

Universidad de Cuenca



Facultad de Ciencias Agropecuarias Maestría en medicina canina y felina II Cohorte

TITULO:

“Efecto de la centrifugación coloidal previo al proceso de crío conservación sobre la calidad seminal post descongelación en caninos”

**Tesis previa a la obtención del título de
Magister en Medicina Canina y Felina**

Autor: MVZ. Gabriela Sofía Garay Peña. **C.I:** 0106047889

Director: PhD. Luis Eduardo Ayala Guangua. **C.I:** 0102635463

Cuenca-Ecuador

2019



RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la centrifugación coloidal como método de selección espermática más la adición de glicerol en tres concentraciones 4%, 6% y 8% como crio protector. Se valoró 72 muestras seminales procedentes de 6 caninos mestizos, sanos, CC 5 (escala 1 a 9), de 3 a 5 años, cuyos eyaculados cumplieron con los siguientes parámetros: volumen mínimo 1ml, motilidad masal 3 (escala 1 a 5), motilidad individual progresiva 60% y menos del 30% de anormalidades. Cada muestra fue dividida en 2 alícuotas, la primera para el Grupo 1 (centrifugación convencional) y la otra para el Grupo 2 (centrifugación coloidal), posterior a ello cada alícuota fue dividida en tres, correspondiente a la concentración de glicerol. Se realizaron 3 evaluaciones espermáticas (inicial, pre congelación y post descongelación). El análisis comparativo entre las muestras iniciales y los Grupos 1 y 2 pre congelación presentaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) para la concentración, siendo menor en el Grupo 2 (183×10^6), en cuanto a la motilidad individual progresiva (MIP) se redujo en el Grupo 1 (61,3%); la vitalidad y el porcentaje de anormalidades no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$), entre grupos. Se determinó que agregar glicerol al 4%, mejora la crio protección expresada en una mayor MIP (76.7%), así como menor porcentaje de anormalidades (4.3%) y mayor vitalidad (93,6) post descongelación, esto cuando la muestra seminal fue centrifugada previamente en medio coloidal. En conclusión, la utilización del medio coloidal contribuye a mejorar la selección de espermatozoides que unido a un crio protector a base de glicerol al 4% permite mantener los parámetros mínimos post descongelación de la muestra seminal en caninos.

Palabras claves: CENTRIFUGACIÓN COLOIDAL; SEMEN; CANINO; GLICEROL.



ABSTRACT

The objective of the investigation was to evaluate the colloidal centrifugation as a method of sperm selection plus the addition of glycerol in three concentrations 4%, 6% and 8% as cryoprotectant. We evaluated 72 seminal samples from 6 mestizo dogs, healthy, CC 5 (scale 1 to 9), from 3 to 5 years old, whose ejaculates met the following parameters: minimum volume 1ml, mass motility 3 (scale 1 to 5), Individual progressive motility 60% and less than 30% of abnormalities. Each sample was divided into 2 aliquots, the first for Group 1 (conventional centrifugation) and the other for Group 2 (colloidal centrifugation), after which each aliquot was divided into three, corresponding to the concentration of glycerol. Three sperm evaluations were performed (initial, pre-freezing and post-thawing). The comparative analysis between the initial samples and Groups 1 and 2 pre-freezing presented statistical differences ($P < 0.05$) for the concentration, being lower in Group 2 (183x10⁶), as for the progressive individual motility (MIP) reduced in Group 1 (61.3%); the vitality and the percentage of abnormalities did not show statistical differences ($P > 0.05$), between groups. It was determined that adding glycerol to 4%, improves cryopreservation expressed in a higher MIP (76.7%), as well as a lower percentage of abnormalities (4.3%) and greater vitality (93.6) post thawing, this when the seminal sample was centrifuged previously in colloidal medium. In conclusion, the use of the colloidal medium contributes to improve the selection of spermatozoa that together with a cryoprotectant based on glycerol to 4% allows to maintain the minimum parameters after thawing of the seminal sample in canines.

Keywords: COLLOIDAL CENTRIFUGATION; SEMEN; CANINE; GLYCEROL.



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	9
CLAUSULAS	10;11
CAPÍTULO I:	10
Introducción	12
CAPÍTULO II:	14
Objetivos	14
Objetivo general:	14
Objetivos específicos:	14
CAPÍTULO III:	15
Revisión bibliográfica	15
3.1 COLECCIÓN DE SEMEN DE PERRO	15
3.2 EVALUACIÓN DE SEMEN DE PERRO	15
3.3 PARAMETROS:	16
3.3.1 Volumen:	17
3.3.2 Movilidad:	17
3.3.3 Movilidad masal:	17
3.3.4 Movilidad individual:	18
3.3.5 Morfología:	18
3.3.6 pH	18



3.3.7 Concentración:	19
3.3.8 Integridad y funcionalidad de membrana:	19
3.4 CENTRIFUGACIÓN CONVENCIONAL	20
3.5 CENTRIFUGACIÓN COLOIDAL	20
3.6 PROCESO DE CRIOCONSERACIÓN:	22
3.7 FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN	24
3.7.1 Estrés térmico: Shock de frío	25
3.7.2 Formación de hielo en el medio extra e intra celular	26
3.7.3 Crioprotectores y estrés celular	27
3.7.4 Diluyentes utilizados para la criopreservación de semen	27
3.7.5 Crio protectores	28
3.7.5.1 Azucares	28
3.7.5.2 Glicero l	29
3.7.5.3 Proteína	30
3.8 CONGELACIÓN DE SEMEN	31
CAPÍTULO IV:	32
Materiales y métodos	32
4.1 Lugar de estudio	32
4.2 Unidades experimentales:	33
4.3 Variables:	33
4.4 Materiales:	34
4.5 Método:	34
4.6 Tratamientos:	34
4.7 Metodología:	35



4.7.1 Colección seminal:	35
4.7.2 Valoración de las muestras seminal inicial	35
4.7.3 División de alícuotas:	36
4.7.4 Preparación de la columna de Percoll (60%):	36
4.7.5 Preparación del diluyente A y B:	36
4.7.6 Centrifugación coloidal:	38
4.7.7 Evaluación seminal pre-congelación	38
4.7.7.1 Movilidad individual progresiva (MIP):	39
4.7.7.2 Vitalidad:	39
4.7.7.3 Morfología:	39
4.7.7.4 Concentración:	40
4.7.7.5 Integridad y funcionalidad de membrana:	40
4.7.8 Determinación de las dosis seminales:	40
4.7.9 Fase de equilibrio:	41
4.7.10 Adición del crioprotector:	41
4.7.11 Empajuelamiento:	42
4.7.12 Congelación	42
4.7.13 Valoración pos descongelación.	42
CAPÍTULO IV:	44
Resultados y discusión	44
CAPÍTULO V:	55
Conclusiones y recomendaciones.....	55
CAPITULO VI:	56
Bibliografía	56
ANEXOS	65



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fórmula diluyente A (base)	36
Tabla 2. Diluyente B con Glicerol 4%	37
Tabla 3. Diluyente B con Glicerol 6%	38
Tabla 4. Diluyente B con Glicerol 8%	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis	32
Figura 2. Detalle de los tratamientos y sub-tratamientos del experimento (G1=grupo 1; G2=grupo 2).....	35
Figura 3. Protocolo utilizado para el procesamiento de cada una de las colectas.	43
Figura 4. Concentración espermática promedio inicial vs la concentración del grupo 1 (Testigo) y grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).....	44
Figura 5. Motilidad individual progresiva (MIP) promedio inicial vs la MIP del Grupo 1 (Testigo) y Grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).....	45
Figura 6. Vitalidad espermática promedio inicial vs la vitalidad del grupo 1 (Testigo) y grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).	47
Figura 7. Promedio del porcentaje de anomalías inicial vs las anomalías del Grupo 1 (Testigo) y Grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).....	48
Figura 8. Promedio del porcentaje de motilidad individual progresiva (MIP) pre-congelación (G1=testigo y G2=Percoll) y sus sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%). ^{abc} =letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.	49
Figura 9. Promedio del porcentaje de vitalidad espermática pre-congelación (G1=testigo y G2=Percoll) y sus sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%). ^{abc} =letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.	50



Figura 10. Promedio del porcentaje de anormalidades espermáticas pre-congelación (G1=testigo y G2=Percoll) y sus sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%).

^{abc}= letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey. 52

Figura 11. Promedio del porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host pos-descongelación en los sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%), análisis con una estadística al 5%, prueba de Tukey. 53



LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

IA: inseminación artificial.

MIP: Motilidad Individual Progresiva.

HOST: Test Hipoosmótico

SLC: Centrifugación en una Solo Capa.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

PUFA: Ácidos Grasos Poliinsaturados.

LPO: Peroxidación lipídica.

SDO: Superóxido Dismutasa.

DPx: Aglutinación Peroxidasa.

LDL: Proteína de Baja Densidad.

N2L: Nitrógeno líquido.

CC: Condición corporal

MM: Movilidad Masal.

DCA: Diseño completamente al azar.

G: Grupo (1 y 2)

Ga, Gb, Gc: Sub tratamientos o sub grupos.

FIV: Fecundación In Vitro.

RPM: Revoluciones por minuto.

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, **Gabriela Sofia Garay Peña**, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Efecto de la centrifugación coloidal previo al proceso de erio conservación sobre la calidad seminal post descongelación en caninos**", 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, 25 de Enero de 2019.



Gabriela Sofia Garay Peña

C.I: 0106047889



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, **Gabriela Sofía Garay Peña**, autora del trabajo de titulación "Efecto de la centrifugación coloidal previo al proceso de crío conservación sobre la calidad seminal post descongelación en caninos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 25 de Enero de 2019.

Gabriela Sofía Garay Peña

C.I: 0106047889



CAPÍTULO I:

Introducción

En los últimos años, la reproducción canina ha experimentado un aumento de interés (Sue *et al.*, 2010) a nivel mundial y Ecuador no es ajeno a esta realidad, en la actualidad la inseminación artificial con semen fresco es una práctica altamente difundida en nuestro medio, que dio paso al desarrollo de biotecnologías como la refrigeración y crioconservación de muestras seminales. Estas técnicas y en específico la crioconservación de semen de perro, presenta dificultades como: factores propios de la especie; cantidad, fracción, pureza del eyaculado (Strzezek y Fraser, 2009) y factores externos como: procesamiento, dilución y congelación de la muestra (Sánchez *et al.*, 2018).

Sin embargo, la calidad de la muestra seminal expresada en pureza es esencial en estos procesos, actividad que se ve afectada principalmente por las tres fracciones en la que se divide el eyaculado, la primera y tercera fracción procedente de la glándula prostática que no poseen espermatozoides, pero contienen componentes que interfieren en el proceso de congelación, por otra parte, la segunda porción es rica en espermatozoides, espermatozoides y es la que se debería colectar. (Goericke *et al.*, 2011). Para disminuir este efecto, la centrifugación mecánica pre congelación es un método que durante varios años ha mejorado la cantidad de espermatozoides, pero no la calidad, por ende la introducción de la centrifugación coloidal ha sido un gran avance, según Morrelle y Rodriguez (2016), esta técnica se puede usar para separar poblaciones de células heterogéneas, de las muestras seminales, que generalmente contienen mezclas de espermatozoides en diferentes etapas de madurez, muertos y células no espermáticas, con lo cual la muestra seminal post



centrifugación coloidal posee un alto grado de espermatozoides viables y puros, los cuales pueden mejorar los resultados de crioconservación.

Para la congelación de semen en perros uno de los crioprotectores es el glicerol, este se agrega en dos formas diferentes: en un solo paso, seguido de un enfriamiento en 4 °C durante 1 a 2 horas (Rota *et al.*, 1999) o en dos fases durante un período total de 1,5 a 2 horas (Peña y Linde, 2000). Sin embargo, el glicerol al tener un peso molecular alto es tóxico en concentraciones elevadas y si bien en otras especies está fuertemente estudiado, en la canina los datos descritos son contradictorios (Belala *et al.*, 2016); por lo tanto, es necesario investigar la dosis adecuada de glicerol que se debería utilizar para la crio preservación de semen canino.

