



Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa

Baquero-Parrado J. R. MVZ; Pardo-Romero E. A. MVZ; Cruz-Casallas P. E. MVZ MSc PhD
Instituto de Acuicultura – Universidad de los Llanos, Villavicencio – COLOMBIA
(Recibido: Mayo 4 de 2004 - Aceptado: Mayo 31 de 2004)

R E S U M E N

El propósito del presente trabajo fue evaluar la utilización de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración, estudiando los efectos del tiempo de almacenamiento, el grado de dilución y los niveles de fructosa, sobre la movilidad, morfología e integridad acrosomal. Se utilizaron 5 machos adultos, sin raza definida (SRD), con edades entre 3 y 6 años, clínicamente sanos. Las muestras se obtuvieron mediante manipulación digital del pene, colectando únicamente la segunda fracción del eyaculado. Cada alícuota fue diluida en proporción 1:2, 1:4 ó 1:8 hasta un volumen total de 0,5 ml, empleando como diluyentes TRIS-ácido cítrico-yema de huevo o TRIS - Citrato de

Sodio - Yema de huevo, con 1,3 ó 1,6 g de fructosa. Inicialmente las muestras fueron enfriadas gradualmente hasta 4 °C (1 °C /4 min.) y luego almacenadas en una nevera convencional (4 ± 2 °C). La evaluación del semen fue realizada antes de la dilución y a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento, determinando % movilidad masal, % viabilidad espermática, anomalías morfológicas e integridad acrosomal; ésta última se evaluó mediante microscopía de contraste de fase. La movilidad fue evaluada por observación directa al microscopio de una gota gruesa de semen y calificada en una escala de 1 a 4, siendo 4 el mayor grado de movilidad. A las seis horas de almacenamiento no se observó

diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tratamientos. Posteriormente, a medida que transcurrió el tiempo, la movilidad espermática disminuyó gradualmente, observándose los menores valores en el semen diluido en proporción 1:2; los efectos de la concentración de azúcar y del tipo de diluyente utilizado no fueron significantes. Por otra parte, los efectos del tiempo de almacenamiento sobre la morfología, viabilidad e integridad acrosomal, tampoco fueron significantes.

Palabras Clave: Perro, conservación de gametos, refrigeración de semen, calidad seminal.

A B S T R A C T

The aim of this study was to evaluate the use of two extenders for conservation of chilled canine semen studying the effect of storage, dilution level and fructose levels as energy substrate on the sperm motility, morphology and acrosomal integrity. Five healthy adult male dogs between 3 to 6 years old without defined breed (SRD) were used. Semen samples were collected by digital

manipulation of penis, collecting only the second fraction of the ejaculate. Each aliquot was diluted in proportions 1:2, 1:4 or 1:8 until total volume of 0.5 ml, using the extenders TRIS- citric acid-egg yolk or TRIS- Sodium citrate-egg yolk, with 1,3 or 1,6 g of fructose. Initially, the samples were cooled gradually until 4° C (1° C/4 min) and then storage in conventional refrigerator (4 ± 2° C). The semen

assessment was estimated before dilution and at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h of storage, measuring % motility gross, % spermatic viability, spermatozoa morphological abnormalities % and acrosomal integrity, this last was estimated using phase contrast microscopy. The motility was evaluated by direct observation to microscope of one semen gross drop and qualified in the scale of 1 to 4,



being 4 the level bigger of motility. At the 6 h of storage no effect was noted significant difference ($p > 0,05$) between the treatments different. Subsequently, along the time the motility gradually

decreased, to less values in diluted semen in ratio 1:2; on the other hand, the effects of the time storage refrigeration on morphology, viability and acrosomal integrity, neither were significant.

Words key: Dogs, gametes conservation, semen refrigeration, semen quality.

El creciente interés en el perro doméstico como especie de compañía y de trabajo, ha generado un importante incremento en la investigación sobre la biología reproductiva de la especie (Farstad, 1996; Cain, 2001). Uno de los asuntos más investigados ha sido la conservación de gametos, ya sea para ser utilizados en programas de inseminación artificial o para fecundación *in vitro* (Yamada *et al.*, 1992; Hay *et al.*, 1997; Bolamba *et al.*, 1998; Ivanova *et al.*, 1999; Farstad, 2000; Holt, 2000).

