

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Evaluación de criopreservantes permeables sobre  
la viabilidad de espermatozoides de *Canis  
familiaris* (perro)**

**Tesis para optar el Título Profesional de Bióloga  
Especialidad de Biotecnología**

**PRESENTADO POR:  
Bach. NÚÑEZ JANAMPA, TANIA**

**AYACUCHO – PERÚ  
2010**

Saber que no se sabe

es una noble intuición.

Pretender saber y no saber

es una enfermedad.

Y el que reconoce la enfermedad

como tal no la sufre.

*En memoria a mi padre,  
a Rosa mi madre por su apoyo incondicional,  
y a toda mi familia por ser mi apoyo y fuerza en los  
momentos más difíciles...*

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por ser mi alma mater y albergarme en sus aulas durante los cinco años de mi formación profesional.

Al Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE) de la Universidad Nacional Agraria La Molina por permitirme realizar el trabajo de tesis, compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo.

A la Ing. Ethel Huamán Fuertes, asesora externa, por su apoyo y los conocimientos brindados, a la M.V. Silvia León Trinidad por su constante apoyo y a todo el equipo del CIETE, por su orientación y apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Mg. Fidel Mujica Lengua, asesor interno, por la revisión y apoyo en la redacción del presente informe.

A mis maestros por su apoyo, enseñanza y cada conocimiento impartido que servirán siempre para el desarrollo de mi vida profesional y como persona.

Al grupo del CIETE por la ayuda prestada y constante apoyo, especialmente a Silvia, Anne, Rosa María, Manuel y Daniel.

A Celestino, Trinidad, Elio, Romel, Baneza, Yovana y todos aquellos que me brindaron su apoyo para la realización de ésta tesis.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Aspectos Generales de <i>Canis familiaris</i> "perro	6
2.3 Principios generales de la criopreservación de semen	12
2.4 Dilución y empleo de crioprotectores	21
2.4.1 Medios de dilución del semen	22
<b>III. MATERIALES y MÉTODOS</b>	28
3.1 Ubicación	28
3.2 Sistema de muestreo	29
3.3 Metodología	29
3.3.1 Selección y entrenamiento de los machos	29
3.3.2 Dilutores	29
3.3.3 Colección y evaluación del semen	29
3.3.4 Procesado del semen	30
3.3.5 Evaluación de espermatozoides en semen fresco y post-descongelación	30
3.3.5.1 Motilidad individual de los espermatozoides de perro	31
3.3.5.2 Reacción hipo-osmótica de la membrana (HOS)	31
3.3.5.3 Porcentaje de vivos y muertos	31
3.3.6 Congelación del semen canino	32
3.3.7 Descongelación de las pajillas	32
3.4 Análisis estadístico	33
<b>IV. RESULTADOS</b>	34
<b>V. DISCUSIÓN</b>	45
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	54
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	56
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	57
<b>IX. ANEXOS</b>	67



**Evaluación de criopreservantes permeables sobre la viabilidad de espermatozoides de *Canis familiaris* "perro".**

Autora: Bach. Tania Núñez Janampa

Asesores: Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, Ing. Ethel Huamán Fuertes.

**RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad espermática post-descongelamiento a través de las características de motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana plasmática, evaluando dos agentes crioprotectores en el semen congelado de caninos. Se tomaron 06 eyaculados de cada uno de los 06 machos caninos de razas medianas, cuyas edades fluctuaron entre los 2 y 6 años, la colección seminal se llevó a cabo mediante la estimulación digital con una frecuencia de dos veces por semana durante 12 semanas, tomándose de cada eyaculado sólo la fracción espermática la cual fue diluida en PBS en una proporción de 1:1 y luego trasladada al laboratorio del Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. En el semen fresco se evaluaron las características seminales de volumen, concentración espermática, motilidad espermática, vitalidad espermática entre otras. Para evaluar el efecto de la congelación en los espermatozoides se utilizó dos agentes crioprotectores: glicerol 10% y etilenglicol al 10%, El semen diluido en PBS fue previamente centrifugado a 1200 rpm por cinco minutos y luego resuspendido en la fracción A del diluyente a evaluar, posteriormente fueron refrigerados a 4 °C por 1.5 h, añadiéndose finalmente la fracción B a 4 °C, en tres partes cada 15 min. Posteriormente el semen fue aspirado en pajillas de 0.25 cc, exponiéndose éstas a los vapores de nitrógeno líquido por 8 min para luego ser sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C. Los resultados encontrados en la presente investigación indican un volumen promedio de  $4.09 \pm 2.29$  ml y concentración espermática de  $553.61 \times 10^6 \pm 427.6$  esp/ml. Así mismo, se observó que la motilidad pre-congelación fue de  $73 \pm 9.5\%$  y post-descongelación de  $20.68 \pm 8.37\%$ ; la vitalidad espermática fue de  $85.37 \pm 7.22\%$  y  $34,92 \pm 11,41\%$  en la pre-congelación y post-descongelación, respectivamente. La integridad de membrana plasmática se midió a través del test de HOS, encontrándose durante la pre-congelación  $71.26 \pm 12.45 \%$  y post-descongelación  $43,79 \pm 16,23\%$ ; mientras que los porcentajes de anomalías fueron de  $18.49 \pm 6.38\%$  y  $26,24 \pm 8,15\%$  para el semen pre-congelado y post-descongelado respectivamente. Se puede concluir que al evaluar el efecto del glicerol y etilenglicol sobre el espermatozoide canino post-descongelación disminuyen significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) la viabilidad y que además tienen efectos crioprotectores similares sobre las células espermáticas.

**Palabras clave:** *Crioprotectores, espermatozoides, congelación, canino.*

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el aumento de la crianza de perros es una afición de distribución mundial. El valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de raza pura como el aumento en la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo, ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie. Si bien en otras especies, como por ejemplo en el bovino, la congelación de semen está extensamente estudiada y es una práctica de uso rutinario en muchos países, en el canino no ocurre lo mismo, encontrándose en pleno desarrollo y siendo su uso poco habitual (Sánchez *et al.*, 2006). Desde que las asociaciones de criadores de perro en distintos países aprobaron el uso de semen congelado, la demanda de éste y de mejores técnicas de criopreservación ha aumentado. Los beneficios de la utilización de semen congelado para propietarios y criadores de perros incluyen la posibilidad de envío de semen congelado a largas distancias con un costo reducido y de conservación por un largo periodo de tiempo (Bohórquez *et al.*, 2005). Para criadores de países con estrictas regulaciones de cuarentena, el hecho de poder obtener material genético proveniente de los mejores ejemplares a nivel mundial facilita la reproducción de perros.

La congelación de semen de diferentes especies animales y en humanos es importante para los procesos de inseminación artificial, fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), producción y transferencia de embriones para la implementación de programas de mejoramiento genético (Luvoni, 2000).

La criopreservación del semen en diversas especies es un importante campo de investigación, tanto para facilitar las posibilidades de reproducción de diversos individuos y así salvaguardar las características genéticas encaminadas a la mejora de las especies, también se está utilizando para crear bancos de genomas de especies salvajes en peligro de extinción como es el caso búfalo africano, ciervo ibérico, oso pardo y rinoceronte blanco. Se aplica esta técnica en gatos domésticos, como modelo para ser utilizados en más de 37 especies felinas, que están en peligro de extinción. Lo anterior se podría aplicar en la especie canina, utilizando el perro como modelo, para su posterior aplicación en caninos no domésticos, ya que en la actualidad dos especies de lobos y tres de zorros están en la lista de animales en peligro de extinción entre ellas el lobo crin peruano (Hewit *et al.*, 2001).

Los objetivos planteados en este trabajo de investigación fueron:

1. Determinar la viabilidad espermática post descongelamiento mediante la motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana plasmática.
2. Evaluar el efecto del glicerol y etilenglicol sobre la motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana del semen criopreservado de perro.
3. Determinar el agente crioprotector que mantiene la calidad y viabilidad del semen post-descongelación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

En los últimos años la utilización de espermatozoides congelados en los programas de reproducción asistida humana y animal, para la obtención de embriones viables, ha tenido una trascendencia exitosa. La criopreservación de espermatozoides de perro (*Canis familiaris*) es un tema que ha sido poco estudiado, sin embargo resulta de gran interés para optimizar las técnicas de mejoramiento en la selección animal mediante la inseminación artificial (IA), constituyéndose en una herramienta fundamental. Varios trabajos de investigación se han realizado hasta la fecha, los cuales han utilizado diferentes métodos de colección, dilutores y técnicas de congelamiento.

Louise (2001), reportó que la adición de glicerol al diluyente suplementado con TALP y cuatro diferentes azúcares (glucosa, fructosa, sucrosa y piruvato-lactato) para criopreservar semen canino da mejores resultados con glucosa, donde se observa el acrosoma del espermatozoide intacto y morfológicamente normal después del descongelado.

Sánchez *et al.*, (2002), obtuvieron como resultados en el semen canino: volumen (ml)  $1,9 \pm 0,87$ ; motilidad progresiva (%):  $83,8 \pm 9,5$ ; vitalidad espermática (%):  $92 \pm 4,7$ ; espermatozoides morfológicamente normales (%):  $83,5 \pm 20,3$  y

concentración espermática (células espermáticas/ mm<sup>3</sup>): 324 ± 188,6; prueba hipoosmótica (HOS): 87,9 ± 8,1 % de espermatozoides con colas curvadas. Por otro lado el valor promedio de motilidad progresiva en el semen descongelado fue 47,4 ± 17,6 % con un 53,7 ± 13 % de espermatozoides con colas enrolladas en respuesta al test de HOS.

Andrade (2005), evaluó la incorporación de aminoácidos al diluyente (taurina) y la reducción de la concentración de yema de huevo, dando como resultado diferencias significativas en la motilidad, test de endosmósis y reacción acrosómica. Posteriormente realizó un segundo experimento para valorar la capacidad del etilenglicol como crioprotector en el diluyente de congelación del semen canino, alternativamente o asociado al glicerol o Equex STM Paste® (tiene como componente activo el dodecilsulfato sódico SDS. La utilización de etilenglicol al 4% presenta resultados similares de motilidad a los obtenidos con 8% de glicerol; sin embargo, el etilenglicol resulta perjudicial cuando se emplea al 8% (p<0,05). La adición de Equex STM Paste® a un diluyente con 5% de etilenglicol mejora los resultados frente al 4% de etilenglicol o el 8% de glicerol (p<0,05). El uso de 5% de etilenglicol y 0,5% de Equex STM Paste® no dio mejores resultados que el diluyente Uppsala-Equex (con 5% de Glicerol y 0,5% de Equex-STM Paste), que permite mayor supervivencia celular post-descongelación.

Bohórquez *et al.*, (2005), realizaron pruebas de congelamiento del semen de 7 machos caninos de varias razas, utilizando un diluyente a base de tris- yema-glucosa empleando glicerol como crioprotector. El semen fue congelado en vapores de nitrógeno líquido a 10 centímetros por encima de su nivel, el cual fue sometido a pruebas de evaluación considerándose los parámetros de volumen 2.8 ± 1,7; pH 6,4 ± 0.1; motilidad 71,4 ± 22,7; concentración (mill/ml) 333,4 x 10<sup>7</sup>

$\pm 243,5$  y anormalidades  $30\% \pm 25,1$ . Adicionalmente se realizaron pruebas de resistencia térmica en placas calentadas para el semen fresco, diluido, glicerinado y descongelado, por períodos de tiempo de 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, obteniéndose resultados de motilidad de hasta 30% al cabo de 90 minutos.

Sánchez *et al.*, (2006), observaron el efecto de dos diluyentes seminales [yema de huevo + Tris (EYT) y leche descremada fluida UHT] sobre la fertilidad potencial de espermatozoides caninos conservados a 4°C, evaluados a través del espermograma y de la prueba hipoosmótica (HOS). En el semen fresco, la motilidad progresiva (MP) fue  $95.7 \pm 3.6\%$  y la respuesta a HOS de  $79.8 \pm 6.6\%$ . Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de MP e integridad de membrana con HOS a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen. Se observaron mayores valores de MP y de espermatozoides dilatados en el diluyente EYT en todos los tiempos ( $p < 0.05$ ). No obstante, los valores de MP ( $>70\%$ ) y HOS ( $>60\%$ ) observados en cada uno de los tiempos de evaluación, independiente del tipo de diluyente, superaron los valores mínimos establecidos como adecuados para uso del semen canino refrigerado en inseminación artificial.

Batista *et al.*, (2007), evaluaron cuatro eyaculados por perro. Las muestras fueron procesadas de manera individual hasta alcanzar una dilución final con una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml, glicerol al 5% y Equex STM Paste® al 0.5%. Las muestras fueron sometidas a dos técnicas de congelación para evaluar la calidad seminal (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de anormalidades) a los 1, 30, 60, 120 y 360 días pos descongelación: (I) el semen fue congelado y almacenado en nitrógeno líquido; (II) el semen fue congelado y almacenado en un ultracongelador de –

152°C. Luego de la descongelación, se observó que la motilidad, la vitalidad espermática y el porcentaje de anormalidades no eran significativamente diferentes con la técnica de nitrógeno líquido de las obtenidas con el protocolo del ultracongelador.