Por lo antes expuesto, el presente trabajo se efectuó con el objetivo de incluir la centrifugación coloidal como método de purificación seminal (Chatdarong *et al.*, 2010) y probar concentraciones diferentes de glicerol como crioprotector de semen de perros.



CAPÍTULO II:

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar los efectos de la centrifugación coloidal (columnas de Percoll) sobre la calidad espermática, aplicado previo al proceso de crío preservación usando tres concentraciones diferentes de glicerol (4; 6 y 8%) en caninos

Objetivos específicos:

- Valorar el efecto de la centrifugación coloidal (columnas de Percoll) sobre la calidad espermática pre congelación.
- Evaluar tres concentraciones diferentes de glicerol (4; 6 y 8%) en el protocolo de crío preservación de semen canino



CAPÍTULO III:

Revisión bibliográfica

La criopreservación de semen de perro se ha constituido en un tema de interés para veterinarios y criadores con el fin de mejorar la reproducción de ejemplares de alto mérito genético, comercial o afectivo (Restrepo *et al.*, 2009). En las razas caninas la criopreservación de semen es utilizada básicamente para la IA (inseminación artificial) y para el almacenamiento de muestras de perros de alto valor genético por períodos de tiempo ilimitado (Futino *et al.*, 2010), y se considera una opción económica para el criador ya que se optimiza la accesibilidad de semen a largo plazo (Restrepo *et al.*, 2009). Por esta razón desde el progreso de la inseminación artificial con semen congelado, se están haciendo avances para desarrollar un medio que mejore la congelación no solo del semen de buena calidad, sino también de muestras de semen mediocres o incluso de mala calidad (Bencharif *et al.*, 2010).

3.1 COLECCIÓN DE SEMEN DE PERRO.

La colecta de semen se realiza por estimulación manual en un intervalo de una semana. Las eyaculaciones se recolectaron en un embudo acoplado a un tubo graduado (Silva *et al.*, 2006). Solo se recolecta la segunda fracción, la cual se coloca rápidamente en un baño de agua a 37 °C para evitar un choque térmico (Herrera *et al.*, 2008).

3.2 EVALUACIÓN DE SEMEN DE PERRO.

Una vez el eyaculado espermático ha sido recogido sin la fracción prostática, debemos evaluar si la calidad espermática es suficiente para que sea adecuada su congelación (Martí y Lafuente, 2011). El análisis de semen tiene múltiples parámetros relacionados con las



características funcionales y morfológicas del espermatozoide que aumenta la predictibilidad del potencial de fertilización de una muestra (Silva *et al.*, 2006), en general es un estudio que brinda información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides presentes en el eyaculado (Stornelli y Sota, 2007), para tomar una decisión sobre el uso de un perro, ya sea para el apareamiento, la inseminación artificial o para la crioconservación del semen (Peña, 2004). Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática (Stornelli y Sota, 2007).

La motilidad y el número de los espermatozoides son dos de los tres pilares que sostienen la estructura diagnóstica del análisis del eyaculado, la morfología constituye el tercer pilar, la evaluación morfológica de semen comprende la diferenciación cuali y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales (Jurado *et al.*, 2008). Durante el proceso de congelación la motilidad espermática se ve afectada al congelar el semen, por ello siempre debemos evaluarla después de la congelación, no se recomienda utilizar esperma con una motilidad inicial menor del 75%, ya que al descongelarlo la motilidad media tiende a ser menor del 40%. Hoy en día, la utilización de semen congelado registra menos tasas de fertilidad y prolificidad (Martí y Lafuente, 2011).

3.3 PARAMETROS:

El siguiente paso después de la obtención del eyaculado es realizar la evaluación espermática para asegurar una adecuada calidad seminal durante el proceso de crioconservación de



semen, la función espermática es analizada en semen fresco y post descongelación (Salinas *et al.*, 2013).

3.3.1 Volumen:

La cantidad de eyaculado varía según la edad, el tamaño, la frecuencia de colecta, métodos y duración de las colectas (Restrepo., 2009). El volumen total de un eyaculado normal de perro varía de 2,5ml a 80ml, cuyo valor se halla dividido en tres fracciones la primera que está compuesta de 0,5 a 5,0 ml de líquido transparente, la segunda de 1,0 a 4,0 ml de líquido opalescente y la tercera de 1,0 a 80,0 ml de líquido transparente; siendo la segunda fracción la que posee mayor cantidad de células espermáticas (Gradil *et al.*, 2007).

3.3.2 Movilidad:

La evaluación de la movilidad del esperma es visual y está influenciada por la temperatura y las habilidades del evaluador (Rijsselaere *et al.*, 2005), este parámetro es de gran importancia ya que evalúa de forma directa la motilidad del esperma dentro del tracto reproductor femenino, principalmente, para la penetración de la zona pelúcida (Dorado *et al.*, 2011a).

3.3.3 Movilidad masal:

La movilidad se evalúa subjetivamente en un portaobjetos de vidrio precalentado (37°C) (Rijsselaere *et al.*, 2005), para observar la existencia eventual de “oleadas”, movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior dispersión de los espermatozoides. La existencia de estas ondas se considera generalmente como indicio de buena vitalidad y alta concentración de los espermatozoides en el eyaculado. El número de campos valorados es un mínimo de diez, siempre en el centro de la muestra, para obtener valores objetivos, con platina temperada a 37°C (Salinas *et al.*, 2013). La motilidad puede clasificarse como:



Muy buena: cuando el 80 – 100 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva.

Buena: cuando el 60 - 79 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva.

Regular: cuando el 40 - 59 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva.

Pobre: cuando menos del 40 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva (Corrada *et al.*, 2014).

3.3.4 Movilidad individual:

Es normal cuando el espermatozoide presenta un movimiento progresivo rectilíneo.

3.3.5 Morfología:

La evaluación de la morfología depende de la técnica de fijación y tinción, la calidad del microscopio y la experiencia del observador (Rijisselaere *et al.*, 2005). Los reproductores deben presentar un 70% de células espermáticas normales en la evaluación seminal o tener menos de un 20% de espermatozoides patológicos, en una evaluación de al menos 100 células.

3.3.6 pH

El pH normal del semen de perro oscila entre 6,3 a 7 y depende de la cantidad de líquido prostático recolectado; una disminución en el valor del pH podría indicar una eyaculación incompleta o inflamación de testículos y epidídimo. El cambio en el pH afecta la motilidad y viabilidad espermática. Se piensa que la naturaleza alcalina del fluido prostático incrementa la motilidad espermática y ayuda a neutralizar el ambiente ácido de la vagina durante su introducción (Stornelli *et al.*, 2001).



3.3.7 Concentración:

La concentración generalmente se determina utilizando una cámara de conteo (Rijsselaere *et al.*, 2005), a más de este método se emplea un hemocitómetro o por espectrofotometría. Una concentración normal para el semen de perro está entre 200 y 1200 millones de espermatozoides por mililitro, con un número total de espermatozoides por eyaculado entre 400 y 2000 millones.

3.3.8 Integridad y funcionalidad de membrana:

La integridad de la membrana plasmática es esencial para la capacidad de fertilización del espermatozoide, la integridad de la membrana de los espermatozoides de perro es rutinariamente evaluado por medio de (Rijsselaere *et al.*, 2005), colorantes vitales como la eosina/azul de anilina, azul de tripano, eosina/negrosina, permiten diferenciar espermatozoides vivos de muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. Las células cuya membrana plasmática es funcional, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. En contraste una membrana alterada permite el paso del colorante y la célula se observa teñida.

Otro método de evaluación es el test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling Test, HOST) que somete a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula con el objetivo de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Restrepo *et al.*, 2009). Se consideraron espermatozoides con membrana funcional los que reaccionaron al medio hipoosmótico con dilatación de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de esta, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (Sánchez y



Zamora, 2016). Para la realización de esta prueba se puede emplear una solución hiposmótica (150 mOsm / l), constituida por 7,35 g de citrato de sodio más 13,51 g de fructosa disuelta en 1000 ml de agua destilada (Silva *et al.*, 2006).

3.4 CENTRIFUGACIÓN CONVENCIONAL

La 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, la centrifugación es un proceso que puede causar daños estructurales en el acrosoma y en la membrana plasmática del espermatozoide, lo que puede llegar a producir una considerable reducción del movimiento espermático (Rijsselaere *et al.*, 2002). Consecuentemente, la centrifugación podría influir en la capacidad fecundante de los espermatozoides ya que cierto número de espermatozoides móviles pueden ser eliminados con el sobrenadante (Morell *et al.*, 2010), y la centrifugación obtiene un pellet de la muestra original que contiene espermatozoides muertos, moribundos y anormales, así como espermatozoides viables (Morrell y Rodríguez, 2011).

3.5 CENTRIFUGACIÓN COLOIDAL

Antes de que los espermatozoides puedan fertilizar un ovocito, deben someterse a una serie de cambios en la membrana, conocidos como capacitación, seguidos de la reacción del acrosoma justo antes de unirse al ovocito. El momento de estos eventos es crucial porque los espermatozoides no sobreviven mucho después de sufrir la reacción de acrosoma. Por lo tanto, la provisión de una mezcla de espermatozoides de diferentes edades en el eyaculado es asegurar que habrá una progresión de espermatozoides capaz de fertilizar en los oviductos durante un período de tiempo en condiciones fisiológicas. Sin embargo, si la muestra de



esperma se almacena antes de ser inseminada en una hembra, la presencia de residuos puede afectar adversamente al espermatozoide viable, por lo tanto la centrifugación coloidal es una técnica para separar diferentes tipos de células de suspensiones heterogéneas, los coloides se pueden usar para enriquecer la población de espermatozoides que son viables y funcionales; estos son los espermatozoides que se necesitan para la fertilización en la reproducción asistida (Morrell y Rodríguez, 2016). La centrifugación a través de capas de coloide se ha utilizado satisfactoriamente para separar espermatozoides móviles, de cromatina intacta y morfológicamente normales (Dorado *et al.*, 2011b), además se dice que separa el esperma normal de los linfocitos, las células epiteliales, el esperma anormal o inmaduro, los desechos celulares, las bacterias y el plasma seminal (Maxwell *et al.*, 2007).

Si las suspensiones celulares se centrifugan a través de coloides de diferentes densidades, las células se mueven a un punto que coincide con su propia densidad: el punto isopícnico. El grado de separación que se puede lograr depende de cuántas capas de coloide de diferentes densidades se usan y las diferencias en las densidades de las distintas células que se van a separar. Cuando se usan coloides para separar las muestras de esperma, es habitual elegir un coloide que sea menos denso que los espermatozoides maduros, de modo que los espermatozoides se acumulen en el fondo del tubo de la centrífuga para facilitar la recuperación (Morrell y Rodríguez, 2016).

Recientemente, un nuevo método que utiliza centrifugación de una sola capa (SLC) se ha desarrollado en la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas a través de un coloide de sílice recubierto con silano específico de la especie, en este sentido, la técnica de centrifugación, ha sido diseñada para seleccionar espermatozoides viables, morfológicamente intactos y purificarlos para el tratamiento (Urbano *et al.*, 2013), con la capacidad de seleccionar



espermatozoides que se aproximan a la de la centrifugación con gradiente de densidad convencional, las formulaciones coloides utilizadas para las SLC son específicas de la especie, generalmente se usa una sílice recubierta con glicidoxipropil-trimetoxisilano en una solución salina tamponada para especie específica (Chatdarong *et al.*, 2010). Dentro de una centrifugación con gradiente de densidad convencional los coloides utilizados típicamente son de sílice recubiertos, Percoll (sílice recubierta con polivinilpirroli), preparada en una solución salina tamponada. Cuando se usa Percoll, se usan soluciones salinas tamponadas para diluir el coloide para lograr la densidad deseada. Las diluciones se deben preparar justo antes de usar, ya que no son estables. Por el contrario, sílice recubierta con silano, es estable en solución y se puede compensar bien con un uso avanzado. Los coloides de sílice recubiertos con silano están disponibles como formulaciones listas para usar específicamente para la selección de espermatozoides. La composición de la sal, el pH, la osmolaridad y la densidad de la formulación coloidal afectan el resultado de la centrifugación en términos de número de espermatozoides en el sedimento y su calidad (Morrell y Rodríguez, 2016).

