resultado lo multiplicamos por  $10^7$  y entonces la concentración fue expresada en millones ( $\times 10^6$  espermatozoides / ml) (Galarza y col., 2018) (Ver **Fig. 5**).



**Figura 5.** Lectura de los espermatozoides en la cámara de Neubauer.

#### 5.2.3.5. Selección espermática en muestras epididimarias frescas

Cada muestra recuperada, fresca-diluida, de cada epidídimo fue sometida a ambos métodos de selección espermática (CGD-BoviPure® y Swim-up). Para este propósito se tomó dos alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de muestra recuperada para ser sometidas a cada método de selección, respectivamente. El análisis de las características cinéticas e integridad de las membranas espermáticas fue realizado en tres muestras: una sin seleccionar que actuó como control, una segunda después de la selección con el





método Swim-up y una tercera muestra después del método de CGD-BoviPure®, respectivamente. El análisis de la cinética e integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) fueron realizados mediante el sistema CASA (SCA-Evolution®) y la prueba de doble fluorescencia usando la tinción de doble fluorescencia con ioduro de propidio y aglutinina FITC-PNA (PI / PNA-FITC) (Ver sección 4.2.3.8.).

### **5.2.3.6. Métodos de selección espermática**

#### **5.2.3.6.1. Swim-up**

Este procedimiento fue realizado según lo descrito por Bukowska y col. (2011) con algunas modificaciones. Se colocó 500 µl del medio Sperm-Talp (previamente atemperado a 38,5°C) en un tubo Falcon de 15 ml, y sobre este, se colocó la muestra de 200 µl de muestra de esperma epididimario fresco previamente calentado a temperatura de cuarto (22°C). Esta muestra se dejó en la incubadora a 38,5°C durante 30 minutos. Posterior a ello, se recuperó los 200 µl superiores del tubo Falcon y se colocó en un tubo éppendorf a 37°C para realizar las pruebas de calidad espermática.

#### **5.2.3.6.2. CGD-BoviPure®**

Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Galarza y col., (2018) con algunas modificaciones. La elaboración de los gradientes de densidad se realizó en tubos eppendorf de 1,5 ml colocando 200 µl de solución Botton layer (gradiente del 80%) al fondo, sobre ésta 200 µl de solución Top layer (gradiente del 40%) y finalmente sobre ésta última 200 µl de la muestra de esperma epididimario fresco previamente calentado a temperatura de cuarto. Estos gradientes fueron centrifugados a 300 x *g* (*gravedades*) durante 20 minutos. Al final de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue re-suspendido en 100 µl de solución TCG-YH para las posteriores pruebas de calidad espermática.



### 5.2.3.7. Análisis de selección espermática en muestras epididimarias agrupadas (pools) frescas y criopreservadas.

Posterior al análisis de cada muestra fresca – diluida recuperada por flujo retrógrado, y considerando que 400  $\mu$ l de cada una de ellas fue usado para la selección espermática (200  $\mu$ l para Swim-up y 200  $\mu$ l para CGD-BoviPure®), el volumen restante (500  $\pm$  100  $\mu$ l) fue usado para hacer las agrupaciones (pools). Cada pool fue conformado por 3 muestras de esperma epididimario recuperado y seleccionadas al azar.

Esta segunda parte del experimento incluyó 20 pools provenientes de los 30 perros (60 epidídimos) orquiectomizados especificados en el primer análisis. Cada pool fue evaluado inicialmente su concentración, cinética espermática e integridad de las membranas plasmática y acrosomal. En consecuencia, cada pool fue subdividido en 3 alícuotas ajustadas a una concentración de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml usando el diluyente TCG-YH.

- **Alícuota 1:** muestras frescas (no criopreservadas)
- **Alícuota 2:** muestras refrigeradas a 5°C durante 24 h.
- **Alícuota 3:** muestras congeladas - descongeladas.

Cada alícuota fue sometida a los dos procesos de selección espermática con una fracción sin seleccionar que fue considerada como control de cada muestra agrupada. Al igual que las muestras simples, cada pool fue evaluado las características cinéticas e integridad de las membranas plasmática y acrosomal mediante el uso del sistema CASA (SCA®) y la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC. Además, sólo a las muestras congeladas - descongeladas fueron analizadas la morfometría de la cabeza de los espermatozoides antes y después de la selección por cada método.



#### 5.2.3.7.1. Refrigeración de las muestras de pool

La alícuota 2 de cada pool fue contenida dentro de un tubo Falcon de 15 ml y fue colocada dentro de un vaso de precipitación de 100 mL con agua destilada. El Falcon sumergido fue recubierto con papel aluminio en su totalidad y se colocó en refrigeración a 5°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras fueron calentadas a 37°C en Baño María para aplicar ambos métodos de selección espermática. Un análisis de calidad espermática a muestras sin seleccionar fue tomado como control.

#### 5.2.3.7.2. Congelación y descongelación de las muestras de pool

El proceso de congelación y descongelación fue realizado según lo descrito por Caturla-Sánchez y col. (2018) con algunas modificaciones. La tercera alícuota de cada pool de semen diluido con TCG-YH (a temperatura de refrigeración) fue ajustada a un volumen de 1 ml a una concentración inicial de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Posteriormente, estas muestras fueron enfriadas a 5°C y mantenidas durante 1 hora. A partir de entonces, se agregó 1 ml del diluyente TCG-YH-Gly (Fracción 2, **Tabla 2**) para alcanzar una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml con un 5% de glicerol, y se dejó en equilibrio durante 1 hora más. Previo a la congelación, las muestras se cargaron en pajuelas de 0,25 ml previamente enfriadas y rotuladas. Las pajuelas fueron selladas con alcohol de polivinilo en su extremo posterior dejando una burbuja de aire de aproximadamente 20  $\mu$ l para evitar la explosión durante la congelación. Las pajuelas fueron expuestas a vapores de  $NL_2$  contenido en una caja de poliestireno de 31 x 29 x 30 cm (largo, ancho y alto, respectivamente). Inicialmente las pajuelas fueron colocadas en la rampa superior que estaba a 24 cm del nivel de  $NL_2$  y se mantuvo durante 1 minuto; por consiguiente, las pajuelas fueron bajadas a la rampa inferior que se encontró a 10 cm del nivel de  $NL_2$  y se mantuvo también durante 1 minuto. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el  $NL_2$  y se almacenaron a -196°C hasta su descongelación y análisis posterior. La descongelación de las pajuelas fue realizada sumergiéndolas en agua atemperada a 37 °C en un baño María durante 30 segundos.



### **5.2.3.8. Análisis de la calidad espermática**

#### **5.2.3.8.1. Cinética espermática**

Las características cinéticas de espermatozoides epididimarios de las muestras simples y agrupadas (pools), frescas-diluidas, refrigeradas y congeladas-descongeladas, antes y después de cada método de selección espermática fueron analizados mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, Spain) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a lo detallado por Galarza y col. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10 X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/s). Las muestras que se usaron para evaluar la cinética fueron ajustadas a una dilución de 15 a 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml usando el mismo diluyente de recuperación espermática (TCG-YH). Una gota de 5 µl se colocó en un porta objetos y fue cubierto con un cubreobjetos, ambos atemperados a 37°C. El sistema CASA registró las siguientes variables cinéticas: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad promedio (VAP, µm/s), porcentaje de linealidad (LIN), porcentaje de rectitud (STR), porcentaje de oscilación (WOB), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm).

#### **5.2.3.8.2. Integridad de membranas plasmática y acrosomal**

Al igual que la evaluación de la cinética, todas esas muestras fueron evaluadas con la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC. Para dicho propósito, se usó la mezcla de 50 µl de yoduro de propidio (PI) más 50 µl de PNA-FITC aglutinina protegido de la luz hasta su uso. Una alícuota de 250 µl de Hepes descongelado y atemperado a 22°C (temperatura ambiente) se le adicionó la muestra de esperma a analizar de tal modo que se ajuste a una concentración final de 10 x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Sin luz, se agregaron 5 µl de la mezcla de fluorescencia (PI / PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 µl de esa mezcla y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser



evaluado en el microscopio de fluorescencia según lo detallado por Galarza y col. (2018). El estado de las membranas plasmática y acrosomal fueron analizados mediante microscopía de fluorescencia contando 200 células, expresándole en porcentaje y utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU., excitación: 450 nm, emisión: 490 nm). La prueba de doble fluorescencia simultánea PI / PNA-FITC proporcionó cuatro subcategorías: 1) porcentajes de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA), 2) con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA); 3) con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA); y 4) con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado (DPDA). Además, el porcentaje total de células que presentaron una membrana plasmática intacta (IMP= IPIA + IPDA), y una membrana acrosomal intacta (IMA= IPIA + DPIA) fueron registrados. La viabilidad espermática (vivos) fue el equivalente al valor de IMP.

#### **5.2.3.8.3. Morfometría de la cabeza espermática**

Las dimensiones de la cabeza espermática que incluye largo, ancho, perímetro y área fueron evaluadas mediante el sistema CASA (Sperm Class Analyzer, SCA®) usando el módulo de morfometría ASMA (*assisted sperm morphometry analysis*), únicamente en las muestras agrupadas antes de la congelación y después de la descongelación y después de ambos métodos de selección espermática. Para este propósito, se hizo un frotis de cada muestra usando un portaobjetos y colocando 5  $\mu$ l de la muestra a analizar y se realizó un frotis usando otro cubreobjetos deslizando a un ángulo de 45°. Cada frotis fue secado en la placa térmica a 37 °C. Los frotis fueron sumergidos en la tinción SpermBlue durante 10 minutos, y luego de ello, los frotis fueron sacados y escurridos verticalmente durante 1 minuto. Se realizó un solo lavado sumergiendo cada frotis en agua destilada durante 1 segundo. Cada muestra se dejó secar nuevamente en la platina térmica y entonces se selló con "mounting medium" y un cubreobjetos largo. Estas muestras fueron evaluadas en el sistema CASA usando el módulo ASMA configurado con luz azul, contraste de fases A (PHA-A) y registrando al menos 100 espermatozoides por muestra.



### 5.3. Diseño estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente analizados estadísticamente en un software Statistica versión 11.0. Los datos fueron expresados en valores promedios  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos. En caso de que los datos no cumplieron con una distribución normal, las variables porcentuales y numéricas fueron transformadas a *Arcoseno* y *Log-10*, respectivamente.

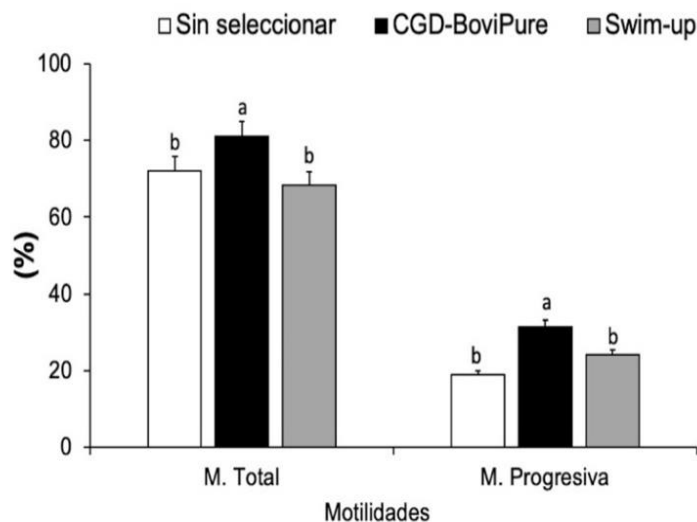
Un modelo lineal general (GLM) con una ANOVA factorial de 3 x 3 fue usado para determinar el efecto de los métodos de selección espermática. Este modelo incluyó el “*Factor 1*” equivalente al *tipo de muestra espermática* (fresco - diluido, refrigerado 24 h y congelado - descongelado); y el “*Factor 2*” equivalente al *método de selección espermática* (sin seleccionar [control], CGD-BoviPure® y Swim-up). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo ( $P < 0,05$ ), los valores se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Estos efectos fueron analizados en las variables de cinética espermática (motilidades, velocidades, parámetros de relación, amplitud del desplazamiento de la cabeza y frecuencia de batida de flagelo) e integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal). Además, en el análisis de las muestras congeladas – descongeladas, se usó un ANOVA unidireccional para determinar el efecto de la selección espermática sobre la morfometría de la cabeza espermática en las muestras frescas (no congeladas) y descongeladas sin seleccionar o seleccionadas con CGD-BoviPure® y con Swim-up.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

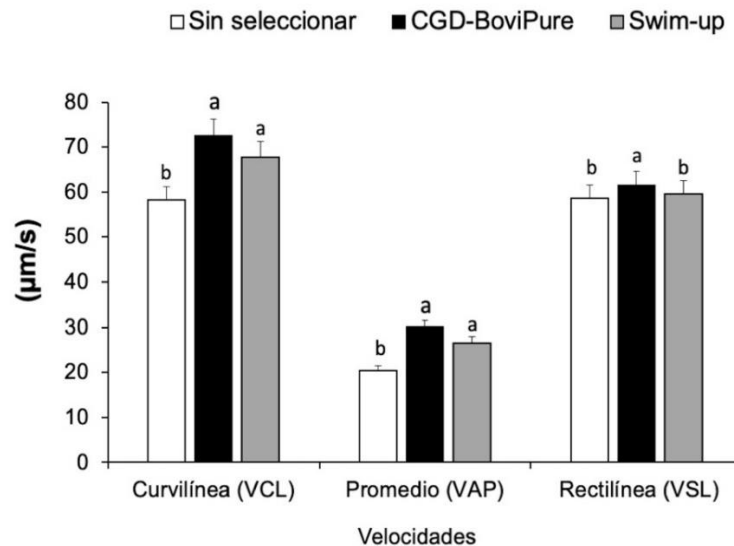
### 6.1. Selección espermática en muestras individuales frescas – diluidas

Los valores promedios ( $\pm$  error estándar de la media) y el grado de significancia de todos los parámetros cinéticos de las muestras individuales frescas – diluidas, antes y después de la selección con CGD-BoviPure® y Swim-up se muestran en el **Anexo 1**.