## **2.2 ASPECTOS GENERALES DE *Canis familiares* “perro”**

El perro doméstico (*Canis familiares*) es un mamífero carnívoro, considerado el primer animal domesticado. El perro ha convivido con el ser humano como compañero de trabajo o animal de compañía en todas las culturas desde la antigüedad. Existen distintas razas dentro de la especie como las razas grandes, medianas y pequeñas, las cuales se diferencian por su aspecto, tamaño y función que desempeñan para el ser humano (Fogle, 1996). Entre las razas conocidas a nivel mundial, podemos encontrar al perro sin pelo del Perú o Viringo. Ésta raza se caracteriza por la ausencia de pelo en su cuerpo, debido a que genéticamente tiene un síndrome llamado “hipoplasia ectodérmica”. Por eso, al contacto físico con ellos da la impresión de estar tocando una bolsa de agua caliente. Otra de sus características es que su dentadura es casi siempre incompleta. Se desconoce cómo llegó al Perú, pero existen evidencias de que ha acompañado a las culturas pre-Incaicas (desde los años 300 a.C.).

### **2.2.1 Anatomía y fisiología reproductiva del macho canino**

Los perros, en general, pueden llegar a tener dos camadas de cachorros por año. La gestación dura 63 días y tienen de 1 a 10 crías por parto, aunque algunas pueden superar este número. Alcanzan la madurez sexual entre 1 y 3 años, dependiendo de la raza. Después del apareamiento, el macho queda unido a la hembra por aproximadamente 20 minutos, asegurando de ese modo que los espermatozoides lleguen a su destino. Tratar de separarlos durante esta etapa puede producir graves heridas en ambos animales.

El sistema reproductor del macho está formado por dos testículos, dos epidídimos, dos conductos deferentes y un pene. Los testículos tienen una función exógena (producción de espermatozoides) y endógena por la producción de hormonas (testosterona, inhibina, estrógeno y varias proteínas). El epidídimo proporciona el entorno para la maduración final de espermatozoides y sirve como órgano de almacenamiento de estas células. En el caso del perro el plasma seminal es producido por la próstata, a diferencia de otras especies que la producen a través de glándulas accesorias. El pene, protegido por el prepucio, tiene características peculiares como la presencia de un hueso peniano en el interior y una luz de tejido eréctil esponjoso, que proporcionan el "enganche" con la hembra durante la cópula (Johnston *et al.*, 2001).

El desarrollo de las gónadas y la espermatogénesis en el perro son similares a lo que ocurre en otros mamíferos. La diferenciación sexual se produce entre 27 y 34 días después de la concepción. El descenso de los testículos se produce entre 2 y 8 semanas después del nacimiento. Las células de Sertoli y las espermatogonias, que se multiplican en toda la vida, ya están presentes en los túbulos seminíferos alrededor de 16 semanas después del nacimiento (Kawakami *et al.*, 1991). Los espermatozoides y espermátidas se observan sólo después de 20 y 22 semanas después del nacimiento. La duración de la espermatogénesis es de 8 a 9 semanas y a partir de 4,5 ciclos de espermatogénesis los espermatozoides se observan en los túbulos epididimales. Una duración del ciclo del epitelio seminífero en perros es de 13,8 días, siendo dividido en ocho etapas, mientras que el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo es de 14 días (Foote *et al.*, 1972).

La calidad del semen mejora a medida que la madurez sexual se alcanza. El perro macho no está influenciado por la estacionalidad y es capaz de mantener su función testicular y la espermatogénesis durante todo el año (Martins, 2002).



Según Olar, (1984), la producción diaria de espermatozoides en el perro es entre 11,7 y 16,7 millones de espermatozoides por gramo de parénquima testicular. Estos autores sugirieron que la frecuencia de colección no afecta la producción diaria de espermatozoides, pero que puede reducir las reservas ubicadas en la cola del epidídimo y en el conducto deferente al 26% después de seis a ocho colecciones de semen por semana. Además, Johnston, (2001) considera que la concentración de espermatozoides normales en perros debe ser mayor de  $200 \times 10^6$  espermatozoides / mi.

### **2.2.1.1 Los espermatozoides caninos**

El gameto masculino o espermatozoide es muy diferenciado y polarizado. Su papel en la propagación de la identidad genética se establece a través de la penetración y posterior fecundación del ovocito (Andrade, 2005).

Fue Leeuwenhoek, en 1679, quien describió por primera vez los espermatozoides caninos (Oettlé, 1993). Más tarde, con el desarrollo de la microscopía en el siglo XIX, fue posible identificar las diferencias morfológicas específicas entre el esperma de diferentes especies animales (Rodríguez *et al.*, (1997). Según Bedford *et al.*, (1995), la diversificación en la morfología de las diferentes especies animales podría estar relacionada por las diferentes formas de fertilización. El espermatozoide canino tiene una longitud total de  $61,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ;  $6,1 \pm 0,04 \mu\text{m}$  de la cabeza con un ancho de  $3,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . La cabeza del espermatozoide está cubierta por el acrosoma post nuclear y está formada principalmente por el ADN y el núcleo. Según Dahlbon *et al.*, (1997), existen marcadas diferencias entre los individuos con respecto a la morfología de la cabeza de los espermatozoides en los perros.

El modelo básico de la estructura de la membrana plasmática de las células del esperma sigue una organización estructural de doble capa de fosfolípidos y proteínas asociados (Watson, 1995). En el esperma, el paquete doble no es

simplemente una membrana pasiva de bicapa lipídica en la que los receptores reciben señales moleculares específicas. También actúa como un receptor altamente especializado, asumiendo un papel activo en la capacidad fertilizante, la recepción de señales y modificando a lo largo del proceso de la espermatogénesis el tránsito y almacenamiento en el epidídimo, la eyaculación, el depósito en el tracto genital, la capacitación femenina y por último la penetración del ovocito (Watson, 1995).

Según Bouchard *et al.* (1990), la membrana plasmática de los espermatozoides caninos tiene una baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con las grasas saturadas. Esta peculiaridad sería el factor responsable de la resistencia propia de los espermatozoides caninos contra el choque térmico, ya que las células del espermatozoides de perro tienen una baja sensibilidad a las variaciones de temperatura.

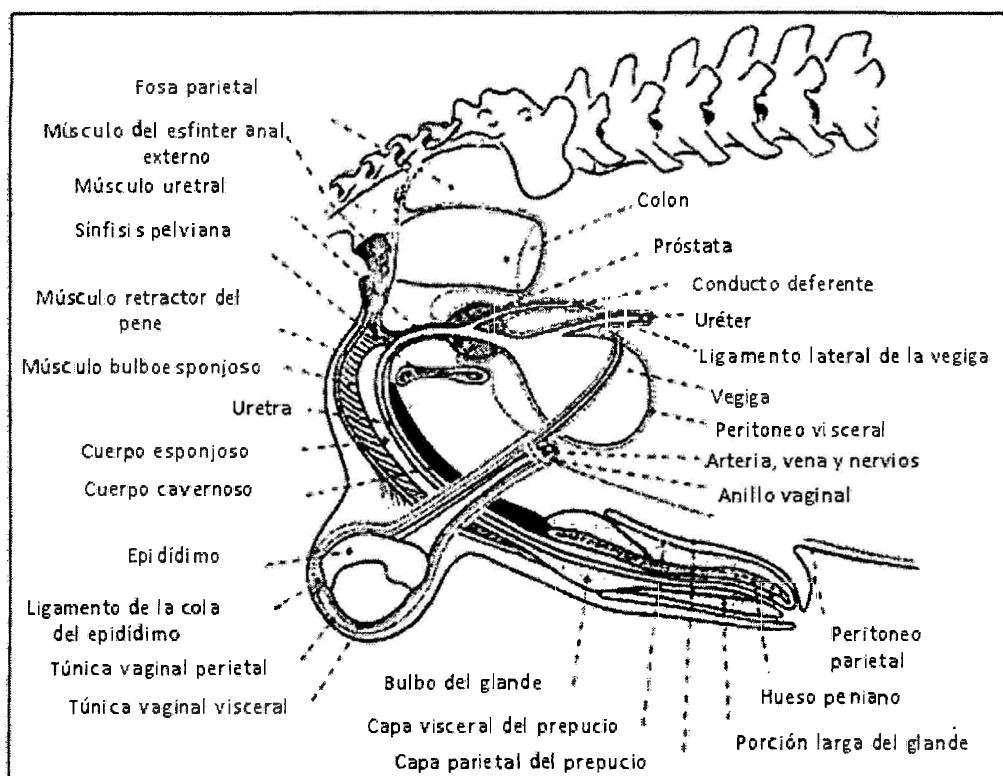


Gráfico N° 2.1. Sistema reproductor del macho *Canis familiaris* "perro"

Fuente: Andrade (2005).

### 2.2.2 Colección de semen

La colección de semen en los animales domésticos se realiza habitualmente con la ayuda de una vagina artificial, por manipulación digital o electroeyaculación. Los espermatozoides también se pueden coleccionar de los epidídimos luego de la castración quirúrgica, *pos mortem* o por lavado vaginal después del servicio natural. Es necesario recordar que el material de colección debe esterilizarse con UV, evitando en todo momento métodos químicos, así como la contaminación con residuos líquidos (Concannon *et al.*, 1993). La colección de semen es fácil en perros, especialmente en aquellos con experiencia previa de apareamiento. La presencia de una hembra en celo puede mejorar la calidad de la eyaculación, en particular para los perros sin experiencia o tímidos. Silva *et al.*, (1996), sostiene que es posible congelar hisopados de algodón impregnados con líquido vaginal de perras en celo o impregnados con feromona sintética metil-benzoato con el fin de frotar en la región perianal de una perra en el momento de recogida el esperma.

La eyaculación canina se divide naturalmente en tres fracciones distintas (Harrop, 1955). La primera fracción se compone de un líquido claro que se origina en la próstata y es responsable de la limpieza del canal de la uretra. La segunda fracción, rica en espermatozoides, tiene un volumen variable de acuerdo al tamaño testicular y la variación individual, tiene aspecto lechoso o turbio. La tercera fracción es líquido prostático, el cual es claro y se distingue fácilmente de la segunda fracción, presentando un gran volumen que sirve como un medio para el transporte de los espermatozoides al tracto genital de la perra (England y Allen, 1992).

En los últimos años se han descrito varios métodos de colección de semen en esta especie, tales como el masaje digital, la vagina artificial, la electroeyaculación y el vibrador eléctrico. Según Bouchard *et al.*, (1990), el uso

del masaje digital para la colecta de semen da mejores resultados que la vagina artificial.

#### **a) Manipulación digital**

El masaje digital consiste en frotar el prepucio hasta que se forme el bulbo cavernoso del pene, hasta que el animal alcance una erección parcial. Luego se presiona sobre el bulbo del glande protruyéndolo fuera del prepucio, con una presión moderada. El eyaculado se recoge fraccionadamente con la ayuda de un embudo de vidrio o de tubos de plástico graduados, evitándose el contacto directo entre el pene y el material de recolección para evitar un sangrado. En ocasiones es útil realizar presión pulsátil sobre el proceso uretral para facilitar la eyaculación en animales no entrenados. Luego de la fracción espermática comienzan movimientos pulsátiles de la uretra, iniciándose así la tercera fracción prostática. En este momento el pene se gira 180° hacia atrás, simulando la posición tomada en el servicio natural (abotonamiento). De la fracción prostática se colecta solo la cantidad suficiente para asegurar la recogida de toda la fracción espermática. Una vez concluida la colección del semen, se controla la reintroducción normal del pene en el prepucio (Seager y Fletcher, 1972).

#### **b) Vagina artificial**

La primera vagina artificial para la especie canina fue creada en 1914 por un fisiólogo italiano (Blonz, 1989). Las vaginas artificiales utilizadas a partir de 1940 son modificaciones. El uso de la vagina de látex permite introducir el pene luego de protruirlo, previamente esta debe ser lubricada. Se debe colocar al final de la vagina un tubo colector. Con este método de colección las fracciones del eyaculado se obtienen juntas. No obstante el plasma seminal es perjudicial para el semen. Este método no es de mucha aceptación y la presencia de lubricantes puede afectar la motilidad espermática. (Fontbonne, 1992).

### **2.3 PRINCIPIOS GENERALES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN**

La conservación de los espermatozoides y su capacidad de fertilidad exige la reducción o interrupción del metabolismo celular. Este objetivo se consigue por medio de la refrigeración o de la congelación, utilizando temperaturas reducidas que depriman el metabolismo. La refrigeración permite mantener la longevidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides por algunos días, sin que su metabolismo sea completamente abolido (Maxwell y Stojanov, 1996).

La criopreservación de espermatozoides en varias especies, toma en cuenta las propiedades biofísicas, osmóticas, tolerancia a crioprotectores y tasas de congelamiento durante un proceso de criopreservación, ya que durante este proceso la célula es expuesta a un estrés osmótico y térmico.

En el proceso de criopreservación existen varios factores que determinan el éxito de este proceso, un factor determinante es el tipo de diluyente usado, la elección y la naturaleza del agente crioprotector mayormente utilizados son el glicerol el dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol; según las especies ya se tiene establecido el tipo y concentración de agente crioprotector a usar. Para facilitar mejoras en el proceso de criopreservación de espermatozoides, se necesita comprender las propiedades criobiológicas fundamentales de éstas células, entre las cuales se encuentran los límites de tolerancia osmótica y la respuesta a la adición, remoción y penetración de los agentes crioprotectores (Salomon y Maxwell, 1995)

El proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo. A diferencia de la refrigeración del

semen, el proceso de congelación necesita también del empleo de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura (Silva, 2007).

