

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

**EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO EN  
CANINOS.**

Prestador de servicio social:  
Martínez García Julio Cesar  
Matricula: 209372579

Asesores:  
Interno: Dr. Javier Lorenzo Olivares Orozco  
Num. Económico: 6288

Externo: MVZ. Emmanuel Garay Salinas  
Céd. Profesional: 7931834

Lugar de Realización:

Federación Canófila Mexicana, A.C. ubicado en Zapotecas No. 29 colonia  
Tlalcoligia CP. 14430 México, D.F.

Fecha de inicio y término:

Del 15 de Julio de 2014 al 15 de Enero de 2015

## INDICE

1.- RESUMEN.....	3
<u>2.- INTRODUCCIÓN.....</u>	4
<u>3.- MARCO TEORICO .....</u>	5
<u>3.1- EXAMEN ANDROLÓGICO COMPLETO.....</u>	5
<u>3.1.1- Evaluación del macho.....</u>	5
<u>3.1.2.- Historia Clínica.....</u>	5
<u>3.1.3.- Examen físico general .....</u>	6
<u>3.1.4.- Evaluación del aparato reproductor .....</u>	6
<u>3.1.5.- Evaluación del eyaculado .....</u>	8
<u>3.2.- Gametogénesis en el perro.....</u>	11
<u>3.2.1.- Espermatogénesis .....</u>	11
<u>3.2.2.- Espermatocitogénesis.....</u>	11
<u>3.2.3.- Espermiogénesis .....</u>	12
<u>3.2.4.- Espermiación .....</u>	12
<u>3.3.- Morfología del espermatozoide.....</u>	12
<u>3.4.- Técnicas para la conservación y criopreservación de semen canino. ....</u>	13
<u>4.- OBJETIVOS.....</u>	14
<u>4.1.- GENERAL:.....</u>	14
<u>4.2.- ESPECIFICOS:.....</u>	15
<u>5.- METODOS.....</u>	15
<u>6.- ACTIVIDADES REALIZADAS.....</u>	16
<u>7.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS.....</u>	17
<u>8.- RESULTADOS .....</u>	17
<u>9.- DISCUSIÓN.....</u>	19
<u>10.- CONCLUSIÓN.....</u>	20
<u>11.- RECOMENDACIONES.....</u>	20
<u>12.- BIBLIOGRAFIA.....</u>	21

## RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar los cambios que presentaba el semen canino en tres estados: fresco, refrigerado y congelado para la inseminación artificial. Se utilizaron 6 machos caninos (3 de raza Bulldog francés y 3 de raza Pug) de edades entre los 2-5 años, clínicamente sanos y antecedentes de camadas anteriores. Las muestras se obtuvieron utilizando la técnica de mano enguantada, cada eyaculado fue evaluado mediante el sistema de análisis computarizado de semen CASA, (Computer assisted semen analysis) en fresco, refrigerado y congelado. Los valores fueron bastante uniformes entre los machos, mostrando un porcentaje menor a los rangos ideales (>70%) en la raza Pug en relación con el Bulldog Frances, así mostrando el descenso de la motilidad en relación semen fresco-semen refrigerado (SF-SR) y semen fresco-semen congelado (SF-SC) se mostraron disminución en ambos casos de motilidad según lo esperado en un proceso de criopreservación, comportándose de forma similar en concentración y mortalidad.

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the changes in canine semen in three states: fresh, refrigerated and frozen for artificial insemination. We used 6 canine (3 French Bulldog breed and 3 Pug breed) aged between 2-5 years, clinically healthy and history of previous litters. The samples were obtained using the gloved hand technique, each ejaculate was evaluated using the computerized semen analysis system CASA (Computer assisted semen analysis) in fresh, refrigerated and froze The values were quite uniform among the males, showing a percentage lower than the ideal ranges (>70%) in the Pug breed compared to the French Bulldog, thus showing a decrease in motility in relation to fresh semen-refrigerated semen (FS-RS) and fresh semen-frozen semen (FS-FS) showed a decrease in motility in both cases as expected in a cryopreservation process, behaving similarly in concentration and mortality.

---

## INTRODUCCIÓN

La reproducción canina es un proceso biológico sexual en el que interactúan el macho y la hembra para producir crías, estos cachorros serán genéticamente diferentes a sus padres, pero podrán heredar características de sus progenitores.

Las características fisiológicas reproductivas de los perros son diferentes a la de otras especies. Para realizar su manejo reproductivo se deben conocer principios básicos de esta especie como: clasificación reproductiva, inicio de la pubertad, madurez sexual, ciclo estral, gestación, parto, entre otras; utilizando herramientas adecuadas (citología vaginal exfoliativa, mediciones hormonales, evaluación del macho, inseminación artificial (IA), diagnóstico de gestación) para evaluarlos y diagnosticarlos (Stornelli, et al., 2001).

La fertilidad en la especie canina obedece a factores que involucran tanto a la hembra como al macho; sin embargo, debido a la baja frecuencia de celos (por ser la perra monoestrica no estacional), y a la dificultad en obtener repeticiones de servicio, existe la equivocada tendencia de responsabilizar a la hembra cada vez que los índices reproductivos no alcanzan los valores esperados. No obstante, el macho tiene un rol importante en la fertilidad de esta especie, más aun si se considera que al igual que en otros animales domésticos, un reproductor debe cubrir a varias hembras (Tello, et al., 1988; Concannon, 2011).