La motilidad total y progresiva de las muestras espermáticas individuales frescas – diluidas fueron mejoradas ( $P < 0,001$ ) después de seleccionar con CGD-BoviPure® en comparación con aquellas muestras sin seleccionar (control) o seleccionadas mediante Swim-up (MT, %:  $81,0 \pm 1,6$  vs.  $72,2 \pm 2,3$  y  $68,4 \pm 2,7$ ; MP, %:  $31,5 \pm 2,1$  vs.  $19,0 \pm 1,6$  y  $24,2 \pm 2,1$ ; respectivamente) (**Figura 6**). Asimismo, las velocidades curvilíneas y promedio incrementaron ( $P < 0,01$ ) después de la selección por CGD-BoviPure® o Swim-up comparadas con su contraparte control (VCL,  $\mu\text{m/s}$ :  $72,6 \pm 2,8$  y  $67,8 \pm 2,7$  vs.  $58,3 \pm 1,9$ ; VAP,  $\mu\text{m/s}$ :  $45,3 \pm 1,6$  y  $41,3 \pm 1,9$  vs.  $32,3 \pm 1,5$ ; respectivamente). Después de la selección espermática por CGD-BoviPure®, la velocidad rectilínea fue mejorada ( $P < 0,01$ ) en comparación con aquellas muestras seleccionadas con Swim-up o el control (VSL,  $\mu\text{m/s}$ :  $30,1 \pm 1,4$  vs.  $26,6 \pm 1,5$  y  $20,5 \pm 0,9$ ; respectivamente) (**Figura 7**).



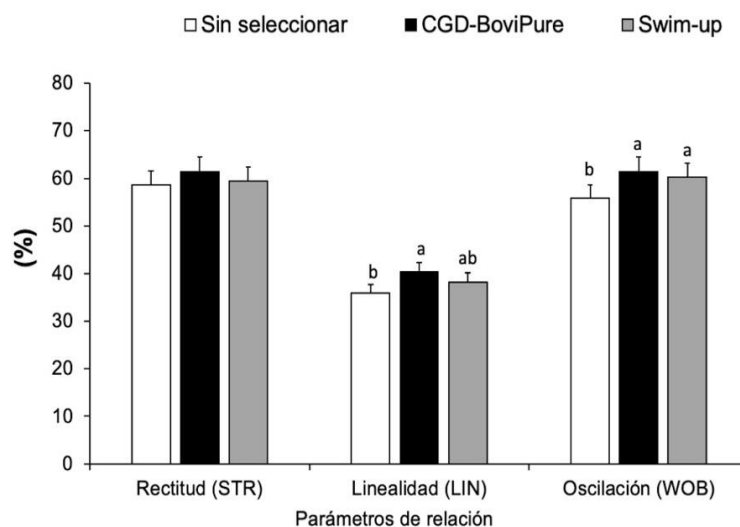
**Figura 6.** MT y MP de muestras espermáticas individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre diferentes métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,001$ .



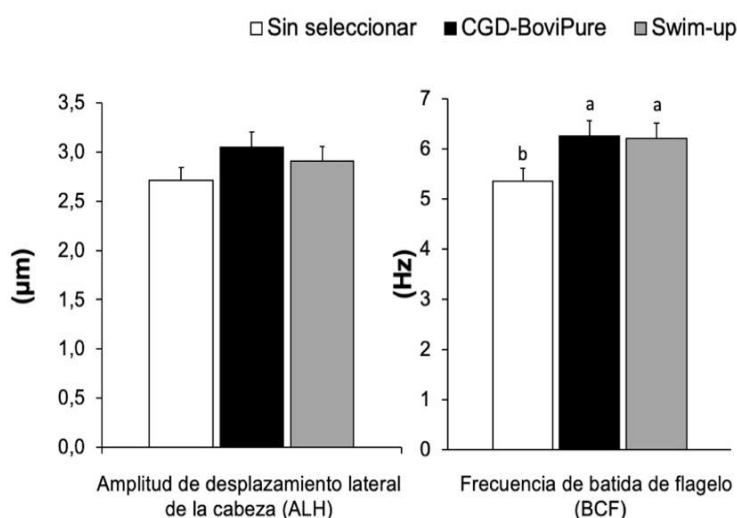
**Figura 7.** Velocidades, VCL, VAP y VSL de muestras individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de velocidad muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,01$ .

El índice de linealidad incrementó ( $P < 0,001$ ) luego de la selección espermática por CGD-BoviPure® comparado con el control (LIN, %:  $40,3 \pm 0,9$  vs.  $35,9 \pm 1,1$ ; respectivamente). Asimismo, la oscilación y la frecuencia de batida de flagelo incrementaron ( $P < 0,001$ ) después de la selección espermática por CGD-BoviPure® o Swim-up en comparación con el control (WOB, %:  $61,4 \pm 0,9$  y  $60,2 \pm 1,4$  vs.  $55,8 \pm 1,1$ ; BCF, Hz:  $6,2 \pm 0,1$  y  $6,2 \pm 0,2$  vs.  $5,3 \pm 0,1$ ; respectivamente) (**Figura 8-9**).





**Figura 8.** Parámetros de relación: STR, LIN y WOB de muestras individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de parámetro muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ .



**Figura 9.** ALH y BCF de muestras espermáticas individuales frescas - diluidas sin seleccionar y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ .

El análisis del estado de las membranas plasmática y acrosomal usando la prueba de doble fluorescencia simultánea PI / PNA-FITC, mostró que el porcentaje de IPIA incrementó significativamente ( $P < 0,01$ ) después de seleccionar las muestras



espermáticas epididimarias con CGD-BoviPure® en comparación con las muestras sin seleccionar. Del mismo modo, el método de selección espermática mediante CGD-BoviPure® mostró ser más efectivo al reducir significativamente ( $P < 0,05$ ) el porcentaje de espermatozoides DPDA indeseables en comparación con las muestras sin seleccionar. Finalmente, después de seleccionar las muestras espermáticas epididimarias con CGD-BoviPure®, los porcentajes de IMP (equivalente a viabilidad espermática) e IMA incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en comparación con su contraparte sin seleccionar (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Porcentajes de espermatozoides caninos de origen epididimario en las diversas categorías de integridad de las membranas plasmáticas y acrosomal (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) en las muestras individuales frescas-diluidas. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

Subcategorías	Sin seleccionar (n = 60)	CGD-BoviPure (n = 60)	Swim-up (n = 60)	Valor P
IPIA (%)	80,1 $\pm$ 1,89b	87,4 $\pm$ 1,55a	83,5 $\pm$ 1,58ab	0,0124
IPDA (%)	4,4 $\pm$ 0,81	2,4 $\pm$ 0,66	3,3 $\pm$ 0,72	0,1731
DPIA (%)	8,8 $\pm$ 0,75	6,9 $\pm$ 0,51	8,0 $\pm$ 0,56	0,1268
DPDA (%)	6,7 $\pm$ 0,87a	3,2 $\pm$ 0,62b	5,1 $\pm$ 0,72ab	0,0095
Integridad M. Plasmática (IMP, %)	84,6 $\pm$ 1,46b	89,8 $\pm$ 1,00a	86,9 $\pm$ 1,04ab	0,0215
Integridad de M. Acrosomal (IMA, %)	89,0 $\pm$ 1,42b	94,3 $\pm$ 1,21a	91,6 $\pm$ 1,29ab	0,0092

IPIA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto, IPDA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado, DPIA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto, y DPDA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. Letras diferentes en cada fila y subcategoría muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b  $P < 0, 01$ .

Los hallazgos de la presente investigación demuestran que la selección de esperma epididimario de perro mediante la centrifugación coloidal con BoviPure® en gradientes de densidad (40 / 80%) mejoró la calidad basado en cinética e integridad de membranas comparado con las muestras sin seleccionar (controles) o seleccionadas por Swim-up. Estos efectos fueron evidenciados en muestras individuales y agrupadas. En muestras individuales, frescas, recuperadas y diluidas con TCG-YH, la



selección espermática por CGD-BoviPure® mejoró la cinética (MT, MP, VCL, VSL, LIN, WOB y BCF) e integridad de las membranas plasmática y acrosomal (IMP e IMA).

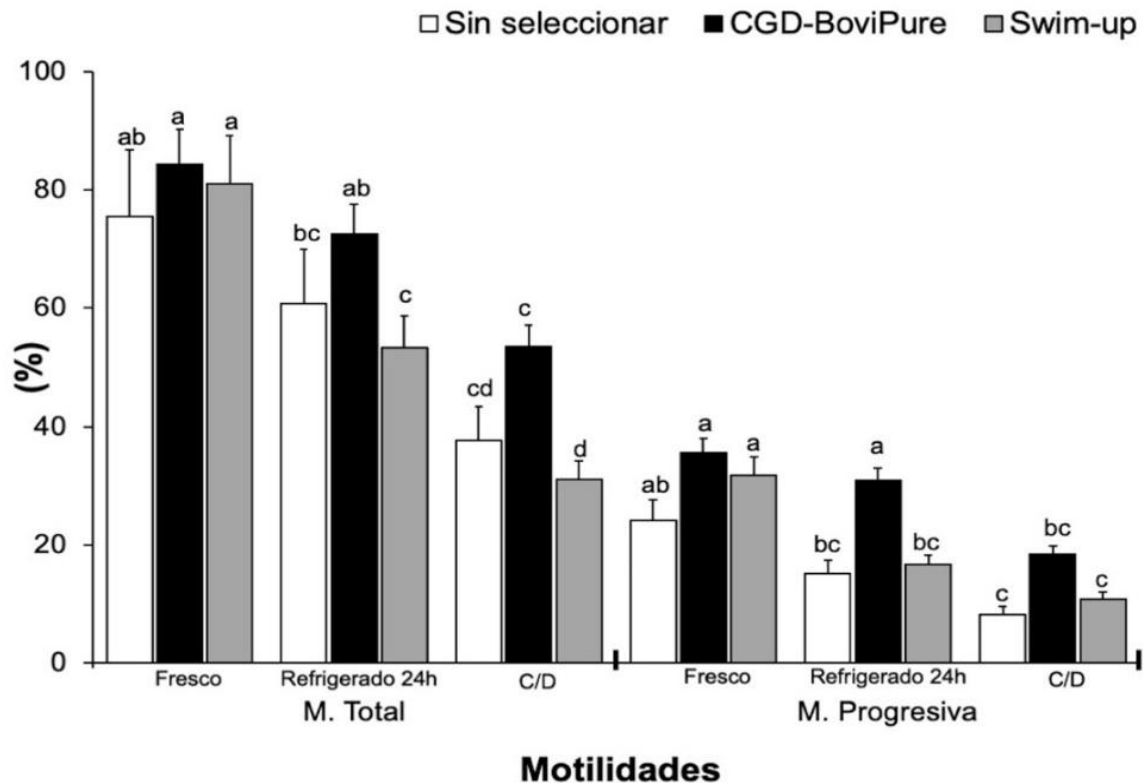
## **6.2. Selección espermática en muestras agrupadas (pools), frescas – diluidas y criopreservadas.**

Los valores promedios ( $\pm$  error estándar de la media) y el grado de significación de factores (*tipo de muestra, método de selección espermática y su interacción*) de todos los parámetros cinéticos y estado de las membranas plasmática y acrosomal de las muestras agrupadas, ya sea frescas – diluidas y criopreservadas (refrigeradas y congeladas–descongeladas [C/D]), antes y después de la selección con CGD-BoviPure® y Swim-up se muestran en los **Anexos 2 y 3**, respectivamente.