El concepto de congelación de las células, gametos, órganos e incluso los organismos que son luego descongelados, no es nuevo. La teoría detrás de la criopreservación es que si las células vivas pueden ser congeladas y mantenidas a temperaturas extremadamente bajas, entonces la tasa de los procesos biológicos necesarios para la vida puede ser reducida a un punto de animación suspendida. El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Las etapas más críticas son la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular, pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquier momento del proceso (Watson, 1995). Por otra parte, las etapas del protocolo de congelación se influyen mutuamente, así que los ritmos de cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente. Por tanto, el logro de una longevidad celular máxima requiere que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984).

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo (Polge *et al.*, 1949) y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y se utiliza con éxito en la inseminación artificial. A excepción de los bovinos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas, en parte porque los protocolos de congelación no proporcionaron resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992). Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias en la fisiología, la bioquímica del espermatozoide,

también a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor femenino que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C, principalmente a partir de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide. El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60°C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Con el enfriamiento de la suspensión celular por debajo de los 0°C, se produce una serie de procesos nocivos para la célula que comienzan con la formación de hielo en el compartimento extra-celular. La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intra-celular. Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extracelular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática. Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Cuando las células están sujetas a temperaturas inferiores a 0°C, el modo en que recuperan el equilibrio depende del ritmo de refrigeración y de su permeabilidad al agua. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad

al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intracelular hacia el hielo externo, o sea, se equilibran por deshidratación; pero si son refrigeradas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van equilibrar, en parte, por congelación intracelular. El ritmo de enfriamiento debe, por tanto, tener en cuenta estos fenómenos (Amann y Pickett, 1987).

La presencia de hielo extra-celular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles. Por el contrario, la formación de cristales de hielo intra-celulares provoca lesión y muerte de la célula. Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular. Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intracelular constituye microcristales y los daños derivados son muy reducidos (Amann y Pickett, 1987). La refrigeración y la congelación son acontecimientos que pueden conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide. Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos orgánulos del espermatozoide derivan de dos principales motivos de estrés de la criopreservación: las alteraciones de la temperatura, formación y disolución de los cristales de hielo. Además de la cristalización, también están implicadas alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes. En consecuencia, la motilidad e integridad acrosómica disminuyen de modo significativo, tras la congelación y descongelación (Watson, 1995).

### **2.3.1 Impacto de la refrigeración y congelación en la estructura, función espermática**

La reducida fertilidad del semen descongelado se atribuye principalmente a las alteraciones en la estructura y función de la membrana durante los procesos de



refrigeración, congelación y descongelación. En trabajos realizados con eyaculados de morueco, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación solamente entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, aunque a penas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Esto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide son afectadas en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

### **2.3.1.1 Susceptibilidad al choque térmico**

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones que sufre el espermatozoide, designadas colectivamente como "choque térmico". Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0°C y cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento, observándose movimientos circulares de los espermatozoides y pérdida precoz de la motilidad. Además se observan otras lesiones como son la disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana. Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación se lleva habitualmente a cabo con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realiza lentamente, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000). Las membranas celulares y la estructura acrosomal son las regiones espermáticas más afectadas por dicho proceso, de igual modo la estructura celular sufre alteraciones, la bioquímica espermática es susceptible de modificaciones por el choque térmico. Así se han referido cambios en el metabolismo espermático de los hidratos de carbono, pérdida de ciertas enzimas, eliminación de algunos lípidos de membrana y desequilibrio en la

distribución de cationes. A partir de entonces numerosos autores han explicado estos hechos por una pérdida de componentes de membrana que aumenta la permeabilidad celular (Watson, 1990).

La susceptibilidad al choque térmico viene determinada por el contenido de colesterol en las membranas y la proporción de ácidos grasos polinsaturados que están presentes en los fosfolípidos, ya que ambos fenómenos influyen en la fluidez de las membranas celulares. La relación colesterol-fosfolípidos es un hecho determinante en la fluidez de las membranas por interacción de los ácidos grasos. Las especies que tienen elevadas relaciones colesterol-fosfolípidos son las que mejor resisten los cambios de temperatura, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles donde se manifiesta alteraciones marcadas en el movimiento de iones, con acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y pérdidas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidencian alteraciones tan marcadas. Además en los espermatozoides de toro y cerdo se ha detectado acumulación de  $\text{Na}^+$  (De Leeuw *et al.*, 1990).

Otros factores que influyen en la sensibilidad al choque térmico, además de la especie de la cual procedan los espermatozoides, son el grado de maduración celular, la variabilidad individual y la presencia de plasma seminal estos parámetros van a incidir en la composición de las membranas celulares, originando variaciones en la estructura lipídica de las mismas, siendo estos hechos determinantes en la fluidez de la membrana plasmática (England, 1999).

### **2.3.2 Alteraciones morfo-funcionales causadas por la refrigeración y congelación**

#### **2.3.2.1 Refrigeración**

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal

estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw *et al.*, 1990). La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precózmamente se producen en el proceso, como hemos visto, está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debido al choque térmico. Esta pérdida de selectividad puede observarse mediante tinción intracelular con colorantes capaces de atravesar la membrana cuando ésta permanece intacta (Medeiros *et al.*, 2002).

En el cerdo, los daños en la membrana plasmática del espermatozoide asociados a la criopreservación están atribuidos a la refrigeración de las células hasta 5°C, más que a los procesos de congelación-descongelación (Maxwell *et al.*, 1997). En el toro, la dilución y refrigeración a 5°C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides. La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la motilidad. Por otra parte, el ADN sufre degeneración. Las alteraciones bioquímicas del espermatozoide están causadas sobre todo por la pérdida de la selectividad de la membrana, por la pérdida de enzimas y de fosfolípidos.

La refrigeración anticipa las modificaciones de la membrana plasmática que normalmente se producen durante la capacitación, observándose un incremento en la tendencia de las células a mostrar patrones típicos de los estadios de capacitación, cuando son teñidas con colorantes específicos. Estos datos indican que la refrigeración induce un estadio equivalente a la capacitación, fenómeno también observado a nivel de la reactividad y de la fluidez de la membrana y en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ , ya aludido. Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la

refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Watson, 2000).

Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios detectados durante la capacitación *in vitro*, dando lugar a un estado de capacitación "intermedia". Estos espermatozoides muy probablemente no permanecerían viables el tiempo suficiente para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales *in vivo* (principalmente cuando son inseminados en el tracto genital posterior). Por otra parte, podrían sufrir la reacción acrosómica precoz y serían incapaces de fecundar el ovocito (Green y Watson, 2001).

#### **2.3.2.2 Congelación**

En cuanto a los daños sufridos tras la congelación, Salamon y Maxwell (1995), esclarecen que la membrana plasmática y el acrosomal son más sensibles que el núcleo y la porción intermedia; que en el acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna, es decir, que el acrosoma propiamente dicho. Las principales situaciones de estrés para las membranas en los procesos de congelación y descongelación son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico; incluyendo: la adición del crioprotector antes de la congelación, alteraciones del volumen de la célula, las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, la deshidratación derivada de la congelación, las fases de transición de los fosfolípidos de membrana, así como los efectos de la elevada concentración de solutos y la formación intracelular de hielo (Parks y Graham, 1992). En consecuencia, los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica (Watson, 1995). Además de estos cambios se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante estos procesos de congelación. Los

daños acrosomales de muchas células, incluyendo la región ecuatorial, se manifiestan por la vesiculación acrosómica, conocida como reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular. Esta reacción consiste en la pérdida del acrosoma debido a la desintegración de las membranas acrosomal y plasmática durante la muerte celular a diferencia de la reacción acrosómica “verdadera” o fisiológica, estos espermatozoides no representan la población espermática con posibilidades de fertilizar ovocitos (Way *et al.*, 1995).

Las alteraciones acrosómicas observadas en una elevada proporción de los espermatozoides y la alteración en la composición de las cabezas sugieren que las modificaciones inducidas por la criopreservación pueden afectar a su longevidad y a su capacidad fertilizante (Ström *et al.*, 1998).

Las lesiones ultra-estructurales del espermatozoide durante la congelación y la descongelación se acompañan de alteraciones bioquímicas y de la pérdida de algunos constituyentes vitales (Salamon y Maxwell, 1995). La pérdida de enzimas en el proceso de congelación está asociada al declive de la actividad metabólica (Pace *et al.*, 1981).

Otro aspecto de la función espermática afectado por la congelación es el proceso de capacitación. El espermatozoide congelado y descongelado puede desarrollar reacción acrosómica y fecundación con más rapidez que un espermatozoide fresco no-capacitado, presentando un estado semejante a la capacitación que contribuye a su reducida longevidad y su rapidez en penetrar los ovocitos sin incubación (Watson, 1995). Una vez capacitado, el espermatozoide exhibe una tasa metabólica elevada, motilidad hiperactiva, aumento de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana y sino llega a alcanzar la fecundación, sufre reacción acrosómica espontánea debido al influjo descontrolado de  $Ca^{2+}$  (Cormier *et al.*, 1997). Sin embargo, una vez alcanzado un determinado grado de desestabilización, el espermatozoide continúa

progresivamente con la degeneración de la función de membrana hasta un punto en que es incapaz de mantener la integridad de la misma, de modo que la capacitación conduce inevitablemente a la muerte celular de los espermatozoides que no fecundaron (Cufry, 2000).

Las consecuencias de la congelación sobre el espermatozoide canino pueden ser: Alteraciones en la estructura proteico-lipídica de la membrana, disminución de la fluidez de la membrana, aumento de la permeabilidad de la membrana, pérdida de enzimas y de fosfolípidos, disminución de la actividad metabólica, disminución del consumo de ATP, plegamientos de la membrana plasmática, edema y rarefacción del acrosoma, vesiculación acrosómica y formación de radicales de oxígeno; lo que implicaría en la funcionalidad espermática, muerte celular, disminución de la motilidad, aumento de los espermatozoides incapacitados, reacción acrosómica precoz y reducción de la longevidad (Watson, 1995).

## **2.4 DILUCIÓN Y EMPLEO DE CRIOPROTECTORES**

Tras la obtención del semen, el primer paso a seguir es la dilución en un medio adecuado para la supervivencia de las células durante su procesamiento y conservación. El tipo de diluyente elegido y los ritmos específicos de refrigeración, congelación y descongelación son factores altamente importantes en la calidad del semen calentado o descongelado, pues influyen en la morfología y la motilidad de los espermatozoides y éstas, a su vez, influyen en los índices de concepción tras la inseminación artificial. En esencia, los diluyentes deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del eyaculado (Concannon y Battista., 1989). Es fundamental que el diluyente aporte una fuente de energía y proteja a los espermatozoides de los

daños causados por la congelación y la descongelación (England, 1993) y también por la refrigeración y posterior calentamiento.

En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche. Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas (Parks y Graham, 1992).

#### **2.4.1 Medios de dilución del semen**

Silva (2007), refiere que los dilutores son sustancias que deben presentar las siguientes propiedades:

1. Presión osmótica lo más isotónica posible con el esperma y mantenerla durante el almacenamiento (entorno a 320 miliosmoles/kg).
2. Contener sustancias tampón que permitan mantener un pH invariable y neutro.
3. Contener sustancias coloidales capaces de proteger a los espermatozoides.
4. Poseer sustancias nutritivas o elementos que favorecen el metabolismo, vitalidad y longevidad de los zoospermos.
5. Estar libres de sustancias tóxicas, productos bacterianos u organismos infecciosos perjudiciales para los espermatozoides.

Los diluyentes pueden ser divididos en dos grupos:

- a) Diluyentes iónicos: Se utilizan cuando se pretende inseminar con semen fresco.
- b) Diluyentes orgánicos: Se utilizan para períodos de conservación más largos en refrigeración o congelación.

Cabe mencionar que para la conservación de semen es necesario la utilización de medios de procedencia biológica o sintética, entre ellos se encuentra la yema

de huevo debido a su valor de descenso microscópico, similar al de semen y a su función protectora frente al "shock por frío", atribuible a la fracción lecitínica, a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (Quinn *et al.*, 1980).

La presencia de yema de huevo en el dilutor (5-20%) se comporta como un protector ante los efectos del choque frío. La adición de agentes crioprotectores es necesario para la sobrevivencia de los espermatozoides. La valoración de la concentración espermática es muy importante para realizar una buena dilución, por tanto estará en función del número mínimo de espermatozoides necesarios en cada dosis (Foulkes, 1977).

#### **2.4.2 Agentes crioprotectores (ACPs)**

La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, pues los crioprotectores tienen efectos notables sobre los fenómenos que acompañan a la congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extra-celulares y en la composición química (Fahy *et al.*, 1990).

La yema de huevo y la leche han sido los primeros componentes utilizados para preservar a los espermatozoides del efecto del frío. Estas son sustancias crioprotectoras puesto que durante los procesos de refrigeración y congelación minimizan la pérdida de los lípidos de membrana aportándole fosfolípidos de bajo peso molecular (Graham y Foote, 1987). Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en penetrantes como glicerol, DMSO, etilenglicol y en no-penetrantes incluyendo determinados azúcares. En la actualidad se incorporan a los diluyentes otras sustancias como detergentes y aminoácidos, combinadas generalmente con glicerol, esperando



preservar mejor la capacidad mótil y fecundante de los espermatozoides en los procesos de refrigeración y congelación.

Los ACPs son esenciales para la supervivencia celular durante la criopreservación, su adición y remoción subsiguiente crean un ambiente anisomótico para las células produciendo cambios en el volumen y daño osmótico potencial.

