

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola Animal
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Protocolo de servicio social:

“Evaluación espermática de muestras obtenidas de cola de epidídimo de perros”.

Presentadora del servicio social

Ruiz Ortega Margarita

Matrícula: 2163023454



Asesor interno:



Alejandro Ávalos Rodríguez

N.E. 26809

Lugar de realización: Laboratorio de Bioquímica de la reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco. Fecha de inicio y término: 25 de Junio a 25 de Diciembre de 2022

ÍNDICE

1.- Resumen	3
2.- Introducción	3
3.- Justificación	3
4.- Marco teórico.....	3
4.1.- Espermatogénesis	3
4.2.- Recuperación post orquiectomía	4
4.3.- Calidad espermática	5
3.4.- Crioconservación	6
5.- Objetivos.....	7
5.1.- Objetivo general.....	7
5.2.- Objetivos específicos.....	7
6.- Metodología.....	7
6.1.- Intervención quirúrgica	8
6.2.- Recuperación de espermatozoides.....	9
6.3.- Pruebas seminales	11
7.- Actividades realizadas	12
8.- Objetivos y metas alcanzadas	12
9.- Resultados discusión y conclusiones.....	12
10.- Recomendaciones	15
11.- Literatura citada.....	15

1.- Resumen

Se realizaron esterilizaciones en diversos puntos de la ciudad de México en donde se recolectaron testículos con sus respectivos conductos deferentes los cuales se pesaron y posteriormente se recolectaron muestras espermáticas por medio de lavado retrogrado; de los cuales, se analizó motilidad progresiva, vitalidad y se contabilizó el número de espermatozoides por campo.

2.- Introducción

Una vez que los espermatozoides llegan a la cola del epidídimo, se les considera maduros ya que tienen la forma definitiva, la capacidad de moverse y de fecundar un ovocito desnudo; Se sabe que en mamíferos la recolección de estos espermatozoides se puede hacer directamente de la cola del epidídimo una vez realizada la orquiectomía, de esta manera se aprovechan los espermatozoides de cola de epidídimo obteniendo muestras que pueden ser utilizadas para inseminación artificial o bien crioconservación para su uso en posteriores técnicas de reproducción artificial.

En el presente trabajo se realizó la recuperación espermática post-orquiectomía de 26 muestras y se analizó la movilidad y vitalidad de éstas. Los resultados se presentan en porcentajes de 68% y 87% respectivamente.

3.- Justificación

La colecta y preservación del semen canino es importante para la conservación de reproductores potenciales que, debido a algún percance se les tenga que realizar una orquiectomía de emergencia.

4.- Marco teórico

4.1.- Espermatogénesis

La espermatogénesis se refiere al proceso por el cual se desarrollan y transforman las células gaméticas del macho de forma cíclica en los túbulos seminíferos. Gobello y wanke (2006) mencionan que “la espermatogénesis se relaciona con el volumen testicular y este a su vez, con el tamaño del perro” así pues, mientras mas grande sea el perro, su producción espermática será mayor; el ciclo espermatogénico se

conforma de tres fases: Espermatocitogénesis, Meiosis y espermiogénesis, una vez terminado esta última fase, los espermatozoides son liberados hacia el lumen de los túbulos seminíferos y transportados hacia el epidídimo.

En el epidídimo se realizan dos eventos importantes, la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides ocurre en el tránsito de la cabeza y el cuerpo del epidídimo, mientras que el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo en donde se pueden considerar potencialmente fértiles (Ávalos *et al.*, 2018; Porras y Páramo., 2009).

4.2.- Recuperación post orquiectomía

La recuperación post mortem o post orquiectomía permite recuperar material genético de buena calidad para posteriormente usarlo en inseminación artificial ya sea en fresco o congelado y almacenado en nitrógeno.

Para la recuperación de espermatozoides de cola de epidídimo el procedimiento es el siguiente:

- Se localiza la cola del epidídimo y conducto deferente en los testículos.
- Se hace la disección tanto del conducto deferente como del epidídimo.
- Se limpia con una gasa para retirar la mayor parte de solución o sangre y evitar contaminación de la muestra.
- El tejido se coloca en un tubo cónico graduado, dejando el conducto deferente fuera del tubo.
- Se realiza una incisión con una navaja de bisturí en la región más craneal de la cauda epididimaria.
- Con una jeringa de 5 ml de medio de extracción se procede a realizar un lavado retrogrado introduciendo la aguja por la luz del conducto deferente.
- Una vez obtenida la muestra se procede a realizar la evaluación de esta (Ávalos *et al.*, 2018).