Los resultados revelaron que no hubo interacción entre los factores independientes ( $P > 0,05$ ): *tipo de esperma* (fresco-diluido, refrigerado 24h y C/D) y *métodos de selección espermática* (sin seleccionar, CGD-BoviPure® y Swim-up) en ningún parámetro cinético ni categoría de integridad de membranas espermáticas.

En general, los valores de cinética y estado de membranas espermáticas fueron mayores en las muestras frescas, seguido por las refrigeradas y finalmente las congeladas-descongeladas. El efecto de la selección espermática no fue evidenciado en la MT y MP de las muestras espermáticas frescas – diluidas ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, el porcentaje de MT en las muestras criopreservadas tanto refrigeradas como C/D, fue mayor ( $P > 0,01$ ) después de seleccionar con CGD-BoviPure® en comparación con aquellas muestras seleccionadas con Swim-up (refrigeradas:  $72,5 \pm 4,25$  vs.  $53,3 \pm 3,8$ ; y C/D:  $53,4 \pm 3,4$  vs.  $31,1 \pm 3,6$ ; respectivamente). Asimismo, la MP de las muestras refrigeradas o C/D incrementó ( $P < 0,05$ ) después de seleccionar con CGD-BoviPure® comparado con el control o seleccionadas mediante Swim-up (refrigeradas:  $30,9 \pm 3,1$  vs.  $15,1 \pm 3,0$  y  $16,6 \pm 2,5$ ; y C/D:  $18,5 \pm 2,3$  vs.  $8,3 \pm 1,5$  y  $10,8 \pm 1,8$ ; respectivamente). Incluso el porcentaje de MP de las muestras seleccionadas con CGD-BoviPure® después de 24 horas de refrigeración alcanzó

valores similares que aquellas muestras frescas seleccionadas por ambos métodos (Figura 10).



**Figura 10.** MT y MP de muestras espermáticas agrupadas, frescas - diluidas y criopreservadas (refrigeradas y C/D) y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,01$ , a – d,  $P < 0,001$ .

En muestras agrupadas en general, la selección espermática por CGD-BoviPure® mostró ser efectiva solo en muestras refrigeradas y/o congeladas – descongeladas, mejorando algunos parámetros cinéticos como la MP, VCL y WOB y la integridad de la membrana plasmática y manteniendo las dimensiones de la cabeza antes y después de la congelación. Estos resultados sugieren que la solución coloidal BoviPure® en dos gradientes (bottom – 80% y top layer – 40%) con volúmenes micrométricos (200  $\mu$ l) cada uno, resulta ser un método adecuado y útil para seleccionar espermatozoides epididimarios de perros e incrementar la calidad espermática antes y después de la criopreservación. Por otro lado, la presente investigación también demostró que los epidídimos provenientes de perros



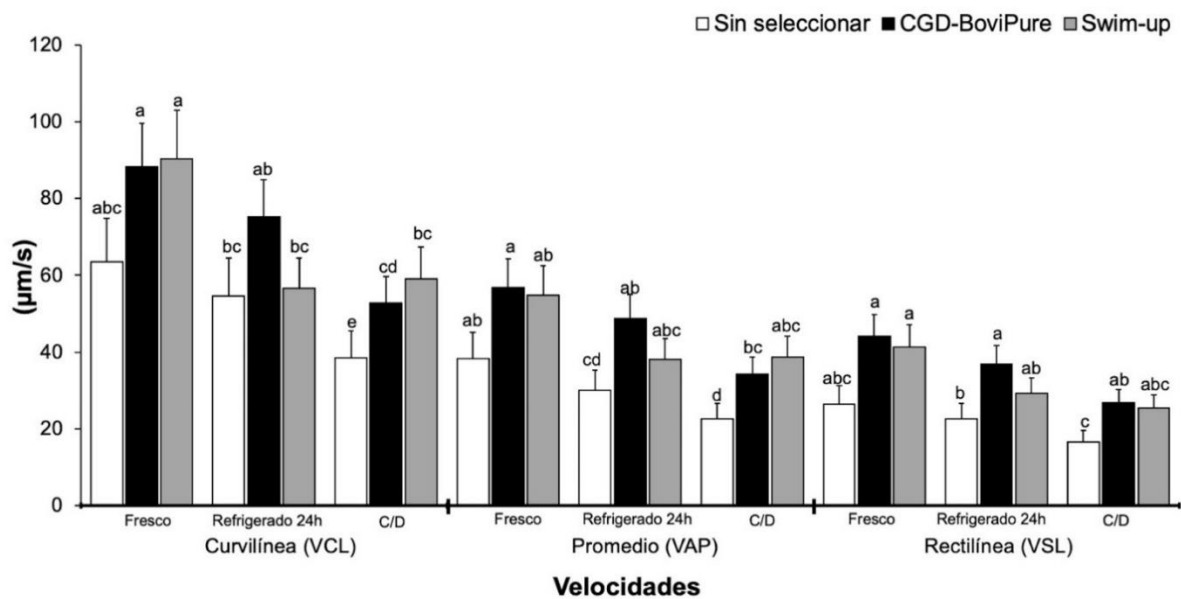
orquiectomizados y almacenados en frío durante al menos 72 horas, pueden ser usados eficientemente para recuperar espermatozoides y utilizarlos en TRAs (Ej. métodos de selección espermática, fecundación *in vitro* [FIV] o inyección intracitoplasmática de espermatozoides [ICSI]) o biotecnologías reproductivas (Ej. Criopreservación e IA) como ha sido previamente demostrado por Hewitt y col. (2001), Yu & Leibo, (2002), Isachenko y col. (2012), Buranaamnuay, (2013) y Abu y col. (2016).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado y en concordancia con los resultados obtenidos, nosotros creemos que esta investigación puede ser usada como estudio base para la gestión de estrategias de conservación de espermatozoides de caninos domésticos y silvestres. Además, el BoviPure® aplicado en la selección espermática de dichos cánidos, puede ser empleado para purificar espermatozoides y aplicar TRAs útiles para conservar *ex situ* dichas especies, incluso en caninos silvestres que estén bajo amenaza latente de extinción.

Existen varios trabajos que comparan la eficacia de las soluciones comerciales a base de partículas de sílice coloidal, recubiertos o no con silano, en la selección de espermatozoides de diferentes especies domésticas comparados con técnicas convencionales como la flotación o filtración (Dorado et al., 2011a; Santiago-Moreno y col., 2014; Galarza y col., 2018).

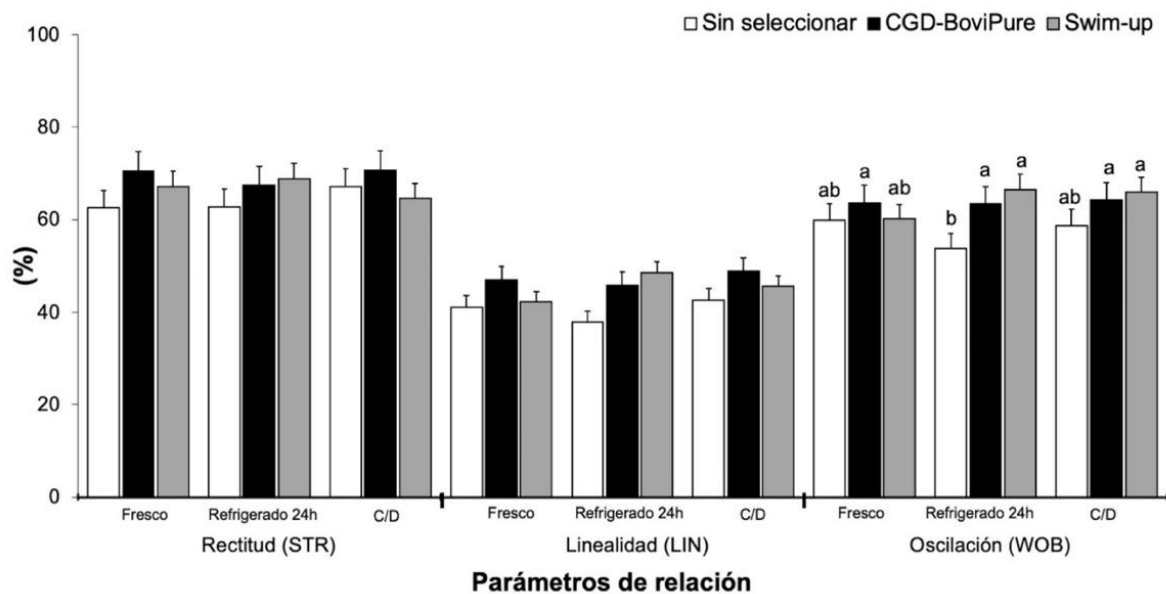
Al igual que las motilidades, los valores de las velocidades VCL, VAP y VSL de las muestras frescas-diluidas no mejoró ( $P > 0,05$ ) después de seleccionar con ambos procedimientos de selección espermática (CGD-BoviPure® y Swim-up). No obstante, el efecto de la selección espermática fue evidenciado en las muestras espermáticas criopreservadas. La velocidad curvilínea incrementó ( $P < 0,01$ ) sólo en las muestras C/D y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up comparadas con su contraparte sin seleccionar (VCL,  $\mu\text{m/s}$ :  $52,8 \pm 2,3$  y  $59,0 \pm 5,5$  vs.  $38,5 \pm 2,6$ ; respectivamente). Las velocidades promedio y rectilínea incrementaron ( $P < 0,05$ ) después de seleccionar las muestras refrigeradas con CGD-BoviPure® comparado con las muestras sin seleccionar (VAP,  $\mu\text{m/s}$ :  $48,7 \pm 2,5$  vs.  $29,9 \pm 2,7$ ; VSL,  $\mu\text{m/s}$ :  $36,9 \pm 2,5$  vs.  $22,5 \pm 2,7$ ;

respectivamente). Además, la velocidad promedio de muestras C/D incrementaron ( $P < 0,05$ ) después de seleccionar con CGD-BoviPure® y Swim-up comparadas con el control (VAP,  $\mu\text{m/s}$ :  $34,2 \pm 1,9$  y  $38,8 \pm 3,3$  vs.  $22,5 \pm 1,6$ ; respectivamente). Asimismo, la velocidad rectilínea de las muestras C/D incrementó después de seleccionar con CGD-BoviPure® en comparación con las muestras el control (VSL,  $\mu\text{m/s}$ :  $26,8 \pm 2,0$  vs.  $16,5 \pm 1,3$ ; respectivamente) (**Figura 11**).



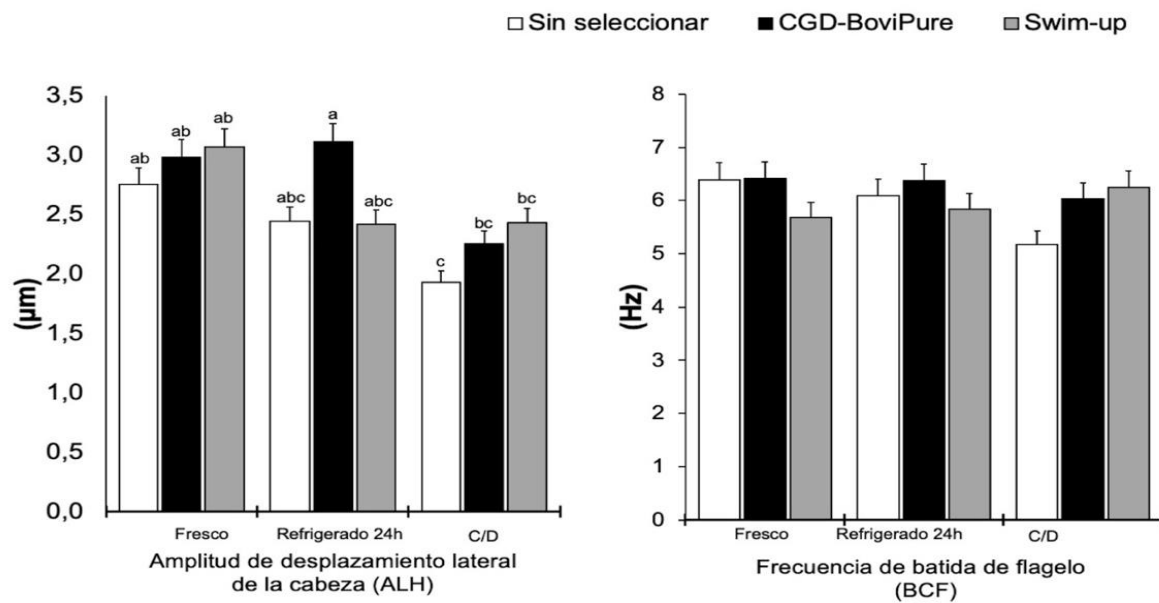
**Figura 11.** Velocidades, VCL, VAP y VSL de muestras espermáticas agrupadas frescas - diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de velocidad muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,01$ , a – d,  $P < 0,001$ .

