



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

SANCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R.

Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado

Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 34, núm. 1, 2002, pp. 123-134

Universidad Austral de Chile

Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013842014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica





Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



## Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Arch. med. vet. v.34 n.1 Valdivia 2002

Arch. Med. Vet., Vol. XXXIV, N° 1, 2002, pp. 123-130

### COMUNICACIONES

## Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado

### Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test

A. SANCHEZ<sup>1</sup>, M.V., M.Sc., Dr. (c) Cs. Vet.; J. RUBILAR<sup>2</sup>, M.V.; R. GATICA<sup>2</sup>, M.V., Ph.D.

<sup>1</sup> Becario Conicyt, Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

<sup>2</sup> Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. [asanchezr@uach.cl](mailto:asanchezr@uach.cl)

### Summary

Twenty ejaculates from 5 adult dogs were collected by digital manipulation, in order to study the functional capacity of spermatozoal membranes in fresh and frozen/thawed semen. The average volume obtained was  $1.9 \pm 0.87$  ml (1 and 2 fractions). The progressive motility, live and normal sperm were 83.3%, 92.0% and 83.5%, respectively. The average concentration was  $325 \times 10^6$  sperm per ml. Semen samples were exposed to an hypoosmotic solution (55 mOsm/L) observing 87.9% of spermatozoa with

curved tails. After evaluation, 18 ejaculates were extended with a TRIS-fructose-citric acid diluent containing 20% egg yolk and 8% glycerol, added to the semen to obtain  $150 \times 10^6$  spermatozoa per ml. The samples were packaged in 0,25 ml straws and kept for 2 hours at 5°C for equilibration and then frozen in liquid N<sub>2</sub> vapour for 8 min. before submerge them into liquid N<sub>2</sub>. The samples were stored in liquid N<sub>2</sub> for 2 to 9 weeks. Straws were thawed in water bath at 40°C for 15 sec. and evaluated. The progressive motility was  $47.4 \pm 17.6\%$  and spermatozoa with curved tails reached 53.7%. The correlation obtained in frozen/thawed semen between progressive motility and HOST was significant  $r = 0.88$  and higher ( $p < 0.01$ ) than the value obtained with fresh semen ( $r = 0.66$ ), indicating a close relationship between this characteristic and potential fertility. The HOST showed to be a simple technique to evaluate the integrity of spermatozoa membrane in fresh and frozen/thawed canine semen.

**Key words:** canine, spermatozoa, semen, HOS-test.

## Resumen

Se estudió la integridad de la membrana espermática en espermatozoides caninos en semen fresco y en semen congelado/descongelado, mediante la prueba hipoosmótica y las correlaciones de dicha prueba con algunos parámetros de evaluación usados de rutina en el estudio de semen de perro, usando 20 eyaculados. El semen se obtuvo por manipulación digital. A través de un espermiograma convencional se obtuvo un volumen promedio  $1.9 \pm 0.9$  ml (1ª y 2ª fracciones), 83.8% de motilidad progresiva, 92.0% de espermatozoides vivos, y 83.5% de espermatozoides normales. La concentración espermática fue de  $325 \times 10^6$  espermatozoides por ml. Se realizó la prueba hipoosmótica para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática empleando una solución hipoosmótica de 55 mOsm/l, obteniéndose un  $87.9 \pm 8.1\%$  de espermatozoides con colas curvadas en el semen fresco. Diez y ocho de veinte eyaculados fueron congelados en un diluyente en base a TRIS-Fructosa - ácido cítrico, 20% yema de huevo y 8% de glicerol, diluyendo hasta alcanzar una concentración promedio de  $150 \times 10^6$  espermatozoides por ml. El semen diluido fue envasado en pajuelas de 0.25 ml. Posteriormente las muestras fueron sometidas a un período de adaptación a 5°C por 2 horas, para luego ser congeladas en vapor de nitrógeno líquido por 8 minutos, antes de ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido. La descongelación de las pajuelas fue hecha en agua a 40°C por 15 segundos, y el semen congelado/descongelado fue evaluado en base a su motilidad progresiva y respuesta a la prueba hipoosmótica, dando como resultados  $47.4 \pm 17.6\%$  de motilidad y un porcentaje promedio de espermatozoides con colas curvadas de  $53.7 \pm 13\%$ . La correlación obtenida para las variables de motilidad progresiva y respuesta a la prueba canino. Además, es importante destacar que este trabajo constituiría uno de los primeros en su tipo a nivel nacional, particularmente en lo referido a la criopreservación de semen de perro.