Uno de los factores más importantes para lograr una adecuada fertilidad es la correcta elección de los reproductores, puesto que serán ellos quienes aporten a su descendencia las características deseadas para la raza. Es por ello que se hace necesario establecer un patrón de clasificación de reproductores que pueda proporcionar las mayores garantías posibles de una preñez con crías sanas y viables. (Stornelli M, et al., 2001)

Dentro de los patrones para la determinación potencial de la fertilidad, quizás el de mayor utilidad en los machos sea el análisis seminal, ya que permite diferenciar formas normales de anormales y grados de alteración que puedan llevar a recabar información de la fertilidad e incluso a la esterilidad (Stornelli M, et al., 2001).

Por tanto, este estudio pretende determinar las diferencias en la evaluación de semen fresco, refrigerado y congelado en caninos para poder establecer las disimilitudes entre ellas como los medios de utilización para la inseminación artificial.

## **MARCO TEORICO**

### **EXAMEN ANDROLÓGICO COMPLETO**

#### **Evaluación del macho**

Las personas que se dedican a la crianza, frecuentemente solicitan evaluaciones reproductivas rutinarias de sus machos para confirmar su fertilidad antes de una compra o de una venta: para conocer su producción espermática, especialmente en perros reproductores de edad avanzada, para valorar el potencial de un perro como reproductor (joven o adulto), ya sea monta natural o para IA con semen fresco, refrigerado o congelado, para descartar problemas de infertilidad aparente y/o anomalías testiculares. De esta forma determinar qué ejemplares son aptos para la reproducción y evitar la transmisión de enfermedades (Root, 2005).

La evaluación del macho se debe realizar rutinariamente, ya que es una parte fundamental del manejo reproductivo en los caninos. Las evaluaciones reproductivas también dependen de que se logre recolectar el semen apropiadamente y de una precisa valoración del mismo (Root, 2005).

La falta de éxito en la reproducción, frecuentemente se asocia a más de un factor, por lo que una evaluación reproductiva del macho, deberá incluir su historia clínica completa, acompañada del examen físico general, evaluación de los genitales (escroto, testículos, epidídimo, pene, prepucio y próstata), evaluación del libido y evaluación del semen. Las pruebas para determinar enfermedades de transmisión sexual, especialmente brucelosis, son parte crucial de la evaluación del macho, para después de estudiar los problemas potenciales dar un diagnóstico y un plan terapéutico (Root, 2005).

#### **Historia Clínica**

Una historia clínica completa debe contener información sobre el estado de vacunación, medicaciones, incluyendo antiparasitarios, régimen alimenticio, suplementos, enfermedades hereditarias, y datos de

laboratorio. La historia clínica debe incluir lo siguiente: edad a la que el perro fue utilizado por primera vez como reproductor; historia de infertilidad en perros emparentados machos ó hembras; manejo reproductivo y otros detalles de cómo se determinó el momento del servicio de cada hembra; cualquier observación sobre el libido de los machos y la cantidad de cachorros por camada (Root, 2005).

### **Examen físico general.**

Se realiza el examen físico general (inspección visual, auscultación y palpación) para evaluar todas las constantes vitales, integridad de miembros torácicos y pélvicos, columna dorsal y descartar problemas que impidan la reproducción. Se deben incluir en el examen enfermedades o condiciones que puedan ser hereditarias (No se deben reproducir ejemplares con enfermedades genéticas (Paramo & Balcazar, 2005).

### **Evaluación del aparato reproductor**

Para la evaluación del aparato reproductor (EAR), en algunos casos es recomendable realizarla después de la colección del semen. En la EAR se revisan todos los órganos que lo integran (Paramo & Balcazar, 2005).

**Escroto.**- Debe ser suave y sin dolor al tacto, sin heridas o laceraciones, debe buscarse inflamaciones por traumatismos (dermatitis, hiperemia o eritema); recordando que la piel del escroto es muy sensible, debe tener un grosor uniforme y se debe palpar un movimiento libre de los testículos, estos no deben presentar adherencias; la presencia de adherencias puede deberse a procesos inflamatorios crónicos que pueden alterar los mecanismos termorreguladores. La presencia de nódulos puede sugerir granulomas o neoplasias (Paramo & Balcazar, 2005).

**Testículos.**- Son de forma ovoide, en posición oblicua con superficie lisa y con la cola del epidídimo en la parte caudal, los 2 se deben encontrar dentro del escroto, normalmente situados de manera horizontal y deben de tener un movimiento libre dentro del escroto, su tamaño debe ser muy similar entre sí, con una ligera asimetría (los perros con una anormal espermatogenesis, generalmente tienen los testículos más pequeños) y de consistencia firme y turgente (debe tener la consistencia de un huevo cocido) pero no se deben palpar duros (se sospecha de degeneración cuando están esponjosos o blandos y de neoplasia u orquitis cuando están duros). No deben de presentar dolor a la palpación.

La palpación de adherencias, nódulos o superficie irregular sugieren inflamación crónica, infecciones o neoplasias (Root, 2005).

**Epidídimo.-** Se debe revisar que este completo y no le falte ningún segmento, se compone de la cabeza, cuerpo y la cola, cuyas funciones principales son el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides respectivamente. La cola se debe de palpar llena, lo que indica que su capacidad de almacenamiento es buena y que se producen espermatozoides en el testículo. El tamaño del epidídimo debe de corresponder al tamaño normal del testículo (Root, 2005).

**Prepucio.-** Debe cubrir completamente el pene cuando no está en erección, no debe tener laceraciones o erosiones. El orificio del prepucio debe permitir la salida y entrada del pene libremente, que no exista fimosis y parafimosis. Es normal observar una ligera secreción (esmegma) que se forma por el proceso de renovación de la mucosa prepucial. No deben observarse secreciones anormales como sangre o pus (Paramo & Balcazar, 2005).