Con respecto a los parámetros de relación, solamente el porcentaje de oscilación de muestras refrigeradas fue mejorada mostrando un incremento ( $P < 0,01$ ) después de seleccionar los espermatozoides con CGD-BoviPure® y Swim-up en comparación con su contraparte control (WOB, %:  $63,4 \pm 1,8$  y  $66,5 \pm 2,0$  vs.  $53,7 \pm 3,3$ ; respectivamente). El porcentaje de STR y LIN no mostraron diferencias significativas entre métodos de selección espermática ni tipo de muestras espermáticas ( $P > 0,05$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras espermáticas agrupadas frescas – diluidas y criopreservadas (refrigeradas durante 24 h y congeladas-descongeladas) y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre diferentes métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ .

Los valores de ALH y BCF no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre métodos de selección en ningún tipo de muestra espermática. Sin embargo, una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) fue evidenciada al mostrar un incremento de la ALH de muestras refrigeradas y seleccionadas con CGD-BoviPure® frente a las muestras C/D y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up o control (ALH,  $\mu\text{m}$ :  $3,1 \pm 0,2$  vs.  $2,2 \pm 0,1$ ;  $2,4 \pm 0,2$  y  $1,9 \pm 0,1$ ; respectivamente) (**Figura 13**).

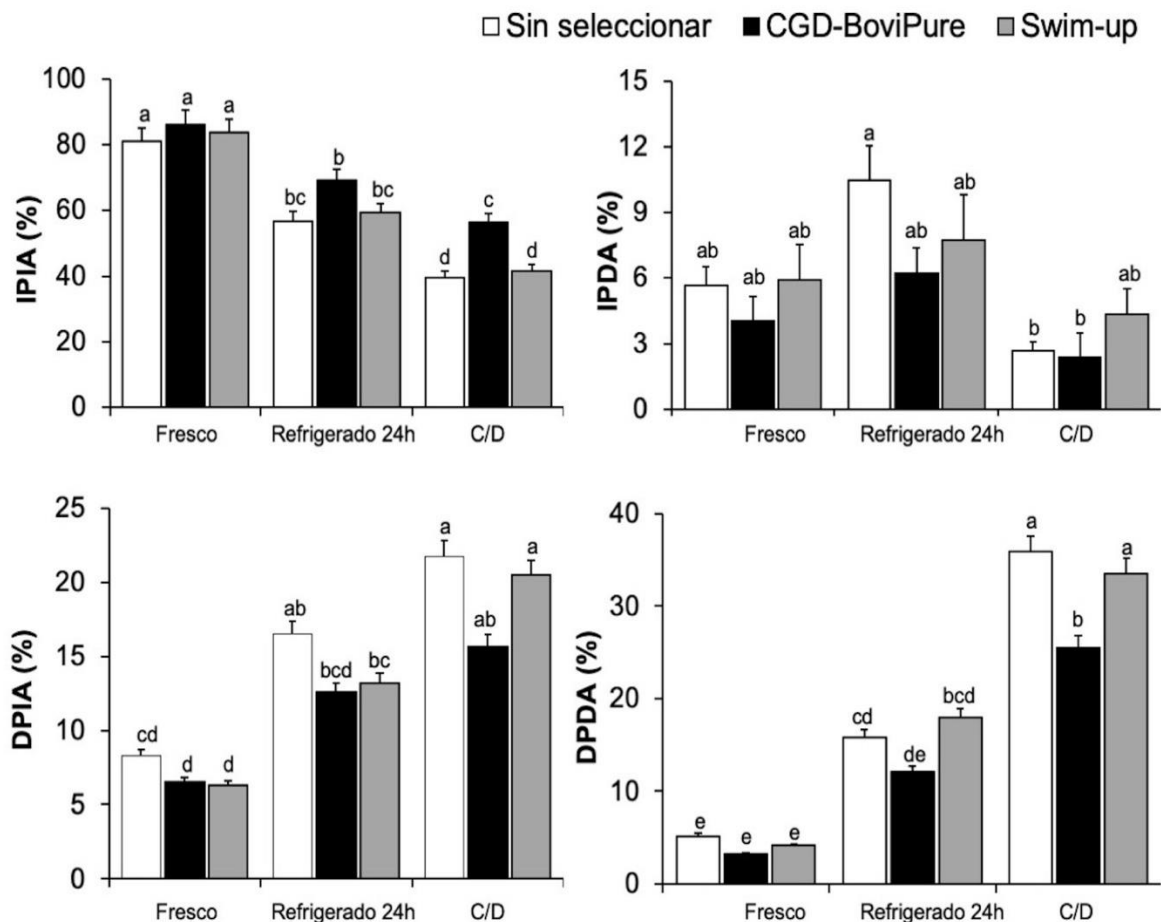


**Figura 13.** ALH y BCF de muestras espermáticas agrupadas frescas – diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de parámetro muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ ; a – c,  $P < 0,01$ .

En el análisis simultáneo del estado de las membranas espermáticas, los resultados indicaron que la integridad de la membrana plasmática (IMP) y acrosomal (IMA) disminuyen (o se degeneran) después del proceso criopreservación, ya sea por refrigeración ( $P < 0,05$ ) o C/D ( $P < 0,01$ ) (**Figura 14 – 15**).

El porcentaje de IPIA no incrementó ( $P > 0,05$ ) después de los procedimientos de selección espermática en muestras frescas – diluidas y refrigeradas. No obstante, en las muestras C/D después de seleccionar con CGD-BoviPure®, el porcentaje de IPIA incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) comparado con las muestras seleccionadas con Swim-up y control (IPIA, %:  $56,4 \pm 2,04$  vs.  $41,6 \pm 1,8$  y  $39,7 \pm 1,9$ , respectivamente). Asimismo, el método de CGD-BoviPure® mostró ser más efectivo al reducir el porcentaje de DPDA indeseables de muestras C/D en comparación con las muestras seleccionadas por Swim-up y control (DPDA, %:  $25,5 \pm 1,78$  vs.  $33,6 \pm 1,6$  y  $35,9 \pm 3,0$ , respectivamente) (**Figura 14**).

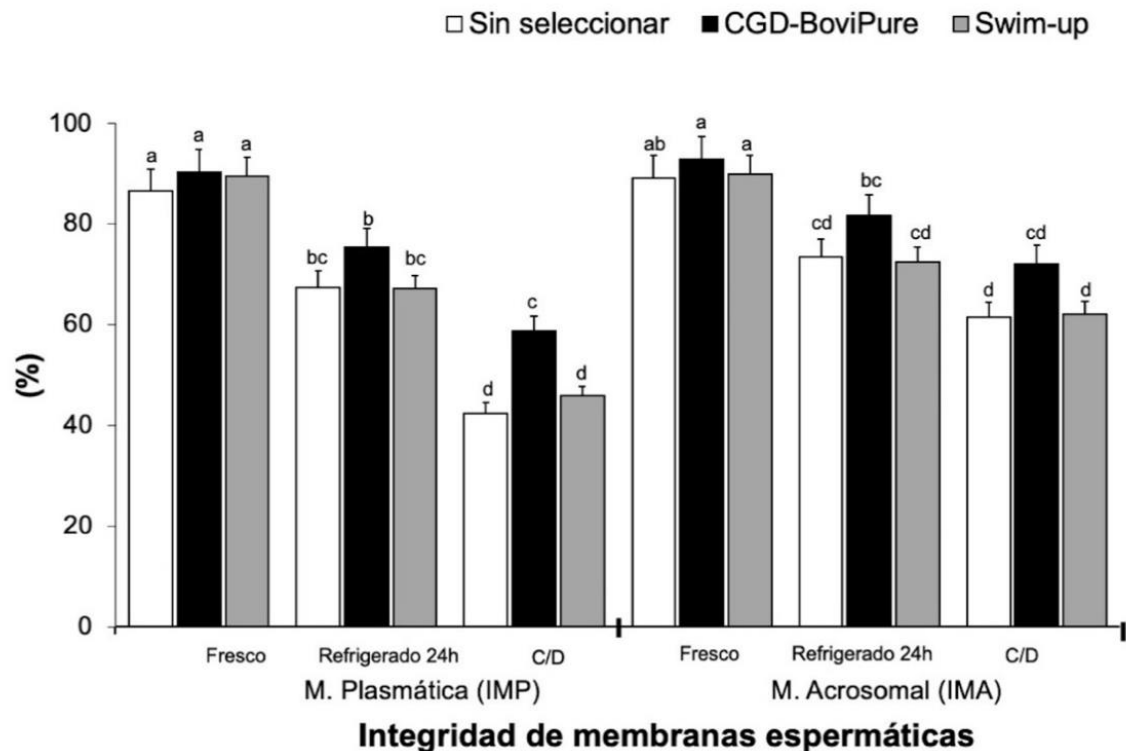




**Figura 14.** Estado de las membranas plasmática y acrosomal evaluados simultáneamente de muestras espermáticas agrupadas frescas-diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. IPIA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto, IPDA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado, DPIA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto, y DPDA= porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ ; a – c, a – d, a – e,  $P < 0,01$ .

Finalmente, la integridad de la membrana plasmática (equivalente a viabilidad espermática) incrementó ( $P < 0,05$ ) sólo en muestras C/D después de la selección espermática por CGD-BoviPure®, en comparación con aquellas muestras seleccionadas con Swim-up y control (IMP, %:  $58,8 \pm 2,2$  vs.  $45,9 \pm 1,9$  y  $42,3 \pm 1,9$ , respectivamente). Este efecto no fue evidenciado en la integridad de la membrana

acrosomal debido a que no existió diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre métodos de selección en ninguna muestra espermática (fresca, refrigerada o C/D) (**Figura 15**).



**Figura 15.** IMP e IMA de muestras espermáticas agrupadas frescas-diluidas y criopreservadas, y seleccionadas con CGD-BoviPure® y Swim-up. Letras diferentes en cada tipo de motilidad muestran diferencias significativas entre diferentes métodos de selección espermática. a – b,  $P < 0,05$ ; a – c, a – d,  $P < 0,01$ .

La selección espermática por Swim-up ha mostrado ser útil al incrementar la motilidad y viabilidad de una muestra heterogénea (Otsuki y col., 2008; Beydola y col., 2013). En la selección de espermatozoides caninos por Swim-up, ya sea en muestras frescas (Bukowska y col., 2011) o refrigeradas (Dorado y col., 2016a) ha resultado útil para mejorar la calidad espermática, evidenciando un incremento de la motilidad y viabilidad, comparado con su contraparte control. Sin embargo, el inconveniente más importante del uso de este método se ha atribuido a las bajas tasas de recuperación espermática, lo que limita su uso sólo en condiciones in vitro en TRAs. Los resultados del presente estudio son consistentes con los estudios antes mencionados. Nosotros suponemos que la efectividad del método Swim-up se debe principalmente al medio



nutritivo “Sperm-Talp” debido al incremento de parámetros cinéticos en muestras frescas individuales (VCL y VAP, WOB y BCF) y muestras agrupadas (VCL y ALH) congeladas – descongeladas. Estos parámetros cinéticos mejorados (incrementados con respecto a su control) se debe posiblemente a la fuente de azúcar (ej. glucosa) del medio Sperm-Talp que permitió que una subpoblación de espermatozoides epididimarios viables y más móviles floten hacia la superficie de la muestra incubada (38,5°C) según lo detallado por Jameel, (2008) y Otsuki y col. (2008).