#### **2.4.2.1 Agentes penetrantes o permeables**

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, etilenglicol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH).

a) El glicerol es el crioprotector mas utilizado en los protocolos de congelación del semen de perro y prácticamente en todas las especies domésticas. Su descubrimiento como agente crioprotector se debe a Polge *et al.* (1949) y ha marcado un avance notable en la preservación del semen, por medio de la congelación. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares. Sin embargo, sugieren que su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extra-celular. Su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extra-celular y la proporción de agua en estado de no- congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrólitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución”, además mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intra-celular disponible para congelarse (Medeiros *et al.*, 2002). Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el glicerol también parece ejercer un efecto directo en la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992).

Por otra parte, existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una

espermatozoide descongelado, que el EG podría sustituir al glicerol si se utiliza en la misma concentración que éste (3%), o incluso más reducida. Asimismo, los trabajos en esta especie lo han sugerido, y además puntualizan que el EG, solo o en combinación con glicerol, ha proporcionado buenos resultados en la motilidad progresiva y en la preservación de la integridad de la membrana del espermatozoide y del acrosoma. La posibilidad de que el EG provoque menores “lesiones” osmóticas que otros crioprotectores en el espermatozoide equino, considerado como un espermatozoide con limitada capacidad de tolerancia a condiciones aniso-osmóticas, tendría como consecuencia un menor perjuicio para la motilidad y la viabilidad tras la descongelación. Por otra parte, los trabajos de Alvarenga *et al.*, (2000) han concluido que las propiedades crioprotectoras del EG han sido semejantes a las del glicerol en la congelación del espermatozoide equino, a niveles de conservación de la motilidad y de integridad acrosomal.

En otras especies como el ratón, en que la congelación del eyaculado es considerada más difícil que en las restantes especies domésticas el EG parece un crioprotector prometedor, capaz de minimizar las lesiones de la membrana plasmática. Por el contrario, Storey *et al.*, (1998) evidenciaron en esta especie una rápida pérdida de la integridad del espermatozoide fresco en presencia de 6% de EG. La adición de EG a 4°C al semen de la Chinchilla lanigera aportó mayor protección que la adición de glicerol (Carrascosa *et al.*, 2001).

En la congelación del semen de perro, el EG parece aportar resultados comparables a los del glicerol, al nivel de motilidad y velocidad espermática, así como en la preservación de su estructura e incluso podría sustituir al glicerol. Además, la buena respuesta del espermatozoide tras la exposición a soluciones hipertónicas de EG hace sugerir que este puede ser utilizado como crioprotector alternativo al glicerol (Songsasen *et al.*, 2002). Sin embargo, otro estudio

muestra que la integridad y la motilidad han sido mejor preservadas con glicerol al 7% que con EG al 7 y 4%.

#### **2.4.2.2 Agentes no penetrantes o no permeables**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, 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. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Aisen *et al.*, 2000).

La adición del criopreservante genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACPs y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACPs durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula. Éstos suelen usarse en asociación con los agentes crioprotectores penetrantes (Molinia *et al.*, 1994).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN**

La evaluación de los diferentes parámetros del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE), perteneciente a la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, durante los meses de octubre - marzo del 2009-2010.

#### **3.2 SISTEMA DE MUESTREO**

##### **3.2.1 Población**

Estaba conformada por los animales de las diferentes razas de la especie *Canis familiaris* "perro" de la ciudad de Lima, octubre, 2009 – marzo, 2010.

##### **3.2.2 Muestra**

Como unidad de muestra se tomó 06 eyaculados de cada uno de los 06 machos caninos de varias razas, edades y pesos, colectados por manipulación digital.

Las muestras fueron tomadas de manera no probabilística es decir que sólo se tomó las muestras que presentaban motilidades mayores o iguales al 70%, por las características de las mismas.

### **3.3 METODOLOGÍA**

#### **3.3.1 SELECCIÓN Y ENTRENAMIENTO DE LOS MACHOS**

Se seleccionaron 06 animales de razas medianas a grandes (01 Samoyedo, 02 Siberianos, 01 Pastor Francés, 01 cruce de Fila con Dogo argentino y 01 Bull Terrier), con un peso promedio de  $36.5 \pm 7.2$  kg y edad promedio de  $4.5 \pm 1.5$  años.

La selección se hizo básicamente por la condición corporal, estado sanitario, tamaño, forma, consistencia, elasticidad de los testículos y epidídimo, así como las condiciones sanitarias del prepucio y el pene.

Los animales fueron entrenados 2 veces a la semana por un período de cuatro semanas consecutivas antes del período experimental, para su acostumbamiento al personal.

#### **3.3.2 DILUTORES**

Se preparó un dilutor en dos fracciones (A y B). Ambos contenían básicamente los mismos ingredientes en su composición y la diferencia se basa en el uso de una concentración mayor de glicerol y etilenglicol en el dilutor B. Los componentes de los dilutores fueron: TRIS, ácido cítrico, glucosa, penicilina, estreptomicina, yema de huevo, glicerol, etilenglicol y agua bidestilada. El dilutor A fue utilizado para equilibrar el semen antes de la congelación. El mientras que el dilutor B fue adicionado antes del proceso de congelación.

#### **3.3.3 COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL SEMEN**

La colección de semen se llevó a cabo con una frecuencia de 2 veces a la semana, mediante la estimulación sobre el bulbo peneano depositando el eyaculado en un tubo de centrifuga de 50 ml, de cada eyaculado sólo se tomó la fracción espermática lo cual fue trasladado al laboratorio previamente diluido en PBS en una proporción 1:1.

En las muestras de semen fresco fueron evaluadas el volumen, color, motilidad, concentración espermática, integridad de membrana, porcentaje de vivos y muertos y porcentaje de anomalías (Bohórquez *et al.*, 2005). Para la dilución del semen se utilizó el dilutor tris-glucosa-yema. La motilidad fue estimada sobre platina caliente temperada a 38 °C a un aumento de 400X.

Estas evaluaciones se realizaron en el semen fresco y descongelado.

Sólo fueron congeladas las muestras seminales consideradas como óptimas y que presentaran: color y volumen normal de acuerdo a la talla del macho.

### **3.3.4 PROCESADO DEL SEMEN**

Los eyaculados de cada animal fueron procesados de forma individual. Cada eyaculado fue centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue retirado con una micropipeta de 1000 µl para proceder a diluir el precipitado. A continuación, los espermatozoides fueron resuspendidos con el dilutor A, dependiendo de la concentración espermática previamente determinada; posteriormente, el semen fue refrigerado a 4°C por 1.5 h; al cabo de este tiempo una cantidad similar del dilutor B fue añadido en tres partes cada 15 minutos, al final de la dilución fue evaluada la motilidad espermática post refrigerado, para luego ser empajillado y congelado.

### **3.3.5 EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN SEMEN FRESCO Y POST DESCONGELACIÓN**

#### **3.3.5.1 Motilidad individual de los espermatozoides del perro**

La motilidad fue evaluada mediante la observación directa al microscopio a 400X sobre platina caliente, de una gota de semen fresco colocada en un portaobjeto temperado a 38 °C, y se procedió a observar (Feldman y Nelson, 2000).

Se evaluaron de acuerdo al porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100) y la calidad del mismo. El valor de la motilidad individual se expresó en porcentajes.

### **3.3.5.2 Reacción hiposmótica de la membrana (HOS)**

La determinación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de perro, consistió en someter al espermatozoide a una solución hiposmótica, provocando el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior de la célula espermática para lograr el equilibrio osmótico. La prueba de endósmosis varía en cuanto a la presión osmótica de la solución y tiempo de exposición de los espermatozoides a la misma, dependiendo de la especie utilizada.

En la técnica de Kumi, (1993), citada por Bohórquez 2005, se señala que se utilizó una solución hiposmótica de citrato de sodio y fructosa (55 mOsm/Kg) para la determinación del porcentaje de endósmosis.

Se mezclaron 50  $\mu$ l de semen diluido con 200  $\mu$ l de la solución hiposmótica de 55 mOsm/kg y se llevó a incubar a 37°C durante 20 minutos. Luego se realizó un frotis en una lámina portaobjeto para observar el porcentaje de espermatozoides con endosmosis total, así como los que no sufrieron ningún cambio morfológico a nivel del flagelo espermático.

Se contabilizaron un total de 200 espermatozoides por muestra mediante la utilización de un microscopio compuesto a 400X, expresando el porcentaje de espermatozoides con endosmosis total.

### **3.3.5.3 Porcentaje de vivos y muertos**

Esta tinción se realizó para diferenciar aquellos espermatozoides vivos de los muertos. La técnica empleada para determinar vivos y muertos es la coloración eosina – nigrosina (Hewitt y England., 1998).

1. Se prepararon los colorantes: primero la eosina al 5% en citrato de sodio y la nigrosina al 10% también en citrato de sodio como se indica (Cuadro 03, anexo) cada uno por separado, se homogeneiza bien para luego ser utilizado.

2. Luego se colocaron en una lámina portaobjeto a un centímetro del final una gota de eosina preparada, de igual modo se colocó dos gotas de nigrosina y al final se colocó la muestra de semen para luego mezclarlas y homogeneizarlas, con otra lámina portaobjetos sobre la primera se realizó el frotis.

3. Rápidamente se secaron las láminas coloreadas sobre una platina caliente.

4. Los espermatozoides muertos absorbieron el colorante y tuvieron un color similar al del colorante, los espermatozoides vivos resistieron a la tinción y quedaron sin colorante. Vivos (no teñidos) y muertos (teñidos) se contaron como mínimo 200 espermatozoides bajo el objetivo de inmersión.

### **3.3.6 CONGELACIÓN DEL SEMEN CANINO**

La técnica de congelación según Bohórquez *et al.*, (2005), fue la siguiente:

1. Se realizó una dilución de 50 millones de espermatozoides/ml.

2. Se enfrió progresivamente hasta alcanzar los 4°C, en un tiempo aproximado de 1.5 h.

3. Al cabo de este tiempo se añadió el dilutor B en 3 partes cada 15 min.

4. Se aspiraron los espermatozoides diluidos y refrigerados en pajuelas de plástico de 0.25cc.

5. Luego las pajillas con semen fueron sometidos en vapor de nitrógeno líquido, a 10 cm sobre el nivel del mismo, por un período de 8 minutos para luego ser sumergidos completamente en nitrógeno líquido a -196 °C.

6. Luego fueron almacenados en tanques de nitrógeno líquido.

### **3.3.7 DESCONGELACIÓN DE LAS PAJILLAS**

El semen fue descongelado en agua a la temperatura de 38°C por 20 segundos.

Luego de secar perfectamente la pajuela, la misma fue vaciada y sometida a su evaluación final.



### **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados sobre volumen, concentración espermática, motilidad inicial, vitalidad, integridad de membrana y anormalidades del espermatozoide de perro fueron analizados por ANVA dentro y entre tratamientos, la prueba de Tukey para hacer análisis de las medias y la prueba *T* de student para la igualdad de medias antes y después del congelamiento del espermatozoide canino.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15 considerándose, para todos los análisis un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

#### IV. RESULTADOS

**Cuadro N°01: Distribución de raza, edad y peso de los animales muestra para la colección de semen de *Canis familiaris* “perro”, Lima 2009-2010.**

N° Animal	Raza	Edad (años)	Peso (Kg)
1	Beauceron	6	45
2	Siberiano	4	38
3	Bull terrier	3	25
4	Fila-Dogo	3	43
5	Siberiano	6	35
6	Samoyedo	6	33

**Cuadro N°02: Promedio de las características seminales obtenidos de seis machos caninos, Lima 2009-2010.**

N° animal	Volumen (ml)*	Color	Motilidad espermática (%) *	Concentración (10 <sup>6</sup> /ml) *	Vivos(%)	Anormalid. (%)	Integridad de membrana (%)
1	6.33 ± 1.36 <sup>a</sup>	Blanco opalescente	70.83 ± 10.21 <sup>b</sup>	508.00 ± 283.23 <sup>a,b</sup>	86.17 ± 8.73	21.50 ± 9.00	78.58 ± 14.60
2	4.95 ± 1.38 <sup>a,b,c</sup>	Blanco claro	70.00 ± 5.48 <sup>b</sup>	228.17 ± 152.13 <sup>b</sup>	87.42 ± 5.45	18.37 ± 8.27	71.58 ± 16.69
3	3.25 ± 2.66 <sup>b,c,d</sup>	Blanco opalescente	67.50 ± 8.80 <sup>b</sup>	376.75 ± 317.95 <sup>b</sup>	78.70 ± 5.35	22.50 ± 5.63	68.22 ± 11.76
4	5.75 ± 1.21 <sup>a,b</sup>	Blanco claro	88.33 ± 4.08 <sup>a</sup>	701.67 ± 199.65 <sup>a,b</sup>	89.75 ± 9.07	13.58 ± 3.71	71.67 ± 6.20
5	1.92 ± 1.39 <sup>d</sup>	Blanco claro	68.33 ± 4.08 <sup>b</sup>	413.00 ± 193.28 <sup>b</sup>	83.42 ± 6.08	16.75 ± 3.08	64.67 ± 13.22
6	2.33 ± 1.37 <sup>d,c</sup>	Blanco claro	73.33 ± 5.16 <sup>b</sup>	1094.08 ± 656.16 <sup>a</sup>	86.75 ± 4.67	18.25 ± 4.29	72.83 ± 10.55