3.6 PROCESO DE CRIOCONSERACIÓN:

La crioconservación de espermatozoides es una parte integral de los programas de concepción (Dorado *et al.*, 2011a), siendo de suma importancia considerar que este proceso reduce la fertilidad del semen congelado y descongelado al conducir a varias modificaciones estructurales y funcionales de los espermatozoides (Sue *et al.*, 2010) por factores como: la exposición a bajas temperaturas con la formación de cristales intracelulares de hielo, la generación de daños espermáticos por choque térmico y la exposición a soluciones con algún grado de toxicidad, a más de estos factores descritos, uno de los principales problemas cuando usamos esperma de perro congelado es su longevidad limitada, por ende una nueva



generación de protocolos de criopreservación basados en el aumento de las velocidades de congelación y el uso de nuevas sustancias diluyentes y crioprotectoras, están permitiendo la optimización en la criopreservación de semen de perro. (Rota *et al.*, 2006),

Para el desarrollo de nuevos protocolos de crioconservación se considera que este proceso disminuye la capacidad fertilizante de los espermatozoides pudiendo deberse a una mayor peroxidación de los lípidos de la membrana de las células espermáticas, que está determinada en gran parte por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el semen. Las ROS, definidas como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, causan infertilidad por dos mecanismos principales, primero, las ROS dañan la membrana del espermatozoide, lo que a su vez reduce la motilidad y la capacidad del espermatozoide para fusionarse con el ovocito, en segundo lugar, las ROS dañan directamente el ADN del espermatozoide, comprometiendo la contribución genómica paterna al embrión (Sue *et al.*, 2010). La membrana de un espermatozoide contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), lo que los hace altamente susceptibles a la peroxidación lipídica (LPO) en presencia de ROS, lo que daña la función de los espermatozoides. (Strzezek *et al.*, 2012). En las técnicas contemporáneas para semen de perro, la criopreservación del plasma seminal se elimina por centrifugación, la principal desventaja de este método es la eliminación de antioxidantes naturales del plasma seminal que, en las células de espermatozoide, son parte de múltiples mecanismos de protección diseñados para proteger a los espermatozoides contra la lesión oxidativa, además como un medio de protección contra los efectos citotóxicos de las ROS generadas internamente, los espermatozoides de perros contienen enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo, el



escaso volumen citoplásmico en la parte media de la célula espermática limita su capacidad antioxidante (Strzezek *et al.*, 2012).

Los protocolos utilizados en la criopreservación del semen de perro son generalmente adaptaciones de los protocolos de crioconservación del semen bovino (Futino *et al.*, 2010).

3.7 FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Para obtener una criopreservación satisfactoria, garantizando la conservación de la integridad estructural y fisiológica de los espermatozoides al descongelado y una mayor sobrevivencia de los mismos en el tracto genital femenino, se deben considerar una serie de factores, relacionados con la utilización de procedimientos apropiados de dilución, congelación y descongelación (Savignone *et al.*, 2007).

En primera instancia la membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito, la integridad del plasmalema no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y, por lo tanto, para la fertilidad del macho (Sánchez *et al.*, 2002); por ende; las modificaciones térmicas que se producen durante los procesos de congelación y descongelación provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los espermatozoides, los cambios más evidentes son la pérdida de la motilidad espermática y la pérdida de la integridad acrosómica, cambios que reducen la longevidad espermática (Savignone *et al.*, 2007). Otros factores que modifican la integridad de las membranas de los



espermatozoides son los relacionados con las características físicoquímicas de los diluyentes utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en la célula (Sánchez *et al.*, 2002).

Entre los factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, se encuentran los cambios de volumen, asociados a cambios en la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular, el estrés térmico, relacionado con los cambios de temperatura (shock de frío), los efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el medio extra e intracelular.

3.7.1 Estrés térmico: Shock de frío

Es bien conocido del daño producido sobre los espermatozoides por las bajas temperaturas a las que son sometidos en el proceso de crio conservación, las alteraciones físicas y químicas que se producen en la membrana celular del espermatozoide debidas a las modificaciones térmicas (Stornelli *et al.*, 2008) durante el enfriamiento rápido del semen entre 30° C y 0° C induce un estrés letal en algunas células, proporcional a la tasa de enfriamiento, por lo que este proceso debe ser realizado cuidadosamente. Un lento enfriamiento también induce estrés sobre la membrana del espermatozoide, relacionado con un cambio de fase lipídica y alteración del estado funcional de la membrana. El shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana, el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación (Savignone *et al.*, 2007).

Varias tasas de enfriamiento y descongelación han sido ensayadas en la crioconservación seminal sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar (Medina *et al.*, 2007),



incluso Savignone *et al.*, (2007), mencionan que el estrés de membrana puede continuar por debajo de 0° C sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo, es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5° C y 15° C.

La susceptibilidad de los espermatozoides a las bajas temperaturas también se ve afectada por las limitantes en cuanto a la disponibilidad de los diluyentes más apropiados para cada caso (Aké *et al.*, 2012) y la falta de obtención de una curva estándar también se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como el diluyente, el crioprotector usado y el tamaño del sistema de empaque; así como también de la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos (Medina *et al.*, 2007).

El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación y descongelación, la composición lipídica del medio donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento se relaciona con la prevención de los mecanismos de injuria celular, debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto protector contra el shock de frío, actuando sobre la superficie celular estabilizándola (Savignone *et al.*, 2007).

3.7.2 Formación de hielo en el medio extra e intra celular

El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura se cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de



descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevida, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo, la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, lo cual es letal para la célula (Savignone *et al.*, 2007).

3.7.3 Crioprotectores y estrés celular

Debido a que en el proceso de la crioconservación hay un gran número de factores que pueden afectar la capacidad fertilizante del semen de perro; en dicho proceso, las células están expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores que evitan la formación de hielo intracelular y el daño en la membrana celular, (Restrepo *et al.*, 2009), ya que los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (Savignone *et al.*, 2007).

3.7.4 Diluyentes utilizados para la criopreservación de semen

Ha sido ampliamente demostrado que la composición de los diluyentes utilizados en los procesos de conservación de semen de perro puede afectar el tiempo de almacenamiento y la calidad de los espermatozoides (Flores *et al.*, 2010).



Un diluyente que permita obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación, y que consiga altas tasas de fertilidad in vivo precisa contener azúcares como fuente de energía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH, antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación, en la última década los diluyentes más usados son los que contienen TRIS base, con el agregado de distintas sustancias como por ejemplo crioprotectores (glicerol, propanodiol, etilenglicol, dimetil formamida), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), azúcares no permeables que crean un medio hipertónico (lactosa, sacarosa, trealosa, rafinosa), o azúcares energéticos permeables, capaces de atravesar la membrana plasmática (fructosa, glucosa) (Savignone *et al.*, 2007).

3.7.5 Crio protectores

La adición de crioprotectores al semen mejora la supervivencia celular tras el proceso de congelación, los crioprotectores se dividen en dos grupos: los primeros son agentes crioprotectores intracelulares como el glicerol y dimetilsulfóxido, los segundas son las extracelulares tales como proteínas y azúcares (Gharajelar *et al.*, 2016).

3.7.5.1 Azúcares

Se sugiere que los azúcares, además de servir como fuente de energía para la célula espermática, permiten el mantenimiento de la presión osmótica y cumplen una acción crioprotectora. En base a esto, es de esperar que la inclusión de azúcares en los dilutores



podría servir para la preservación de la motilidad espermática y el mantenimiento de la viabilidad e integridad del acrosoma y de la membrana espermática (Flores *et al.*, 2010).

Los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación, esto permite la protección de los espermatozoides al aumentar la viscosidad de los fluidos intra y extracelulares, por lo tanto, evita la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos, que pueden producir mini alteraciones en la permeabilidad de la membrana. La trealosa es un disacárido de la glucosa que preserva las células del daño durante la crioconservación (Caturla *et al.*, 2018), su acción crio protectora está relacionada con la interacción específica en los fosfolípidos de membrana durante la desecación, congelación y puede ser capaz de prevenir la fusión entre las bicapas durante la congelación, sin embargo, la adición de trealosa a un diluyente TRIS base ejerce un efecto negativo sobre la motilidad, pero se observaba cierta acción protectora sobre la integridad acrosómica (Savignone *et al.*, 2007).

3.7.5.2 Glicerol

Las sustancias permeables (glicerol, propilenglicol, etilenglicol) tienen como función la remoción de gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo y previniendo de esta manera la ruptura celular (Savignone *et al.*, 2007).

El glicerol es un agente crio protector penetrante utilizado universalmente para congelar esperma (Silva *et al.*, 2012), para la esperma canina, el glicerol se ha utilizado con éxito para preservar la fertilidad después de la congelación y la descongelación durante varios años (Farstad, 2009). Dentro del protocolo a base de glicerol; en perros existe una gran diversidad



con respecto a la concentración de glicerol empleado, diferentes extendedores y diferentes métodos. Todas estas variaciones en los protocolos usados dan como resultado un amplio rango de velocidades de motilidad post descongelación para el semen de perro congelado (Futino *et al.*, 2010).

Sin embargo, el glicerol puede inducir cambios en la estructura de relleno lipídico de la membrana espermática, alterando así la estabilidad del espermatozoide y la permeabilidad al agua; estos cambios pueden reducir la longevidad de los espermatozoides y acelerar la capacitación (Lopes *et al.*, 2009), a más de esto el glicerol provoca estrés osmótico, ya que tiene una menor velocidad de difusión a través de la membrana, respecto a otros crioprotectores (Restrepo *et al.*, 2009).

El etilenglicol es un crioprotector a base de alcohol que mejora la preservación del acrosoma y la membrana plasmática de los espermatozoides (Silva *et al.*, 2012). Sin embargo, si lo comparamos con el glicerol, el etilenglicol a altas dosis posee mayores efectos tóxicos sobre la célula espermática. La toxicidad de estos compuestos puede ser considerada como uno de los factores responsables de los fracasos ocurridos en ciertas ocasiones con el uso de esta biotecnología.

3.7.5.3 Proteína

Observando las dificultades que presenta la aplicación de glicerol en la criopreservación de semen se introdujo la yema de huevo, la cual se considera un excelente crioprotector, y se ha usado durante mucho tiempo para la crioconservación de espermatozoides caninos a una concentración del 20% (Bencharif *et al.*, 2008), recientes estudios que investigan diferentes especies animales, incluyendo perros, han demostrado que la proteína de baja densidad (LDL) extraída



de la yema de huevo puede ser responsable de la protección contra el choque frío, mejora de la motilidad espermática, integridad de acrosoma, membrana plasmática y protección más efectiva contra el ADN espermático. (Strzezek *et al.*, 2012).

Por lo antes expuesto, dentro de las alteraciones encontradas en el estudio ultramicroscópico del semen descongelado tenemos hinchazón y formación de pliegues en la membrana plasmática, hinchazón de la membrana acrosomal, contenido acrosomal distribuido en forma no uniforme, formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y plasmática (Savignone *et al.*, 2007), que en consecuencia, disminuye la vida seminal provocando que el momento de inseminación sea muy crítico e impida alcanzar una mayor fertilidad cuando se deposita el semen dentro del útero de la perra, donde se supone que tiene las mejores posibilidades de alcanzar los oviductos y fertilizar los ovocitos (Rota *et al.*, 2006).