**Palabras claves:** canino, espermatozoides, semen, prueba hipoosmótica.

## INTRODUCCION

El descubrimiento del glicerol como crioprotector y el hecho de que fueran espermatozoides las primeras células en ser satisfactoriamente congeladas/descongeladas ([Polge y col., 1949](#)) resultó determinante en el desarrollo de la inseminación artificial. La criopreservación de espermatozoides y así como la preservación de la capacidad fecundante de los mismos, ha sido descrita como exitosa en varias

especies de animales domésticos y silvestres ([Holt, 2000](#); [Farstad, 2000](#)). No obstante estos antecedentes, se debe considerar que los espermatozoides experimentan daño durante el proceso de congelación y descongelación ([Parks y Graham, 1992](#)). Se ha descrito que semen con alto porcentaje de espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales, al ser sometido a técnicas corrientes de criopreservación experimenta una reducción de la motilidad espermática, fenómeno que se asocia con modificaciones en el metabolismo celular y daños en la membrana espermática ([Hammerstedt y col., 1990](#); [Abraham-Peskir y col., 2000](#)).

Aceptado: 05.03.2002.

Un aspecto fundamental en el uso de semen congelado/descongelado en técnicas de biotecnología reproductiva lo constituye la adecuada evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides ([Anzar y Graham, 1995](#)). En nuestro país, por ejemplo, se han seleccionado y recuperado espermatozoides móviles, morfológicamente normales y con acrosoma intacto para fecundación *in vitro* ([Risopatrón y col., 1994](#); [De los Reyes y col., 1996](#)). Sin embargo, en medicina veterinaria, en la evaluación de rutina del semen congelado/descongelado, se usan fundamentalmente parámetros físicos tales como motilidad, morfología y concentración espermática ([Hellemann y col., 1992](#)).

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 ([Hammerstedt y col., 1990](#)). La evaluación de su integridad constituye una importante información en la evaluación de la fertilidad potencial del macho ([Jeyendran y col., 1984](#)). Además, 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 ([Yanagimachi, 1993](#)).

La prueba hipoosmótica o «*hyposmotic swelling test*» ([Jeyendran y col., 1984](#)), permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas (incremento de tamaño y flagelos flectados o curvos). Se ha observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen ([Bredderman y Foote, 1969](#)).

En condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipoosmótica es un indicador más preciso que las coloraciones supravitales ([Tamuli y Watson, 1992](#)).

El propósito del presente estudio fue usar la prueba hipoosmótica como un método para evaluar la integridad de la membrana espermática en espermatozoides caninos en semen fresco y en semen congelado/descongelado. Además, estudiar la relación de dicha prueba con algunos parámetros convencionales de evaluación usados de rutina en el estudio del semen de perro.

## MATERIAL Y METODOS

*Obtención de semen.* Se colectaron 20 eyaculados mediante manipulación digital. Los donantes de semen fueron 5 perros: 2 Siberian Husky, 1 Ovejero Alemán y 2 mestizos, sexualmente maduros, con un peso promedio de  $20.8 \pm 7.2$  kg y una edad promedio de  $3.7 \pm 1.4$  años. De cada eyaculado sólo se recolectaron la primera y segunda fracción, considerando que se ha descrito que la tercera fracción presenta un efecto desfavorable en la conservación de semen a bajas temperaturas ([England y Allen, 1992b](#)), considerando especialmente que uno de los objetivos del estudio implicaba la criopreservación de los espermatozoides.