Por otro lado, se conoce que la centrifugación en gradientes de densidad separa los espermatozoides en función de su densidad (Beydola y col., 2013). Las fuerzas de centrifugación influye en la integridad estructural de los espermatozoides seleccionados (García-López y col., 1996). Efectos indeseables (iatrogénicos) como colas látigo (enrolladas) lo relacionan con fuerzas de centrifugación altas (Ej. > 700 x g) (Beydola y col., 2013; Galarza y col. 2018a). Bajo este principio, el uso de soluciones coloidales en la selección de espermatozoides de perro ha resultado útil. Por ejemplo, Dorado y col., (2011a) y (2011b) usaron dos gradientes de densidad (40/80%) de una solución comercial PureSperm® con una fuerza de centrifugación de 300 X g durante 20 minutos a temperatura ambiente (22°C) e incrementaron la motilidad y viabilidad de esperma canino fresco y criopreservado. En la presente investigación, se usó también dos gradientes de densidad (40/80%) de BoviPure®, una fuerza de centrifugación también baja de 300 x g durante 20 minutos, y volúmenes micrométricos (200 µl) contenidos en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Nosotros suponemos que esta fuerza de centrifugación menor aplicada a los gradientes de densidad de menor volumen permitieron ubicar eficientemente a los espermatozoides más densos (más móviles e íntegros) al fondo del pellet tanto de las muestras frescas como criopreservadas (Beydola y col., 2014). Un espermatozoide maduro morfológicamente normal tiene una densidad de al menos 1,10 g/ml, mientras que un espermatozoide inmaduro, morfológicamente anormal o degenerado, tiene una densidad de entre 1,06 y 1,09 g/ml (Oshio y col., 1987). Nosotros especulamos que una población de espermatozoides viables y maduros con una densidad superior a 1,10 g/ml fueron ubicados en el pellet posterior a la centrifugación con BoviPure®. En resumen, la selección con CGD-BoviPure® mejoró la calidad espermática más



eficientemente que el método de flotación (o su control) al mostrar espermatozoides más densos, viables, mótils, morfológicamente íntegros y con sus membranas plasmática y acrosomal íntegras como ha sido previamente evidenciado en otras especies domésticas y silvestres (Santiago-Moreno y col., 2014); Galarza y col., 2018a).

Estudios previos han demostrado la eficacia del método de selección mediante CGD-BoviPure® frente a su control (sin seleccionar) o selección por Swim-up en espermatozoides de toro (Samardzija y col., 2006; Ancco, 2017; Arias y col., 2017) y cabra (Santiago-Moreno y col., 2017) con mejoramiento de la cinética espermática. En otro estudio realizado en carneros, el método con CGD-BoviPure® produjo una mejor cinética espermática (motilidades y velocidades) en muestras frescas y refrigeradas en comparación con CGD-Percoll® o CGD-Accudenz® (Galarza y col., 2018a). De la misma manera, el uso de CGD-BoviPure® (40/80%) fue usado eficientemente para seleccionar espermatozoides de carnero previo al proceso de la FIV (Galarza y col., 2018b; Galarza y col. 2019). Varela y col. (2015) demostraron que el CGD-Androcoll®, otro tipo de solución coloidal de uso comercial fue útilmente para mejorar las subpoblaciones de espermatozoides equinos con altas velocidades, en especial, la velocidad curvilínea. Los resultados de estos estudios son consistentes con los resultados de esta investigación.

Satisfactoriamente, los espermatozoides seleccionados con CGD-BoviPure® tuvieron velocidades (VCL y VSL) y parámetros de relación (LIN, STR y WOB) más altos que los espermatozoides seleccionados o no con Swim-up. Nuestros resultados son consistentes a los reportados por Oliveira (2006), Dorado y col. (2011a) y Ancco (2017). La relevancia biológica de este hallazgo en perros ha sido establecida por Silva y col. (2006) demostrando que las altas velocidades curvilínea y rectilínea de los espermatozoides influyen directamente en mayores tasas de fertilidad, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, otros parámetros que influye en la fertilidad del espermatozoides canino refrigerado por varias horas (Ej. hasta 196 horas a 5°C) son la motilidad total y progresiva, integridad de las membranas plasmática y acrosomal (Yu y col., 2002). Otros autores sugieren que la predicción de la capacidad fecundante



está influenciada por la integridad acrosomal (Rijsselaere y col., 2002); si el acrosoma está reaccionado (capacitación), la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida es considerada como incompatible, independientemente de la motilidad y viabilidad. En estudios previo se demostró que el protocolo CGD-BoviPure® seleccionó una población de espermatozoides caninos con una calidad mejorada con respecto a una mayor movilidad, viabilidad e integridad del acrosoma (Hernández-López y col., 2005; Maxwell y col., 2007). Los hallazgos del presente estudio sugieren que, tanto en muestras individuales o agrupadas, la selección con BoviPure® mejoró las subpoblaciones espermáticas con membranas plasmática y acrosomal íntegras (IPIA, IMP e IMA). La subpoblación de espermatozoides IPIA representa las células íntegras y vivas, que serán capaces de llegar al sitio de fecundación (después de una IA), y mantener la capacidad fecundante para penetrar al ovocito debido a su acrosoma intacto listo para reaccionar (capacitación espermática) (Dorado y col., 2011a; Santiago-Moreno y col., 2020).

El análisis morfométrico que evaluó las dimensiones de la cabeza de espermatozoides de las muestras únicamente C/D y seleccionadas o no con ambos métodos, evidenciaron que el ancho de la cabeza disminuyó significativamente ( $P < 0,01$ ) después de seleccionar con Swim-up comparado con su contraparte control. Con el mismo efecto, las muestras seleccionadas por Swim-up mostraron una disminución significativa del área de la cabeza comparado con las muestras frescas o C/D sin seleccionar o seleccionadas por CGD-BoviPure®. Eficientemente, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides no variaron ( $P > 0,05$ ) después de selección espermática por CGD-BoviPure® comparado con sus contrapartes frescos o C/D sin seleccionar (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Dimensiones de la cabeza de espermatozoides caninos de origen epididimario de muestras agrupadas, frescas-diluidas y congeladas/descongeladas, y seleccionadas mediante CGD-BoviPure® y Swim-up. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

Variables	Fresco	Congelado - descongelado			Valor P
		Sin seleccionar	Seleccionado		
			CGD-BoviPure®	Swim-up	
Largo ( $\mu\text{m}$ )	5,7 $\pm$ 0,11	5,9 $\pm$ 0,05	5,8 $\pm$ 0,05	5,7 $\pm$ 0,08	0,2213



---

Ancho ( $\mu\text{m}$ )	$3,4 \pm 0,06\text{ab}$	$3,5 \pm 0,02\text{a}$	$3,4 \pm 0,04\text{ab}$	$3,3 \pm 0,02\text{b}$	0,0086
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	$19,6 \pm 0,39\text{a}$	$20,7 \pm 0,26\text{a}$	$20,2 \pm 0,41\text{a}$	$17,6 \pm 1,08\text{b}$	0,0005
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	$13,1 \pm 0,24$	$13,7 \pm 0,10$	$13,3 \pm 0,10$	$13,0 \pm 0,12$	0,0570

---

Durante la congelación, los espermatozoides experimentan varias tensiones que pueden provocar lesiones a nivel celular y alteraciones en el tamaño y forma de la cabeza espermática (Esteso y col., 2018). Se ha determinado por microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM) que la criopreservación puede reducir las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides comparado con los valores antes de la congelación (Bóveda y col., 2018; O'Brien y col., 2019). Además, el proceso de congelación y descongelación provoca daños en la membrana celular y citoesqueleto (Arruda y col., 2002; Gao y Zhou, 2012; Santiago-Moreno y col., 2016). Los resultados del presente estudio demostraron que el proceso de criopreservación no afectó las dimensiones de la cabeza, evidenciando que el largo, ancho, área y perímetro fueron iguales en muestras frescas y congeladas-descongeladas. Sin embargo, el método Swim-up mostró una reducción del ancho y área de la cabeza luego de la selección espermática, comparada con una efectiva invariación de las dimensiones luego de la selección espermática por método CGD-BoviPure®. Esta reducción de las dimensiones de la cabeza post-selección con Swim-up se debe posiblemente a la condensación de la cromatina del núcleo del espermatozoide epididimario (Santiago-Moreno y col., 2020). Además, puede existir una deshidratación por el medio hiperosmótico ( $> 320 \text{ mOsm/kg}$ ) atribuido por medio Sperm-Talp usado en el método Swim-up y como resultado se produce una disminución de la cabeza del espermatozoide como ha sido reportado previamente por Santiago-Moreno y col. (2020).

Otra posible causa de la reducción de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides seleccionados por Swim-up podría ser atribuido a las acuaporinas (AQP) (Pastor-Soler y col., 2002). Recientes investigaciones ponen de manifiesto la importancia de diferentes proteínas de membrana relacionadas con la difusión del agua, AQPs, en la respuesta celular a los procesos de congelación y descongelación (Santiago-Moreno y Galarza, 2019). Las acuaglicerolporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y



AQP10), que transportan agua y glicerol (Wang y col., 2006) que hace de sustrato energético durante la maduración y almacenamiento espermático (Yeung, 2010). Estudios previos han determinado que la AQP7 durante el proceso de congelación y descongelación regula el intercambio osmótico con el medio extracelular Vicente-Carrillo y col. (2016). Nosotros suponemos que estas AQP podrían interactuar con el medio Sperm-Talp en la membrana plasmática lo que provocaría una mayor deshidratación celular, y por lo tanto, una reducción de la dimensión de la cabeza de los espermatozoides (Santiago-Moreno y col., 2014). Incluso, en espermatozoides humanos, se ha observado una correlación entre la baja expresión de AQP7 y la alteración en los parámetros cinéticos (Yeung y col., 2009).



## 7. CONCLUSIONES

- En conclusión, la centrifugación con gradientes de densidad usando BoviPure® fue un método exitoso en la selección de espermatozoides epididimarios de perro en muestras heterogéneas simples o agrupadas, frescas y criopreservadas, debido al incremento (mejoramiento) de la calidad espermática basada en una mejor cinética (motilidades, velocidades, parámetros de relación y progresividad) e integridad de las membranas plasmática y acrosomal en comparación con las muestras sin seleccionar o seleccionadas por el método Swim-up.





## 8. RECOMENDACIONES

- Utilizar el método CGD con BoviPure® (40% / 80%) para seleccionar esperma canino fresco-diluido post-recuperación epididimaria previo a los procesos de criopreservación (refrigeración y congelación) permitiría incrementar la respuesta a la criosupervivencia celular, de acuerdo a los resultados obtenidos en muestras simples, frescas y diluidas con TCG + 20%YH.
- Se recomienda realizar estudios sobre el uso de los espermatozoides obtenidos por selección espermática, para evaluar la capacidad fecundante mediante pruebas como la fecundación in vitro.
- Se puede usar estos protocolos de selección espermática como modelos para aplicarlos en TRA en caninos silvestres u otras especies de carnívoros que hayan muerto bajo situaciones inesperadas o en su entorno natural, siempre y cuando los testículos se hayan mantenido a bajas temperaturas.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abu, A. H., Kisani, A. I., & Ahemen, T. (2016). Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary World*, 9(12), 1440. Retrieved from [https://pdfs.semanticscholar.org/6586/fce307ee3655951a4a355e77bc2fc8e63d75.pdf?\\_ga=2.153729392.953898190.1617890733-1071768219.1583421227](https://pdfs.semanticscholar.org/6586/fce307ee3655951a4a355e77bc2fc8e63d75.pdf?_ga=2.153729392.953898190.1617890733-1071768219.1583421227)
- Aisen, E., Medina, V., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trealose concentrations. *Elsevier*, 57(7), 1801–1808. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- Alamo, D. (2007). *Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de - 152°C*. De las Palmas de Gran Canaria. Retrieved from <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/1910/1/3031.pdf>
- Ancco, E. (2017a). *Efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones in vitro en bovinos*. Univerdad Nacional Agraria La Molina.
- Ancco, E. (2017b). *Efecto de la motilidad espermática en la producción de embriones in vitro en bovinos*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2898/L10-A55-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Anchatuña, C. (2017). *Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post- congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein Friesian*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9830/1/T-UC-0015-002-2017.pdf>
- Arias, M. E., Andara Katherine, Briones, E., & Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*, 17(2), 126–132. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002>
- Arruda, R. P., Ball, B. A., Gravance, C. G., Garcia, A. R., & Liu, I. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, 58(2), 253–256. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00858-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00858-0)
- Arthur, G., Noakes, D., & Pearson, H. (1991). Reproducción y Obstetricia en Veterinaria (pp. 563–579). DF- México: McGraw-Hill -Interamericana.
- Ayala, L., Garay, G., Carpio, F., Rodas, R., Nieto, P., & Calle, G. (2019). Centrifugación coloidal como método de selección espermática previo a la crioconservación con glicerol en caninos. *Revista de Producción Animal*, 31(1), 37–46. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202019000100037](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202019000100037)
- Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L., & Legred, J. (2010). Guías para la Evaluación Nutricional de perros y gatos de la Asociación Americana Hospitalaria de Animales (AAHA). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46, 1–16. Retrieved from [https://www.aaha.org/globalassets/02-guidelines/nutritional-assessment/nag\\_spanish\\_color.pdf](https://www.aaha.org/globalassets/02-guidelines/nutritional-assessment/nag_spanish_color.pdf)
- Berger, T. (1990). Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Elsevier*, 33(3). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X90905466?via%3Dihub>
- Beydola, T., Sharma, R. K., Lee, W., Agarwal, A., Rizk, B., & Aziz, N. (2013). Sperm