3.8 CONGELACIÓN DE SEMEN

En perros, la congelación y conservación de espermatozoides por periodos prolongados de tiempo se realiza en nitrógeno líquido (N₂L). Además, han sido utilizadas técnicas alternativas para el procedimiento de congelación como el hielo seco y ultra congeladores programables para conservar muestras de semen, sin embargo, el almacenamiento es en N₂L (Salinas *et al.*, 2013).

CAPÍTULO IV:

Materiales y métodos

4.1 Lugar de estudio

La presente investigación se efectuó en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, dentro de la Granja de Irquis, coordenadas $4'48.34''S$ y $79^{\circ} 4'30.12''O$, altitud de 2671 m.s.n.m., pluviosidad anual es de 800 mm y 2000 mm, humedad relativa del 80% y sus temperaturas oscilan entre 7 y $12^{\circ} C$.

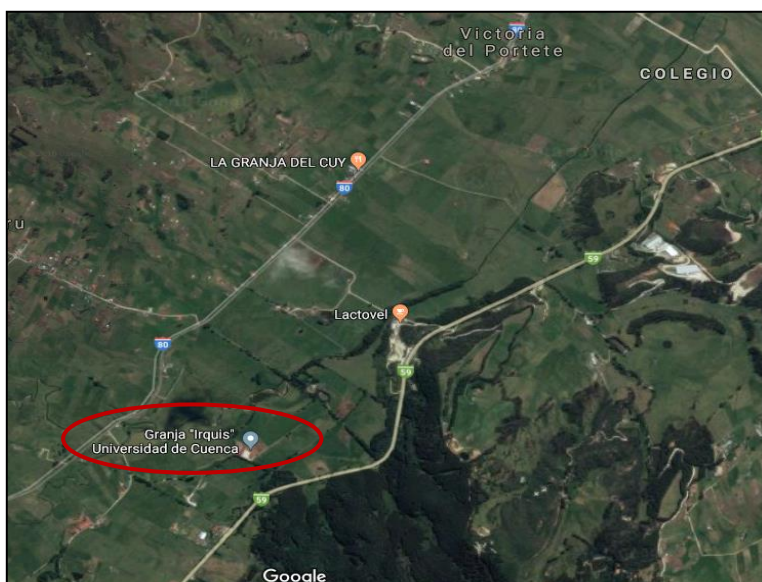


Figura 1. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2018.



4.2 Unidades experimentales:

Para el presente estudio se empleó 6 perros, mestizos, de diferente talla, clínicamente sanos, con CC de 5 escala 1-9 (Baldwin *et al*, 2010), con edades comprendida entre 3 a 5 años, cuyos eyaculados cumplieron con los parámetros mínimos determinados para que la muestra fuese crioconservadas (Restrepo *et al.*,2009), es decir, mínimo 1ml de eyaculado, motilidad masal (MM) de 3 (escala 1 a 5), 60% de motilidad individual progresiva (MIP), menos del 30% de anormalidades y ph de 6,3 a 7.

A cada perro se le realizó dos extracciones lo que nos permitió tener 12 muestras finales (unidades experimentales), por cada subtratamiento.

4.3 Variables:

Independientes:

- Tipo de centrifugación utilizada para seleccionar espermatozoides pre congelación (normal y en columna de Percoll)
- Concentración de glicerol (4; 6 y 8%) como crio conservante.

Dependientes:

- Motilidad masal MM (pre congelación)
- Concentración (pre y post congelación)
- Motilidad individual progresiva MIP (pre y post congelación)
- Vitalidad espermática (pre y post congelación)
- Morfología (pre y post congelación)
- Prueba de Host Test (post congelación)



4.4 Materiales:

Para la presente investigación se utilizó como material biológico, el semen de 6 perros. En materiales físicos se empleó guantes de examinación, tubos Falcon graduados, baño maría, placas portaobjetos, microscopio, cámaras de Neubauer, pipetas, centrifugadora, refrigeradora, tubos de vidrio, gradillas, vaso de precipitación, bandeja de congelación, tanque de conservación de pajuelas. En materiales químicos se utilizará diluyente tris, huevos, nitrógeno líquido y Percoll al 60%.

4.5 Método:

Es una investigación experimental de 2x6 completamente al azar (DCA), en donde la unidad experimental fue el eyaculado (muestras seminales). El experimento se basó en dos tratamientos (G1; G2) y en cada uno de ellos se contempló tres sub-tratamientos: G1 (G1a; G1b; G1c) y G2 (G2a; G2b; G2c).

4.6 Tratamientos:

Grupo 1: Utilizó centrifugación convencional a 700 rpm/10min., en forma mecánica de la alícuota de la muestra seminal.

Grupo 2: La alícuota de la muestra seminal del grupo 2 se colocó en una columna de Percoll (60%) y se procedió a centrifugar en un primer momento a 700 rpm/10 min., y luego se re suspendió en medio FIV y fue centrifugado a 350 rpm/10 min.

Detalle de los sub tratamientos: cada grupo experimental G1 y G2 tenían los siguientes subgrupos experimentales en los cuales se probaron tres dosis diferentes de glicerol (4; 6 y 8%). Cada sub grupo mantuvo un total de 12 pajuelas.

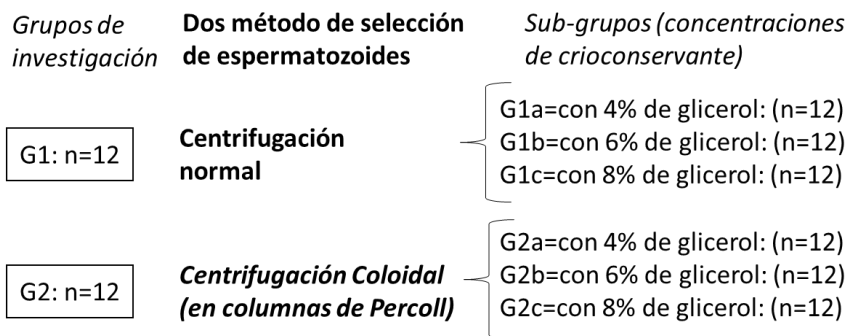


Figura 2. Detalle de los tratamientos y sub-tratamientos del experimento (G1=grupo 1; G2=grupo 2)

4.7 Metodología:

4.7.1 Colección seminal:

La extracción de semen se realizó mediante compresión mecánica (masturbación). A cada animal se estimuló manualmente sobre el bulbo del pene, logrando exteriorizar el cuerpo y bulbo cavernoso, de esta manera se inició la eyaculación; se colectó al mismo tiempo las dos primeras fracciones; con el objetivo de obtener la segunda fracción rica en espermatozoides. La muestra colectada fue colocada en tubos de atemperados a 37° C, al finalizar la extracción se verificó la detumescencia del pene y su correcto envainado.

4.7.2 Valoración de las muestras seminal inicial

La muestra una vez en el laboratorio fue valorada en los siguientes aspectos:

4.7.2.1 Volumen de eyaculado: Total de volumen obtenido, expresado en milímetros.

4.7.2.2 Motilidad masal: 10 ul de muestra seminal se colocó en un portaobjetos atemperado y se observó al microscopio a 40x. La valoración se realizó utilizando la escala de 1-5, donde 1 era una muestra seminal que no formaba remolinos y 5 semen con gran formación de remolinos.



4.7.3 División de alícuotas:

Al volumen total del eyaculado se le adicionó diluyente A en relación 1:1. De esta dilución se tomó 100ul para la valoración microscópica. El volumen restante fue dividido en 2 alícuotas similares, la primera para el grupo 1 (centrifugación tradicional) y la segunda para el grupo 2 (centrifugación coloidal).

4.7.4 Preparación de la columna de Percoll (60%):

Se tomó 900ul de Percoll puro atemperado y se colocó en un tubo eppendorf, luego se añadió 100ul de medio TALF 10x. De la mezcla anterior se aspiró 335ul y se depositó en un tubo eppendorf al cual se incorporó 165ul de medio FIV-SOF, esto permitió tener Percoll al 60%.

4.7.5 Preparación del diluyente A y B:

Tabla 1. Fórmula diluyente A (base)

Para 10 ml	
Ácido cítrico	0.13g
Tris	0.24g
Fructosa	0.1g
Yema de huevo	2ml
Agua	8ml

Fuente: Autora

- Para preparar la yema se usó huevos frescos, estos se limpiaron con alcohol al 70%



para eliminar restos de materiales orgánicos y se procedió a secarlos perfectamente con papel absorbente.

- Se partieron los huevos y se retiró con cuidado la mayor cantidad de clara, evitando que en los contornos del cascarón existan puntas o aristas que lastimen la yema al momento de sacarla.
- Con una jeringa graduada estéril (sin aguja), se punciona la yema con cuidado, se toma la cantidad deseada procurando no incluir la membrana vitelina.
- Se procedió a centrifugar en dos tiempos: primero a 100rpm durante 20 minutos, se extrajo el sobrenadante y se repite el procedimiento.
- Otro equipo pesó uno a uno los ingredientes por separado
- La yema de huevo se adicionó lentamente al medio con los demás ingredientes
- Al final se completó 8ml de agua bidestilada.
- Se procedió a medir el pH (7-7,3) y la osmolaridad (275-300, óptimo 285).

4.7.5.2 Fórmula del diluyente B:

Al diluyente A (base) se le agregó las siguientes cantidades de glicerol, con lo cual se obtuvo el diluyente B (1000ul):

Tabla 2. Diluyente B con Glicerol 4%

Diluyente base	920 ul
Glicerol 4%	80 l

Fuente: Autora

**Tabla 3.** Diluyente B con Glicerol 6%

Diluyente base	880 ul
Glicerol 6%	120

Fuente: Autora

Tabla 4. Diluyente B con Glicerol 8%

Diluyente base	840 ul
Glicerol 8%	160 ul

Fuente: Autora

4.7.6 Centrifugación coloidal:

La alícuota del grupo 1 sirvió de testigo (G1), fue centrifugada a 700 rpm/10min, luego se tomó el pellet (250ul) y se adicionó diluyente A en relación 1:1.

La alícuota del grupo 2 (G2), fue sometió a un proceso de selección espermática mediante centrifugación en una columna de Percoll (60%) preparada con anterioridad, esta centrifugación fue realizada a 700rpm/10min. Se tomó el pellet (250ul) y se colocó en 500ul de medio de fertilización (FIV), se procedió a centrifugar a 350rpm/10min., esta permitió retirar los residuos del Percoll. Finalmente, se tomó 250ul de pellet y se le adicionó diluyente A en relación 1:1.

4.7.7 Evaluación seminal pre-congelación

Una vez diluida la muestra inicial en relación 1:1 se tomó 100ul y se realizó la valoración de



la calidad espermática pre-congelación de acuerdo a lo descrito por Restrepo et al., (2009), los parámetros a evaluar son los siguientes:

4.7.7.1 Movilidad individual progresiva (MIP):

La evaluación se realiza en una muestra diluida 1:1 vista al microscopio con aumento 40x, se observa el movimiento progresivo que le permite al espermatozoide avanzar con cierta rapidez, normalmente se desplaza gracias a movimientos de la cola al mismo tiempo que experimenta una rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que la progresión final resulta rectilínea, se utilizó un valor porcentual para expresar los resultados.

4.7.7.2 Vitalidad:

Se valoró mediante la tinción de eosina nigrosina, colocando 5ul de muestra seminal y 5 ul de eosina-nigrosina, se mezcló y se procedió a realizar un frotis, luego se observó en microscopio 40x el número de vivos y muertos.

4.7.7.3 Morfología:

La evaluación de la morfología consistió en la coloración con eosina nigrosina, y se calculó el porcentaje de las células normales dentro de la muestra, la misma que fue evaluada en microscopio con aceite de inmersión (100x). Se examinan 100 espermatozoides y se clasifican en normales y anormales. Según Sorribas, (2000), las anomalías radican en la cabeza (acrosomas desprendidos, protuberantes, defecto del cráter (defecto de la vacuola), cuello torcido o roto), pieza media (gota citoplasmática proximal, unión al cuello, mitocondrias alteradas), cola (gota citoplasmática distal, pero suele ser aceptado como normal, cola torcida, cola enrollada).