*Espermiograma.* Las muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo con la método descrito por [Díaz y Arancibia \(1971\)](#). Brevemente: se registró volumen, color, olor, motilidad progresiva con microscopio de contraste de fase (x400) y platina temperada, porcentaje de espermatozoides vivos y morfología con tinción eosina \_ nigrosina, evaluadas mediante microscopía de campo claro (x1000), y concentración espermática mediante el recuento en cámara de Neubauer y dilución 1:100 con agua destilada.

*Congelación y descongelación de semen.* El semen fue diluido lentamente con un diluyente en base a TRIS - yema de huevo (20%) - glicerol (8%) ([Gill y col., 1970](#)), hasta alcanzar una concentración promedio de  $150 \times 10^6$  espermatozoides por ml. El semen fue envasado en pajuelas de 0.25 ml (MINITÜB.), las cuales fueron rotuladas para su posterior identificación. Las pajuelas fueron enfriadas a 5°C por 2 horas, período de equilibrio, y luego puestas en vapor de nitrógeno líquido en una rampa metálica a una altura de 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 8 minutos antes de ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido. Una vez pasado este tiempo las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido y transferidas y guardadas en un termo para su almacenamiento. Para descongelar las muestras, las pajuelas fueron sumergidas en agua a 40°C por 15 segundos ([Hellemann y col., 1992](#)). Se descongelaron

y evaluaron dos pajuelas por cada eyaculado.

*Prueba hipoosmótica.* Se preparó una solución de fructosa anhidra: 0.675 g/l y citrato de sodio: 0.268g/l, calibrada a 55 mOsm/l en agua bidestilada. Cabe señalar que en el presente estudio se usó una solución de osmolaridad levemente inferior a la descrita por [Kumi-Diaka \(1993\)](#) (55 mOsm/l v/s 60 mOsm/l). Para efectuar la prueba, tanto en semen fresco como congelado/descongelado, se diluyó 10 ml de semen en 100 ml de la solución hiposmótica, luego se incubó en estufa a 37°C por 45 minutos, para finalmente determinar la proporción de células que respondieron positivamente a la prueba hipoosmótica, bajo un aumento de x100 con microscopio de contraste de fase. Se estimó como respuesta positiva de la integridad de la membrana los diferentes grados de curvatura de colas espermáticas realizando un recuento de 200 espermatozoides por muestra ([Jeyendran y col., 1984](#)).

*Evaluaciones y análisis estadístico.* Cada muestra de semen fresco fue evaluada inmediatamente después de la obtención, tanto por espermiograma convencional como por la prueba hipoosmótica. En el semen congelado/descongelado se evaluó motilidad progresiva y prueba hipoosmótica. Para el análisis estadístico los porcentajes de motilidad progresiva y de células con curvatura de la cola fueron transformados por el método de Bliss y luego se calcularon las correlaciones y compararon las medias por la prueba de t o de comparación múltiple de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En general, la respuesta de los perros a la recolección del semen con estimulación manual fue satisfactoria, es decir, fue posible colectar el semen en todos los donantes. Los resultados del espermiograma, así como el porcentaje de espermatozoides que respondieron a la prueba hipoosmótica en el semen fresco, se presentan en el [cuadro 1](#).

### CUADRO 1. Espermiograma y respuesta a la prueba hipoosmótica en semen canino fresco (n=20).

Semen evaluation and hypoosmotic test (n=20).