Han sido evaluados diferentes protocolos para la crioconservación de semen canino (Gill *et al.*, 1970; Ström *et al.*, 1997; Farstad, 2000; Medeiros *et al.*, 2002); sin embargo, las tasas de fertilidad hasta ahora reportadas son bajas e inferiores a aquellas obtenidas utilizando semen diluido y conservado bajo condiciones de refrigeración (Gill

et al., 1970; Linde-Forsberg, 1991, Pinto *et al.*, 1999). La menor fertilidad del semen crioconservado no solamente se manifiesta por un menor número de hembras gestantes, sino también por la disminución en el tamaño de la camada (Mickelsen *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1999). Esta circunstancia hace que la inseminación artificial canina, se realice principalmente empleando semen diluido y conservado en fresco (Crusco y Vannucchi, 1997), aunque los porcentajes de fertilidad aún son inferiores a aquellos obtenidos con monta natural (Medeiros *et al.*, 2002).

Ha sido ampliamente demostrado que la composición de los diluyentes utilizados en los procesos de conservación de semen canino, puede afectar el tiempo de almacenamiento y la calidad de los espermatozoides (Sirivaidyapong

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, localizado a 418 metros sobre el nivel del mar. El clima se caracteriza por una temperatura promedio anual de 25°C, precipitación pluvial de 4.050 mm y humedad relativa de 75%.

Como fuente de esperma se utilizaron 5 perros machos, sin raza

definida (SRD), con edades entre 2 y 6 años, clínicamente sanos, con plan de vacunación completo y condiciones de manejo similares. La recolección de las muestras de semen se realizó por manipulación digital del pene (Freshman *et al.*, 1988), desechando la primera y la tercera fracción, pues es conocido que éstas poseen condiciones que afectan la movilidad espermática y reducen el tiempo de conservación (Rota *et al.*, 1995; Gabaldi y

INTRODUCCIÓN

et al., 2000). En este contexto, atención especial ha recibido el tipo y la concentración de azúcar utilizado, los cuales pueden modificar no solamente la movilidad espermática, sino también la viabilidad e integridad acrosomal (Yildis *et al.*; 2000; Rigau *et al.*, 2001). En general, los monosacáridos, cumplen diversas funciones en el diluyente: proporcionan una fuente de energía para la célula espermática, mantienen la presión osmótica y, además, ejercen acción crioprotectora (Yildis *et al.*, 2000).

El propósito del presente trabajo fue evaluar la utilización de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración, estudiando los efectos del tiempo de almacenamiento, el grado de dilución y los niveles de fructosa, sobre la movilidad, morfología e integridad acrosomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

López, 1998). Inmediatamente después de su recolección las muestras fueron evaluadas para determinar: volumen, color, consistencia, concentración espermática, movilidad masal, viabilidad y anomalías primarias y secundarias. Únicamente se utilizaron muestras con más de 70% de movilidad masal y menos de 20% de células espermáticas anormales. La composición de los diluyentes estudiados fue la siguiente:



Diluyente 1: Tris – Ácido Cítrico

Tris (hidroximetil-amino metano)	3.187 g
Ácido cítrico	1.781 g
Fructosa	1.3 ó 1.6 g
Agua destilada	c.s.p. 80 mL
Yema de huevo	15%
Penicilina G sódica	1000 UI / mL
Estreptomycinina	1000 ìg / mL

Diluyente 2: Tris – Citrato de Sodio

Tris	2.526 g
Citrato de Sodio	1.368 g
Fructosa	1.3 ó 1.6 g
Agua destilada	c.s.p. 80 mL
Yema de huevo	15%
Penicilina G sódica	1000 UI / mL
Estreptomycinina	1000 ìg / mL

Después de la evaluación inicial, el semen fue diluido en proporciones 1:2, 1:4 ó 1:8, con cada uno de los diluyentes en estudio, conformando un diseño factorial 2 x 2 x 3, donde el factor 1 la constituyó el tipo de diluyente (Tris –ácido cítrico o Tris Citrato de Sodio), el factor 2 la concentración de azúcar en el diluyente (1.3 ó 1.6 g/80mL) y el factor 3 el grado de dilución (1:2; 1:4 ó 1:8). Cada unidad experimental consistió de 0.5 mL de eyaculado diluido, envasado en un tubo de reacción plástico de 1.5 mL. Para cada tratamiento se realizaron 6 repeticiones.

El almacenamiento de las muestras se llevó a cabo en una nevera convencional (Centrales® Nature Fresh), dispuestas suspendidas en un *Beaker* (Brand®) con agua a una temperatura inicial de 37°C. De

esta forma se consiguió un descenso gradual de la temperatura, alcanzando los 4° C en 2.0 a 2.5 horas (descenso aproximado de 0.2 a 0.4° C por minuto). Las muestras se mantuvieron cerradas con un tapón de algodón hidrofílico estéril y se identificaron con el nombre de perro del cual procede la muestra, el diluyente, el grado de dilución, la concentración de fructosa utilizada y la fecha correspondiente. La movilidad, morfología espermática, viabilidad e integridad acrosomal fueron nuevamente evaluadas a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento.