- preparation and selection techniques. In *Male Infertility Practice*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (pp. 244-51.). Retrieved from [https://www.clevelandclinic.org/ReproductiveResearchCenter/docs/publications/51\\_Beydola\\_et\\_al\\_Sperm\\_Preparation\\_and\\_selection\\_techniques.pdf](https://www.clevelandclinic.org/ReproductiveResearchCenter/docs/publications/51_Beydola_et_al_Sperm_Preparation_and_selection_techniques.pdf)
- Bóveda, P., Estesó, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Muñiz, A., & Santiago-Moreno, J. (2018). Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (Dama dama) epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 192, 193–199. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.010>
- Bukowska, D., Kempisty, B., Sikora, J., Jackowska, M., Wozna, M., Antosik, P., ... Jaskowski, J. (2011). The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Veterinarni Medicina*, 56(5), 248–254. Retrieved from <http://vri.cz/docs/vetmed/56-5-248.pdf>
- Bukowska, D., Kempisty, B., Sikora, J., Jackowska, M., Wozna, M., Antosik, P., & Jaskowski, J. M. (2011). The effect of swim-up purification and incubation of cells on sperm viability in dogs of different ages. *Veterinarni Medicina*, 56(5), 248–254. Retrieved from <http://vri.cz/docs/vetmed/56-5-248.pdf>
- Buranaamnuay, K. (2013). Sperm-TALP: An Alternative Extender for Retrieving and Diluting Epididymal Sperm in the Domestic Cat. *Reproduction in Domestic Animals*. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/rda.12185>
- Cabrera, P., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2014). Selección Espermática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmática, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial. *International Journal of Morphology*, 32(2), 725–731. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v32n2/art57.pdf>
- Carpio, S. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>
- Caturla Sánchez, E., Sánchez Calabuig, M., Pérez Gutiérrez, J. F., Cerdeira, J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.11.001>
- Centola, G., Mattox, J., Burde, S., & Leary, J. (1990). Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev*, 130–135.
- Directorio cartográfico de Google Maps. (2020). Mapa Geográfico del Ecuador. *Google Maps*.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J. M., Acha, D., Demyda, S., & Hidalgo, M. (2011). Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 76(2), 381–385. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11001178?via%3Dihub>
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J. M., Acha, D., & Hidalgo, M. (2011). Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Animal Reproduction Science*, 125(1–4), 211–218. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432011001060>
- Dorado, J., Gálvez, M. J., Demyda-Peyrás, S., Ortiz, I., Morrell, J. M., Crespo, F., & Hidalgo,



- M. (2016a). Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(10), 1545–1552. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/275052661\\_Differences\\_in\\_preservation\\_of\\_canine\\_chilled\\_semen\\_using\\_simple\\_sperm\\_washing\\_single-layer\\_centrifugation\\_and\\_modified\\_swim-up\\_preparation\\_techniques](https://www.researchgate.net/publication/275052661_Differences_in_preservation_of_canine_chilled_semen_using_simple_sperm_washing_single-layer_centrifugation_and_modified_swim-up_preparation_techniques)
- Dorado, J., Gálvez, M. J., Demyda-Peyrás, S., Ortiz, I., Morrell, J. M., Crespo, F., & Hidalgo, M. (2016b). Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(10), 1545–1552. Retrieved from <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/48093>
- Eddy, E. M., & O'Brien, D. A. (1994). Knobil, E., Neill, J. (Eds.). In *The Physiology of Reproduction* (Vol. 1, pp. 29–77).
- Esteso, M. C., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., Lopez-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2018). Effect of two cooling protocols on the post-thaw characteristics of Iberian ibex sperms. *Cryobiology*, 80, 12–17. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.003>
- Farstad, W. (2001). Cubrición e inseminación artificial en el perro. In *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales*. Barcelona - España. <https://doi.org/1125-1138>
- Frandsen, R., & Spurgeon, T. (1995). *Anatomía y fisiología de los animales domésticos* (5th ed.). México: Interamericana McGraw-Hill.
- Galarza, D. A., de Guevara, M. L., Beltrán-Breña, P., Sánchez-Calabuig, M. J., Rizos, D., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk-and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*, 133, 29–37. Retrieved from [https://www.imageh2020.eu/Publications/THERIO\\_Galarza\\_et al2019.pdf](https://www.imageh2020.eu/Publications/THERIO_Galarza_et al2019.pdf)
- Galarza, D.A., Ladrón de Guevara, M., Beltrán-Breña, P., Rizos, D., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sperm selection by density-gradient centrifugation of Merino ram semen cold-stored up to 48 h improves viability and membrane integrity. *Anim. Reprod.*, 15(3), 562. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31171/2/documento.pdf>
- Galarza, D.A., Lopez-Sebastian, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.022>
- Galarza, Diego Andrés, Sebastian, L., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.022>
- Gálvez, M. J. (2015). *Estudio de la influencia del proceso de preservación y de la centrifugación coloidal sobre la calidad seminal y la estructura de las subpoblaciones cinéticas identificadas en el semen canino*. Universidad de Córdoba. Retrieved from <https://helvia.uco.es/handle/10396/12759>
- Gao, D., & Zhou, X. (2012). *Prevention of Lethal Osmotic Injury to Cells During Addition and Removal of Cryoprotective Agents: Theory and Technology*. *Current Frontiers in Cryobiology*. Retrieved from



<https://pdfs.semanticscholar.org/1608/b134d2e3a40f5fa2c56a0fbb78dbc4204ad1.pdf>

- Garay, G. (2019). *Efecto de la centrifugación coloidal previo al proceso de crío conservación sobre la calidad seminal post descongelación en caninos*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31851/3/Trabajo de titulación.pdf>
- García-López, N., Ollero, M., Muino-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (1996). A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*, 46(1), 141–151. Retrieved from [http://www.biozar.es/BIOZAR/ARTICULOS\\_files/1996\\_A\\_DEXTRAN\\_SWIM-UP\\_PROCEDURE\\_Therio.pdf](http://www.biozar.es/BIOZAR/ARTICULOS_files/1996_A_DEXTRAN_SWIM-UP_PROCEDURE_Therio.pdf)
- González, J., Tadeo, J., Ortega, C., Toledano, A., Vergara, M., & Ávalos, A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Salud Animal - Scielo*, 35, 137–141. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n2/rsa10213.pdf>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/rda.13409>
- Hernández, L., Umland, N., Mondragón, R., & Nayudu, P. (2005). Comparison of the effects of Percoll and PureSperm on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) semen. *Journal of Medical Primatology*, 34(2), 86–90. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2005.00095.x>
- Hewitt. (2000). *Fisiología y Endocrinología del macho* (pp. 79–90). Barcelona - España: Ediciones S.
- Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., & England, G. C. W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1), 101–111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00090-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00090-2)
- Hewitt, D., Leahy, R., Sheldon, I. ., & England, G. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1–2), 101. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/11932043\\_Cryopreservation\\_of\\_epididymal\\_dog\\_sperm](https://www.researchgate.net/publication/11932043_Cryopreservation_of_epididymal_dog_sperm)
- Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. *Animal Andrology: Theories and Applications*, 76. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=hv6dAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=Fundamental+and+practical+aspects+of+semen+cryopreservation&ots=DC-Ky\\_yokw&sig=EvHmQxOlxZz5cOnUGIQZKYhzaBl#v=onepage&q=Fundamental and practical aspects of semen cryopreservatio](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=hv6dAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=Fundamental+and+practical+aspects+of+semen+cryopreservation&ots=DC-Ky_yokw&sig=EvHmQxOlxZz5cOnUGIQZKYhzaBl#v=onepage&q=Fundamental and practical aspects of semen cryopreservatio)
- Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., & Isachenko, E. (2012). Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *Journal of Andrology*, 33(3), 462–468. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2164/jandrol.111.013789>
- Jameel, T. (2008). Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *J Pak Med Assoc*, 58(2), 71–74
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 53, 73–84. Retrieved from





[https://www.researchgate.net/publication/12669823\\_Plasma\\_membrane\\_structure\\_and\\_remodelling\\_during\\_sperm\\_maturation\\_in\\_the\\_epididymis](https://www.researchgate.net/publication/12669823_Plasma_membrane_structure_and_remodelling_during_sperm_maturation_in_the_epididymis)

- Karadjole, Martina; Getz, Iva; Samardžija, Marko; Maćešić, Nino; Matković, Mario; Makek, Zdenko; Karadjole, Tugomir; Goran, Bačić; Tomislav Dobrani; Poletto, M. (2010). The developmental competence of bovine immature oocytes and the developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by o. *Veterinarni Medicina*, 80(4), 445–454.
- Kim, S. H., Yu, D. H., & Kim, Y. J. (2010). Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Animal Reproduction Science*, 119(1–2), 106–114. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432009002644?via%3Dihub>
- Martinez-Alborcia, M., Morrell, J., Gil, M., Barranco, I., Maside, C., Alkmin, D., ... Roca, J. (2013). Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 140(3–4), 173–179. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432013002017?via%3Dihub>
- Maxwell, W. M. C., Parrilla, I., Caballero, I., Garcia, E., Roca, J., Martinez, E. A., & Rath, D. (2007). Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm® density gradient centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(5), 489–494. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0531.2006.00811.x>
- Miró, M. (2015). *Valoración seminal: Sistema CASA* (Gestión de la Reproducción en el macho No. 7). Retrieved from [http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/22\\_17\\_13\\_Tema\\_7.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/22_17_13_Tema_7.pdf)
- Mogas, T., Rigau, T., Piedrafita, J., Bonet, S., & Rodriguez-Gil, J. E. (1998). Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology*, 50(8), 1171–1189. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X98002180>
- Morell, J., & Rodriguez, H. (2016). Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7, 597–610. Retrieved from [https://www.scirp.org/pdf/AJAC\\_2016072717374752.pdf](https://www.scirp.org/pdf/AJAC_2016072717374752.pdf)
- Morrell, J., Dalin, A., & Martínez, H. (2008). Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Anim. Reprod*, 5(3–4), 121–126. Retrieved from <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6077f7783717068b479a/pdf/animreprod-5-3-121.pdf>
- Morrell, J. M., Alsina, M. S., Abraham, M. C., & Sjunnesson, Y. (2018). Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. *Animal Reproduction (AR)*, 13(3), 340–345. Retrieved from <https://animal-reproduction.org/article/10.21451/1984-3143-AR876/pdf/animreprod-13-3-340.pdf>
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas*. Universidad de Santiago de Compostela. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda,



- L., & Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160–167. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X18308239>
- Ochoa, A., & Torres, L. (2012). *Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/384/1/Tesis.pdf>
- Oliveira, Juliani; Marques, H. (2006). In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 58(6), 1116–1122.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec*, 19(4), 426–436. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n4/v19n4a08.pdf>
- Oshio, S., Kaneko, S., Iizuka, R., & Mohri, H. (1987). Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Archives of Andrology*, 19(1), 85-93.
- Otsuki, J., Chuko, M., Momma, Y., Takahashi, K., & Nagai, Y. (2008). A comparison of the swim-up procedure at body and testis temperatures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 413–415. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582120/pdf/10815\\_2008\\_Article\\_9242.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582120/pdf/10815_2008_Article_9242.pdf)
- Páramo, R. (2015). Anatomía reproductiva del macho y de la hembra caninos. Retrieved from [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/52\\_Reproduccion\\_Perros.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/52_Reproduccion_Perros.pdf)
- Páramo, R., & Balcazár, J. (2013). Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros (pp. 9–11). Retrieved from [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual de Practicas de Profundizacion en Reproduccion Animal Perros.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual_de_Practicas_de_Profundizacion_en_Reproduccion_Animal_Perros.pdf)
- Parrish, J. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Elsevier*, 25(4), 591–600. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X86901433>
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44, 859–869. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)
- Pastor-Soler, N., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., & Breton, S. (2002). Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biol Reprod*, 66, 1716–1722. Retrieved from [https://watermark.silverchair.com/biolreprod1716.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAArkwggK1BgkqhkiG9w0BBwagggKmMIIcogIBADCCAPsGCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMnoDTZ5-yqtffox\\_AgEQgIICbD3-4GYuDKMjOhqagN6k\\_WejzBi7wdUxAuZ3R6jS](https://watermark.silverchair.com/biolreprod1716.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAArkwggK1BgkqhkiG9w0BBwagggKmMIIcogIBADCCAPsGCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMnoDTZ5-yqtffox_AgEQgIICbD3-4GYuDKMjOhqagN6k_WejzBi7wdUxAuZ3R6jS)
- Peña, A. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Elsevier*, 82–83, 209–224. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432004000788?via%3Dihub>
- Phillips, T. C., Dhaliwal, G. K., Verstegen-Onclin, K. M., & Verstegen, J. P. (2012). Efficacy of