4.3.- Calidad espermática

Las características microscópicas son de suma importancia para la valoración de la calidad espermática, por lo que un buen manejo es indispensable para evitar resultados erróneos por lo que se recomienda que todo el material para su evaluación sea de vidrio y se encuentre a una temperatura de 37°C (Acurio, 2019).

Las características que se evalúan son las siguientes:

- **Motilidad:** Se evalúa colocando una gota de semen entre un portaobjetos y un cubreobjetos previamente calentado, se le lleva al microscopio en objetivo de 400x. se deben observar espermatozoides con movimiento progresivo, flagelar en progresión rápida y lineal. Se clasifica de acuerdo al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. La motilidad en semen fresco debe oscilar entre los 70-95 % para que sea considerado de buena calidad y la motilidad seminal post-congelación se describen valores superiores a 50% para considerar que tiene buena calidad (Cuoto y Nelson, 2010; Avalos 2018).
- **Vitalidad:** Se evalúa a través de una tinción de eosina-nigrosina al 2% donde se pueden apreciar los espermatozoides vivos de los muertos. El semen fresco es considerado de buena calidad cuando tiene un 90 a 95% de vitalidad, mientras que, el semen crioconservado debe de poseer mínimo un 80% de vitalidad para ser aceptable (Acurio, 2019).
- **Morfología:** Para evaluar la morfología espermática se debe de tomar en cuenta dos tipos de anormalidades; las primarias que son anomalías producidas en el testículo durante la espermatogénesis y las secundarias son a causa de errores de manipulación del semen por parte del examinador al momento de la obtención del mismo o durante el tránsito a través del sistema ductal. Se emplean colorantes vitales para la observación, una de las tinciones más utilizada es la de eosina-nigrosina al 2%. El porcentaje normal de anormalidades primarias es de 10-15% mientras que de anormalidades secundarias es de 10-20% (Tello, 2015; Alamo, 2007; Jurado *et al.*, 2008).
- **Concentración espermática:** Es el número de espermatozoides existentes en el semen. Para el conteo de estos, se utiliza una cámara de Neubauer y el

recuento se hace por medio de un microscopio de luz. La concentración de espermatozoides normal es de $100 - 500 \times 10^6/\text{ml}$ (Cunningham y Klein, 2009).

3.4.- Crioconservación

El semen puede usarse en fresco para inseminación inmediata, se puede refrigerar a 5°C o se puede criopreservar y mantener en tanques de nitrógeno líquido a -196°C , éste último método le da a los espermatozoides una limitada viabilidad post-descongelación (Armas, 2009). Para prevenir a los espermatozoides del estrés osmótico se utilizan agentes crioprotectores cuya función es disminuir el punto eutéctico (punto de solidificación) de modo que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, lo que implica que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que estarán sometidos será menor. Estos crioprotectores se clasifican de acuerdo a la permeabilidad celular como:

- Crioprotectores no penetrantes: son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.
- Crioprotectores penetrantes: Son sustancias permeables a través de la membrana debido a su de bajo peso molecular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (Avalos *et al.*, 2018).

El método de congelación más usado en caninos es el descrito por Andersen en 1975; En el cual se realiza una dilución del semen a 37°C Con un dilutor Tris, yema de huevo y glicerol. En seguida, se procede a un periodo de equilibrio de tres horas, seguido del envase en pajillas plásticas y a la exposición a los vapores de nitrógeno para la congelación (Armas, 2009).

5.- Objetivos

5.1.- Objetivo general

Obtener y evaluar muestras seminales de cola de epidídimo de perros de diferentes tamaños

5.2.- Objetivos específicos

Realizar orquiectomías de calidad

Recuperar muestras espermáticas de cola de epidídimo post orquiectomía

Valorar las características espermáticas de las muestras

Obtener la concentración espermática de las muestras recolectadas en cola de epidídimo

Ejecutar la crioconservación de semen en perros

6.- Metodología

El presente trabajo se realizó de manera presencial en campañas de esterilización organizadas por la fundación "BIOCAN SALVANDO VIDAS" y por campañas organizadas por el programa "DEJANDO HUELLA" de la alcaldía de Xochimilco; se obtuvieron muestras de perros de diferentes tamaños con un promedio de edad de 2-7 años.