**Pene.-** Es de tipo vascular, se debe revisar el glande, que va desde la punta hasta el bulbo, se revisa por medio de la retracción del prepucio, hasta la parte caudal del bulbo, no debe de haber adherencias entre prepucio y pene. A los machos jóvenes que no se les pueda retraer el prepucio se debe de evaluar la presencia de frenillo persistente. No deben presentarse laceraciones, lesiones, o úlceras en la mucosa. Se debe de evaluar que el tamaño del hueso peneano tenga el tamaño adecuado para facilitar la penetración en la vulva cuando todavía no hay una buena erección. Es importante revisar el bulbo; este se llena de sangre al momento de la erección y es la estructura responsable del abotonamiento. Una patología importante que se puede encontrar en éste, es el tumor venéreo transmisible (TVT), que se observa en la parte caudal del bulbo en forma de coliflor (Paramo & Balcazar, 2005).

**Próstata.-** Esta es la única glándula accesoria del perro, se encuentra cerca del borde craneal de la pelvis, rodea el cuello de la vejiga y la porción proximal de la uretra. La próstata es de forma redondeada y presenta un rafé medio que la divide en 2 lóbulos firmes, lisos y de tamaño similar. Se revisa por palpación rectal, se puede evaluar su funcionamiento revisando el líquido prostático que se encuentra en el eyaculado, a este se le puede hacer un análisis citológico y bacteriológico. Cuando se presenta una asimetría, dolor o consistencia anormal se puede sospechar de alguna disfunción. Con

la edad se presenta una hiperplasia prostática, considerada normal, con lo que se pierde el rafé medio y la próstata aumenta de tamaño (Root, 2005).

### Evaluación del eyaculado

La evaluación del semen complementa el examen reproductivo, valorando la funcionalidad normal del testículo y epidídimo. Se evalúan los parámetros entre morfología y funcionalidad de los espermatozoides, incrementando la predictibilidad de una fertilización potencial de una muestra de semen, y así poder estimar la probabilidad de que una hembra quede gestante, ya sea con IA o con monta natural. Es importante evaluar el semen después del descongelamiento para conocer su viabilidad, de igual forma con el semen refrigerado antes de una inseminación artificial (Andrade, 2005).

Durante y después de la colección del semen se deben de evitar los cambios de temperatura, por lo que el material que se utilice para la evaluación deberá estar cerca de los 37 °C. También se debe de evitar la exposición a la luz, esto con el fin de evitar cualquier factor que afecte la muestra y la evaluación (Andrade, 2005).

Las técnicas que se utilizan para la evaluación de semen deben de ser constantes, aunque son realizados por una persona capacitada, se pueden cometer errores y esta evaluación se puede considerar subjetiva, hoy en día existen analizadores automatizados para evaluar el eyaculado (motilidad, concentración y anormalidades) y aunque son más objetivos, su costo es muy elevado (Andrade, 2005).

La evaluación del semen se divide en dos partes: análisis macroscópico y microscópico.

- **Análisis macroscópico**

**Volumen.** – Se debe medir el volumen del eyaculado el cual depende de la talla, la edad, raza y la frecuencia del procedimiento y la cantidad colectada del líquido prostático, por lo que puede ser de 1 a 40 ml por eyaculado (Feldman & Nelson, 2000)

<b>Fracciones del eyaculado</b>			
Fracción	Volumen	Color	Procedencia
1°	0.5 – 2 ml	Transparente	Próstata
2°	0.5 – 2 ml	Blanquecino/ Lechoso	Próstata y Epidídimo
3°	5 – 20 ml o mas	Transparente	Próstata

(Root, 2005)



Con el fin de evaluar el semen, la fracción que se debe colectar es la segunda, que es la que contiene a los espermatozoides. La tercera fracción solo se colecta cuando se desea dar volumen al eyaculado o evaluar la función prostática

**Color.** - El color del eyaculado debe ser de blanquecino a blanco lechoso; la intensidad de la opacidad depende de la concentración espermática, cuando es demasiado claro o transparente sugiere azoospermia. Los colores anormales que sugieren un problema son: verde sugiere una enfermedad del aparato reproductor; amarillo sugiere orina o pus en el eyaculado; el rojo puede indicar sangre en el eyaculado, que puede venir de próstata (la sangre proveniente de próstata se observa café) o de un pene traumatizado. La presencia de cualquier sustancia afecta la calidad, concentración y viabilidad de los espermatozoides (Restrepo, et al., 2009).

**pH.** - Se mide con tiras reactivas semicuantitativas, se considera normal de 6.5 a 7, depende en gran parte de la cantidad de líquido prostático colectado ya que este tiene un pH de 6.0 a 7.4, un pH alcalino del líquido prostático favorece la motilidad espermática y neutraliza el ambiente ácido de la vagina. Un cambio en el pH puede vincularse con una eyaculación incompleta, o una inflamación de los testículos, próstata o epidídimo (Bonilla & Ballesteros, 2007).