La movilidad, morfología espermática y viabilidad fueron evaluadas empleando un microscopio óptico convencional, mientras que la integridad acrosomal se evaluó utilizando cámaras húmedas y

un microscopio de contraste de fase. Las cámaras húmedas fueron construidas colocando una gota de 20 µL del semen diluido sobre una lámina portaobjetos y sobre ésta una laminilla cubreobjetos, teniendo el cuidado de evitar la presencia de aire entre las dos láminas. Luego las dos láminas se sellaron, aplicando esmalte de uñas entre los bordes de la laminilla cubreobjetos y la lámina portaobjetos. Posteriormente fueron observadas en aumento de 100x (Cormarck, 1988). La movilidad masal se calificó en una escala arbitraria de 0 a 5, siendo 5 el mayor grado de movilidad.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza no paramétrico – prueba de Kruskal Wallis – utilizando el software INSTAT versión 2.01.

R E S U L T A D O S

Movilidad espermática masal:

Durante todo el tiempo de conservación, la movilidad masal en todas las muestras diluidas en proporción 1:2, empleando los dos diluyentes y con las dos concentraciones de fructosa (1.3 g ó 1.6 g), fue inferior ($p < 0.05$) a las otras diluciones evaluadas.

La figura 1 ilustra la movilidad masal de semen diluido con Tris – Ácido Cítrico, empleando 1.3 g de fructosa, en los tres grados de dilución estudiados.

El diluyente TRIS – Ácido Cítrico, con 1.3 g de fructosa, diluido en proporción 1:2 mostró una movilidad de $3.2 \pm 0,4$; $3.2 \pm 0,4$; $2.6 \pm 0,5$; $2.2 \pm 0,4$; $1.4 \pm 0,5$ y $1.8 \pm 0,4$ a las 6, 12, 24, 28, 72 y 92 h respectivamente, mientras que para la muestra diluida en proporción 1:4 la movilidad fue de $3.8 \pm 0,4$; $3.8 \pm 0,4$; $3.4 \pm 0,5$; $2.6 \pm 0,5$; 2.0 ± 0 y 1.0 ± 0 a las 6, 12, 24, 28, 72 y 92 h, respectivamente.

Por su parte, la muestra diluida en

proporción 1:8 con una concentración de fructosa 1.6 g, mostró un mejor patrón de movilidad hasta las 72 h con valores de $3.8 \pm 0,4$; $3.8 \pm 0,4$; $3.8 \pm 0,4$; $2.8 \pm 0,4$; 2.0 ± 0 y de 1.0 ± 0 , con respecto a los valores observados en las diluciones 1:2 y 1:4, conservando una movilidad entre el rango clasificado como BUENA hasta las 24 horas de almacenamiento (figura 2).

Las muestras diluidas en proporciones 1:4 y 1:8 mostraron un pa-

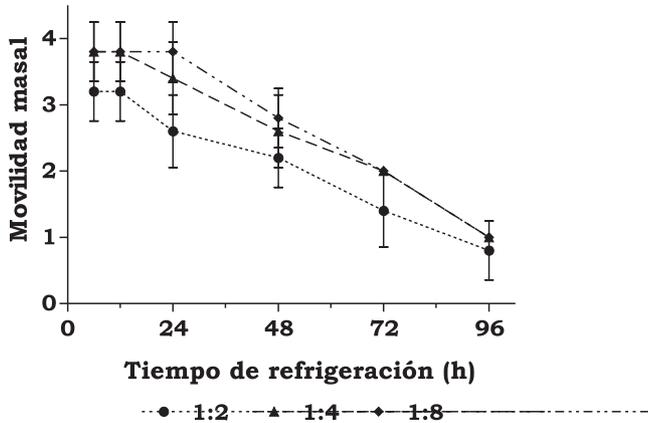
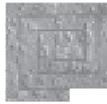


Figura 1: Movilidad masal de semen canino diluido con Tris - Ácido Cítrico, con 1.3 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).