Media(%)± Desviación típica

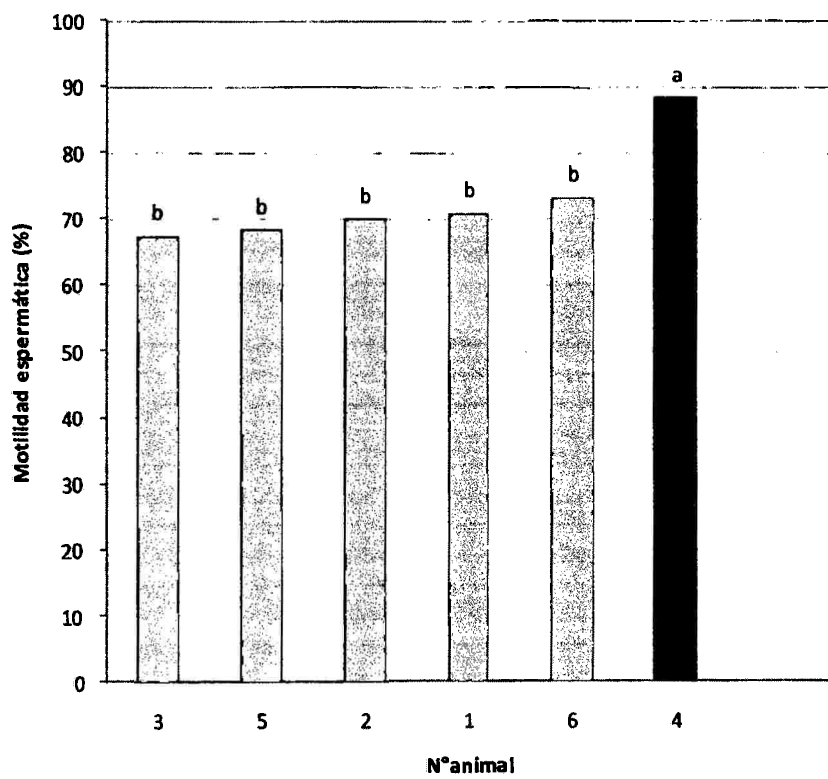
\* a, b, c, d: Rangos asignados por el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

**Cuadro N°03: Promedio de las características de semen canino utilizando glicerol y etilenglicol después de la congelación, Lima 2009-2010.**

<b>N° animal</b>	<b>Motilidad espermática (%) *</b>	<b>Espermatozoides vivos(%)*</b>	<b>Integridad de membrana (%) *</b>	<b>Anormalidades (%) *</b>
<b>1</b>	29.58± 9.41 <sup>a</sup>	48.54±7.87 <sup>a</sup>	57.79±11.83 <sup>a</sup>	31.54±13.24 <sup>a</sup>
<b>2</b>	18.17±3,61 <sup>b</sup>	29.75±8,27 <sup>b,c</sup>	33.83± 11,72 <sup>b,c</sup>	27.33 ± 7.43 <sup>a,b</sup>
<b>3</b>	16.5 ± 6,78 <sup>b</sup>	34.50 ± 8,28 <sup>b,c</sup>	30.08 ± 12.29 <sup>c</sup>	29.38 ± 6.21 <sup>a,b</sup>
<b>4</b>	28.33± 6.51 <sup>a</sup>	39.58± 8.12 <sup>a,b</sup>	57.42± 13.15 <sup>a</sup>	23.93± 5.36 <sup>a,b</sup>
<b>5</b>	14.58± 2.58 <sup>b</sup>	27.42± 8.98 <sup>c</sup>	36.92± 6.84 <sup>b,c</sup>	21.13± 5.18 <sup>b</sup>
<b>6</b>	16.82± 4.04 <sup>b</sup>	29.27± 12.15 <sup>b,c</sup>	46.95± 16.18 <sup>a,b</sup>	23.91±4.14 <sup>a,b</sup>

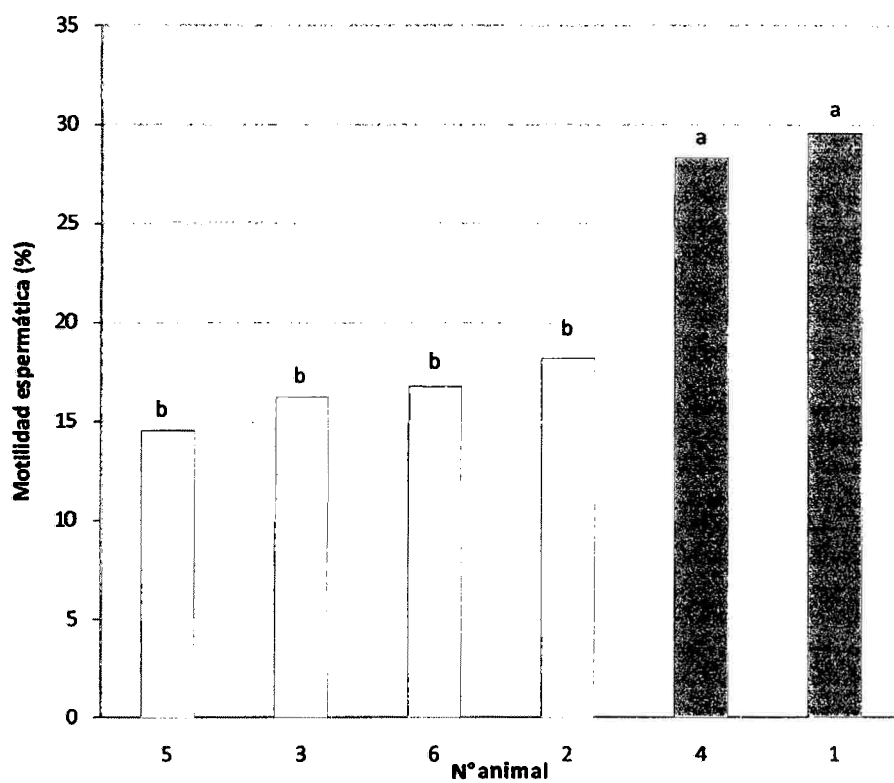
Media(%)± Desviación típica

\* a, b, c: Rangos asignados por el test de Tukey ( $\alpha=0.05$ )



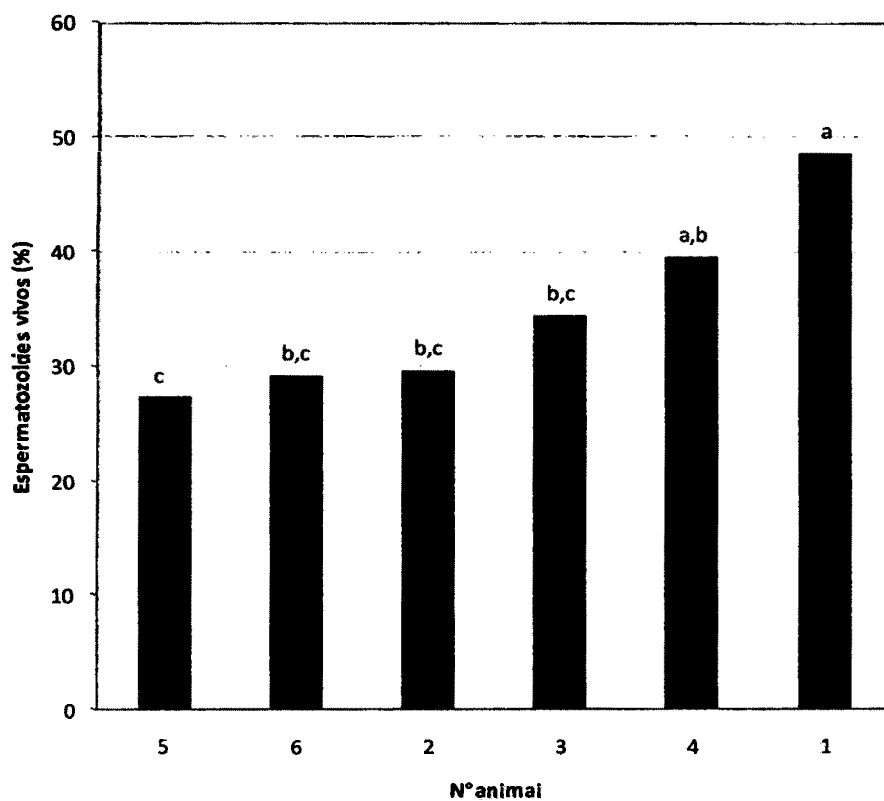
\*a, b: rangos asignados por el test de Tukey ( $\alpha < 0.05$ )

**Gráfico N°03. Valor promedio del porcentaje de motilidad espermática inicial de seis machos de *Canis familiaris*, Lima 2009-2010.**



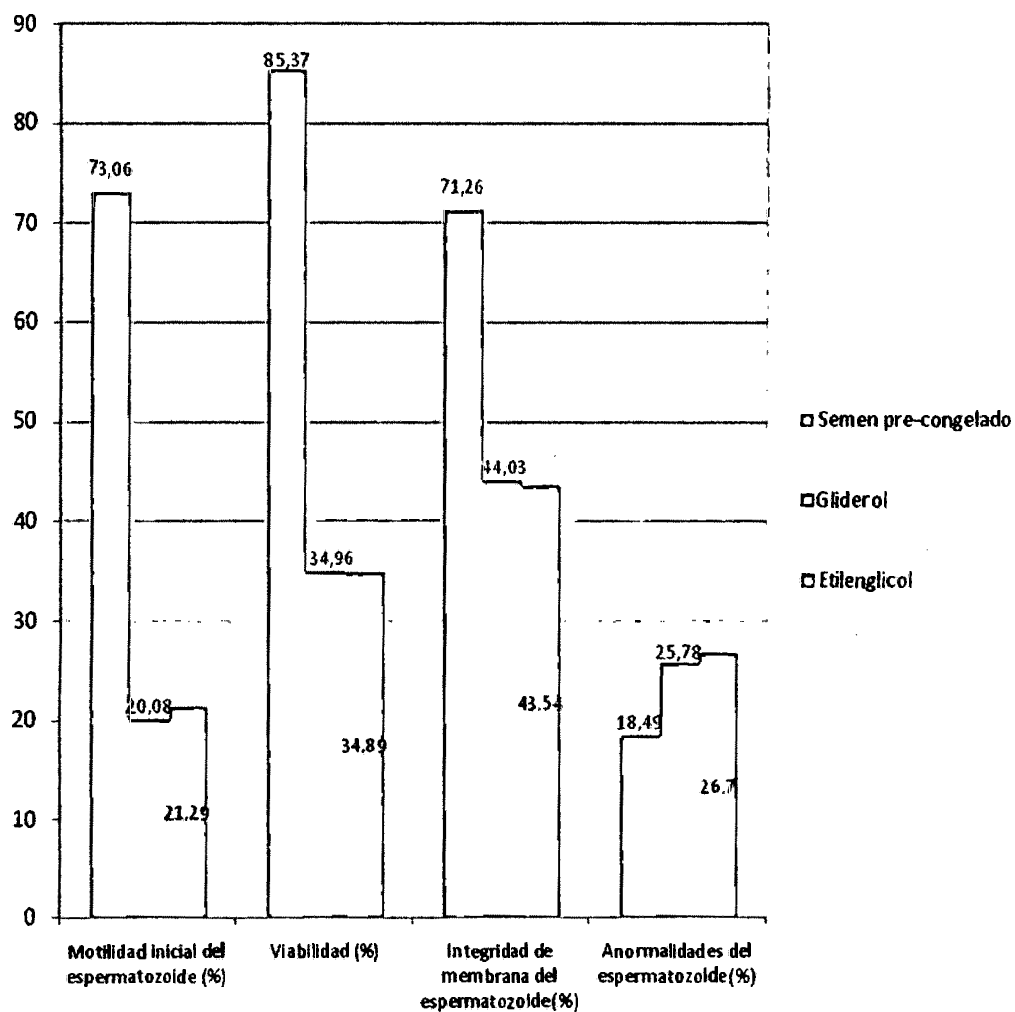
\*a, b: rangos asignados por el test de Tukey ( $\alpha < 0.05$ )

**Gráfico N°04. Valor promedio del porcentaje de motilidad espermática post-descongelación de seis machos de *Canis familiaris*, Lima 2009-2010.**



\*a, b, c: rangos asignados por el test de Tukey ( $\alpha < 0.05$ )

**Gráfico N°05. Valor promedio del porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación de seis machos de *Canis familiaris*, Lima 2009-2010.**



**Gráfico N° 08. Valor promedio del porcentaje de las características del semen precongelado y post-descongelado con Glicerol y Etilenglicol de seis machos de *Canis familiaris*, Lima 2009-2010.**



## V. DISCUSIÓN

### 5.1 Características seminales en fresco

En el semen fresco, las características seminales macroscópicas y microscópicas mostraron ligeras variaciones entre individuos, pero generalmente se mantuvieron bastante homogéneas dentro del mismo animal (Cuadro N°02). El volumen eyaculado (2ª fracción) mostraron una importante variabilidad (rango: 1.9 - 6.3 ml) entre los diferentes animales, presentando mayores volúmenes los animales 1 y 4, los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por otros autores (Alamo, 2007; Concannon *et al.*, 1993; Romagnoli, 2002). Asimismo, dentro de cada individuo, el volumen aportado también fue bastante variable en todas las colectas efectuadas. Resulta ampliamente aceptado que el rango de volumen de semen eyaculado obtenido en los diferentes estudios puede ser consecuencia de numerosos factores: raza, edad, frecuencia de colección, tamaño testicular, reserva espermática extragonadal. (Concannon *et al.*, 1993; England, 1999), si bien queda fuera de toda duda, que la razón principal de las oscilaciones parece ser la variabilidad individual propia de cada ejemplar, como se muestra en el Gráfico N°01.