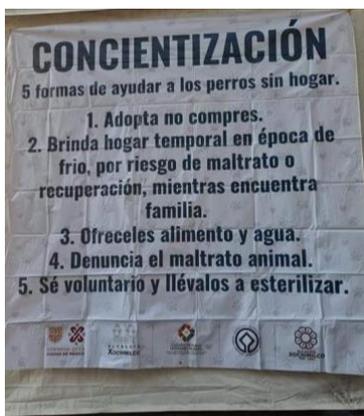


Ilustración 1. Pancarta del programa "Dejando huella".



Ilustración 2. Pancarta de la organización "BIOCÁN SALVANDO VIDAS"

6.1.- Intervención quirúrgica

El desarrollo de orquiectomías se realizó siguiendo los protocolos anestésicos en perros, empleando los fármacos: xilazina, tiletamina y zolazepam por medio de una inyección intramuscular profunda.



Ilustración 3. Esterilización realizada en una de las campañas.



Ilustración 4. Esterilización realizada en la alcaldía Xochimilco

Inmediatamente después de la orquiectomía cada testículo con su respectivo epidídimo y conducto deferente se colocaron en bolsas de plástico con 20 mL de solución salina fisiológica y se almacenaron a 5°C durante 24 horas.

6.2.- Recuperación de espermatozoides

La recuperación se realizó según el método descrito por Ávalos., *et al* (2018).

Se realizó un lavado de los testículos y su respectivo pesaje; posteriormente se localizó la cola del epidídimo y conducto deferente en los testículos, se diseccionó tanto el conducto deferente como la cauda epididimaria y posteriormente se retiró la mayor parte de solución o sangre con una gasa para evitar contaminación de la muestra; posteriormente se realizó el pesaje de este tejido.



Ilustración 5. Peso del testículo completo.



Ilustración 6. Resección de la cola del epidídimo y conducto deferente.



Ilustración 7. peso del conducto deferente y cola del epidídimo.

Se realizó una incisión en la cola del epidídimo; se colocó el tejido en un tubo cónico graduado, dejando el conducto deferente fuera del tubo, con una jeringa de 3 ml de solución salina fisiológica se realizó un lavado retrogrado introduciendo la aguja por la luz del conducto deferente.

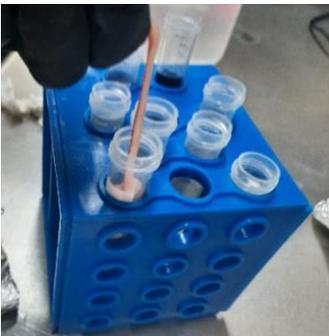


Ilustración 8. Introducción de la cola del epidídimo en el tubo graduado.



Ilustración 9. Introducción de la aguja por la luz del conducto deferente.



Ilustración 10. resultado del lavado retrogrado

6.3.- Pruebas seminales

La movilidad progresiva se evaluó depositando una gota de 15 μ l sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para observar a un aumento de 40X al menos cinco campos en diferentes sitios de la preparación, con la intención de homogenizar un criterio general y estimar el porcentaje de espermatozoides con movimiento.

El recuento de espermatozoides se realizó haciendo tinciones con eosina-nigrosina, se dejaron secar y posteriormente se realizó una observación en el microscopio óptico a un aumento de 40X en cinco diferentes campos para observar espermatozoides y se contabilizó el número de espermatozoides en total y también se hizo la diferenciación vivos y muertos para medir también vitalidad

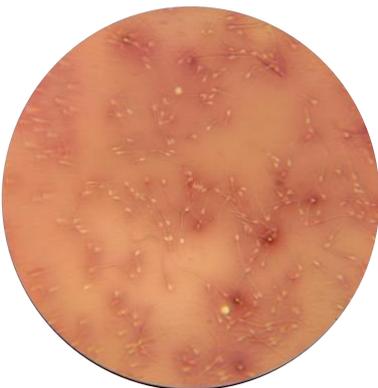


Ilustración 11. Evaluación de viabilidad espermática con la tinción eosina-nigrosina bajo el objetivo de 40X

7.- Actividades realizadas

Se realizaron esterilizaciones en diversos puntos de Iztapalapa, Tulyehualco y Xochimilco.