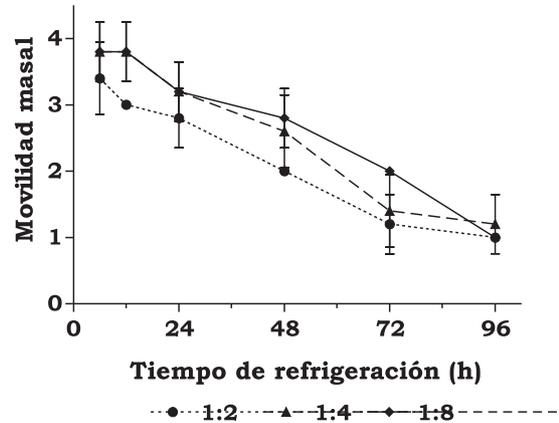


Figura 2: Movilidad masal de semen canino diluido con Tris - Ácido Cítrico, con 1.6 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).

trón de movilidad masal igual hasta las 24 horas. Sin embargo, la muestra diluida en proporción 1:8 superó a las diluciones 1:2 y 1:4 hasta las 72 h de almacenamiento, aunque no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

La figura 3 muestra la movilidad masal de semen canino diluido con

Tris - Citrato de Sodio, empleando 1.3 g de fructosa, en los tres grados de dilución estudiados.

Similares resultados se observaron para el diluyente 2 (Tris - Citrato de Sodio), empleando las dos concentraciones de fructosa. Hasta las 48 h de almacenamiento, la mayor movilidad masal se observó en la

muestra diluida en la proporción 1:8, cuando fue comparada con la observada en las muestras diluidas en las proporciones 1:2 y 1:4. Sin embargo, para el diluyente Tris-Citrato de Sodio- con 1.6 g de fructosa, en la muestra diluida en proporción 1:4 se observó una movilidad mayor a las 48 h, que la obtenida en la dilución 1:2.

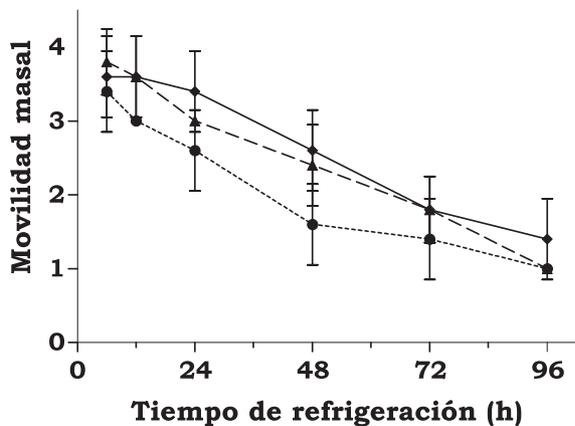


Figura 3: Movilidad masal de semen canino diluido con Tris - Citrato de Sodio, con 1.3 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).

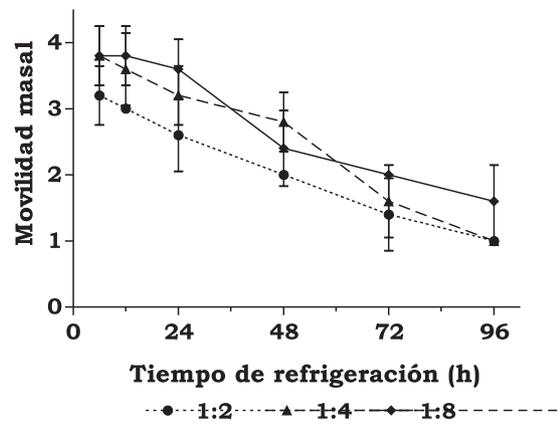
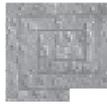


Figura 4: Movilidad masal de semen canino diluido con Tris - Citrato de Sodio, con 1.6 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).



Viabilidad espermática

A las 6 h de almacenamiento, la viabilidad espermática ya mostró diferencias significativas entre los diluyentes. El diluyente Tris - Ácido Cítrico, con 1.3 g de fructosa, diluida en proporción 1:4, mostró mejor ($p < 0.05$) porcentaje de viabilidad espermática ($94.8 \pm 2.6\%$) que el observado con el diluyente Tris-Citrato de Sodio, con 1.3 g de fructosa, diluido en proporción 1:2 ($72.8 \pm 4.0\%$).

De igual modo, también hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores encontrados a las 6 h con el diluyente Tris-Citrato de Sodio, entre la concentración de fructosa 1.3 g en la muestra

diluida en proporción 1:8 con un porcentaje de 89.6 ± 2.7 de espermatozoides vivos y la concentración de fructosa 1,6 g diluida en proporción 1:2, con un porcentaje de espermatozoides vivos de 68.6 ± 3.3 .