4.7.7.4 Concentración:

Se extrajo 5µl de la muestra seminal y se colocó en un tubo eppendorf, se añadió 95ul de agua y se mezcló. Luego se tomó 10ul de la mezcla y se colocó en la cámara de Neubauer, se dejó reposar un minuto y se procedió a contar 5 cuadrantes. El número de espermatozoides contados en el cuadrado central grande equivale al número en millones de estos por ml; Este valor es multiplicado por el volumen total del eyaculado para calcular el número total de células.

4.7.7.5 Integridad y funcionalidad de membrana:

Para la evaluación de este parámetro se aplicó el test de Host; que consiste en tomar 20 µl de semen diluido y 100 µl de solución de Host (constituida por 7,35 g de citrato de sodio más 13,51 g de fructosa disuelta en 1000 ml de agua destilada a 150 mOsm/l) en tubos eppendorf, se homogeniza la mezcla y se mantiene en baño María por 30 min, finalmente se colocó una gota de la preparación en un portaobjetos y se observa al microscopio cuantos espermatozoides tienen colas dobladas o enrolladas.

4.7.8 Determinación de las dosis seminales:

Una vez terminado el proceso de centrifugación en los grupos 1 y 2, se tomó 250ul de pellet y se añadió diluyente A en proporción 1:1. Luego se realizó la determinación de la concentración espermática en la cámara de Neubauer (explicado en valoración de la concentración), con el dato obtenido se aplicó la siguiente fórmula para determinar el número de pajillas.

1. Volumen*concentración. Ejemplo: $1,5\text{ml} * 500 \times 10^6 / \text{ml} = 750 \times 10^6$
2. Concentración por pajueta = 30×10^6
3. Cantidad de pajuelas = $750 / 30 = 25$ pajuelas



Luego se procedió a determinar la cantidad de diluyente que se debía incorporar, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

1. Número de pajuelas*Volumen de pajuelas

- $25 * 0,25 = 6,25$ cc
- $Volumen\ total - Volumen\ de\ semen = Volumen\ de\ diluyente$
 - $1,5 - 6,5 = 5$ cc de diluyente

4.7.9 Fase de equilibrio:

Se prepararán tres alícuotas para el grupo 1 (centrifugación convencional), previamente diluidas (diluyente A), las cuales fueron colocados en tubos Eppendorf. Igual se procedió para el grupo 2. Estas tres alícuotas por tratamiento (6 en total), fueron colocados en un recipiente con agua a 15°C/30min., luego fueron colocados en la refrigeradora a 5°C/1hora. Con este procedimiento se logró bajar la temperatura a 5°C manteniendo las muestras seminales únicamente con el diluyente A.

4.7.10 Adición del crioprotector:

Se preparó previamente las tres alícuotas (glicerol 4%: 6% y 8%) correspondientes del diluyente B para los grupos 1 y 2, estas fueron colocadas 1 hora en el refrigerador a 5°C para que bajen su temperatura.

Luego del tiempo de equilibrio de las alícuotas de los grupos 1 y 2 que contenían las muestras seminales, se les adicionó el diluyente B, para lo cual se fraccionó la cantidad total requerida en cuatro partes, cada una de ellas se adicionó con un lapso de 20min.



4.7.11 Empajuelamiento:

Se utilizaron pajillas de 0,25, las cuales fueron colocadas en la refrigeradora para que se encuentren a 5°C antes de empaquetar. Se cargó manualmente las pajuelas dentro del refrigerador para mantener la cadena de frío. El sellado se realizó con balines.

4.7.12 Congelación

Las pajuelas fueron colocadas en una rejilla a 5 cm de altura de nitrógeno líquido (N₂L) por 10 minutos. Luego las pajuelas fueron introducidas en un termo con N₂L a -196° C.

4.7.13 Valoración pos descongelación.

Para este proceso se tomó la pajuela del termo de crioconservación e inmediatamente fue colocada a baño maría (37°C), durante 30 segundos. Se procedió a secar y cortar la pajuela para colocar en un tubo Eppendorf atemperado.

Pos-descongelación se valoró: motilidad individual progresiva (MIP), Vitalidad, Anormalidades y la prueba de Host, usando las técnicas descritas anteriormente.

A continuación, se detalla en un esquema todo el proceso:

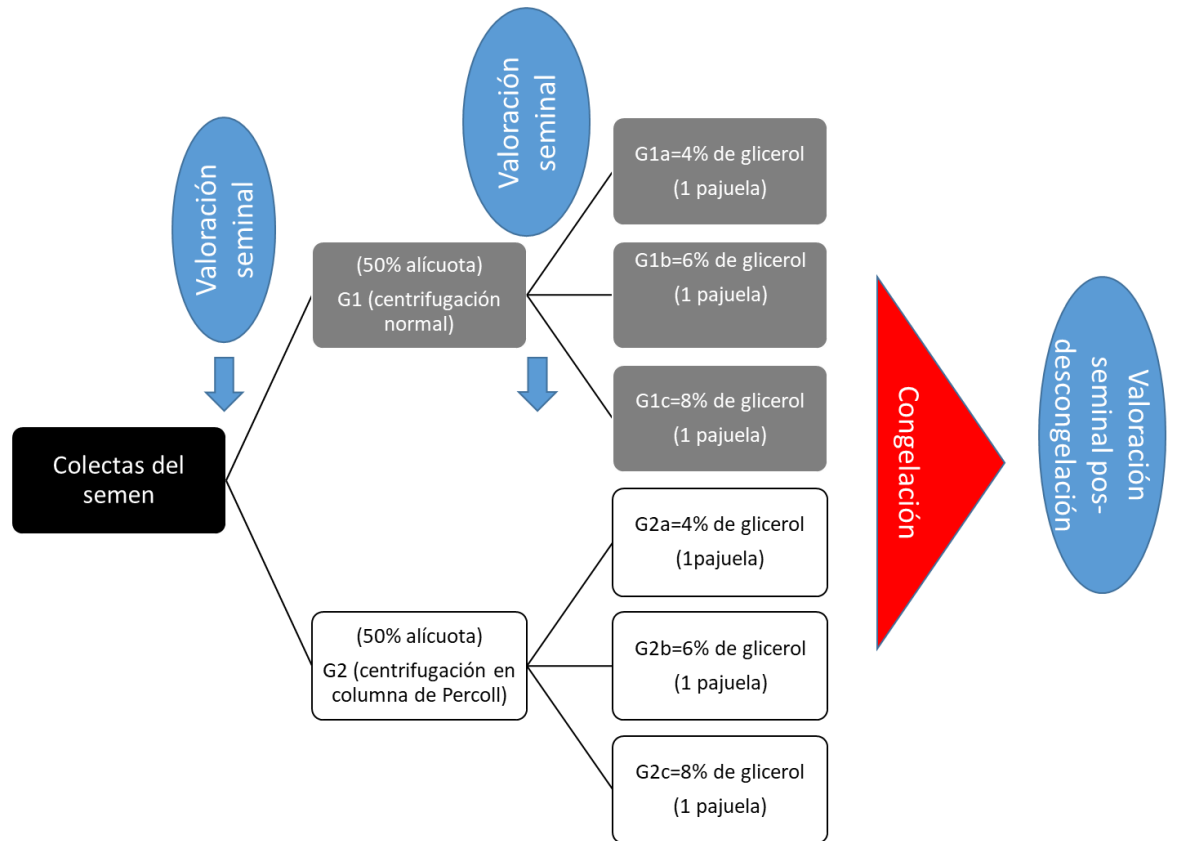


Figura 3. Protocolo utilizado para el procesamiento de cada una de las colectas.

CAPÍTULO IV:

Resultados y discusión

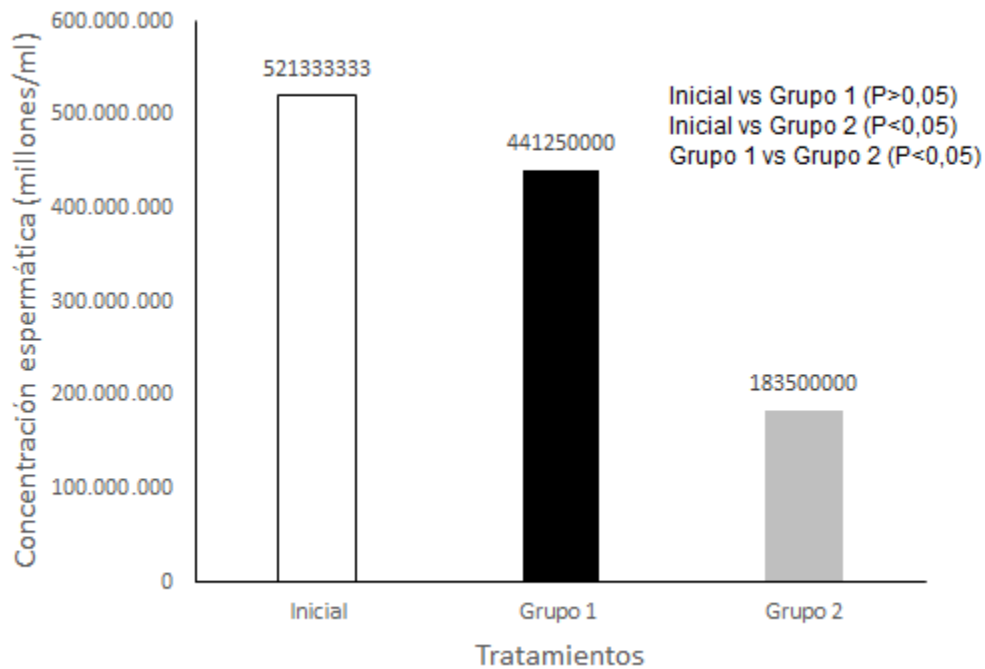


Figura 4. Concentración espermática promedio inicial vs la concentración del grupo 1 (Testigo) y grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática)

Al aplicar centrifugación convencional (Grupo 1) el número de espermatozoides obtenidos al finalizar la misma, no difiere estadísticamente de la muestra seminal inicial ($P > 0.05$). Sin embargo, al comparar con el Grupo 2 (centrifugación con Percoll), difieren estadísticamente ($P < 0.05$), igual comportamiento demuestran los grupos G1 y G2 entre sí ($P < 0.05$).

La reducción del número de espermatozoides al realizar centrifugación convencional se encuentra justificada por el enunciado de Gharajelar *et al.*, (2016) quienes afirman en su

estudio, que los espermatozoides fueron dañados por los golpes mecánicos en la centrifugación durante el procesamiento, por ende, cuando a esta centrifugación se le adiciona un medio coloidal “columna de Percoll 60%”, la presión de selección espermática es mayor y el número de espermatozoides recuperados del pellet se reducen aún más. Similares resultados obtuvieron García *et al.*, (2009), quienes aplicaron centrifugación coloidal post descongelación de pajuelas, donde observaron una reducción de concentración espermática inicial de 100×10^6 ml a 20×10^6 espermatozoides / ml.