- **Análisis microscópico**

**Motilidad.** - La motilidad demuestra la capacidad funcional y estructural de un espermatozoide, el porcentaje de motilidad progresiva esta correlacionado con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal. La evaluación de la motilidad se debe de realizar inmediatamente después de la recolección, debido a que los espermatozoides no son resistentes al choque por frio, una temperatura más baja disminuye su motilidad. Los espermatozoides deben tener un movimiento rectilíneo progresivo, solo se evalúan los que tengan este movimiento. Un eyaculado normal se considera cuando el porcentaje de espermatozoides observados en el microscopio es mayor del 70% de motilidad progresiva rectilínea. Un espermatozoide canino con buena motilidad deberá atravesar el campo observado (100X) en 2-3 segundos. La motilidad puede estar afectada por la temperatura, presencia de sangre, orina en el eyaculado y el método de colección. Cuando se evalúa la motilidad se puede realizar una evaluación subjetiva de aglutinación. Los problemas persistentes de motilidad baja pueden reflejar un problema en testículos o epidídimo (Restrepo, et al., 2009).

**Concentración.** - La concentración de espermatozoides por mililitro debe de ser mayor de 100 millones. Se considera que la concentración mínima es de 100 millones que es lo suficiente para dejar gestante a una hembra. Y pueden llegar a tener una concentración mayor a 500 millones por mililitro. No se debe de confundir el volumen del eyaculado con la concentración de espermatozoides en un eyaculado. La concentración de espermatozoides en un eyaculado podrá variar dependiendo la edad, la actividad sexual, tamaño testicular y posiblemente la época del año (Restrepo, et al., 2009).

**Morfología.** - Se evalúan el porcentaje de espermatozoides anormales en el eyaculado, se evaluará realizando un frotis del semen utilizando una gota de semen y una gota de tinción (Eosina- Nigrosina, Spermac, etc.), se mezclan con suavidad y se realiza el frotis. Las anomalías se clasifican en primarias y secundarias

Las primarias se originan en la espermatogénesis o en el túbulo seminífero, las anomalías primarias que se pueden encontrar son: macrocéfalos, microcéfalos, dobles cabezas, dobles colas, gota citoplasmática proximal, entre otras. Las anomalías secundarias se consideran de maduración y de transporte, se producen durante el almacenamiento, transporte en el epidídimo, durante el manejo del semen o después de un traumatismo, infecciones o fiebre. Las anomalías secundarias que se pueden encontrar son: gota citoplasmática medial o distal, colas enrolladas, colas dobladas, colas deshilachadas, cabezas sueltas, colas sueltas, entre otras. En la evaluación de la morfología mínimo se deben de contar 100 espermatozoides para obtener un porcentaje; para considerar que el eyaculado es bueno se debe de encontrar máximo de 15-20% de anomalías en el eyaculado. Cuando se encuentra un porcentaje menor al 60% de espermatozoides normales se menciona que la fertilidad se puede ver afectada (Restrepo, et al., 2009).

**Mortalidad.** - Se evalúa el porcentaje de espermatozoides muertos en el eyaculado. La evaluación de mortalidad se realiza junto con la evaluación morfológica. El porcentaje máximo para considerar que el semen es de buena calidad es de 5%. Es muy importante conocer la calidad de un semen antes de una monta natural o una inseminación artificial. El porcentaje de espermatozoides normales que debe de contener un eyaculado para considerarlo de buena calidad es del 80% o más (Bonilla & Ballesteros, 2007).

La evaluación de sementales se debe realizar periódicamente por lo menos cada seis meses ya en edad adulta. Existen factores que pueden alterar la espermatogénesis y modificar el diagnóstico de la

evaluación, cabe señalar que la espermatogénesis en los perros dura de 55 a 70 días (promedio 62 días). Por lo que un estudio aleatorio de un perro no refleja necesariamente lo que ocurrió ese día, antes de diagnosticar a un perro con mala calidad de su eyaculado se debe evaluar varias veces (Bonilla & Ballesteros, 2007).

No hay unanimidad a la hora de establecer unos patrones de recogida seminal en el perro. Hay autores que realizan recogidas de 3-4 eyaculados totales/ perro a la semana con una distribución de 2-3 recogidas semanales, sin embargo, en otros trabajos se defiende que es posible mantener una frecuencia de recogida de 2 eyaculados/perro cada 2 días, sin que se observe un marcado descenso de la calidad seminal (Alamo, 2007).

## **Gametogénesis en el perro**

### **Espermatogénesis**

La gametogénesis comienza ya en el estadio fetal donde las células primordiales se diferencian en gonocitos que sufrirán procesos de mitosis tanto durante la vida fetal como en la prepuberal; a este nivel, es cuando se diferenciarán en espermatogonias, momento en el cual se detiene el desarrollo de las células germinales a nivel de los túbulos seminíferos, hasta que comience la pubertad (Allen, 1992). El proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos comienza aproximadamente a los 4 meses de edad y dura unas 8 semanas, si bien, la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado no se define hasta los 10-12 meses de edad. No obstante, hay autores que definen que las células de Leydig no completan su maduración hasta los 5 meses, pudiendo encontrar espermatozoides en los túbulos seminíferos sobre los 6-7 meses de edad (Hewitt, 2000). La espermatogénesis se ve alterada cuando la temperatura testicular es muy alta, por lo que se dispone de una serie de estructuras (saco escrotal, músculo cremaster, músculo dartos, vasos sanguíneos en el cordón espermático) que garantizan la temperatura idónea para que este proceso pueda tener lugar, ya que a la temperatura fisiológica del animal es imposible (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### **Espermatocitogénesis**