También a las 6 h de almacenamiento, el diluyente Tris -Ácido Cítrico, con 1.6 g de fructosa y empleado en proporción 1:8, presentó un porcentaje ($93.8 \pm 3,5\%$) de espermatozoides vivos mayor ($p < 0.01$) que el diluyente Tris-Citrato de Sodio, con 1,3 g de y fructosa diluida en proporción 1:2 ($72.8 \pm 4.0\%$).

Por otra parte, a las 6 h de almacenamiento, el diluyente Tris - Áci-

do Cítrico, con 1.3 g de fructosa, diluido en proporción 1:4 presentó un porcentaje de espermatozoides vivos ($94.8 \pm 2.6\%$) mayor ($p < 0.01$) que el diluyente Tris - Citrato de Sodio, con 1.6 g de fructosa y a una dilución 1:2 ($68.6 \pm 3.3\%$).

Además, el diluyente Tris-Citrato de Sodio, con 1.6 g de fructosa y diluido en proporción 1:2, mostró un porcentaje de espermatozoides vivos el cual resultó diferente estadísticamente ($p < 0.001$) cuando comparado con el observado con el diluyente Tris-Ácido Cítrico, con 1.3 g de fructosa y diluido en proporción 1:4 ($94.8 \pm 2.6\%$).

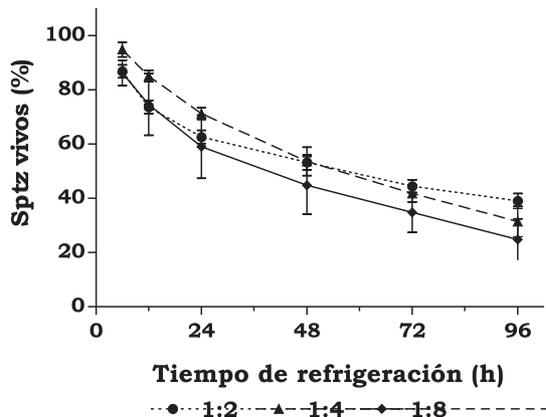


Figura 5: Viabilidad de espermatozoides caninos, diluido con Tris - Ácido Cítrico, con 1.3 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).

A las 12 h de almacenamiento se observó que el diluyente Tris - Ácido Cítrico, a la concentración de fructosa 1.3 g en la muestra diluida en proporción 1:4 presentó un porcentaje de 85.08 ± 2.1 espermatozoides vivos siendo superior ($p > 0.05$) con respecto al mismo diluyente a la concentración de fructosa 1,6 g diluida en proporción 1:2 con un porcentaje de

espermatozoides vivos de 63.8 ± 2.8 , y también fue superior ($p > 0.01$) con relación al diluyente Tris-Citrato de Sodio a la concentración de fructosa 1.3 g, en muestra diluida en proporción 1:2, el cual presentó un porcentaje de $57 \pm 2.9\%$.

Por otra parte, el diluyente Tris - Ácido Cítrico, con 1.6 g de

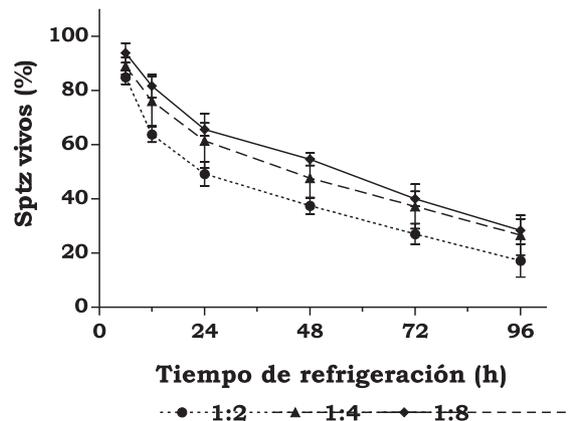


Figura 6: Viabilidad de espermatozoides caninos, diluido con Tris - Ácido Cítrico, con 1.6 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$).

fructosa, diluido en proporción 1:8 presentó $81.6 \pm 4.2\%$ de espermatozoides vivos, mostrando diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al diluyente Tris-Citrato de Sodio, a la concentración de fructosa 1.3 g en muestra diluida en proporción 1:2 la cual presentó un porcentaje de 57.0 ± 2.9 espermatozoides vivos y fue muy superior ($p > 0.01$) con respecto



al diluyente Tris-Citrato de Sodio, en concentración de 1.6 y en muestra diluida en proporción 1:2 con un porcentaje de 54.8 ± 3.1 espermatozoides vivos manteniendo una vitalidad destacable sobre los preparados en mención.