Variable Seminal	Promedio $\pm$ D. E.	Coeficiente de Variación (%)
Volumen (ml)	1.9 $\pm$ 0.87	45.8
Motilidad Progresiva (%)	83.8 $\pm$ 9.5	11.3
Vitalidad Espermática (%)	92.0 $\pm$ 4.7	5.1
Morfología Normal (%)	83.5 $\pm$ 20.3	24.3
Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml)	324.7 $\pm$ 188.5	58.1
Respuesta a prueba hipoosmótica (%)	87.9 $\pm$ 8.1	9.2

Se obtuvo un volumen seminal promedio de 1.9  $\pm$  0.9 ml, colectando sólo la primera y segunda fracción de los eyaculados. Este valor es similar a lo descrito por [Boucher y col. \(1958\)](#) y [England y Allen \(1989\)](#). Cabe señalar que el plasma seminal afecta negativamente la viabilidad de los espermatozoides preservados a temperatura ambiente y refrigerados ([England y Allen, 1992b](#); [Sánchez y col., 1995](#); [Rota y col., 1995](#)).

La motilidad espermática evaluada en este estudio alcanzó un valor promedio de 83.8% (rango 60 - 90%), destacando que en sólo dos eyaculados la motilidad progresiva fue inferior a 70%, valor considerado como mínimo para una buena calificación reproductiva en perros ([Feldman y Nelson, 1996](#)). Los valores de motilidad progresiva encontrados fueron similares a los descritos por [Taha y col. \(1983\)](#), [England y Allen \(1989\)](#) y [Sánchez y Rubilar \(2001\)](#), quienes señalan porcentajes de entre 80 y 90%. Sin embargo, [Tello y col. \(1988\)](#), usando vagina artificial, obtuvieron un 72.8 y 49.7% de motilidad en perros de raza Ovejero Alemán de 3 y 4 años respectivamente. Al respecto, [Boucher y col. \(1958\)](#) describen mejor calidad seminal en la recolección con manipulación digital versus vagina artificial, esto fundamentalmente considerando aspectos tales como motilidad progresiva, concentración espermática y volumen seminal.

El porcentaje de espermatozoides vivos fue similar a los reportados por [England y Allen \(1992a y 1992b\)](#). Esta característica fue la que presentó menor variabilidad (coeficiente de variación 5.1%). [Díaz y Arancibia \(1971\)](#) indican que valores sobre 75% de espermatozoides vivos permiten estimar a un eyaculado como de buena calidad.

La morfología espermática, considerando el porcentaje de espermatozoides normales obtenidos (83,5%), fue levemente inferior al reportado por [Tello y col. \(1988\)](#) y [Thomas y col. \(1993\)](#). Sin embargo, este valor se considera adecuado para una buena calificación reproductiva en perros adultos, por cuanto es superior al 70% ([Feldman y Nelson, 1996](#); [Farstad, 1998](#)). En el 90% de los eyaculados (18/20) se encontró sobre un 80% de espermatozoides normales; el coeficiente de variación de 24.3% obtenido se puede explicar por el efecto de eyaculados con valores de 18.7 y 30.3% de células morfológicamente normales, respectivamente.

La concentración espermática promedio registrado en este estudio fue de  $325 \times 10^6 \pm 188$  espermatozoides por ml, cifra que se encontraría dentro del rango normal para perros adultos ([Feldman y Nelson, 1996](#); [Farstad, 1998](#)). Según [Feldman y Nelson \(1996\)](#) un perro de tamaño medio con menos de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totales por eyaculado es sospechoso de problemas de fertilidad. Sólo dos eyaculados presentaron valores inferiores a  $200 \times 10^6$  espermatozoides totales y estos coincidieron con baja motilidad progresiva. Esta variable seminal fue la que presentó el mayor coeficiente de variación (58.1%), lo que se podría explicar por el efecto de factores como raza, tamaño testicular, reserva espermática extragonadal, frecuencia de eyaculación y edad ([Olar y col., 1983](#); [England, 1999](#)).