Con referencia a la motilidad individual progresiva, los valores obtenidos fueron variables entre individuos, presentando el animal 4 ( $88.3 \% \pm 4.08$ ) y 3 ( $67.50 \pm 8.80$ ) mayor y menor porcentaje de motilidad espermática respectivamente. Estos valores se encuadran dentro de los descritos por otros autores, hay estudios que describen resultados bajos de motilidad (valor medio: 69.4%; England, 1999), si bien, la mayoría de los autores utiliza semen con una motilidad comprendida entre un 70-80% (Thomas *et al.*, 1993; Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997; Yildiz *et al.*, 2000) y otros autores utilizan muestras seminales con motilidades superiores al 90% (Silva y Verstegen, 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000).

El parámetro microscópico que mayor oscilación mostró fue la concentración espermática (rango: 228 - 1094 x 10<sup>6</sup> esp/ml); estas variaciones se presentaron entre diferentes individuos como dentro del mismo macho (Gráfico N°02). Al igual que la vitalidad espermática, las diferencias entre individuos pudieron deberse a que los machos pertenecían a diferentes razas y presentaban distintas edades. Asimismo, varios autores defienden la teoría de que la producción espermática depende de la cantidad de parénquima testicular presente; de hecho, se ha establecido que los ejemplares de razas grandes producen mayor cantidad de espermatozoides que los de razas pequeñas que tienen menor tamaño testicular (Alamo, 2007; Johnston *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2007) y queda perfectamente claro que las reservas espermáticas del epidídimo dependen del tamaño del animal (Alamo, 2007; England, 1999). Con respecto a la variación dentro de un mismo individuo, las concentraciones espermáticas fueron mayores a partir de la 2<sup>da</sup> recogida, conforme la eyaculación espermática adquiría cierta regularidad.

En cuanto a la viabilidad espermática, en el presente trabajo los porcentajes medios observados oscilaron entre un 78.7 y un 87.4%. Este parámetro no

mostró diferencias entre individuos, siendo éstos resultados comparables a los obtenidos en fresco por otros autores que describen valores de viabilidad que oscilan entre 80-95% (Silva y Verstegen, 1995; Alamo, 2007; Batista *et al.*, 2007). Las diferencias encontradas en los porcentajes de vitalidad fueron debidas probablemente a la utilización de animales de diferentes razas, con edades no similares, además de la propia variabilidad individual que se puede presentar entre distintos ejemplares.

Finalmente, aunque se observó una cierta variabilidad en algunos individuos concretos, el porcentaje medio de anomalías fue de (18.5 %) e integridad de membrana espermática (71.3 %) presentaron valores intermedios por debajo del 20% y del 30%, respectivamente, estos valores son semejantes a los descritos para espermatozoides caninos por Sánchez *et al.*, 2006; England, 2000; Sánchez *et al.*, 2002, aunque no hubo diferencias significativas entre individuos. Esta circunstancia podía asociarse a que los ejemplares empleados se encontraban en una condición corporal, estado sanitario y rango de edad normal para los procesos de generación de espermatozoides normales. Aunque el animal 1 y 3 presentaron mayores anomalías con respecto al resto de animales, hay estudios que demuestran que un mayor porcentaje de anomalías puede aparecer como consecuencia de inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de testosterona, edad avanzada, etc. (Alamo, 2007; Kawakami *et al.*, 1998; Peña, 2004).

## **5.2 Características seminales post-descongelación**

Al realizar la comparación de la eficiencia de los agentes crioprotectores permeables (10% glicerol y 10% etilenglicol) en el proceso de congelación de semen canino (Gráfico N° 08), los resultados obtenidos demostraron que el

glicerol presenta un efecto crioprotector similar al etilenglicol ( $p > 0.05$ ), en todos los parámetros evaluados después de la descongelación (motilidad espermática, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana) no observándose diferencias significativas, los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparables a los publicados por otros autores que utilizaron diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente (3%, 4%, 5%, 6%, 8% y 10 %) como concentración final (Louise, 2001; Sánchez *et al.*, 2002; Andrade, 2005; Bohórquez *et al.*, 2005; Silva, 1996; Alamo, 2007), con valores que oscilan entre un 20 y un 59% de motilidad individual progresiva.

Algunos autores obtienen resultados elevados (motilidad post-descongelación  $> 60\%$ ), cuando se utiliza el glicerol y etilenglicol en combinación de los mismos con diluyentes comerciales y la adición de aminoácidos como la taurina en el proceso de dilución seminal (Silva y Verstegen, 1995; Silva *et al.*, 1996; Andrade, 2005; Batista *et al.*, 2007)).

En este estudio realizado se pudo comprobar que al añadir un 10% de glicerol y 10% etilenglicol al diluyente, provoca un estrés osmótico que disminuye el porcentaje de la viabilidad espermática post-descongelación, algunos estudios demuestran que a elevadas concentraciones éstos crioprotectores tienen un efecto tóxico sobre los espermatozoides como alteraciones físico-químicas que pueden llevar a la ruptura de la membrana espermática, remoción de importantes proteínas en la membrana u originar daños acrosomales. También pueden inducir a la modificación de la estabilidad de la estructura lipídica y la permeabilidad de la membrana celular esto contribuye en la reducción de la supervivencia y la aceleración de la capacitación espermática (Watson, 1995; Curry, 2000).

Otros autores, que han realizado estudios utilizando diferentes concentraciones de glicerol han obtenido resultados diversos, así Olar *et al.*, (1989) demostraron

que la motilidad post-descongelación de los espermatozoides era mejor con un 2-4% de glicerol que cuando se utilizaba un 8%, mientras que Fontbonne (1990) no encontró diferencias utilizando diluyentes con un 4 o un 8% de glicerol. Finalmente, Fontbonne y Badinand (1993) observaron que no se presentaban diferencias cuando se utilizaba un 3.2 o un 6.4% de glicerol en la concentración final, mientras que cuando se utilizaba un 1.6% se provocaba un descenso significativo de la motilidad post-descongelación, utilizando otros envases de conservación y con un 6% de glicerol de concentración final en el diluyente, obtienen resultados de motilidad individual progresiva del  $29.1 \pm 1.3$  y  $34.1 \pm 2.4\%$  en pellets y tubos de aluminio de 5 mi respectivamente (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997). Cuando la concentración final de glicerol se incrementa al 8%, se detectaron valores medios de motilidad del  $20.5 \pm 1.3$  y  $25.9 \pm 2.4\%$  para pellets y tubos de aluminio de 5 mi, respectivamente (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1997).

En el Cuadro N°03, se puede apreciar los resultados obtenidos tras la descongelación donde se puede observar claramente la disminución de la motilidad progresiva existiendo un cierto grado de variabilidad individual en el semen descongelado. Dentro de cada animal, la motilidad individual mostraba valores dispersos, que podrían explicarse por un efecto del shock térmico, estrés osmótico, la reducción del metabolismo espermático y daños causados sobre las células espermáticas (Watson, 1995), por tanto el logro de una longevidad celular máxima requiere que el ritmo de descongelación este en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984), algunos de los machos empleados presentan descensos en la motilidad post-descongelación más evidentes que otros, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en la calidad seminal post-descongelación entre las diferentes razas, la baja calidad, podría disminuir la viabilidad y la capacidad fertilizante del espermatozoide canino (Gráfico N°04).

Con respecto a la viabilidad espermática (Gráfico N° 05), los resultados obtenidos evidencian diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre las muestras congeladas de los diferentes animales siendo el animal 1 y 5 que presentaron un mayor y menor porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación (48.5 y 27.4% respectivamente). Éstos resultados son similares a otros estudios que utilizaron concentraciones similares de dilutores y agentes crioprotectores, presentando valores de viabilidad espermática que oscilan entre un 50-65% de espermatozoides vivos (Bohórquez *et al.*, 2005; Alamo, 2007; Batista *et al.*, 2007). Otros autores también describen valores de viabilidad comprendidos entre 70-85%, pero el diluyente empleado en estos estudios contenía un 8% de glicerol (Silva *et al.*, 1996; Yildiz *et al.*, 2000).

En base a los resultados observados, parece lógico suponer que pueda existir cierta predisposición individual a la congelación, ya que hay individuos que mantienen valores medios de viabilidad del 84% (animal 1 y 5), la motilidad sufre un notable descenso (48% y 27%, respectivamente). Este hecho fue constatado por Batista *et al.*, (2007) en un estudio realizado en perros de la raza Dogo Canario, donde observaron que de los 5 animales empleados en su estudio, dos de ellos manifestaron una disminución significativa en la motilidad seminal, pero los valores de viabilidad espermática permanecían relativamente altos. Asimismo, Peña *et al.*, (2000) proponían la posibilidad de que el deterioro de la calidad seminal se deba a la disminución en la concentración de calcio intracelular, por un mal funcionamiento de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la membrana celular del espermatozoide, debido a la agresión que suponía los procedimientos de criopreservación; esta modificación en el funcionamiento de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  podría tener reflejo primero sobre la motilidad espermática, para posteriormente terminar afectando a la vitalidad espermática, además la formación de cristales de hielo intracelular, alteraciones de la temperatura, el

grado de maduración celular y el proceso de capacitación espermática que provoca un grado de desestabilización que causa la degeneración espermática que conduce inevitablemente a la muerte (Watson, 1995).

Luego de ser sometidos a la prueba hipo-osmótica los espermatozoides presentaron cambios morfológicos evidenciados por la curvatura de la cola y la pieza intermedia. En los animales 1 y 4 se pueden observar (Cuadro N° 03) que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), al realizar la comparación con el animal 3 que presentó mayor porcentaje de alteraciones a nivel de la membrana espermática (70%) las diferencias individuales son bastante evidentes (Gráfico N°06).

La diferencia en la respuesta a la prueba hiposmótica entre el semen fresco y el descongelado se podría explicar por daño a la membrana espermática durante el proceso de congelación, la deshidratación osmótica más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultra-estructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992), porque cada etapa del proceso son críticas que ejerce una interacción especial con la estructura, función de la membrana y con el metabolismo celular, pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionamiento normal en cualquier momento del proceso (Watson, 1995).

Diferentes autores postulan que el glicerol, además de los efectos osmóticos beneficiosos para la congelación seminal, actúa directamente sobre la membrana espermática y aunque no se conoce con exactitud la naturaleza de esta acción, puede relacionarse con la alteración directa de la membrana espermática, la interacción con los enlaces de proteínas y glicoproteínas, o bien la inducción de un incremento de la demanda bioenergética propone que la interacción de todos estos factores, podría explicar porqué la adición de concentraciones elevadas de glicerol provocan mejores resultados de motilidad,

pero ello va en el aumento del porcentaje de anomalías en los espermatozoides presentes en las muestras descongeladas (Alamo, 2007).

Al estudiar cada animal por separado, se observa que en 3 de los perros (1, 4 y 6), los valores promedios de integridad de membrana fueron mayores al 50%, independientemente del agente crioprotector, en los machos restantes (5, 2 y 3) se observaron porcentajes superiores al 65% de alteraciones membranas.

Los ejemplares que tenían valores de motilidad espermática más homogéneos (1 y 4) post-descongelado mostraron este mismo comportamiento cuando se valoraban las alteraciones presentes en las muestras. Asimismo, los perros 1 y 4 también evidenciaban un comportamiento correlacionado entre ambos parámetros, el resto de los individuos presentaron comportamientos más arbitrarios en correlación entre parámetros se refiere.

En las alteraciones morfológicas no se detectaron diferencias entre los resultados obtenidos con respecto a los agentes crioprotectores utilizados (10% glicerol y 10% etilenglicol) post-descongelado, pero las diferencias entre individuos son significativas ( $p < 0.05$ ) aunque se observó un porcentaje mayor de anormalidades en el animal 1, 3 y 2 de 31.5%, 29.4% y 27, 3% respectivamente (Gráfico N°07), estas alteraciones se pueden producir principalmente durante la refrigeración y la congelación que afectan su longevidad y capacidad fertilizante. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Silva *et al.*, 1996; Bohórquez *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2003) que presentan un promedio de 27% de anormalidades, también describen valores inferiores al 15% de anormalidades (Batista *et al.*, 2007; Alamo, 2007), e incluso niveles superiores al 50% (Hay *et al.*, 1997).

Hay estudios donde se han intentado utilizar sistemas informáticos para la determinación de alteraciones morfológicas, porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad



del movimiento, como el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis), resultando este sistema costoso y necesita una exacta calibración (Núñez-Martínez *et al.*, 2005). No obstante, otros autores ya proponen este modelo automatizado para la determinación de las morfoanomalías espermáticas (Rijsselaere *et al.*, 2005).

## VI. CONCLUSIONES

1. En los resultados obtenidos se determinaron la viabilidad espermática mediante la motilidad pre-congelación que fue de  $73 \pm 9.5$  % y post-descongelación de  $20.68 \pm 8.37$ , espermatozoides vivos por la tinción eosina-nigrosina pre-congelación  $85.37 \pm 7.22$  % y post-descongelación de  $34,92 \pm 11,41$ , integridad de membrana evaluada por hipo-ósmosis (HOST), pre-congelación  $71.26 \pm 12.45$  % y post-descongelación  $43,79 \pm 16,23$  y anormalidades pre-congelación  $18.49 \pm 6.38$  y post-descongelación  $26,24 \pm 8,15$ .

De éstos resultados se puede concluir que el proceso de congelación en el nitrógeno líquido a  $-196$  °C afecta la viabilidad espermática (Gráfico N°08).