También a las 12 h el diluyente Tris- Citrato de Sodio, en concentración de fructosa 1,6 g y diluida en proporción 1:8 con un promedio de espermatozoides vivos de 77.8 ± 4.4 mostró ser superior ($p > 0.05$) con respecto al mismo diluyente en igual concentración, pero en dilución 1:2 con un porcentaje de espermatozoides vivos de 54.8 ± 3.1 .

Ya a las 24 h el diluyente Tris-Ácido Cítrico a concentración de fructosa 1,3 g y en muestra diluida en proporción 1:4 presentó un porcentaje de $71.2 \pm 2.1\%$ espermatozoides vivos siendo superior con una diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a la muestra en concentración de fructosa de 1,6 g en muestra diluida en proporción 1:2 que presentó un porcentaje de $49,2 \pm 4.4\%$ espermatozoides vivos y también

fue diferente estadísticamente ($p > 0.001$) con respecto al diluyente Tris-Citrato de Sodio a concentración de fructosa 1.3 g y en muestra diluida en proporción 1:2, la cual presentó un porcentaje de $41.6 \pm 3.3\%$ espermatozoides vivos y encontrando también diferencia significativa ($p > 0.01$) contra el diluyente Tris-Citrato de Sodio, a concentración de fructosa 1.6 g y en muestra diluida en proporción 1:2 con un porcentaje de $46.4 \pm 7.6\%$ espermatozoides vivos.

También a las 24 h el diluyente Tris - Citrato de Sodio-yema de huevo a la concentración de fructosa 1,6 g diluida en proporción 1:8 con un porcentaje de espermatozoides vivos de 70.4 ± 8.2 presentando diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al diluyente Tris-Citrato de Sodio-yema de huevo en concentración de fructosa 1,3 g diluido en proporción 1:2 el cual presentó un porcentaje de 41.6 ± 3.3 espermatozoides vivos.

A las 48 h el diluyente Tris - Citrato de Sodio, con concentración de fructosa 1.3 g y en muestra diluida en proporción 1:2 presentó un

porcentaje de 26.6 ± 3.05 espermatozoides vivos siendo diferente estadísticamente ($p < 0.05$) con el diluyente Tris - Ácido Cítrico, a la concentración de fructosa 1.3 g en muestra diluida en proporción 1:2 con un porcentaje de espermatozoides vivos de $53.2 \pm 2.8\%$; con el diluyente Tris- Ácido Cítrico, a la concentración de fructosa 1.3 g diluida en proporción 1:4 con un porcentaje de espermatozoides vivos de $53.6 \pm 5.2\%$ presentando diferencias significativas ($p > 0.01$) con el diluyente Tris-Ácido Cítrico, concentración de fructosa 1,6 g en muestra diluida en proporción 1:8 con un porcentaje de espermatozoides vivos de 54.6 ± 2.3 mostrando una marcada inferioridad del diluyente Tris - Citrato de Sodio, con concentración de fructosa 1.3 g diluido en proporción 1:2 con respecto a los diluyentes confrontados.

Anormalidades secundarias

Con relación a las anomalías secundarias, se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diluyentes en estudio.

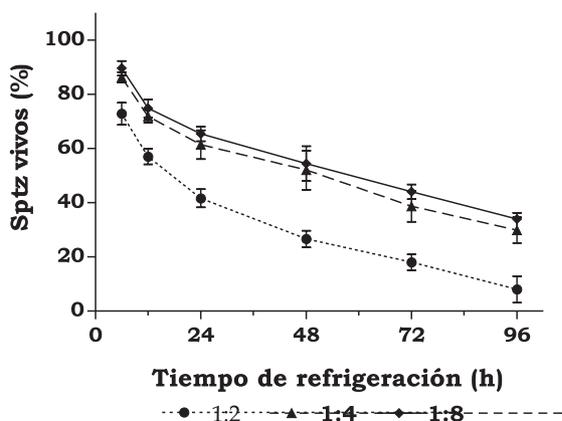


Figura 7: Viabilidad de espermatozoides caninos, diluido con Tris - Citrato de Sodio, con 1.3 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^\circ \pm 2^\circ \text{C}$).