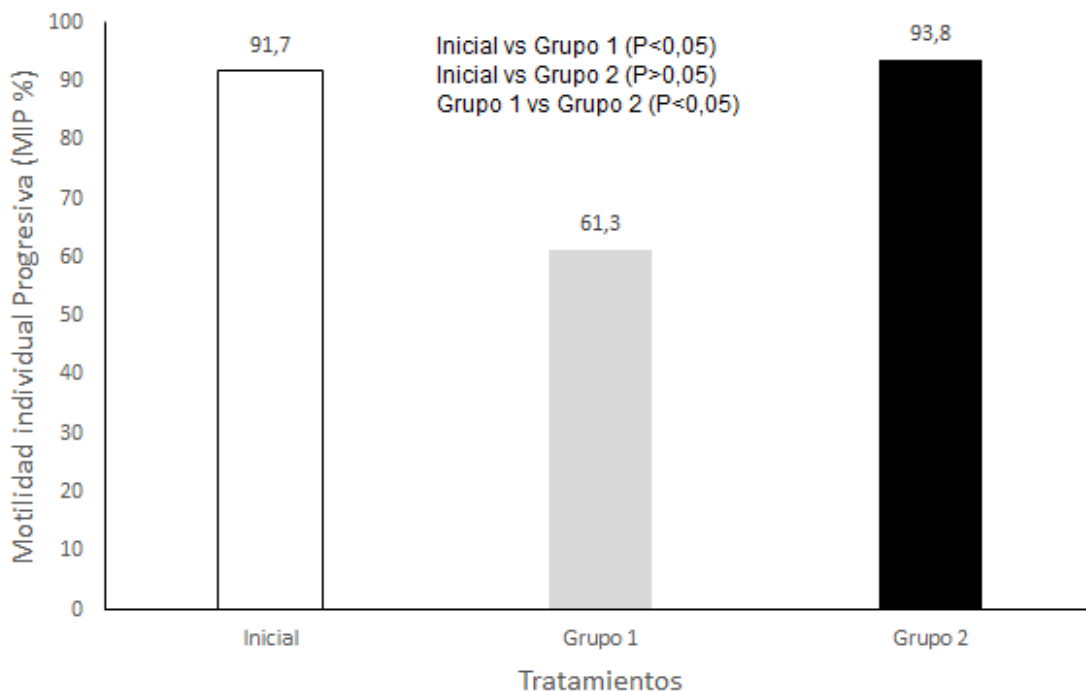


Figura 5. Motilidad individual progresiva (MIP) promedio inicial vs la MIP del Grupo 1 (Testigo) y Grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).

Los resultados obtenidos para la motilidad individual progresiva (MIP) inicial, son mayores y difieren estadísticamente ($P < 0,05$) con los del Grupo 1, no así, con los valores del Grupo



2 ($P > 0,05$). La reducción de la MIP luego del proceso de centrifugación como se pudo observar en el grupo 1 podría ser explicado por el concepto emitido por Restrepo *et al.*, (2016), quienes mencionan que incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación logran alterar la motilidad total y motilidad individual progresiva, reduciendo la actividad espermática.

El Movimiento individual progresivo observado en los Grupos 1 y 2, difieren estadísticamente ($P < 0,05$). EL Grupo 2 al cual se le realizó centrifugación coloidal permitió obtener mayor porcentaje de espermatozoides móviles (Fig. 5). Resultados que concuerdan con lo mencionado por Dorado *et al.*, (2013) quienes expresan que la centrifugación coloidal en semen de canino mejoró significativamente ($P < 0.001$) la MIP. El incremento de la motilidad podría ser atribuido al método empleado que, según Morell y Rodríguez, (2016), permite seleccionar una subpoblación de espermatozoides móviles con morfología normal, y membranas intactas. Sin embargo, existen otros autores que expresan que la centrifugación per se genera disminución en el movimiento espermático (Varela *et al.*, 2015).

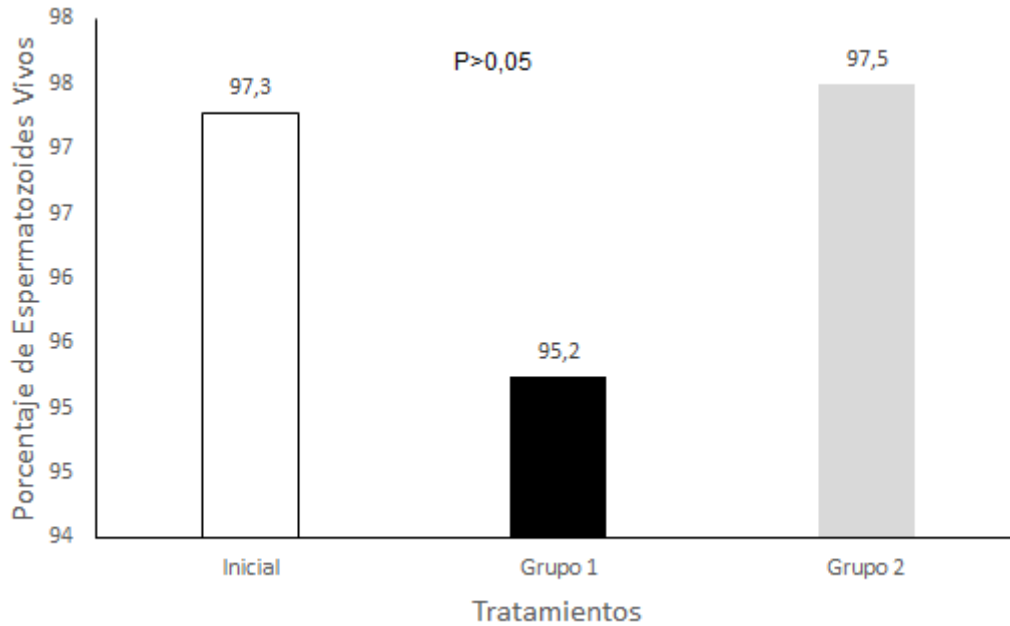


Figura 6. Vitalidad espermática promedio inicial vs la vitalidad del grupo 1 (Testigo) y grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).

El efecto de la centrifugación con o sin medio coloidal sobre el número de espermatozoides vivos obtenidos post centrifugación no presentó diferencia ($P > 0,05$) entre grupos, resultados similares de vitalidad espermática fueron reportados por Restrepo *et al.*, (2016) al valorar diferentes concentraciones de coloides utilizados durante la centrifugación. En contraposición existen trabajos que describen valores mayores de vitalidad espermática cuando se utiliza Percoll durante la centrifugación (Dorado *et al.*, 2013; Crespo *et al.*, 2015; Valera *et al.*, 2015 y Gálvez *et al.*, 2015).

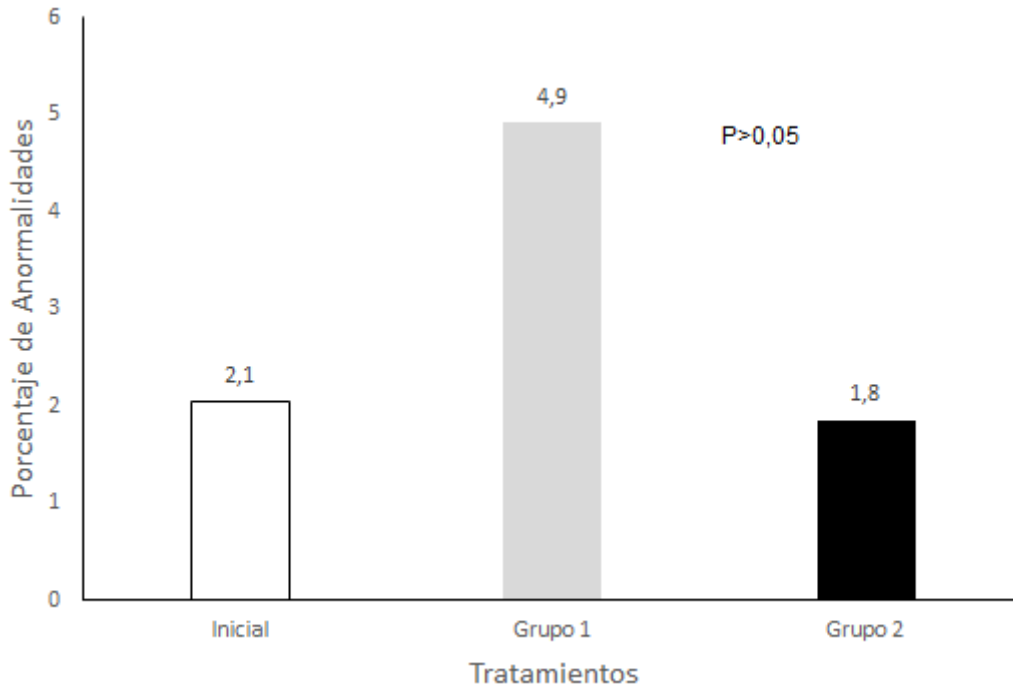


Figura 7. Promedio del porcentaje de anomalías inicial vs las anomalías del Grupo 1 (Testigo) y Grupo 2 (Percoll), luego del proceso de centrifugación (técnica de selección espermática).

El porcentaje medio de anomalías en las muestras iniciales comparado con los obtenidos en los Grupos 1 y 2 no muestran diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$), lo cual concuerda con lo expresado por Gálvez *et al.*, (2015), y mantiene similitud con los resultados del presente estudio, contrario a Dorado *et al.*, (2013) que en su estudio determinaron que el método convencional de centrifugación incrementa el número de anomalías espermáticas al comparar con una centrifugación coloidal ($P < 0,05$).

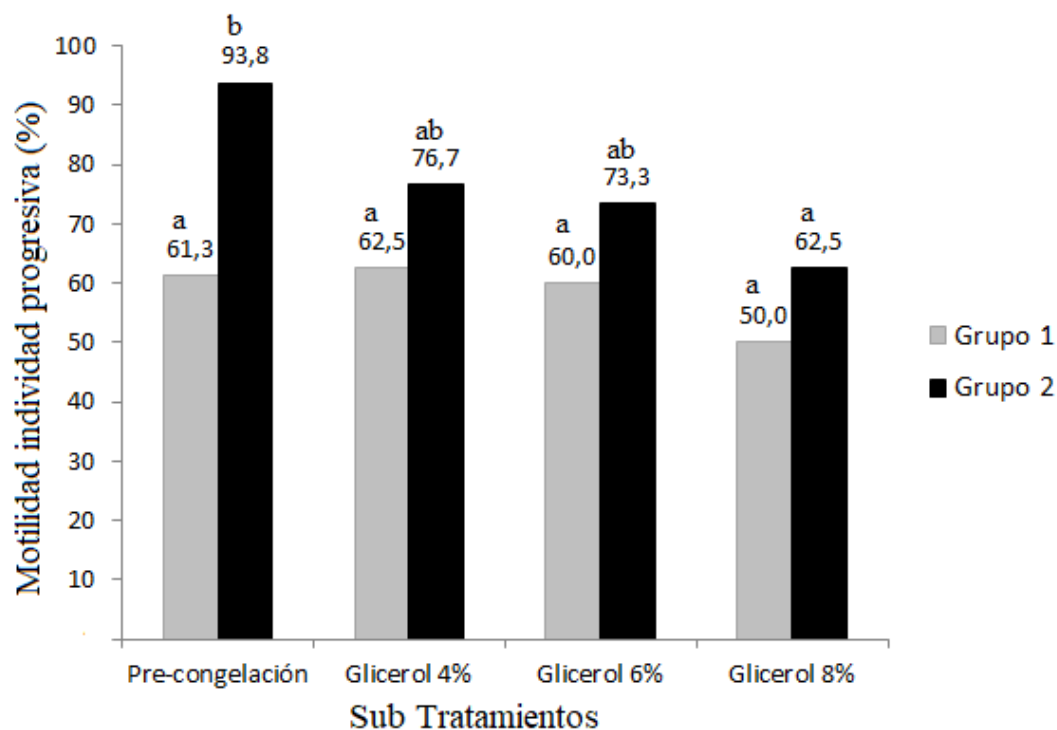


Figura 8. Promedio del porcentaje de motilidad individual progresiva (MIP) de los grupos 1; 2 (G1=testigo y G2=Percoll) y sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%). abc=letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.