La respuesta de los espermatozoides sometidos a la prueba hipoosmótica, alcanzó un valor de  $87.9 \pm 8.1\%$ , la cual fue similar a lo descrito en espermatozoides caninos ([Kumi-Diaka, 1993](#)), espermatozoides humanos ([Jeyendran y col., 1984](#)), espermatozoides bovinos ([Correa y col., 1997](#)) y espermatozoides equinos ([Elgueta, 1992](#)). Luego de ser sometidos a la prueba hipoosmótica los espermatozoides exhibieron cambios morfológicos evidenciados por curvatura de la cola y pieza media, lo cual concuerda con las observaciones de [Kumi-Diaka \(1993\)](#) y [Rota y col. \(1995\)](#). Las correlaciones obtenidas entre la respuesta al HOST y algunos parámetros convencionales de evaluación seminal fueron las siguientes: HOST v/s Motilidad Progresiva  $r = 0.65$  ( $p < 0.01$ ); HOST v/s espermatozoides vivos  $r = 0.61$  ( $p < 0.01$ ) y HOST v/s espermatozoides normales  $r = 0.85$  ( $p < 0.01$ ). Estos valores concuerdan con lo observado para espermatozoides caninos ([England y Plummer, 1993](#); [Kumi-Diaka, 1993](#); [Rodríguez-Gil y col., 1994](#)), humanos ([Jeyendran y col., 1984](#)) y equinos ([Elgueta, 1992](#)) y permiten señalar que la prueba hipoosmótica estima de manera eficiente la fertilidad potencial del semen canino, y dado su bajo costo y facilidad de realización, podría sugerirse su implementación para el análisis seminal de rutina en clínica reproductiva de animales pequeños.

De los eyaculados obtenidos sólo se procesaron 18 para congelación (90%), ya que 2 de ellos presentaron parámetros seminales considerados como insatisfactorios para ser sometidos a este proceso. Es decir, motilidad progresiva  $< 70\%$ , espermatozoides morfológicamente normales  $< 70\%$  y concentraciones totales por eyaculado  $< 200 \times 10^6$  espermatozoides ([Feldman y Nelson, 1996](#)). La concentración espermática promedio por dosis (0.25 ml) usada en el presente estudio fue de  $38 \times 10^6$ , lo cual coincide con [Seager y Fletcher \(1973\)](#) y [Nöthling y col. \(1995\)](#); si bien algunos autores describen el uso de pajuelas de 0.5 ml con concentraciones espermáticas que fluctúan entre 50 y  $100 \times 10^6$  espermatozoides por dosis ([Rota y col., 1995](#); [Silva y col. 1996](#); [Ström y col., 1997](#)). El valor de  $38 \times 10^6$  espermatozoides por dosis de nuestro estudio, sería comparable con estos últimos trabajos si se considera que estos tienen el doble de volumen por dosis.

El porcentaje de motilidad progresiva promedio obtenido en el semen congelado/descongelado fue de  $47.4 \pm 17.6\%$  ([cuadro 2](#)), con un rango entre 10 y 70%, destacando el hecho de que sólo un 33.3% de los eyaculados procesados (6/18) presentaron valores de motilidad progresiva inferiores a 50%. Los valores de motilidad progresiva en el semen canino congelado/descongelado, usando diluyentes con glicerol fluctúan entre 30 y 70% ([Foote, 1964](#); [Platz y Seager, 1977](#); [Province y col., 1984](#); [Hay y col. 1997](#)). Si bien los resultados de nuestro estudio son similares a los reportados por estos autores, cabe señalar que el uso de diferentes diluyentes y velocidades de congelación y descongelación dificultan las comparaciones en términos de lo exitoso del método de congelación.