En total se realizaron las esterilizaciones de 43 hembras y 24 machos.

Para las muestras espermáticas, se excluyó a perros monorquideos, criptorquideos y aquellos que no fueron clínicamente sanos; del resto de machos se recolectaron gónadas que se analizaron en el Laboratorio de Bioquímica de la reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco.

8.- Objetivos y metas alcanzadas

Durante el periodo de Junio a Noviembre se realizaron las orquiectomías de manera exitosa y sin contratiempos; se obtuvieron 26 muestras espermáticas de cola de epidídimo las cuales se analizaron de manera que se pudieran visualizar las características y concentraciones de las muestras; Desafortunadamente, la crioconservación no se pudo realizar debido a la falta de insumos y tiempo para el presente trabajo.

9.- Resultados discusión y conclusiones.

En total de se obtuvieron 26 muestras de las cuales el promedio de Movilidad progresiva de los porcentajes obtenidos en el presente trabajo fue del 68%; Santiani et al. (2020) encontró valores similares en perros de raza. Niveles inferiores se han Reportado en los estudios realizados por Restrepo *et al.* (2017) donde se encontraron porcentajes del 26.3% y en estudios realizados por Armas (2009) se encontró un promedio de 55.5%

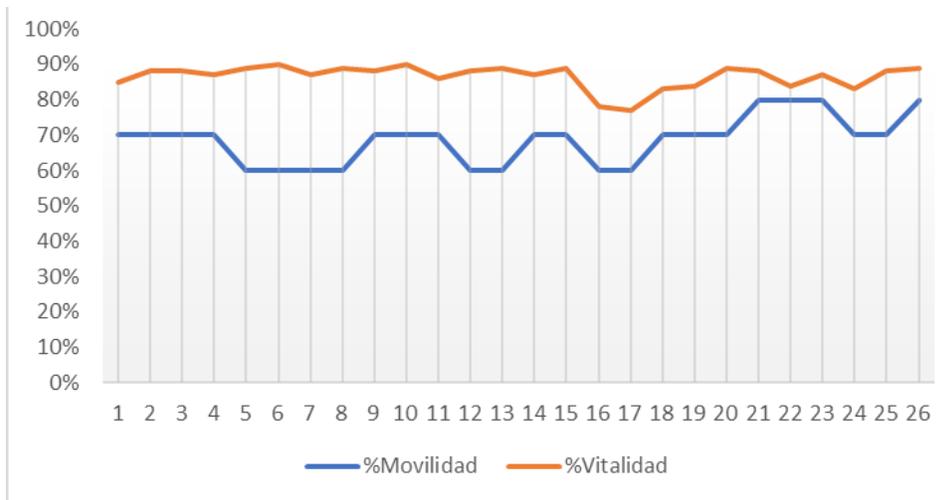


Gráfico 1. Porcentajes de vitalidad y motilidad de las muestras.

El porcentaje de vitalidad fue en promedio de 87% valores similares a los encontrados por Cheuqueman (2012) cuyos valores fueron de 82% en perros de razas labrador, Pastor alemán y Golden retriever; en un estudio realizado en 3 perros de raza se encontró una vitalidad de 94.66% (Bonilla y Ballesteros., 2007)

En ambos parámetros estas variaciones podrían deberse a la diferencia de razas, edad y manipulación de las muestras.

En cuanto al peso, se realizaron pesajes dado que según Boniila y Ballesteros (2007) A medida que el peso (tamaño testicular) incrementa, también se incrementa la producción espermática diaria.

Inicialmente se realizó una gráfica en donde se observa el peso total del testículo y el peso de su respectiva cauda epididimaria. Cabe mencionar que el 26% de las muestras pesó menos de 10 gramos.