Representa la primera fase de la espermatogénesis y consiste en la producción cíclica de espermaticitos primarios. Aparte de las células en división, hay presente una reserva de

espermatogonias en estado de latencia que son extremadamente resistentes a las agresiones por radiaciones y toxinas, pudiendo incluso sobrevivir a traumatismos graves en los testículos (Allen, 1992; Hewitt, 2000). Está descrito que en la especie canina, cada espermatogonia es capaz de producir un total de 64-96 espermatozoides (McDonald y Pineda, 1989). Estas espermatogonias, que son las células precursoras de los espermatozoides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y sufren procesos de mitosis para generar los espermaticitos primarios que, posteriormente, sufrirán procesos de meiosis para dar lugar a los espermaticitos secundarios. Finalmente, los espermaticitos secundarios se convertirán en espermátidas esféricas que ya contienen la mitad de cromosomas (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### **Espermiogénesis**

En esta fase, las espermátidas esféricas se transforman en espermátidas maduras que serán liberadas al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Allen, 1992). Para que ocurra la transformación es necesario que ocurra un complejo reagrupamiento de los orgánulos de la espermátidas maduras que darán lugar a los espermatozoides. Básicamente, el núcleo pasa a ser la cabeza, el aparato de Golgi generaría el acrosoma y por último, las mitocondrias y los centriolos darán lugar al desarrollo de la cola. Las células de Sertoli, que se sitúan sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, retienen la mayor parte del citoplasma; de esta forma, participan en la regulación del paso de espermátidas maduras a espermatozoides (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### **Espermiación**

Esta fase simplemente consiste en la liberación de los espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### **Morfología del espermatozoide**

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para desarrollar una única función: fecundar al óvulo. Presenta a nivel de la cabeza una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y transmitirle así el material genético; por otro lado, la cola

posee una maquinaria metabólica encargada de dotar de movimiento al espermatozoide (Alamo, 2007).

Estructuralmente se diferencian en el espermatozoide:

a) **Cabeza:** en su interior se sitúa el núcleo y recubriendo su polo craneal se encuentra el acrosoma con las enzimas acrosómicas. La extensión del núcleo es de un tercio de la longitud total de la cabeza. El acrosoma es un saco membranoso invertido que contiene un complejo lipoglucoprotéico específico que incluye una serie de enzimas, tales como la hialuronidasa y acrosina. La primera de ellas se encarga de degradar los mucopolisacáridos y es posible que provoque la dispersión del cúmulus oóforos del ovocito. En cambio, la segunda facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito (Alamo, 2007).

b) **Segmento o pieza intermedia:** formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice y cuya función es la de garantizar el metabolismo del espermatozoide y asegurar su movilidad (Alamo, 2007).

c) **Cola:** gracias a su movimiento flagelar permite el movimiento del espermatozoide. De dos centriolos situados en la porción terminal de la pieza intermedia parten una serie de fibrillas hacia la cola, presentando dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, responsables del movimiento del espermatozoide (Alamo, 2007).

### **Técnicas para la conservación y criopreservación de semen canino.**

La refrigeración a 4°C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin embargo, la refrigeración de semen es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra. Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C. a pesar de esto no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (Restrepo, et al., 2009).

La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura (Restrepo, et al., 2009).

La congelación por almacenaje en nitrógeno líquido, es considerada como la mejor técnica para preservar semen a través del tiempo, debido a que se obtiene un porcentaje de espermatozoides móviles descongelados entre el 60 y 70%, y una tasa de fertilidad del 60%. Otras técnicas de criopreservación de semen canino incluyen el uso de hielo seco o congeladores automáticos para congelar las pajillas de semen, sin embargo, requieren de igual manera de nitrógeno líquido para el almacenamiento final de las pajillas. Otra alternativa para la congelación de semen está en el uso de ultra congeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$ ; pero no se han encontrado diferencias significativas en los valores de los parámetros espermáticos entre este método de congelación y el almacenaje con nitrógeno líquido (Restrepo, et al., 2009).

La congelación con exposición previa del semen empacado a vapores de nitrógeno antes de sumergirlo totalmente en nitrógeno líquido, se considera como congelación rápida. Algunos trabajos de congelación rápida han sido desarrollados utilizando semen canino, evidenciando resultados superiores por congelación lenta mediante el uso de congeladores programables (Restrepo, et al., 2009).

El semen canino puede congelarse en pastillas o pajuelas de 0,5 ó 0,25 ml. Las pajuelas son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en la descongelación. Las pastillas se descongelan a  $37^{\circ}\text{C}$ , utilizando una solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0.5 ml se descongelan en baño térmico a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante un minuto, o a  $75^{\circ}\text{C}$  durante 6 segundos, mientras que las mini pajillas (0,25 ml), deben descongelarse a  $75^{\circ}\text{C}$  durante 5 segundos (Restrepo, et al., 2009).

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL:**

Realizar un manejo reproductivo completo de un canino domestico adulto macho y así obtener muestras de semen en 2 razas distintas para analizar motilidad, concentración y mortalidad en fresco con los cambios en refrigerado y congelado.

## ESPECIFICOS:

1. Reforzar el conocimiento sobre anatomía y fisiología reproductiva del canino domestico macho.
2. Conocer y realizar el manejo reproductivo del canino domestico macho adulto.
3. Aprender a realizar la colección del semen en caninos domésticos para su evaluación
4. Saber las técnicas de manejo y conservación del semen.
5. Conocer las características seminales normales de un perro, así como sus alteraciones.
6. Recolectar 18 muestras para refrigerar y congelar para su posterior análisis

## METODOS

El trabajo se realizó en el Banco de Semen de Federación Canófila Mexicana ubicado en Zapotecas No. 29 colonia Tlalcoligia CP. 14430 México, D.F. Como fuente de esperma, se realizaron la colecta de 6 caninos de los cuales fueron 3 de raza Pug (P) y 3 de raza Bulldog francés (BF), de edades entre los 2-5 años, clínicamente sanos y antecedentes de camadas anteriores. Se realizaron 3 muestreos por perro en un lapso de 2 días entre colecta; obteniendo un total de 18 muestras.