- four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. *Theriogenology*, 77(1), 39–45. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11003311?via%3Dihub>
- Pontón, A., & Lagos, J. (2014). *Efectos de la refrigeración y crioconservación sobre la motilidad y mortalidad de espermatozoides caninos*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12701/1/T-UCE-0014-062-2014.pdf>
- Rath, D., & Niemann, H. (1997). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47, 785–793. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X97000344?via%3Dihub>
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & de Kruif, A. (2002). Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57, 1669–1681. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., ... Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91, 237–242. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3–4), 237–247. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432005001132>
- Samardzija, Marko, & Karadjole, M. (2006). Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1647281/>
- Samardzija, Marko, Karadjole, M., Getz, I., Makek, Z., Cergolj, M., & Dobranic, T. (2006). Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(58). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-58>
- Santiago-Moreno, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Rodríguez, E., & López-Sebastián, A. (2014). Sperm selection by Capripure® density-gradient centrifugation versus the dextran swim-up procedure in wild mountain ruminants. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4), 178–186. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.003>
- Santiago-Moreno, J., Estes, M. C., Castano, C., Toledano, A., Delgadillo, J., & Lopez, S. (2017). Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science*, 27. [https://doi.org/S0378-4320\(16\)30709-6](https://doi.org/S0378-4320(16)30709-6)
- Santiago-Moreno, J., Estes, M. C., Pradiee, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., O'Brien, E., & Zhihe, Z. (2016). Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) sperm morphometry and function after repeated freezing and thawing. *Andrologia*, 48(4), 470–474.
- Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18–38. Retrieved from <http://www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116/11>





- Santiago-Moreno, J., Martínez-Fresneda, L., Martínez-Madrid, B., Toledano-Día, A., Castaño, C., & A., L.-S. (2020). Reproducción de los animales domésticos. In Biomedica S.L (Ed.), *Fisiología del semen*. (Asis). Zaragoza, España.
- Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Dorado, J., Pulido-Pastor, A., Coloma, M. A., & López-Sebastián, A. (2007). Recovery and cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Archives of Andrology*, 53(6), 309–316. <https://doi.org/10.1080/01485010701730674>
- Sbracia, M., Sayme, N., Grasso, J., Vigue, L., & Huszar, G. (1996). Sperm function and choice of preparation media: comparison of Percoll and Accudenz discontinuous density gradients. *Journal of Andrology*, 17(1), 61–67. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.1996.tb00587.x>
- Silva, A. R., Rita de Cássia, S. C., Silva, L. D., Chirinéa, V. H., Lopes, M. D., & Souza, F. F. (2006). Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm–oocyte interactions. *Theriogenology*, 66(2), 456–462. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.12.009>
- Silva, L., Onclin, K., Lejeune, B., & Verstegen, J. (1996). Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*, 154–156.
- Sisson, S., & James, J. (2002). *Anatomía de los animales domésticos* (Quinta). Barcelona - España: MASSON S.A. <https://doi.org/84-458-0723-4>
- Threlfall, W. (2005). Recolección y evaluación del semen. In *Manual de Reproducción del Perro y del Gato* (pp. 43–54). Barcelona - España: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Vallvé, J. (2017). CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro. *SEQC*, 32, 82–111.
- Valverde, Anthony; Madrigal, M. (2019). Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 447–458.
- Varela, E., Duque, J., Ramírez, M., Ocampo, D., Montoya, J., & Restrepo, G. (2015). Efecto de cuatro métodos de separación seminal sobre la calidad y la capacidad fertilizante in vitro de espermatozoides equinos criopreservados. *Rev Inv Vet Perú*, 26(3), 451–461. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n3/a12v26n3.pdf>
- Varesi, S. (2012a). Canine epididymal spermatozoa: characteristics, collection and cryopreservation. Retrieved from [https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/219126/271556/phd\\_unimi\\_R08797.pdf](https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/219126/271556/phd_unimi_R08797.pdf)
- Varesi, S. (2012b). *Canine epididymal spermatozoa: characteristics, collection and cryopreservation*. Università degli Studi di Milano. Retrieved from [https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/219126/271556/phd\\_unimi\\_R08797.pdf](https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/219126/271556/phd_unimi_R08797.pdf)
- Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.*, 110, 256–268. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/5557019\\_Motility\\_and\\_acrosomal\\_integrity\\_comparisons\\_between\\_electro-ejaculated\\_and\\_epididymal\\_ram\\_sperm\\_after\\_exposure\\_to\\_a\\_range\\_of\\_anisotonic\\_s](https://www.researchgate.net/publication/5557019_Motility_and_acrosomal_integrity_comparisons_between_electro-ejaculated_and_epididymal_ram_sperm_after_exposure_to_a_range_of_anisotonic_s)



olutions\_cryoprotective\_agents\_and\_low\_temperatures

- Verstegen, J., Onclin, K., & Iguer, M. (2005). Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Elsevier*, 64(3), 720–733. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.035>
- Vicente-Carrillo, A., Ekwall, H., Álvarez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2016). Membrane Stress During Thawing Elicits Redistribution of Aquaporin 7 But Not of Aquaporin 9 in Boar Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 665–679. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/rda.12728>
- Wang, F., Feng, X., Li, Y., Yang, H., & MA, T. (2006). Aquaporins as potential drug targets. *Pharmacologica Sinica*, 27(4), 395–401. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00318.x>
- Wang, X., Sharma, R. K., Sikka, S. C., Thomas Jr, A. J., Falcone, T., & Agarwal, A. (2003). Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 80(3), 531–535. Retrieved from <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2803%2900756-8>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071 / rd9950871>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481–492.
- Way, L., Henault, M., & Killian, G. (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Elsevier*, 43(8), 1301–1316. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00115-O](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00115-O)
- Yeung, C.-H. (2010). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian Journal of Andrology*, 12(4), 490–499. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/aja.2010.40>
- Yeung, C.-H., Callies, C., Rojek, A., Nielsen, S., & Cooper, T. G. (2009). Aquaporin Isoforms Involved in Physiological Volume Regulation of Murine Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 80(2), 350–357. Retrieved from <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.0719>
- Yu, I, Songsasen, N., Godke, R. A., & Leibo, S. P. (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, 44(1), 62–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00005-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00005-6)
- Yu, Il-jeoung, & Leibo, S. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Elsevier*, 57(3), 1179–1190. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00711-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00711-7)



## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** Parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA, SCA®) de muestras espermáticas individuales frescas-diluidas y seleccionados mediante CGD-BoviPure® y con Swim-up. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

Parámetros cinéticos	Sin seleccionar (n = 60)	CGD-BoviPure® (n = 60)	Swim-up (n = 60)	Valor P
Motilidad total (%)	72,2 $\pm$ 2,31b	81,0 $\pm$ 1,58a	68,4 $\pm$ 2,71b	0,0005
Motilidad progresiva (%)	19,0 $\pm$ 1,56b	31,5 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>	24,2 $\pm$ 2,06b	0,0000
Velocidad curvilínea (VCL, $\mu$ m/s)	58,3 $\pm$ 1,99b	72,6 $\pm$ 2,83a	67,8 $\pm$ 2,70a	0,0003
Velocidad promedio (VAP, $\mu$ m/s)	32,3 $\pm$ 1,46b	45,3 $\pm$ 1,64a	41,3 $\pm$ 1,88a	0,0000
Velocidad rectilínea ( $\mu$ m/s)	20,5 $\pm$ 0,91b	30,1 $\pm$ 1,36a	26,6 $\pm$ 1,53b	0,0000
Rectitud (STR, %)	58,7 $\pm$ 0,98	61,5 0,93	59,5 $\pm$ 1,50	0,2141
Linealidad (LIN, %)	35,9 $\pm$ 1,12b	40,3 $\pm$ 0,89a	38,2 $\pm$ 1,44ab	0,0308
Oscilación (WOB, %)	55,8 $\pm$ 1,09b	61,4 $\pm$ 0,88a	60,2 $\pm$ 1,37a	0,0011
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, $\mu$ m)	2,7 $\pm$ 0,08	3,1 $\pm$ 0,13	2,9 $\pm$ 0,11	0,1322
Frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz)	5,3 $\pm$ 0,13b	6,2 $\pm$ 0,13a	6,2 $\pm$ 0,21a	0,0000

Letras diferentes en cada fila y subcategoría muestran diferencias significativas entre métodos de selección espermática. a – b, P < 0,01; a – c, P < 0,001.



**Anexo 2.** Parámetros cinéticos (evaluados por el sistema CASA, SCA®) resultantes de la evaluación de espermatozoides caninos epididimarios frescos-diluidos, refrigerados durante 24 horas y congelados-descongelados (C/D) y seleccionados o no con CGD-BoviPure® y Swim-up. Los valores están expresados en promedio ± EEM (error estándar de la media).

Parámetros cinéticos	Fresco			Refrigerado 24 h			Congelado / descongelado			Significancia		
	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	(A)	(B)	(A X B)
MP (%)	75,5 ± 3,63ab	84,3 ± 2,31a	81,1 ± 4,26a	60,7 ± 4,26bc	72,5 ± 4,19ab	53,3 ± 3,83c	37,7 ± 4,43cd	53,4 ± 3,35c	31,1 ± 3,64d	0,0000	0,0000	0,1125
MP (%)	24,1 ± 3,51ab	35,5 ± 3,72a	31,7 ± 4,17a	15,1 ± 2,97bc	30,9 ± 3,11a	16,6 ± 2,50bc	8,3 ± 1,54c	18,5 ± 2,32bc	10,8 ± 1,83c	0,0000	0,0000	0,4848
VCL (µm/s)	63,5 ± 3,84abc	88,2 ± 9,72a	90,4 ± 10,75a	54,7 ± 2,94bc	75,1 ± 3,22ab	56,7 ± 3,62bc	38,5 ± 2,56e	52,8 ± 2,29cd	59,0 ± 5,45bc	0,0000	0,0000	0,0943
VAP (µm/s)	38,3 ± 2,61ab	56,9 ± 6,03a	54,9 ± 7,03ab	29,9 ± 2,69cd	48,7 ± 2,47ab	38,2 ± 2,82abc	22,5 ± 1,60d	34,2 ± 1,85bc	38,8 ± 3,28abc	0,0000	0,0000	0,2083
VSL (µm/s)	26,4 ± 2,48abc	44,2 ± 6,36a	41,4 ± 6,94a	22,5 ± 2,65b	36,9 ± 2,54a	29,1 ± 2,67ab	16,5 ± 1,32c	26,8 ± 1,99ab	25,3 ± 2,55abc	0,0001	0,0000	0,8513
STR (%)	62,5 ± 2,55	70,5 ± 3,22	67,2 ± 3,38	62,8 ± 3,09	67,4 ± 1,75	68,8 ± 2,15	67,1 ± 1,85	70,7 ± 2,24	64,6 ± 3,17	0,8476	0,0455	0,4682
LIN (%)	41,1 ± 2,35	47,0 ± 2,16	42,3 ± 2,45	37,9 ± 3,70	45,9 ± 2,24	48,5 ± 2,61	42,7 ± 3,00	48,9 ± 2,90	45,6 ± 3,36	0,6067	0,0113	0,4950
WOB (%)	59,8 ± 1,58ab	63,6 ± 1,38a	60,2 ± 1,43ab	53,7 ± 3,31b	63,4 ± 1,84a	66,5 ± 2,04a	58,8 ± 2,51ab	64,2 ± 2,36a	65,9 ± 2,53a	0,5382	0,0002	0,1078
ALH, µm	2,8 ± 0,16ab	3,0 ± 0,20ab	3,1 ± 0,21ab	2,4 ± 0,11abc	3,1 ± 0,15a	2,4 ± 0,13abc	1,9 ± 0,13c	2,2 ± 0,11bc	2,4 ± 0,21bc	0,0000	0,0083	0,0936
BCF (Hz)	6,39 ± 0,26	6,4 ± 0,23	5,7 ± 0,28	6,1 ± 0,45	6,37 ± 0,34	5,8 ± 0,44	5,2 ± 0,32	6,0 ± 0,28	6,2 ± 0,52	0,4488	0,3599	0,1716

Análisis factorial 3 x3: (A) Factor 1 equivalente a tipo de muestra espermática; (B) Factor 2 equivalente al método de selección espermática; y (A X B) interacción entre Factor 1 y Factor 2. Letras diferentes en la misma fila y parámetro cinético muestra diferencias significativas entre los diferentes



métodos de selección espermática (sin seleccionar, CGD-BoviPure® y Swim-up) y tipo de esperma (fresco, refrigerado y C/D). a – b  $P < 0,05$ ; a – c  $P < 0,01$ ; a – d, a - e  $P < 0,001$ .