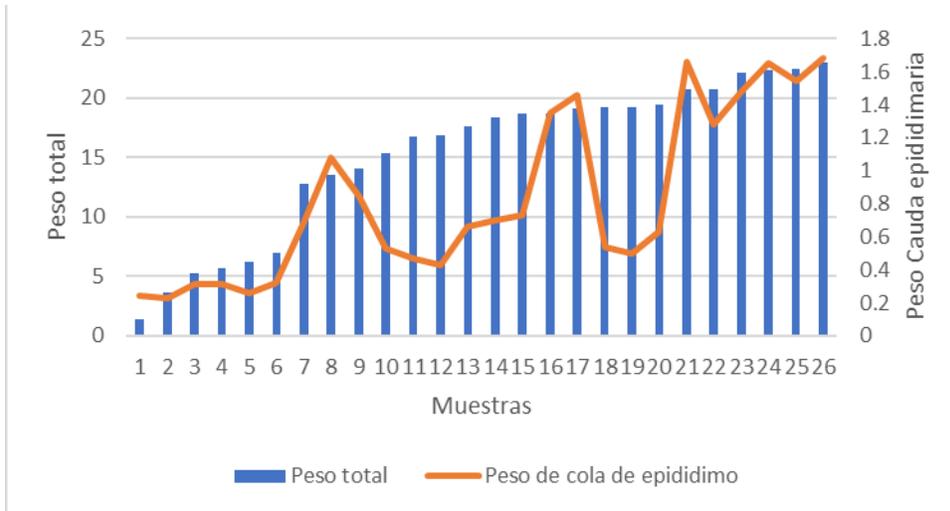


Gráfico 2. Peso testicular y de cola de epididimo.

También se realizó una grafica en donde se organizaron las muestras por su peso total y se agregaron los pesos de sus respectivas caudas epididimarias y el promedio de espermatozoides observados en cada uno.



Gráfico 3. Peso testicular y no. espermatozoides por campo.

Las muestras se organizaron de menor a mayor peso, las primeras 6 muestras tuvieron un peso menor a 10 gramos; sin embargo, en el presente estudio no se observó una relación entre el peso testicular con la cantidad de espermatozoides.

10.- Recomendaciones

Se recomienda para futuras investigaciones, organizar las muestras por tamaño, teniendo en cuenta el peso del perro y su altura a la cruz; también se recomienda ampliar el número de muestras para hacer la discriminación por tamaño.

11.- Literatura citada

Acurio, A. (2019). CRIOCONSERVACION DE SEMEN EN PERROS DOMESTICOS (Canis Lupus Familiaris), EN LA CLINICA ANIMAL KINGDOM [Tesis de licenciatura]. Universidad Técnica de Cotopaxi.

Alamo, D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152°C. [Tesis de doctorado]. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Armas, S. (2009). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. [Tesis de licenciatura] Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Avalos, A., Ganzáles, J., Vargas, A., Herrera, J. (2018). Recolección y manipulación seminal. Universidad Autónoma Metropolitana.

Bonilla, C., Ballesteros, R. (2007). Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente tris glucosa yema de huevo. Universidad de La Salle

Cheuquemán, C., Bravo, P., Treulén, F., Giojalas, L., Villegas, J., Sánchez, R., Risopatrón, J. (2012) Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reprod Domest Anim.* 47(1).

Couto, C., Nelson, R. (2010). Transtornos de fertilidad en machos. *Medicina interna de pequeños animales*, 4 Edición. ELSEVIER

Cunningham, J. Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. 4 edición. ELSEVIER

Gobello, C., Wanke, M. (2005). *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Editorial inter-medica S.A. Primera edición. 27-31.

Jurado, S., Sarmiento, P., Stornelli, A.(2008). La microscopia electrónica como herramienta en la evaluación del semen canino. *Rev. Analecta Veterinaria* 28 (1) 7-14. Consultado en 2022 de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11211/Documento_completo.pdf?sequence=1#:~:text=Microscop%C3%ADa%20electr%C3%B3nica%20en%20sem en%20canino,-13&text=Concluimos%20que%20la%20microscop%C3%ADa%20elec,especies%20animales%20y%20el%20hombre.

Pineda, M., Dooley, M. (1991). Métodos para la recolección de semen en el gato doméstico. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 6(1). Consultado en 2022 de: <https://derechoyhumanidades.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4622>

Santiani, A., Pérez- Rosales, M., & Challco, C. (2020). Caracterización básica y funcional del semen del Perro sin Pelo del Perú. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(4), Consultado en 2022 de: <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19251>

Restrepo, G., Madrid, C., Prieto, L., Duque, J., Usaga, A. (2017). Congelación de semen epididimal canino con yema de huevo centrifugada. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*. 28(4).