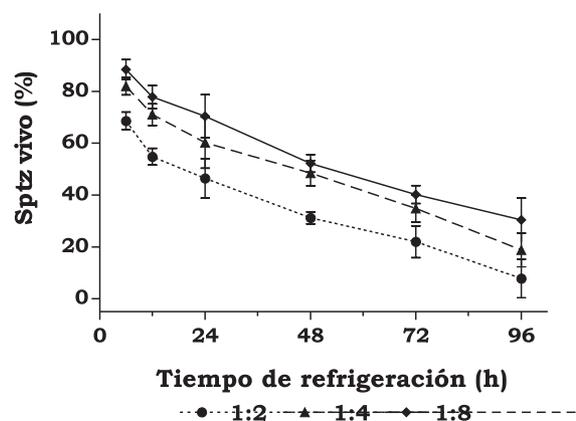


Figura 8: Viabilidad de espermatozoides caninos, diluido con Tris - Citrato de Sodio, con 1.6 g de fructosa, en proporciones 1:2, 1:4 y 1:8. La observación fue realizada a las horas 0, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ($4^\circ \pm 2^\circ \text{C}$).



D I S C U S I Ó N

Durante el choque por frío, los fosfolípidos interactúan con la estructura lipídica de la membrana plasmática de las células espermáticas y proveen protección. Las lipoproteínas se unen a la membrana de la célula espermática y ayudan a conservar la integridad celular durante el almacenamiento (Bouchard *et al.*, 1990). La estabilidad de la membrana y la resistencia al choque por frío está relacionada con el contenido de fosfolípidos de la membrana celular. Una baja proporción de fosfolípidos poliinsaturados - ácidos grasos saturados en la composición espermática, ha sido relacionada con una alta resistencia al choque por frío (Bouchard *et al.*, 1990).

La configuración bilaminar de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, junto con las proteínas integrales y periféricas, conforman una barrera hidrofóbica difícil de atravesar. Los fosfolípidos de la membrana se pueden mover lateralmente en la membrana, por lo que se dice que la membrana es un mosaico fluido. La fluidez de la membrana puede alterarse por varios factores, entre ellos la temperatura. Al descender ésta se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas. Sin embargo, hay regiones en las que todavía existen líquidos y aquellas proteínas que fueron separadas del bloque cristalino se reagrupan, de forma que se construyen brechas de comunicación en la membrana. Una hipótesis que también se plantea explica que al descender la temperatura disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba sodio-potasio de la membrana plasmática (ATP dependiente) también disminuye su actividad. Esto causa que el potasio que atraviesa la

membrana para salir, fluya a una tasa mayor que el potasio que entra, por lo que la concentración de potasio intracelular disminuye, y la relación sodio-potasio se altera. Esto causa una despolarización de la membrana, abriéndose por ello los canales de calcio, el cual activa enzimas fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas.

Teóricamente se podría hacer más resistente a un espermatozoide reduciéndole el número de poros en la membrana y reduciéndole las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos. Presumiblemente esta es la acción de las proteínas de la yema de huevo en los diluyentes. En los diluyentes utilizados para semen refrigerado como para semen congelado, ha sido necesario incluir leche descremada o yema de huevo, sobre todo esta última. A pesar de haber sido utilizada desde hace décadas, lo único que se conoce sobre el efecto de la yema de huevo es que su inclusión mejora la fertilidad y la movilidad del semen (Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

Por otra parte, uno de los obstáculos que se presentan para realizar la evaluación del semen en estudios de diluyentes con base a yema de huevo, es la consistencia de la misma, la cual interfiere, tanto por la viscosidad que produce en el diluyente, como por la poca nitidez que tiene el campo visual del microscopio. La densidad del diluyente con yema de huevo puede influir en la dirección o movimiento espermático. Lo cual podría explicar la inferior tasa de movilidad en las diluciones 1:2 con respecto a las obtenidas en las diluciones 1:4 y 1:8 para ambos diluyentes y ambas concentraciones de fructosa.

De otro modo y teniendo en cuenta que a las 72 h el semen canino almacenado bajo condiciones de refrigeración alcanzó un valor máximo de supervivencia de 44,4 (± 2.408) en el diluyente 1, a concentración de 1.3 g de fructosa en dilución 1:2 y que la movilidad para este mismo diluyente a las 72 h fue de 1.4 ± 0.5 espermatozoides y que la media de espermatozoides morfológicamente anormales va desde 6.1 hasta 34.6 (Johnston, 1991) se podría conjeturar que el semen diluido para refrigeración con los preparados utilizados a las 72 h de almacenamiento tendría poca probabilidad de lograr tasas de concepción satisfactoria.