Para la recolección del semen se utilizó la técnica de mano enguantada o masturbación manual (manipulación digital) (Buritica, et al., 2009), la cual se inicia dando un masaje sobre el pene, especialmente donde se encuentra el bulbo, el prepucio se retrae suavemente hasta que pase el bulbo del pene, el bulbo del pene se sostiene con los dedos pulgar e índice para evitar que el prepucio regrese, se continua estimulando manualmente para que el perro complete su erección, se observara un movimiento de cabalgue, se ejerce una ligera presión en la parte caudal del bulbo, se pasa el miembro posterior sobre el brazo y se rota el pene 180° simulando el abotonamiento, en este momento el perro debe de estar eyaculando, se sigue presionando el bulbo del perro simulando la copula hasta que se colecte el material de interés. Se le pone lubricante en el pene y se le comenta al manejador que lo camine por unos minutos. Antes de que se retire el perro siempre se tiene que revisar que el pene haya envainado correctamente.

En seguida el semen es analizado en fresco mediante el sistema de análisis computarizado de semen CASA, (Computer assisted semen analysis) el cual es un sistema que combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se

mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática y permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (Stornelli M & De la Sota, 2006).

Terminado el análisis en fresco se comenzó el proceso de refrigeración y congelación.

Para el proceso de refrigeración, con el fin de evitar el estrés térmico se debe disminuir de temperatura epididimal (37 °C) a temperatura ambiente (15 °C aprox.). se agrega el diluyente *Canipro™ ApX<sup>2</sup> Chill 10 Protocol*,(agua, citrato de Na, TRIS, glucosa, fructosa, factores del fabricante, gentamicina, y antioxidantes) a una relación de 1:3 (eyaculado-diluyente) y adicionando un 20% de yema de huevo fresca, el cual pasara a la cámara de refrigeración en un lapso de 30-60 minutos para pasar a temperatura de 1 a 4 °C el cual podrá almacenarse en un promedio de 6 días para su posterior análisis.

Para congelar el semen se realizarán los mismos pasos de refrigeración, y posteriormente cuando se encuentre de 1 a 4 °C, se agregará *Canipro™ ApX<sup>2</sup> Freeze Protocol* (agua, citrato de Na, TRIS, glucosa, glicerina, factores del fabricante, gentamicina, antioxidantes) en 3 pasos el cual evitara la formación de cristales intracelulares, en un lapso de 10 minutos. Se mantiene alrededor de 20 minutos, posteriormente se homogeniza la muestra y se procederá a empajillar para colocar a vapores de nitrógeno, con ello, se disminuirá la temperatura a -70 °C en un lapso de 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se continuará a sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido, para que se alcance una temperatura de -196 °C y posteriormente su almacenaje dentro de goblets y un bastón que previamente fueron identificados. El proceso de descongelación y evaluación correspondiente se realizó 15 días después de la congelación

## **ACTIVIDADES REALIZADAS**

Ayudé con procedimientos de congelación y refrigeración de semen, colaboré en los procedimientos de obtención de semen, en su análisis e inseminación endoscópica transcervical, asistí en cesáreas y

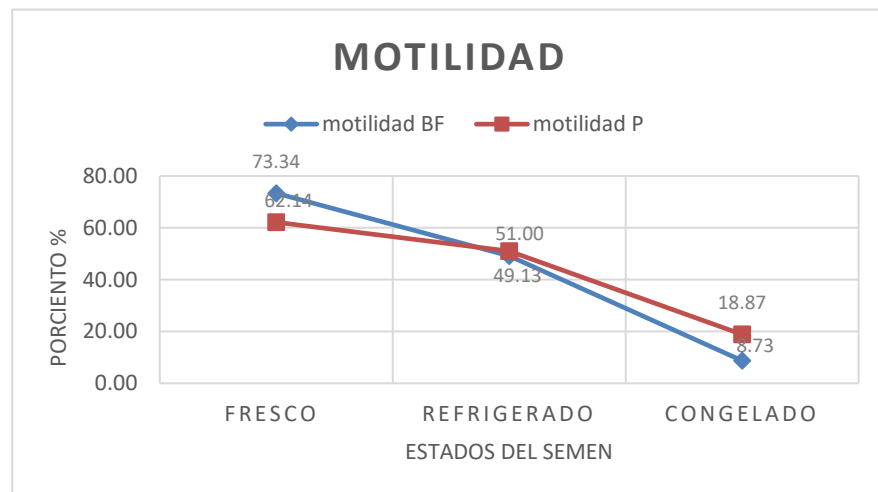


reanimación de cachorros. Brindaba información sobre los servicios que ofrecía el banco de semen y la clínica veterinaria, realicé toma de radiografías pélvicas para diagnóstico de displasia de cadera.