La MIP (motilidad individual progresiva) post descongelación en el Grupo 1 (centrifugación convencional) no presenta diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre subgrupos, datos similares a Silva *et al.*, (2002); Herrera *et al.*, (2008); Carlotto *et al.*, (2011) y Uribe *et al.*, (2011) quienes obtuvieron resultados no significativos ($p > 0,05$) con respecto al porcentaje de motilidad individual progresiva post descongelación cuando se evaluó el uso de diferentes concentraciones de glicerol. En contra posición, en el Grupo 2 (centrifugación coloidal), los sub tratamientos sí presentaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$), esto concuerda con lo descrito por Restrepo *et al.*, (2011), quienes obtuvieron diferencias estadísticas al aplicar dos concentraciones distintas de glicerol.

Autores como Mota *et al.*, (2011) y Gharajelar *et al.*, (2016), afirman que la adición de glicerol al proceso de crioconservación, aumenta significativamente el porcentaje de motilidad pos descongelación, resultados contrarios a los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, en el presente trabajo las dosis altas de glicerol parecen generar toxicidad en los espermatozoides.

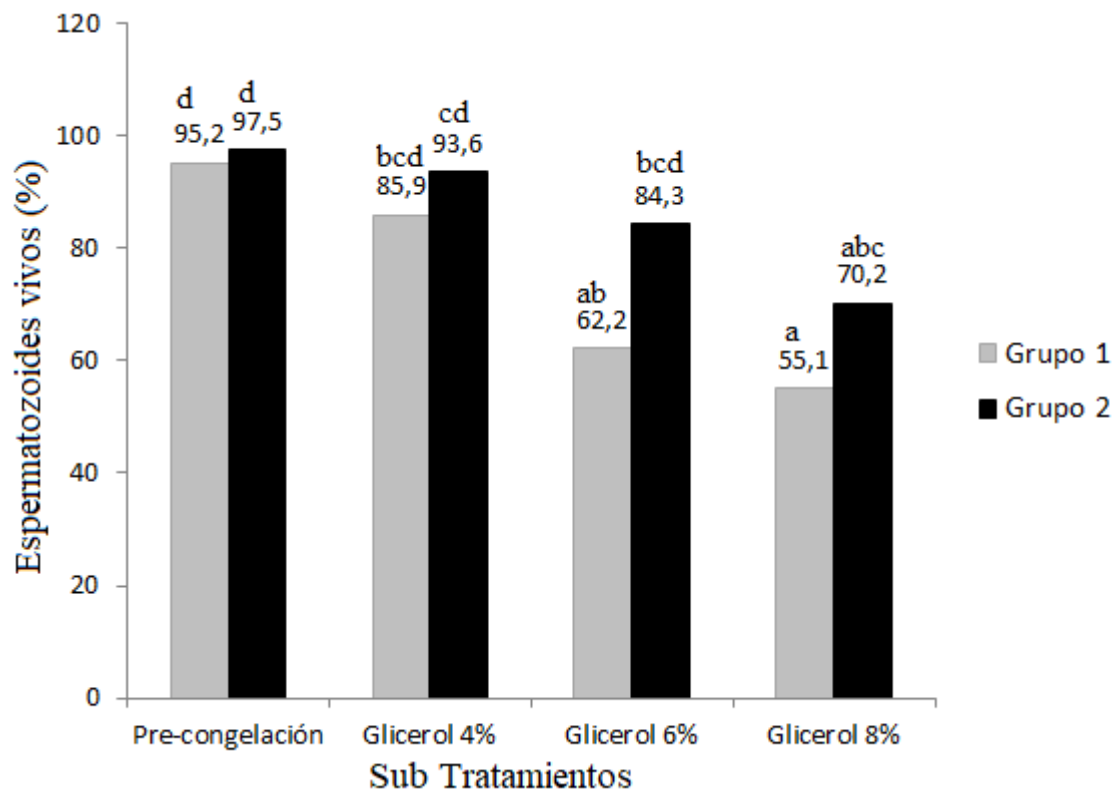


Figura 9. Promedio del porcentaje de vitalidad espermática de los grupos 1=testigo y G2=Percoll y sus sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%). ^{abc}=letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.



Posterior a la adición de glicerol al 4%, 6% y 8%, los porcentajes de espermatozoides vivos post descongelación difieren estadísticamente ($P < 0,05$) entre los sub tratamientos de los Grupos 1 y 2. Datos similares a los obtenidos por Uribe *et al.*, (2011) y Cheuquemán *et al.*, (2018) que consiguieron resultados estadísticamente significativos al aplicar tres concentraciones distintas de glicerol, afirmando que el proceso de crioconservación disminuye la vitalidad espermática post descongelación y resultados contrarios a Cardoso *et al.*, (2003) quienes al aplicar tres concentraciones (4%, 6% y 8%) de glicerol lograron porcentajes de vitalidad similares.

A pesar de que los grupos inician con porcentajes similares de vitalidad espermática pre congelación, los porcentajes del Grupo 1 post descongelación disminuyen drásticamente, a diferencia del Grupos 2 donde se mantienen con un buen porcentaje a excepción del subgrupo con 8% de glicerol.

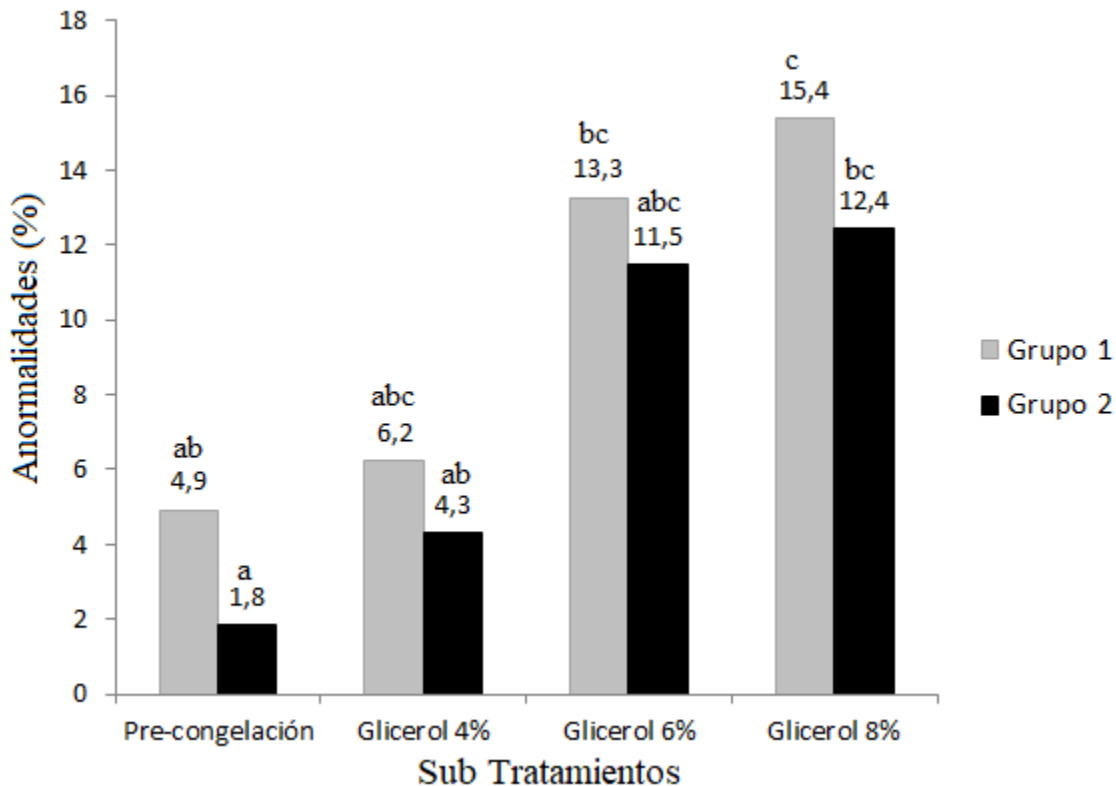


Figura 10. Promedio del porcentaje de anomalías espermáticas de los grupos 1=testigo y G2=Percoll y sus sub-tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%). ^{abc}=letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.

Los porcentajes de anomalías obtenidos en los Grupos 1 y 2 presentan diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre sí, valores análogos a los obtenidos por Silva *et al.*, 2002 y Cardoso *et al.*, 2003, donde la comparación entre concentraciones de glicerol al 4% 6% y 8% presentaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$), al igual que el estudio realizado por Restrepo *et al.*, (2010) quienes aplicaron distintas concentraciones de glicerol y obtuvieron diferencias estadísticas entre sí, todo esto en contra posición con Uribe *et al.*, (2011), que en su estudio obtuvo un valor de $P > 0,05$ en la aplicación de distintas concentraciones de glicerol.

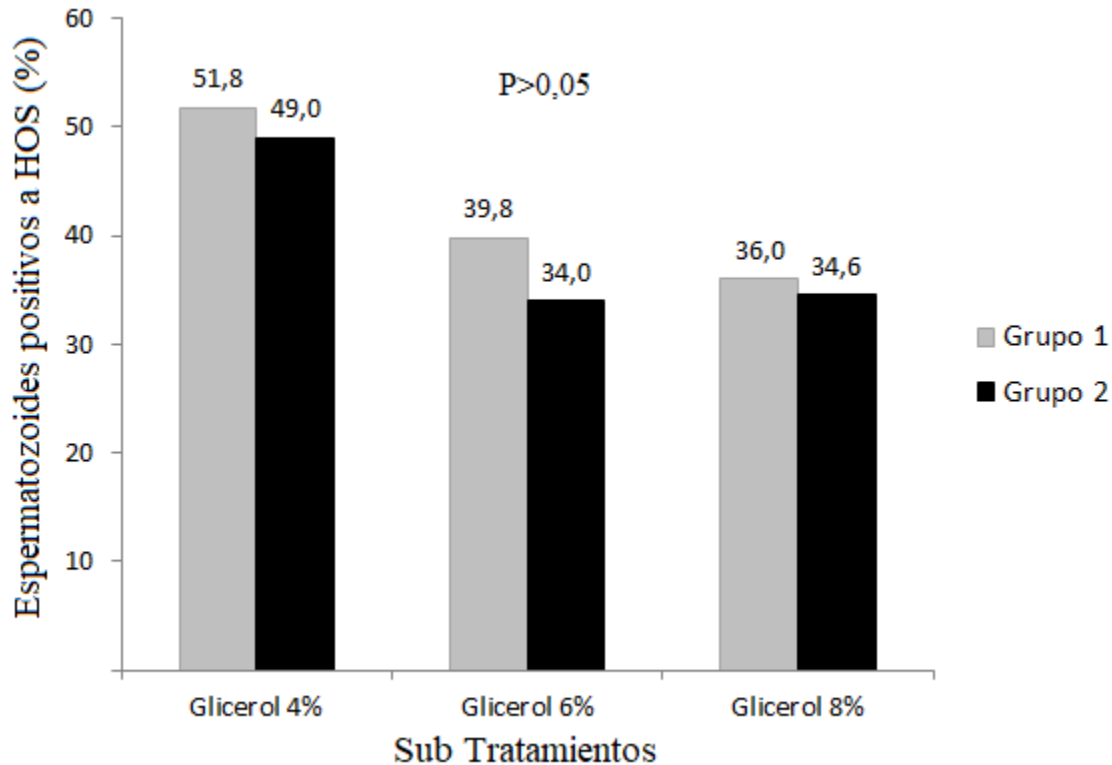


Figura 11. Promedio del porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host en los sub tratamientos (Glicerol 4%; Glicerol 6%; Glicerol 8%) de los grupos 1=testigo y 2=Percoll ^{abc}=letras diferentes indican diferencia estadística al 5%, prueba de Tukey.

La reacción positiva de los espermatozoides a la prueba de Host revela porcentajes similares entre los sub tratamientos de cada Grupo ($P > 0,05$), estos resultados son similares a los determinados por Carlotto *et al.*, (2011), quienes no obtienen diferencias estadísticas al aplicar distintas concentraciones de glicerol en diversos tiempos de congelación. Sin embargo, son valores contrario a los datos obtenidos por Restrepo *et al.*, (2011), que al aplicar diferentes concentraciones de glicerol encuentran diferencias significativas y para Sanchez *et al.*,



(2002), quienes encuentran valores estadísticamente significativos para la prueba de Host, al aplicar el glicerol como metodo de crioconservacion.