Respecto a la respuesta al HOST en el semen descongelado se obtuvo un promedio de  $53.7 \pm 13\%$  ([cuadro 2](#)) de espermatozoides curvados, valor muy similar al descrito por [Kumi-Diaka \(1993\)](#). La diferencia en la respuesta a la prueba hipoosmótica entre el semen fresco y el descongelado se podría explicar por daño en la membrana espermática durante el proceso de congelación \_ descongelación ([Parks y Graham, 1992](#)). La correlación obtenida para las variables motilidad progresiva y respuesta a la prueba hipoosmótica en el semen congelado/descongelado fue alta y significativa  $r = 0.88$  ( $p < 0.01$ ), valor que resultó superior a la correlación del semen fresco ( $r = 0.66$ ), lo que indicaría una asociación más estrecha de estas características en el semen congelado/descongelado y probablemente una mayor relación con la capacidad fecundante de los espermatozoides.

**CUADRO 2. Valores de Motilidad progresiva y respuesta a la prueba hipoosmótica en semen canino congelado/descongelado (n = 18).**

Progressive motility and hypoosmotic test in frozen/thawed canine semen (n = 18).

Variable Seminal	Semen congelado	Semen fresco
Motilidad Progresiva (%)	$47.9 \pm 16.6$	$83.8 \pm 9.5$
Respuesta a Prueba Hipoosmótica (%)	$53.7 \pm 13.0$	$87.9 \pm 8.1$
Correlación entre Motilidad Progresiva y Respuesta a la Prueba Hipoosmótica	$r = 0.88$ ( $p < 0.01$ )	$r = 0.66$ ( $p < 0.01$ )

Los resultados de este trabajo permiten destacar el uso de la prueba hipoosmótica como un método simple para evaluar la integridad de la membrana espermática en espermatozoides caninos en semen fresco y en semen congelado/descongelado, así como establecer algunas relaciones entre dicha prueba y algunos parámetros convencionales de evaluación usados de rutina en el estudio de fertilidad del macho hipoosmótica en el semen descongelado fue alta y significativa  $r = 0.88$  ( $p < 0.01$ ), valor que resultó ser superior a la correlación obtenida en el semen fresco  $r = 0.66$  ( $p < 0.01$ ), lo que indicaría una asociación más estrecha de estas características en el semen congelado/descongelado y probablemente una mayor relación con la capacidad fecundante de los espermatozoides. En conclusión, la prueba hipoosmótica resultó un método simple y económico para evaluar la integridad de la membrana espermática en espermatozoides caninos en semen fresco y en semen congelado/descongelado. Así también se pudieron establecer algunas relaciones entre dicha prueba y parámetros convencionales de evaluación, usados de rutina en el estudio de fertilidad del macho canino. Además es importante destacar que este trabajo constituiría uno de los primeros en su tipo a nivel nacional, particularmente en lo referido a la criopreservación de semen de perro.

## BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM-PESKIR, J., E. CHANTLER, E. UGGERHØJ. 2000. Significance of plasmalemma disruption in bovine and equine spermatozoa. *Theriogenology* 54: 1075-1086.
- ANZAR, M., E. GRAHAM. 1995. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology* 43: 439-449.
- BOUCHER, J., R. FOOTE, R. KIRK. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet.* 48: 67-86.
- BREDDERMAN, P., R. FOOTE. 1969. Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *J. Anim. Sci.* 28: 496-501.
- CORREA, J., M. PACE, P. PAVOS. 1997. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48: 721-731.