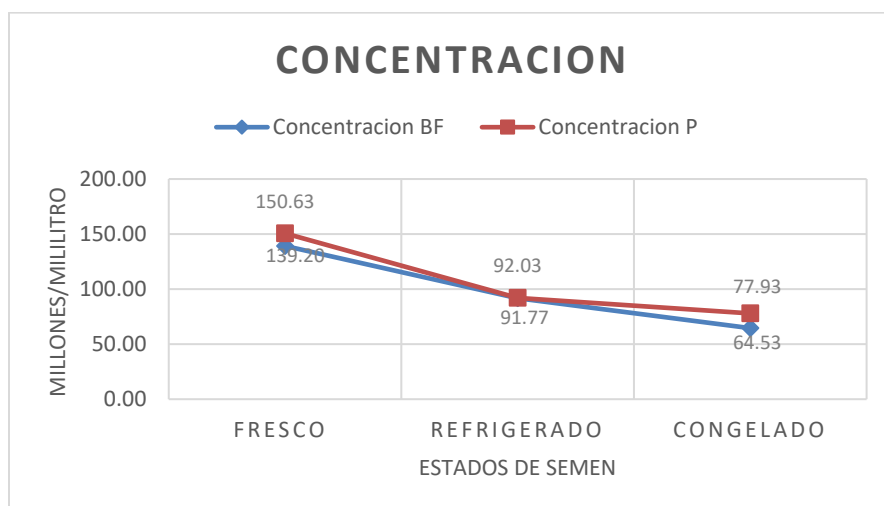
## OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

A lo largo de la realización de este estudio pude cumplir con todos los objetivos y metas planteados con anterioridad, reforzando lo aprendido en clases, así como en las practicas escolares y obteniendo nuevos conocimientos que la experiencia del trabajo de campo brinda para la realización de un mejor trabajo ya sea en el área médica, reproductiva, comercial y zootecnia que nos puede brindar la profesión a lo largo de nuestra vida.

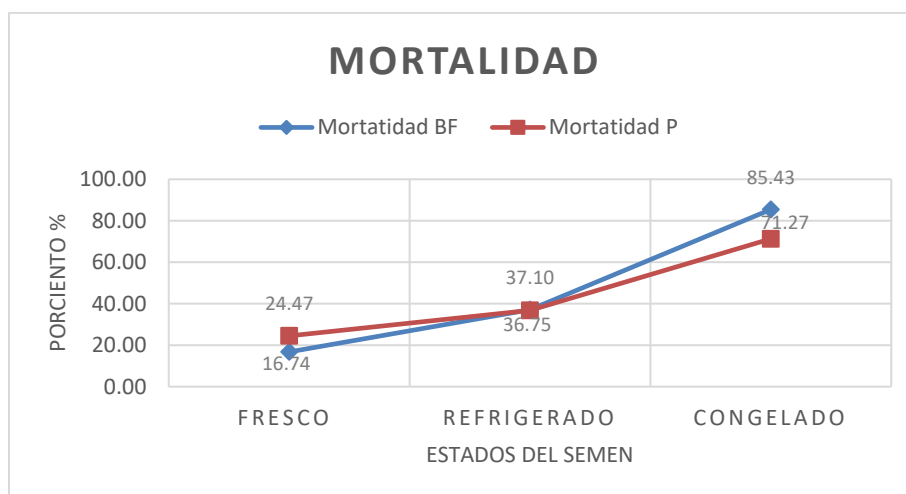
## RESULTADOS



**Grafica 1:** Porcentaje de Motilidad que presenta el eyaculado del Bulldog Frances y el Pug en sus tres estados.



**Grafica 2:** Concentración que presenta el eyaculado del Bulldog Frances y el Pug en sus tres estados.



**Grafica 3:** Porcentaje de Mortalidad que presenta el eyaculado del Bulldog Frances y el Pug en sus tres estados.

Las características seminales de motilidad del semen en fresco en relación con el semen refrigerado y el semen congelado se presentan en la Grafica 1. Los valores fueron bastante uniformes entre los machos, mostrando un porcentaje menor a los rangos ideales (>70%) Arango et al (2020) en la raza P en relación con el BF, así mostrando el descenso de la motilidad en relación semen fresco-semen refrigerado (SF-SR) con un 51% en el P y 49.13% en el BF y semen fresco-semen congelado (SF-SC) con un 18.87% en el P y un 8.73% en el BF se mostraron disminución en ambos casos de motilidad según lo esperado en un proceso de criopreservación siendo más notorio el descenso de la motilidad en la relación SF-SC en ambas razas, no existiendo diferencias significativas entre ninguno.

Se muestra la concentración en la Grafica 2 donde se puede observar la cantidad de espermatozoides por mililitro en la raza P y BF en la que la cantidad es mayor en el P de 150.63 millones/ml que en el BF de 139.20 millones/ml en el estado fresco con una marcada disminución en la relación SF-SR de 92.03 millones/ml y 91.77 millones/ml respectivamente al igual que en la relación SF-SC en la que se observa una concentración menor en ambas razas de 77.93 millones/ml en el P, pero aún menor en el BF de 64.53 millones/ml.

Por otro lado, en la Grafica 3 Se muestran el porcentaje de mortalidad que presentan ambas razas la cual se reduce significativamente en comparación de los estados SF-SR y aún más en la relación SF-SC considerando que el porcentaje de mortalidad en el SF es alto al porcentaje máximo para considerar que el semen es de buena calidad (5%) y reduce a lo que se espera conforme a los procesos de refrigeración y congelación.

## DISCUSIÓN

En los procesos de criopreservación de semen canino existen diversos factores que influyen en su capacidad fertilizante. Las células espermáticas son expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores los cuales evitan parcialmente alteraciones a sus características fecundantes. Sin embargo, dichas sustancias sumadas a los severos cambios térmicos y osmóticos propios de la técnica, pueden tener otros efectos adversos sobre los espermatozoides, los cuales han sido directamente relacionadas con la reducción en la fertilidad del semen.