CAPÍTULO V:

Conclusiones y recomendaciones.

La aplicación del coloide a la centrifugación convencional pre-congelación, resulto ser un excelente método de selección y purificación espermática.

La adición de glicerol al 4% durante el proceso de crioconservación brindo altos porcentajes de protección celular.

Recomendaciones:

- Al tratarse de los primeros resultados obtenidos en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, seria importante continuar y profundizar estudios sobre la aplicación de coloides como método de selección de espermatozoides en la especie canina.
- Difundir el protocolo establecido a estudiantes y profesionales dedicados a la reproducción canina.



CAPITULO VI:

Bibliografía

- Aké, J. R., Harmakis, E., y Centurión, F. (2012). Efecto de los diluyentes triladyl y seagear sobre la congelación de semen canino. *Bioagrocencias*, 5(1).
- Belala, R., Amirat, L., Vinciguerra, L., Tainturier, D., Kaidi, R., Thorin, C., . . . Bencharif, D. (2016). Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Veterinary science*.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., y Tainturier, D. (2008). The advantage of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70.
- Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., y Tainturier, D. (2010). The advantages of combining low density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod Dom Anim*, 45.
- Cardoso, R., Silva, A., Uchoa, D., y Silva, L. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59(4), 743-751.
- Carlotto, G., Fernández, V., Lira, B., y Santiani, A. (2011). Momento de adición del glicerol sobre la calidad espermática en la criopreservación de semen canino. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 22(3), 183-189.



- Caturla , E., Sánchez, M., Pérez, J., Cerdeira, J., Castaño, C., y Santiago, J. (2018).
Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose)
and two warming procedures. Elsevier - Cryobiology, 80, 126 - 129.
- Chatdarong, K., Thuwanut, P., y Morrell, J. (2010). Single-layer centrifugation through
colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. Elsevier - Theriogenology,
73, 1284 - 1292.
- Cheuquemán , C., Faúndez, R., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2018). Changes in sperm
function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa . Wiley andrologia.
- Corrada, Y., De la Sota, P., Gimenez , A., Fernández , L., & Gobello, C. (2014). El
espermograma en la reproducción canina. *Revista del Colegio 36, Suplemento técnico
veterinario.*, 36-37.
- Crespo , I., Pardal, S., Mata , M., Castañeda, A., Morell, J., y Martínez, F. (2015). Evaluación
del coloide Androcoll para seleccionar espermatozoides descongelados de ciervo.
AIDA - XVI Jornadas sobre producción animal, 2, 370-372.
- Dorado , J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J., Acha, D., y Demyda, S. (2011a).
Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa
from frozen-thawed dog semen. Elsevier - Theriogenology , 76, 381-385.
- Dorado , J., Alcaraz, L., Gálvez, M., Acha, D., Ortiz, I., Urbano, M., e Hidalgo, M. (2013).
Single-Layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality
spermatozoa from frozen-thawed dog semen. Elsevier - Animal Reproduction
Science, 140, 232-240.



- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J., Acha, D., & Hidalgo, M. (2011b). Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Elsevier - Animal Reproduction Science*, 125, 211-218.
- Farstad, W. (2009). Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reprod. Dom. Anim*, 44.
- Flores, J., Fernández, V., Huamán, H., y Santiani, A. (2010). Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Rev Inv Vet*, 21(1), 26-34.
- Futino, D., Mendez, M., Matos, W., Mondador, R., y Lucci, C. (2010). Glycerol, methyl formamide and dimethyl formamide in canine semen. *Reprod Dom Anim*, 45.
- Gálvez, M., Ortiz, I., Hidalgo, M., Morrell, J., y Dorado, J. (2015). Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is cooled? *Veterinary Record*, 1.
- García, B., Morrell, J., Ortega, C., González, L., Tapia, J., Rodríguez, H., y Peña, F. (2009). Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen - thawed stallion semen. *Elsevier - Animal Reproduction Science*, 114, 193-202.
- Gharajelar, N., Sadrkhanloo, R., Onori, M., y Saberivand, A. (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary Research Forum*, 7(3), 235-239.



- Goericke, S., Weiss, R., y Wehrend, A. (2011). Bacteriological findings in different fractions of canine ejaculates showing normospermia, teratozoospermia or azoospermia. *Australian veterinary journal*.
- Gradil, C. M., Yeager, A., & Concannon, P. W. (2007). Evaluación de los problemas reproductivos del macho canino . *International Veterinary Information Service IVIS*.
- Herrera, E., Castro, L., y Chacón, J. (2008). Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino. *Cienc. Vet.*, 26(1), 7-20.
- Jurado, S., Sarmiento, P., y Stornelli, A. (2008). La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. *Analecta Veterinaria*, 28(1).
- Lopes, K., Costa, L., Lima, G., Souza, A., y Silva, A. (s.f.). Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 72.
- Martí, S., y Lafuente, S. (2011). Reproducción y neonatología canina y felina (Vol. 1). Zaragoza, España: Grupo Asís Biomedica.
- Maxwell, W., Parrilla, I., Caballero, I., García, E., Roca, J., Martínez, E., . . . Rath, D. (2007). *Reprod Dom Anim*, 42, 489-494.
- Medina, V. M., Sánchez, E., Velasco, Y., y Cruz, P. E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdecongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA). *Orinoquia*, 11(1).



- Morell, J. M., Rodríguez , H., y Johannisson , A. (2010). Single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Veterinary Journal*, 579-585.
- Morrell, J., y Rodríguez, H. (2011). Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*, 9.
- Morrell, J., y Rodríguez, H. (2016). Colloid centrifugation of semen: applications in assisted reproduction. *Scientific Research Publishing - American journal of analytical chemistry*, 597-610.
- Mota, A., Teles, C., Jucá, R., Cardoso, J., Uchoa, D., Campello, C., . . . Silva, L. (2011). Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Elsevier - Theriogenology*, 76(7), 1367-1372.
- Peña, A. I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Elsevier - Animal Reproduction science.*, 82(83), 209-224.
- Peña, A., & Linde, C. (2000). Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54, 859-875.
- Restrepo , G., Cantero , J., y Montoya, J. (2016). Effect of centrifugation on integrity and functionality of stallion spermatozoa. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1).



- Restrepo , G., Gómez, J., y Vásquez, N. (2011). Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida. *Revista La Sallista de Investigación*, 8(2).
- Restrepo , G., Vásquez , N., y Garcia , E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES*, 4(2).
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., y de Kruif, A. (2002). Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57, 1669 - 1681.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., y de Kruif, A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Elsevier - Theriogenology*, 64, 706-719.
- Ródenas , C. (2015). Tesis doctorales en red. Obtenido de Avances en conservación de semen y separación espermatozoides X y Y en la especie canina: <https://www.tdx.cat/handle/10803/345229>
- Rota, A., Milani, C., Cabianca , G., y Martini, M. (2006). Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65.
- Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J., & Linde-Forsberg, C. (1999). Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51(6), 1045-1058.
- Salinas , P., Sánchez, R., y Risopatrón , J. (2013). Criopreservación de espermatozoides caninos a - 80°C. *International Journal of Morphology*, 1(31).



- Sánchez, E., Sánchez, M., Pérez, J., Cerdeira, J., Castaño, C., & Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Elsevier - Cryobiology*, 80, 126-129.
- Sánchez, A., y Zamora, P. (2016). Efecto del medio hipoosmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. *Scielo - Rev. investig. vet. Perú*, 27(2).
- Sánchez, A., Rubilar, J., y Gatica, R. (2002). Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Scielo - Arch. med. vet.*, 34(1).
- Savignone, C. A., Tittarelli, C. M., Stornelli, M. C., Gimenez, F., de la Sota, R. L., y Stornelli, M. A. (2007). Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo. *Veterinaria Montevideo*, 42(167), 15-22.
- Silva, A. R., Cardoso, R., y Silva, L. (2006). Influence of Temperature during Glycerol Addition and Post-thaw Dilution on the Quality of Canine Frozen Semen. *Reprod Dom Anim*, 41, 74-78.
- Silva, A., Soares, R., y Machado, L. (2002). Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. *Revista Brasileña de Ciencia Veterinaria*, 9(1), 25-28.
- Silva, E. C., Cajuerio, J. F., Silva, S. V., Vidal, A. H., Soares, P. C., y Guerra, M. M. (2012). In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Elsevier*, 155.158.
- Sorribas, C. E. (2000). *Reproducción en los animales pequeños*. Buenos Aires: Intermedica



- Stornelli, M. A., y Sota, R. L. (2007). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta veterinaria*, 25(2).
- Stornelli, M. A., y Sota, R. L. (2008). Congelación de semen canino. *Argos*(1).
- Stornelli, M., Arauz, M., y De la sota, L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta*, 21, 58-66.
- Strzezek, R., y Fraser, L. (2009). Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reproductive biology*, 9(2).
- Strzezek, R., Kozirowska, M., y Stawiszynska, M. (2012). Cryopreservation of canine semen; the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Polish Journal of veterinary sciences*, 15(4).
- Sue-Hee, K., Do-Hyeon, Y., y Yong, J. (2010). Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Elsevier*, 73, 282-292.
- Urbano, M., Dorado, J., Ortíz, I., Morrell, J., Demyda, S., Gálvez, M., . . . Hidalgo, M. (2013). Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Elsevier - Animal Reproduction Science*, 143, 118 - 125.
- Uribe, R., Arango, M., Rendón, L., y Acevedo, C. (2011). Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector. *Revista CES Medicina veterinaria y zootecnia*, 6(1), 21-30.



Varela, E., Duque, J., Ramírez, M., Ocampo, D., Montoya, J., y Restrepo, G. (2015). Effect of four sperm separation methods on quality and in vitro fertilizing capacity of cryopreserved stallion spermatozoa. *Scielo - Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 26(3).

ANEXOS



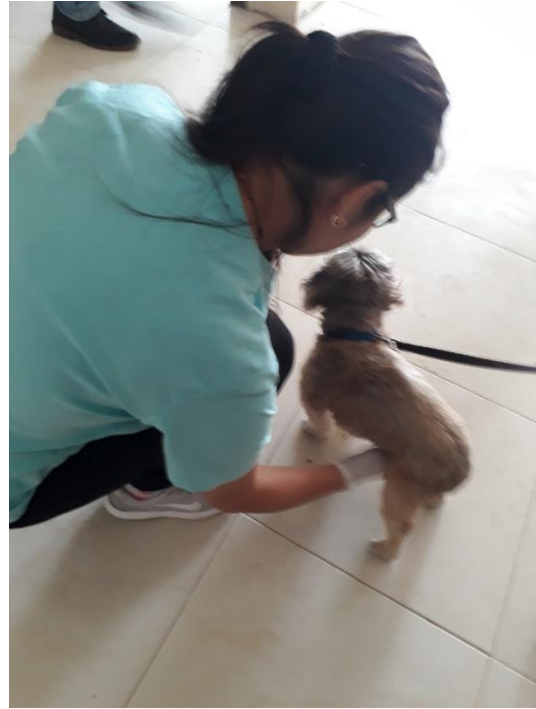
Anexo 1. Toma de muestras de animales candidatos, evaluación de parámetros espermáticos y planificación de trabajo

Fuente: Autora



Anexo2. Materiales empleados para la extracción mecánica de semen en perros seleccionados.

Fuente: Autora.



Anexo 3. Extracciones mecánicas de semen en perros seleccionados.

Fuente: Autora



Anexo 4. Recolección de la muestra post extracción.

Fuente: Autora



Anexo 5. Evaluación de parámetros espermáticos post extracción de semen en perros.

Fuente: Autora



Anexo 6. División de alícuotas para los subgrupos.

Fuente: Autora



Anexo 7. Preparación de columna de Percoll 60%.

Fuente: Autora



Anexo 8. Proceso de criopreservación.

Fuente: Autora