2. Al evaluar el efecto del glicerol al 10% y etilenglicol al 10% sobre el espermatozoide canino post-descongelación se puede concluir que disminuyen significativamente ( $p < 0.05$ ) la viabilidad, afectando sobre la motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana del semen criopreservado.
3. No hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), al determinar el agente crioprotector que mejor mantiene la calidad y viabilidad del semen post-

descongelación, es decir que el glicerol y el etilenglicol tienen efectos crioprotectores similares sobre el espermatozoide canino, sin embargo éstos crioprotectores pueden mantener los espermatozoides viables en condiciones hipotérmicas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Probar otros crioprotectores a diferentes concentraciones a las utilizadas en el presente trabajo.
2. Realizar el proceso de congelación rápida bajo la forma de pellets.
3. Probar distintos tiempos y temperaturas de descongelación.
4. Evaluar el efecto de los agentes crioprotectores en combinación con los aminoácidos.
5. Evaluar los espermatozoides caninos post-descongelación, teniendo en cuenta la integridad de acrosoma, fertilización in vitro e inseminación artificial.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aisen, E., Álvarez, H., Venturino, A. and Garde, J.** 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
2. **Alamo, D.** 2007. Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152 °C. Tesis para optar grado de doctor en veterinaria. Universidad las Palmas - España.
3. **Alvarenga, A., Landim-Alvarenga, C., Moreira, M. and Cesarino, M.** 2000. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J* 32: 541-545.
4. **Amann, P. and Pickett, W.** 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
5. **Andrade-Martins, A.** 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación de semen canino. Tesis para optar grado de doctor. España.2005.
6. **Batista, M., Álamo, D., González, F., Rodríguez, N., Cabrera, F. y Gracia, A.** 2007. Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido y ultracongeladores de - 152 °C) y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario. *RecVet*, 2(5).
7. **Bedford, J., Jasko, J., Graham, K., Amann, P., Squires, L. and Pickett, B.** 1995. Effect of seminal extenders containing egg yolk and

- glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Therio* 43: 955-967.
8. **Bohórquez, R., Ondiz, A., Palomares, R. y Gallardo, F.** 2005. Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. *Rev. Cient*, 15(5):458-463. Venezuela.
  9. **Blonz, O.** 1989. Techniques d' examen du esperme du chine. Thése Doct. Vet. Nantes.
  10. **Bouchard, F., Morris, K., Sikes, D., Yongquist, S.** 1990. Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology* 34: 147-157.
  11. **Carrascosa, E., Martinil, C., Ponzio, F., Busso, M., Ponce, A. and Lacuara, L.** 2001. Storage of Chinchilla lanigera semen at 4°C for 24 or 72h with two different cryoprotectants. *Cryobiology* 42: 301-306.
  12. **Concannon, W. England, C., Verstegen, P. and Russell, A.** 1993. Fertility and Infertility in Dogs, Cats and Others Carnivores. Ed. *The Journals of Reproduction and Fertility Ltd.*, Cambridge, pp: 243-359.
  13. **Concannon, W. and Battista, M.** 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. En: *Current Veterinary Therapy (Kirk R).* Ed. *WB Saunders*, Philadelphia, pp: 1247-1259.
  14. **Cormier, N., Sirard, A. and Bailey, L.** 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468.
  15. **Curry, R.** 2000 - Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5: 46-52.
  16. **Dahlbon, M., Andersson, M., Vierula, M. and Alanko, M.** 1997. Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*, 48: 687-698.

17. **De Leeuw, E., Colenbrander, B. and Verkleij, J.** 1990. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl 1*: 95-104.
18. **England, W.** 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert Suppl 47*: 243-255.
19. **England, W. and Allen, E.** 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. Potential influences during processing for artificial insemination. *Therio 37*: 363-371.
20. **England, W.** 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52: 981-986.
21. **England, W.** 2000. Control farmacológico de la reproducción en el perro. *Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona*, pp: 267-295.
22. **Fahy, M., Lilley, H., Linsdell, H., John-Douglas, T. and Meryman, T.** 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology 27*: 247-268.
23. **Feldman, E. y Nelson, R.** 2000. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter. Médica, S.A.I.C.I., Buenos Aires.*
24. **Fogle, B.** 1996. *Enciclopedia del perro. Ed Omega, Barcelona*, pp: 6-35.
25. **Fontbonne, A.** 1990. Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin: influence de la glycérolisation et de la Dilution. *Cit en: Peña, A.* 1997 Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.*
26. **Fontbonne, A.** 1992. Physiologie sexuelle du chien male. L'es indispensables de l'animal de compagnie. *Reproduction, Pract. Med. Chir. Anim. Comp.* 20-27.Paris.

27. Fontbonne, A. and Badinand, F. 1993. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* 47:531-532.
28. Foote, R. 1972. Semen quality from the bull to the freezer and assessment. *Theriogenology* 3(6): 219-234.
29. Foulkes, J. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal Reprod. Fert.* 49:277-284.
30. Garner, L., Thomas, A. and Gravance, G. 1999. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 34: 399-404.
31. Graham, K. and Foote, H. 1987. Effects of several lipids, fatty acid chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
32. Green, E. and Watson, F. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.
33. Hammerstedt, H., Graham, K. and Nolan, P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
34. Hammerstedt, H. and Graham, K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26-38.
35. Harrop, A. 1955. Artificial Insemination in a bitch with preserved semen. *Brit. Vet.* 110: 424-425.
36. Hay, A., King, A., Gartley, J., Leibo, P. and Goodrowe, L. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 99-108.



37. Hewitt, D. and England, G. 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim. Reprod. Sci.* 51(4):321-332.
38. Hewitt, D., Leahy, R., Sheldon, I. and England, G. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67: 101-111.
39. Holt, V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
40. Ivanova-Kicheva, G., Bobadov, N. and Somley, B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48: 1343-1349.
41. Johnston, S., Kustritz, M. and Olson, P. 2001. Canine and Feline Theriogenology. Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1-104, 275-306.
42. Kawakami, E., Hori, T. and Tsutsui, T. 1991. Induction of dog sperm capacitation by oviductal fluid. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 197-202.
43. Kawakami, E., Hori, T. and Tsutsui, T. 1998. Changes in semen quality and *in vitro* capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. *J. Vet. Med. Sci.*, 60: 607-614.
44. Kumi, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
45. Louise, H. 2001. Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival. Thesis para optar grado de Magister en ciencias.
46. Luvoni, C. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod. Nutr. Develop.* 40:505-512.

- 47. Martins, A., Malibren-Rosas, B., González, E. y Mayenco, M.** 2002. Resultados preliminares del efecto de los aminoácidos en la calidad del semen refrigerado de perro. I Congreso Universitario de Ciencias Veterinarias y afines, 28-30 Abril 2002. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- 48. Massip, A.** 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 36: 49-55
- 49. Maxwell, C. and Stojanov, T.** 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev* 8: 1013-20.
- 50. Maxwell, C., Welch, R. and Johnson, A.** 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 8: 1165-1178.
- 51. Mazur, P.** 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
- 52. Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A. and Rodrigues, J.** 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- 53. Molinia, F., Evans, G. and Maxwell, M.** 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42: 849-858.
- 54. Montovani, R., Rota, A., Falomo, E., Bailoni, L. and Vincenti, L.** 2002. Comparasion between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment wiht standard analyses and wiht the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 42: 217-226.

55. **Nowshari, A. and Brem, G.** 2001. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. *Human Reproduction* 16: 2368-2373.
56. **Nuñez-Martínez, I., Moran, M. and Peña, J.** 2005. Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 537-543.
57. **Oettlé, E.** 1993. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Med. Ve. Rev.* 1998; 59:28-70.
58. **Olar, T.** 1984. Cryopreservation of dog spermatozoa. Ph Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Colorado.
59. **Olar, T., Bowen, A. and Pickett, W.** 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen straws. *Theriogenology*, 31: 451-461.
60. **Pace, M., Sullivan, J., Elliott, I., Graham, F. and Coulter, H.** 1981. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0,5ml french straws. *J Anim Sci* 53: 693-701.
61. **Parks, E. and Graham, K.** 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
62. **Peña, A. and Linde-Forsberg, C.** 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 703-718.
63. **Peña, A.** 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82: 209-224.
64. **Polge, C., Smith, U. and Parkes, S.** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

- 65. Quinn, J., Chow, W. and White, G.** 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal Reprod. Fert.* 60:403-407.
- 66. Rijsselaere, T., Van, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D. and De Kruif, A.** 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64: 706-719.
- 67. Rodrigez-Gil, E., Montserrat, A. and Rigau, T.** 1997. Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 44:885-900.
- 68. Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H. and Linde-Forsberg, C.**1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fert Suppl* 47: 279-285.
- 69. Romagnoli, S.** 2002. Canine artificial with fresh, refrigerated and frozen semen. *Proceedings of the veterinary sciences congress. Oeiras*, 10-12 out, pp. 167-170.
- 70. Salomon, S. and Maxwell, C.** 1995. Frozen storage of rar semen. *Processing, Freezing, Thawing and Fertility alter cervical insemination. Anim. Reprod.* 37: 185-249.
- 71. Sánchez, A., Rubilar, J. y Gatica, R.** 2002. Congelación de semen canino y evaluación de la fertilidad potencial. *Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral. Valdivia - Chile.*
- 72. Sánchez, A., Cartagena, A. y Berland, M.** 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet.*, 17 (1): 1-7.
- 73. Seager, J. and Fletcher, S.** 1972. Collection, storage, and insemination of canine semen. *Laboratory Animal Science* 22: 177-182.

- 74. Silva, A., Onclin, K., Lejeune, B. and Verstegen, P.** 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*, 138: 154-157.
- 75. Silva, A., Cardoso, S., Uchoa, C. and Silva, M.** 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.
- 76. Silva, A.** 2007. Actualidades sobre la criopreservación de semen canino. XVII Congreso Brasileño de reproducción animal. 31: 119-127. Brasil.
- 77. Silva, A. and Verstegen, P.** 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
- 78. Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, L., Eilts, E., Godke, A. and Leibo, P.** 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* 44: 79-90.
- 79. Storey, T., Noiles, E. and Thompson, A.** 1998. Comparison of glycerol, other polyols, thehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37: 46-58.
- 80. Strom, B., Rota, A., Andersen, K., Linde, C. and Rodriguez, H.** 1998. Canine sperm head damage after freezin-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim* 33: 77-82.
- 81. Thomas, G., Larsen, E., Burns, M. and Hahn, N.** 1993. A comparison of three packaging techniques using two extenders for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40: 1199-1205.
- 82. Watson, F.** 1990. Artificial insemination and preservation of semen. En: *Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the Male* (Lamming GE). Ed Churchill Livingstone, Edimburgo, pp: 747- 869.

- 83. Watson, F.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-91.
- 84. Watson, F.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
- 85. Way, L., Henault, A. and Killian, J.** 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Therio* 43: 1301-1316.
- 86. Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. and Tekeli, T.** 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54: 579-585.

## **IX. ANEXOS**

**Cuadro N° 04. Composición del dilutor para criopreservación de semen canino tris- yema-glucosa (TYG).**

FRACCIÓN	A	B
Tris	2.4 g	2.4 g
Glucosa	0.8 g	0.8 g
Ácido cítrico	1.4 g	1.4 g
Yema de huevo	20ml	20ml
Penicilina	1000 UI	1000UI
Estreptomina	0.1 g	0.1 g
Agua destilada	100 ml	100 ml
Glicerol	3ml	7ml
Etilenglicol	3ml	7ml

Fuente: Bohórquez *et al* (2005)



**Cuadro N° 05. Composición química de la solución de endosmósis (Test de HOS)**

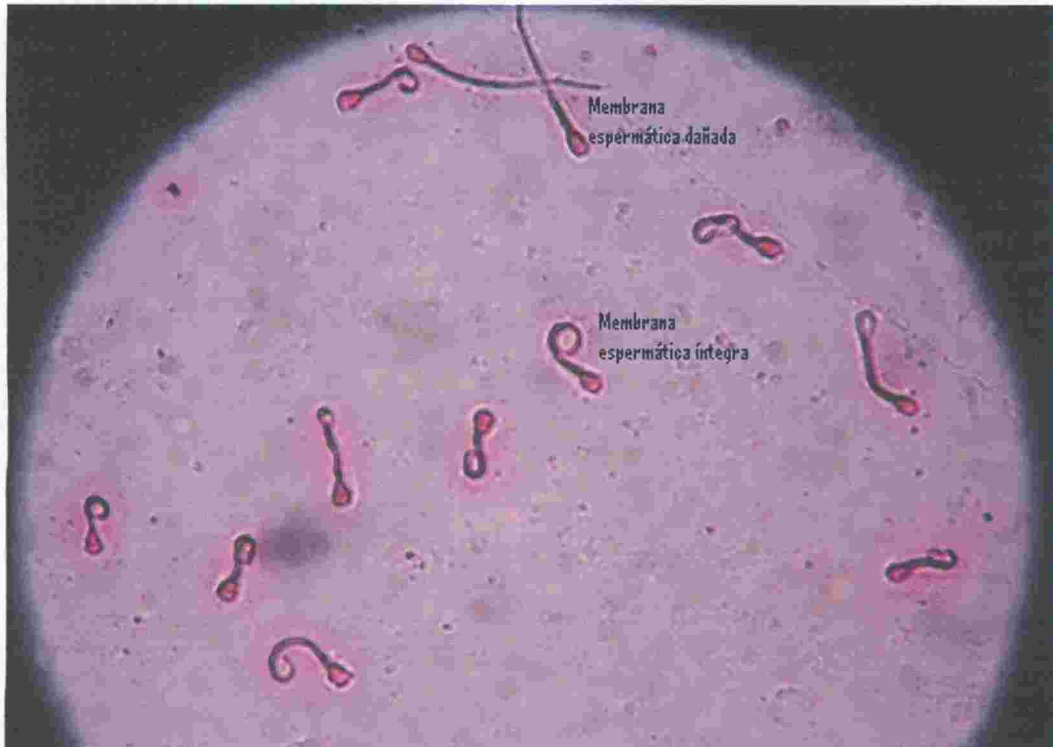
Fructosa	0.0675 g
Citrato de sodio	0.0268 g
Agua bidestilada	100ml

Fuente: Bohórquez *et al* (2005).