Stornelli et al (2001), mencionan que los porcentajes de fertilidad y viabilidad de los espermatozoides son muy variables pudiendo explicarse por la variabilidad existente entre diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas. Así mismo el proceso de congelación-descongelación resulta en una reducida fertilidad comparada con la del semen fresco. Se ha comprobado que esto resulta de una combinación tanto de pérdida de viabilidad como de daño de la población espermática sobreviviente. Se estima que entre el 40 y 50 % de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación-descongelación. Por otro lado, parte de la población de espermatozoides que sobreviven habrán sufrido daños que los convierten en incapaces de fecundar.

La reducción de los valores de las variables motilidad individual y vigor postdescongelación se podrían explicar por las alteraciones funcionales generadas en los espermatozoides debido a los cambios de temperatura (shock de frío), la toxicidad del crioprotector, la formación y disolución de hielos en el medio ambiente extracelular (Stornelli et al 2001; Restrepo et al 2009)

La concentración espermática promedio del semen fresco registrada en este estudio fue de 150.63 millones/ml en el Pug y 139.20 millones/ml en el Bulldog Frances inferiores a lo reportado por Arango et al (2020) quienes registraron una concentración de  $388.50 \pm 226$  millones/ml según Restrepo et al 2009 cumplen la concentración mínima suficiente para dejar gestante a una hembra aunque disminuyeron por debajo de lo deseado después de los procesos de criopreservación.

Por otra parte en los factores que pueden alterar los valores de concentración en procesos de criopreservación (congelación-descongelación) puede ser los largos periodos de transporte desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, lo cual puede reducir las reservas metabólicas de los espermatozoides haciéndolos más susceptibles a sufrir cambios durante la refrigeración congelación y descongelación, es posible que comenzando el proceso de criopreservación inmediatamente

después de la recolección del semen se obtengan mejores cualidades espermáticas en el semen post-descongelación (Uribe et al. 2011).

Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenado son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración (Stornelli & De la sota, 2006)

Es importante tener en cuenta que factores como el transporte, la maquinaria y la mano de obra tienen una importante influencia en los resultados obtenidos en el trabajo por lo tanto sería pertinente continuar la realización de otros estudios similares, minimizando la influencia de los factores previamente mencionados.

## **CONCLUSIÓN**

Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

Los procesos de refrigeración y congelación utilizados en esta investigación generaron un alto deterioro de la viabilidad, así como a los valores reportados en la literatura (Uribe, et al., 2011). Ya que recomiendan la realización de nuevos estudios para establecer procesos de refrigeración que permitan obtener mejores resultados de viabilidad, ya que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un marcado aumento en la mortalidad cuando el semen es sometido a procesos de criopreservación.

Además de la utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino, logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con buenas características fecundantes durante más tiempo, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos del país o el mundo, así disminuyendo la necesidad de traslado de animales y con ello minimizar los costos y esfuerzo que esto implica.

## **RECOMENDACIONES**

Utilizar un extender diferente al ocupado en la actualidad o probablemente probar un extender en concentraciones diferentes de glicerol y tal vez optimizar la técnica en reducción de temperatura y formas de almacenaje.

También podrían cambiar el lugar o combinar el sitio de recolección con el de análisis y de proceso de criopreservación.

## BIBLIOGRAFIA

Alamo S, D., 2007. *Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152 °C*, Las Palmas de Gran Canaria, España.: s.n.

Allen, W. E., 1992. *Allen´s fertility and obstetrics in the dog*. s.l.:Blackwell science, oxford.

Andrade Martins , A. C., 2005. *Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino*, Madrid: Memoria para optar al grado de doctor.

Arango M, J. y otros, 2020. Criopreservación de semen canino (canis familiaris) en pajilla francesa en el municipio de medellin antioquia. *Revista colombiana de ciencia animal recia.*, 2(1).

Bonilla H, C. L. & Ballesteros M, 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*, Bogota: Universidad de la salle Facultad de Medicina Veterinaria.

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*, 34(1), pp. 147-157.

Concannon, P. W., 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction Science*, pp. 200-210.

Feldman, E. C. & Nelson, R., 2000. *Endocrinología y Reproducción en perros y gatos*. 2° ed. s.l.:McGraw hill/interamericana de Mexico.

Hewitt, D., 2000. *Fisiología y Endocrinología del Macho En: Manual de Reproduccion y Neonatología en pequeños animales*. s.l.:Harcourt.

Mcdonald , L. E. & Pineda, M. H., 1989. *Endocrinología Veterinaia y Reproduccion*. 4th ed. México: Interamericana McGraw-Hill.

- Paramo Ramirez, R. M. & Balcazar Sánchez, J. A., 2005. *Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros*. Mexico, D.F: Universidad Nacional Autonoma de México.
- Restrepo, B. G., Vazquez, N. A. & Andres, G. E., 2009. Criopreservacion de semen canino y su aplicacion en la inseminacion artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), pp. 119-129.
- Root Kustritz, M. V., 2005. *Manual de reproduccion del perro y del gato*. Barcelona: Grafica IN-Multimédica S.A..
- Stornelli M, A. & De la Sota, L., 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 25(2), pp. 29-38.
- Stornelli M, A., Stornelli M, C., Arauz M, S. & De la Sota, L., 2001. Inseminacion artificial con semen fresco, refirgerado y congelado, aplicacion y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*, 21(1), pp. 58-66.
- Tello, L., De los reyes S., M. & Bernal S., A., 1988. Descripcion de algunas características seminales en caninos de raza ovejero aleman.. *Avances en ciencias veterinarias*, pp. 52-56.
- Uribe, R., Arango Rodriguez, M. E., Rendón Álvarez, L. & Acevedo Naranjo, C. M., 2011. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(1), pp. 21-30.