En conclusión, los dos diluyentes tanto en la preparación con ácido cítrico monohidratado como en la que tiene citrato de sodio se comportan mejor a diluciones mayores siendo la dilución 1:8 con tasas de movilidad mayor con respecto a las diluciones 1:4 y 1:2. Por otro lado, el efecto benéfico de la implementación de fructosa al diluyente sobre la viabilidad espermática se observó encontrándose mayores tasas de supervivencia para ambos diluyentes en la concentración de fructosa 1.6 g, con respecto a las encontradas en la concentración 1.3 g.

Finalmente, la supervivencia del espermatozoide canino bajo condiciones de refrigeración conserva su patrón inicial para ambos diluyentes con ambas concentraciones de fructosa hasta las 24 horas de almacenamiento coincidiendo con lo encontrado con otros autores. La integridad del acrosoma del espermatozoide canino no sufrió daño aparente durante el almacenamiento bajo refrigeración con los diluyentes en estudio.



BIBLIOGRAFÍA

- BOLAMBA, D., BORDEN-RUSS, K.D., DURRANT, B.S. 1998. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, Abril 1, Vol. 49, No. 5, pp. 933 - 942.
- BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, Vol. 34, No. 1, pp. 147 - 157.
- CAIN, J.L. 2001. An overview of canine reproduction services. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, March, Vol. 31, No. 2, pp. 209 - 218.
- CORMACK D.H. 1988. La histología y sus métodos de estudio. *Histología de Ham*. Novena Edición. Editorial Harla. México, pág 13.
- CRUSCO S. E.; VANNUCCHI, C. I. 1997. Inseminação artificial em cães. *Clínica Veterinaria*, V. 2, N. 6, pp. 22 - 24.
- FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, Vol. 53, pp. 175 - 186.
- FARSTAD, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, Vol. 42, pp 251 - 260.
- FRESHMAN, J.L., AMMAN, R.P., SODERBERG; S.F. 1988. Clinical Evaluation on Infertility in Dogs. *Compendium on Continuing Education*. Abril, Vol. 10, No. 4, pp, 443 - 460.
- GABALDI SH, LOPES MD. 1998. Considerações sobre a congelação de semen canino. *Clínica Veterinaria*, No. 14, pp. 24 - 26.
- GILL. H.P., KAUFMAN. C.F., FOOTE. R.H., KIRK. R.W. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-store, and frozen semen. *American Journal Veterinary Research*, Vol. 31, No. 10, pp. 1807 - 1813.
- HAY, M.A., KING, W. A., GARTLET, C.J., LEIBO, S.P., GOODROWE, K.L. 1997. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*. Vol. 48, December, pp. 1329 - 1342.
- HOLT, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, Vol. 53, 1 January, pp. 47 - 58.
- IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, Vol. 55, 15 January, pp. 671 - 684.
- IVANOVA, M., MOLLOVA, M., IVANOVA-KICHEVA, M.G., PETROV, M. 1999. Effect of cryopreservation on zona - binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*, 1 July, Vol. 51, No. 1, pp. 163 - 170.
- JOHNSTON, S.D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. Vol. 21, No 3, pp. 421 - 425.
- LINDE - FORSBERG, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. Vol 21, No. 3, pp. 467 - 485
- MEDEIROS, C.M.O., FORELL. F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRÍGUEZ, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, January, Vol. 57, No. 1, pp. 327 - 344.
- MICHELSEN, W.D., MEMON, M.A., ANDERSON, P.B., FREEMAN, D.A. 1993. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*, Vol. 39, pp. 553 - 560.
- PINTO, C.R.F., PACCAMONTI, D.L., EILTS, B.E. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, Vol. 52, No. 4, pp. 609 - 616.
- RIGAU, T, FARRÉ, M., BALLESTER, J., MOGAS, T., PEÑA, A., RODRÍGUEZ-GIL, J.E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, Vol. 56, pp. 15 september, pp. 801 - 815.
- ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 15 October, Vol. 44, No. 6, pp. 885 - 900.
- SIRIVAIYAPONG, S., CHENG. F.P., MARKS, A., VOORHOUT, W.F., BEVERS, M.M., COLENBRANDER, B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*. Vol. 53, No. 3, pp. 789 - 802.
- STRÖM, B., ROTA, A., LINDE - FORSBERG, C. 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. Vol. 48, pp. 247 - 256.
- YAMADA, S., SHIMAZU, Y., KAWAJI, H., NAKAZAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, Vol. 46, pp. 852 - 858.
- YILDIZ, C., KAYA, A., AKSOY, M., TEKELI, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 1 september, Vol. 54, No. 4, pp. 579 - 585.