**Cuadro N° 06. Solución de eosina al 5% y nigrosina al 10%, para la tinción de vitalidad espermática.**

Eosina	5.0 g
Nigrosina	10.0 g
Citrato de sodio	0.3 g
Agua bidestilada	100 ml

Fuente: Hewitt y England., (1998).



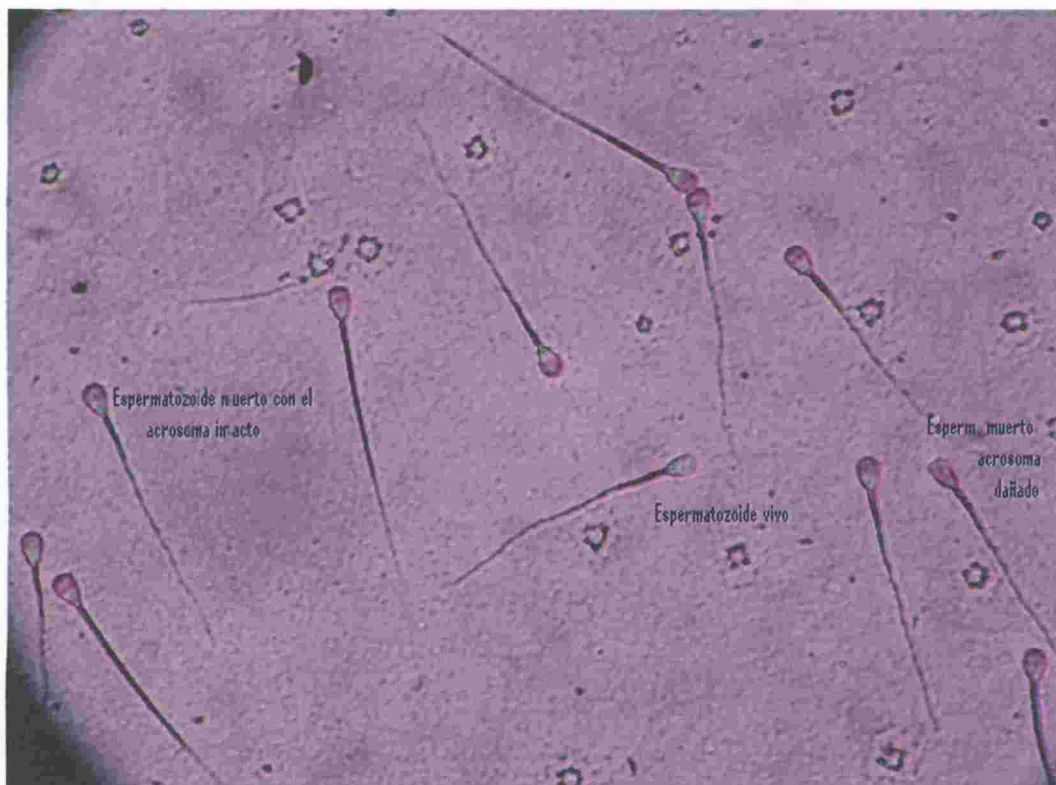
**N° 01. Microfotografía de prueba de hipo-ósmosis realizada en espermatozoides de perro en semen fresco, a 40X.**



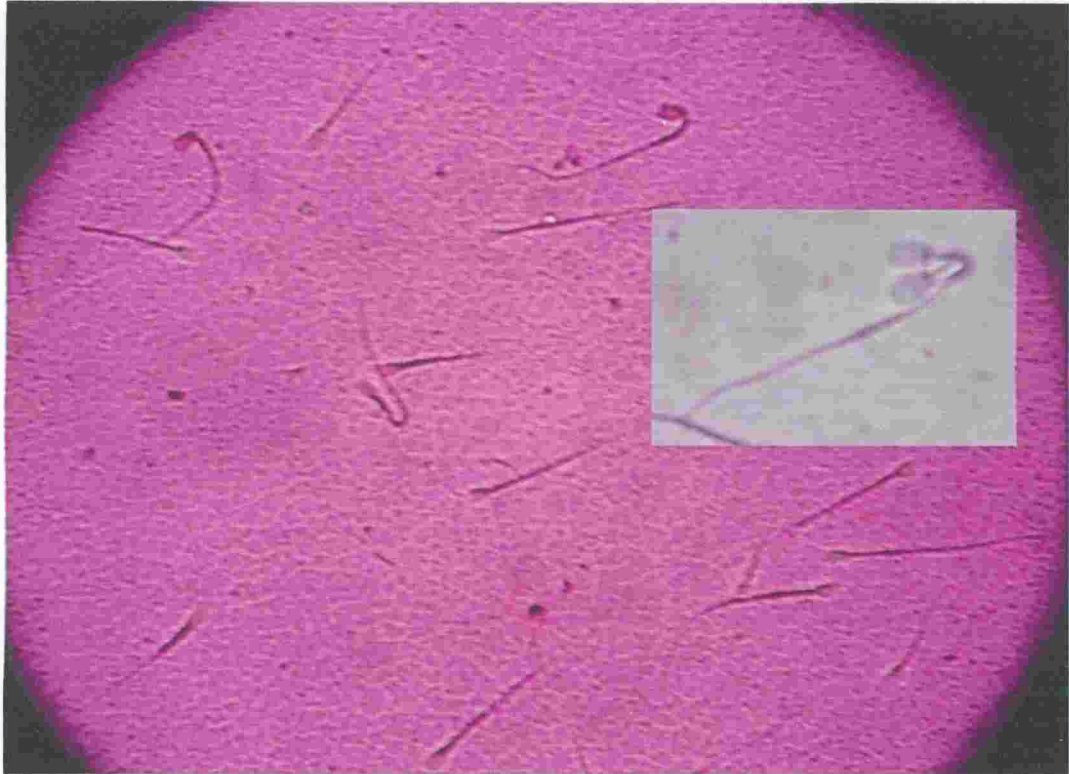
**N° 02. Microfotografía de prueba de hipo-ósmosis realizada en espermatozoides de perro post-descongelación, a 40X.**



**N° 03. Microfotografía de la tinción de eosina-nigrosina para prueba de vitalidad espermática en semen fresco, espermatozoides no teñidos (vivos) y los teñidos (muertos), a 40X.**



**N° 04. Microfotografía de la tinción de eosina-nigrosina para prueba de vitalidad espermática en semen post-descongelación, a 40X.**



**N° 05. Microfotografía de las anomalías observadas en los espermatozoides de perro, a 40X.**

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

TEMA: Evaluación de criopreservantes permeables sobre la viabilidad de espermatozoides de *Canis familiaris* (perro), Ayacucho, 2009.  
 FORMULADO POR: Tania Núñez Janampa

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Cuál es el efecto de los criopreservantes permeables sobre la viabilidad de espermatozoides de <i>Canis familiaris</i> "perro"?	<p><b>OBJETIVO GENERAL</b></p> <p>Determina la viabilidad post espermática descongelmiento mediante la motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana plasmática.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evaluar el efecto del glicerol y etilenglicol sobre la motilidad individual e integridad de membrana del semen criopreservado de perro.</li> <li>2. Determinar el agente crioprotector que mantiene la calidad y viabilidad del semen canino post descongelmiento.</li> </ol>	<p>3.1 Antecedentes</p> <p>3.2 Aspectos generales del perro</p> <p>3.3 Colección de semen</p> <p>3.3.1 Manipulación digital</p> <p>3.3.2 Vagina artificial</p> <p>3.4 Conservación de semen</p> <p>3.4.1 Refrigeración y congelación</p> <p>3.4.2 Criopreservación de semen</p> <p>3.4.3 Medios de dilución</p> <p>3.4.4 Agentes crioprotectores (ACPs)</p> <p>3.4.4.1 Agentes penetrantes</p> <p>3.4.4.2 Agentes no penetrantes</p>	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE:</b></p> <p>Criopreservantes permeables.</p> <p><b>Indicadores:</b></p> <p>- 10% de Glicerol</p> <p>- 10% de Etilenglicol</p> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE:</b></p> <p>Viabilidad de espermatozoides de perro.</p> <p><b>Indicadores</b></p> <p>Vivos y muertos</p> <p>Motilidad individual</p> <p>Integridad de membrana</p> <p>Anormalidades</p>	<p>Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizará el método científico como método general de investigación y como métodos auxiliares recurrimos al método experimental.</p> <p>La muestra se tomará de manera no probabilística por las características de las mismas. Como unidad de muestra se tomará 08 eyaculados de 04 perros colectados por manipulación digital.</p> <p>La viabilidad de los espermatozoides serán evaluados pre- congelación y post-congelación en base a la motilidad individual, integridad de la membrana plasmática por el test de HOS y el porcentaje de vivos y muertos de los espermatozoides por la coloración eosina - nigrosina.</p>

**R.D N° 211-2010-FCB-D**  
**Bach. Tania NÚÑEZ JANAMPA.**

En Ayacucho, siendo las cinco y treinta de la tarde en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas se reunieron los docentes el viernes 03 de diciembre del dos mil diez bajo la presidencia del Decano MS Elmer Avalos Pérez, con la asistencia de los miembros Mg Carlos Piscoya Sarmiento, Mg Fidel Mujica Lengua, (asesor); Mg Paula García Godos Alcázar y Blgo Yuret Miranda Tomasevish, actuando como secretaria docente la Mg Maricela López Sierralta, para recepcionar la sustentación de tesis: "Evaluación de criopreservación permeables sobre la viabilidad de espermatozoides de *Cannis Familiares* "perro" Ayacucho 2009, presentado por la bachiller en Ciencias Biológicas: Tania Nuñez Janampa, - quien pretende obtener el título Profesional de Bióloga con especialidad en Biotecnología.

Luego de la verificación de la documentación el decano instruye a la sustentante y solicita a la secretaria docente la lectura de la resolución Decanal N° 211-2010-FCB-D, para que la sustentante dé inicio a la sustentación en el tiempo establecido de cuarenta minutos.

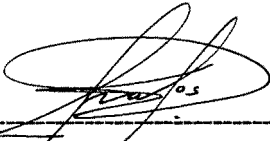
El decano cede la palabra para su evaluación y observaciones a la profesora Paula García Godos; quien pregunta sobre Criopreservantes no permeables; Cuadro 1 y 3 sobre; Razas, Edades de los caninos; Relación y Evaluación de ambos criopreservantes y cual fue el interés del tema. Luego el decano cede la palabra al cuarto jurado Prof. Yuret Miranda Tomasevich quien manifiesta la falta de cuadro de comparación de los dos criopreservantes y cuales fueron los criterios de selección de Canes; porque el proceso de congelación es paulativo?; también pregunta ¿Cuál es la importancia de la viabilidad de la célula? ¿Que es la prueba hipoosmotica? ¿Qué colorante utilizó? ¿Cuál es la característica de la Eosina?, luego felicitó a la sustentante antes de culminar su participación. El doctor Piscoya inicia su participación dando mérito a la investigación: ¿Cuáles son etapas críticas en la criogenización? ¿Metodología de la Toma de Muestra-Riesgos?

El decano pregunta lugar de toma de muestra? En el cuadro dice solo 6 muestras ¿Con repetición? ¿Qué diseño estadístico utilizó? ¿Es o no es significativo? ¿Qué es congelamiento?, luego, cede la palabra al docente Asesor quien aclara algunas dudas y observaciones que quedaron no resueltas.

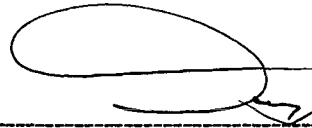
Luego el decano solicita a la sustentante y al público que abandonen el auditorio para que el jurado puede deliverar y realizar la evaluación como sigue:

JURADO CALIFICADOR	Exposición	Rpta a Preguntas	Promedio
Mg Carlos Piscoya Sarmiento	17	16	17
Mg Fidel Mujica Lengua	16	16	16
Mg Paula García Godos Alcázar	16	16	16
Blgo Yuret Miranda Tomasevich.	17	17	17

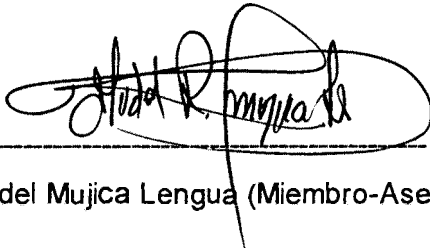
Como resultado la sustentante obtuvo el promedio de diecisiete (17), de lo cuál dan fé estampando su firma al pie de la presente. Concluye el acto de sustentación siendo las siete y treinta de la noche.



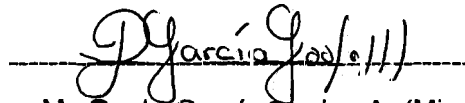
MS Elmer Avalos Pérez (Presidente)



Mg Carlos Piscoya Sarmiento (Miembro)




Mg Fidel Mujica Lengua (Miembro-Asesor)



Mg Paula García Go dos A. (Miembro)



Blgo Yuret Miranda Tomasevich (Miembro)



Mg Maricela López S. (Secretaria Docente)