- DE LOS REYES, M., C. ALMENDRA, M. BERLAND, H. DEL CAMPO, C. BARROS. 1996. Selección de espermatozoides de toro para fecundación *in vitro*. *Arch. Med. Vet.* 27: 31-38.
- DIAZ, O., C. ARANCIBIA. 1971. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. Santiago, Chile, Eds. Vera-Gianini.
- ELGUETA, M. 1992. Evaluación y adaptación de la prueba hipoosmótica del semen de potro. Tesis M.V., Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1989. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet. Rec.* 125: 399.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1992a. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology* 37: 363-371.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1992b. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 37: 373-381.
- ENGLAND, G., J. PLUMMER. 1993. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47: 261-270.
- ENGLAND, G. 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short interval second ejaculation. *Theriogenology* 52: 981-986.
- FARSTAD, W. 1998. Mating and artificial Insemination in the Dog. En: Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom, pp. 95-103.
- FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
- FELDMAN, E., R. NELSON. 1996. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W. B. Saunders Co., Philadelphia, USA.
- FOOTE, R. 1964. Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.* 25: 37-39.
- GILL, H., C. KAUFMAN, R. FOOTE, R. KIRK. 1970. Artificial insemination of beagles bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen semen. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1807-1813.
- HAMMERSTEDT, R., J. GRAHAM, J. NOLAN. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11. 73-88.
- HAY, M., W. KING, C. GARTLEY, S. LEIBO, K. GOODROWE. 1997. Canine spermatozoa \_ cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48: 1329-1342.
- HELLEMANN, C., M. GONZÁLEZ, A. GUZMÁN. 1992. Efecto de yema de huevo en polvo, un surfactante y centrifugación en la sobrevida de espermatozoides caprinos congelados. *Arch. Med. Vet.* 24: 141-148.
- HOLT, W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- JEYENDRAN, R., H. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAES, B. CRABO, L. ZANEVELD. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.
- KUMI-DIAKA, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
- NÖTHLING, J., C. GERSTENBERG, D. VOLKMANN. 1995. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen \_ A retrospective study. *Jl. S. Afr. Vet. Ass.* 66: 49-55.
- OLAR, T., R. AMMAN, B. PICKETT. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal reserves of the dog. *Biol. Reprod.* 29: 1114-1120.



- PARKS, J., J. GRAHAM. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- PLATZ, C., S. SEAGER. 1977. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.* 27: 1013-1016.
- POLGE, C., A. SMITH, A. PARKES. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- PROVINCE, C., R. AMANN, B. PICKETT, E. SQUIRES. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22: 409-415.
- RISOPATRON, J., R. SANCHEZ, N. SEPULVEDA, E. VILLAGRAN, P. PEÑA. 1994. Selección de espermatozoides de bovino desde semen congelado-descongelado: comparación de dos métodos. *Arch. Med. Vet.* 26: 35-40.
- RODRIGUEZ-GIL, J., A. MONTSERRAT, T. RIGAU. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42: 815-829.
- ROTA, A., B. STRÖM, C. LINDE-FORSBERG. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44: 885-900.
- SANCHEZ, A., W. VON FREY, M. DE LOS REYES. 1995. Efecto de diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. *Vet. Arg.* 113: 172-178.
- SANCHEZ, A., J. RUBILAR. 2001. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. *Arch. Med. Vet.* 33: 105-110.
- SEAGER, S., W. FLETCHER. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.* 92: 6-10.
- SILVA, L., K. ONCLIN, B. LEJEUNE, J. VERSTEGEN. 1996. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 138: 154-157.
- STRÖM, B., A. ROTA, C. LINDE-FORSBERG. 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.
- TAHA, M., D. NOAKES, W. ALLEN. 1983. The effect of the frequency of the ejaculation on seminal characteristics and libido in the beagle dog. *J. Small Anim. Pract.* 24: 309-315.
- TAMULI, M., P. WATSON. 1992. Effect of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubated for up to 24 hours. Proc. 12<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod. AI. 1484-1486.
- TELLO, L., M. DE LOS REYES, A. BERNAL. 1988. Descripción de algunas características seminales en caninos de raza ovejero alemán. *Avances en Cs. Vet.* 3: 52-56.
- THOMAS, P., R. LARSEN, J. BURNS, C. HAHN. 1993. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 40: 1199-1205.
- YANAGIMACHI, R. 1993. Mammalian Fertilization. Physiology of Reproduction. En: Knobil, E., J. Neil. Ed. NY Raven Press, pp. 189-317.