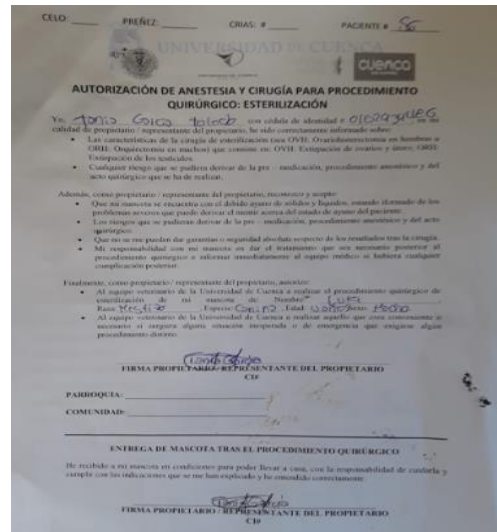
**Anexo 3.** Porcentajes de espermatozoides caninos de origen epididimario en las diversas categorías de integridad de la membranas plasmáticas y acrosomal (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) en las muestras frescas-diluidas, refrigeradas durante 24 horas y congeladas / descongeladas y seleccionadas o no con CGD-BoviPure® y Swim-up. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

Sub categorías	Fresco			Refrigerado 24 h			Congelado - descongelado			Significancia		
	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	Sin seleccionar	CGD-BoviPure®	Swim-up	(A)	(B)	(A X B)
IPIA (%)	80,9 $\pm$ 2,80a	86,2 $\pm$ 2,77a	83,6 $\pm$ 3,10a	56,8 $\pm$ 3,39bc	69,1 $\pm$ 2,96b	59,3 $\pm$ 3,31bc	39,7 $\pm$ 1,88d	56,4 $\pm$ 2,04c	41,6 $\pm$ 1,78d	0,0000	0,0000	0,5813
IPDA (%)	5,7 $\pm$ 1,82ab	4,1 $\pm$ 1,68ab	5,9 $\pm$ 2,30ab	10,5 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 1,15ab	7,7 $\pm$ 2,02ab	2,7 $\pm$ 0,62b	2,4 $\pm$ 0,55b	4,3 $\pm$ 0,96ab	0,0007	0,2451	0,6592
DPIA (%)	8,3 $\pm$ 0,91cd	6,5 $\pm$ 0,52d	6,3 $\pm$ 0,79d	16,5 $\pm$ 1,90ab	12,6 $\pm$ 1,32bcd	13,2 $\pm$ 1,28bc	21,7 $\pm$ 2,35a	15,7 $\pm$ 1,07ab	20,5 $\pm$ 1,23a	0,0000	0,0036	0,3701
DPDA (%)	5,2 $\pm$ 0,97e	3,2 $\pm$ 1,03e	4,1 $\pm$ 1,03e	15,8 $\pm$ 2,33cd	12,1 $\pm$ 1,96de	18,0 $\pm$ 2,46bcd	35,9 $\pm$ 2,98a	25,5 $\pm$ 1,78a	33,6 $\pm$ 1,63a	0,0000	0,0015	0,1534
IMP (%)	86,5 $\pm$ 1,67a	90,3 $\pm$ 1,39a	89,6 $\pm$ 1,43a	67,3 $\pm$ 2,73bc	75,3 $\pm$ 2,87b	67,0 $\pm$ 2,43bc	42,3 $\pm$ 1,94d	58,8 $\pm$ 2,22c	45,9 $\pm$ 1,95d	0,0000	0,0000	0,1745
IMA (%)	89,1 $\pm$ 2,40ab	92,8 $\pm$ 2,49a	89,9 $\pm$ 2,88a	73,4 $\pm$ 3,07cd	81,7 $\pm$ 2,20bc	72,5 $\pm$ 3,09cd	61,4 $\pm$ 3,03d	72,1 $\pm$ 1,65cd	62,1 $\pm$ 1,44d	0,0000	0,0005	0,9524

Análisis factorial 3 x3: (A) Factor 1 equivalente a tipo de muestra espermática; (B) Factor 2 equivalente al método de selección espermática; y (A X B) interacción entre Factor 1 y Factor 2. Letras diferentes en la misma fila y subcategoría muestra diferencias significativas entre los diferentes métodos de selección espermática (sin seleccionar, CGD-BoviPure® y Swim-up) y tipo de esperma (fresco, refrigerado y C/D). a – b  $P < 0,05$ ; a – c  $P < 0,01$ ; a – d, a - e  $P < 0,001$



**Anexo 4.** Paciente canino previo a orquiectomía.



**Anexo 5.** Fichas de autorización para orquiectomía.



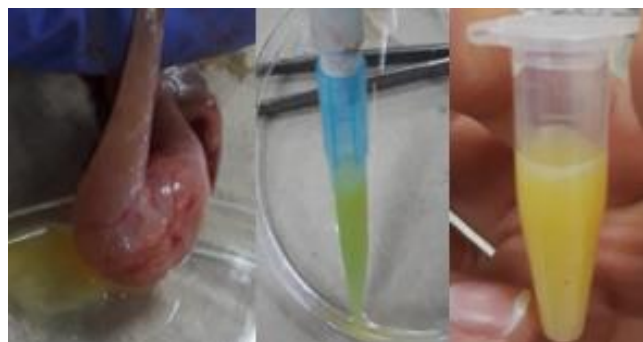
**Anexo 6.** Muestra de testículo recolectado.



**Anexo 7.** Muestra de epidídimo recuperado.



**Anexo 8.** Flujo retrógrado.

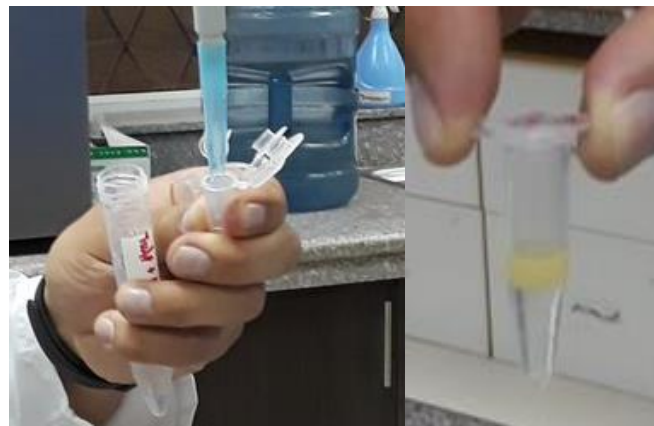


**Anexo 9.** Recuperación espermática.

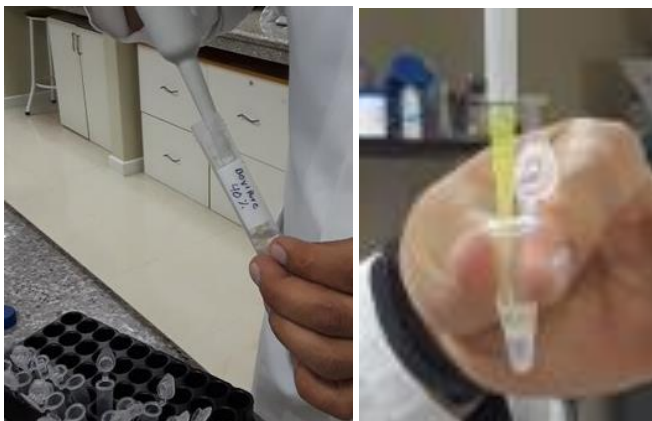




**Anexo 10.** Análisis de concentración espermática de muestras frescas.



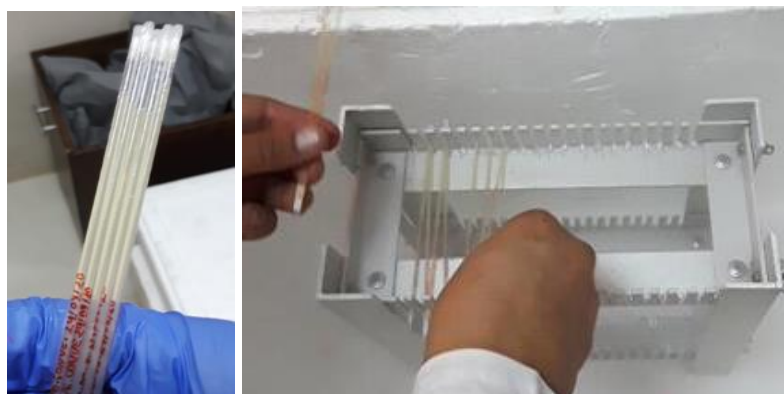
**Anexo 11.** Método de selección espermática Swim up en muestras frescas.



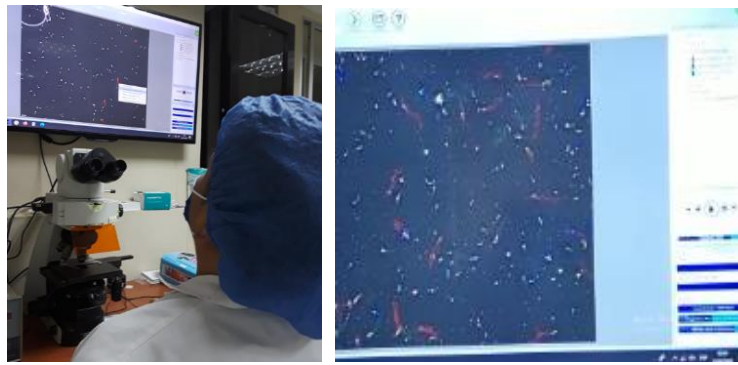
**Anexo 12.** Método de selección espermática CGD-BoviPure® en muestras frescas.



**Anexo 13.** Análisis de selección espermática en pools frescos y criopreservados.



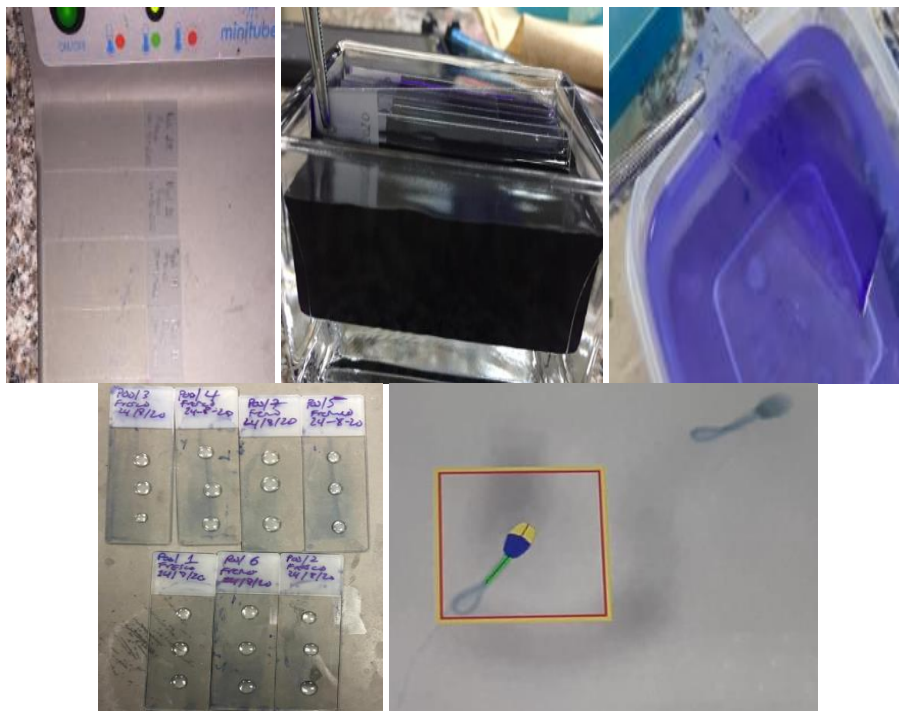
**Anexo 14.** Congelación y descongelación de las muestras pools.



**Anexo 15.** Análisis de Cinética espermática (CASA).



**Anexo 16.** Integridad de membranas plasmática y acrosomal.



**Anexo 17.** Morfometría de la cabeza espermática.



