

1-1-2014

# Comparación del efecto de la yema de huevo de pata y de gallina sobre parámetros espermáticos en semen canino refrigerado

Victor Manuel Latorre  
*Universidad de La Salle*

Freddy Gonzalo Borda Veloza  
*Universidad de La Salle*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)

---

## Citación recomendada

Latorre, V. M., & Borda Veloza, F. G. (2014). Comparación del efecto de la yema de huevo de pata y de gallina sobre parámetros espermáticos en semen canino refrigerado. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/258](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/258)

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA



**UNIVERSIDAD DE LA SALLE**  
*Educar para Pensar, Decidir y Servir*

**COMPARACION DEL EFECTO DE LA YEMA DE HUEVO DE PATA Y DE GALLINA  
SOBRE PARAMETROS ESPERMATICOS EN SEMEN CANINO REFRIGERADO.**

VICTOR MANUEL LATORRE

FREDDY GONZALO BORDA VELOZA

Bogotá, Colombia

2014

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Programa de Medicina Veterinaria



**COMPARACION DEL EFECTO DE LA YEMA DE HUEVO DE PATA Y DE GALLINA  
SOBRE PARAMETROS ESPERMATICOS EN SEMEN CANINO REFRIGERADO.**

Director:

**CÉSAR GÓMEZ**

MV. US, Esp GERENCIA AGROPECUARIA

Preparado por:

**VICTOR MANUEL LATORRE**

Código: 14031069

**FREDDY GONZALO BORDA VELOZA**

Código: 14011021

Bogotá, Colombia

2014

**APROBACIÓN**

DIRECTOR

---

  
Dr. César Gómez.**DIRECTIVOS**

RECTOR

Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo

VICERRECTOR ACADÉMICO

Hno. Fabio Humberto Coronado Padilla

VICERRECTOR DE PROMOCIÓN  
Y DESARROLLO HUMANO.

Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Dr. Eduardo Ángel Reyes

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN  
Y TRANSFERENCIA

Hno. Manuel Cancelado Jiménez

DECANO DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS

Dr. Luis Carlos Villamil Jiménez

DIRECTOR PROGRAMA  
MEDICINA VETERINARIA

Juan Fernando Vela Jiménez

## **COMPROMISO**

Los trabajos de grado no deben contener ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por los graduando.

**AGRADECIMIENTOS**

A la universidad por proveer los recursos para la realización de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>3</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA</b>	<b>4</b>
1.1.1. Características del semen canino	4
1.1.2. Características del espermatozoide canino	4
<b>1.2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DEL SEMEN CANINO</b>	<b>5</b>
1.2.1. Hembra señuelo	5
1.2.2. Manual	5
1.2.3. Electroeyaculación	5
1.2.4. Lavado vaginal post servicio	6
1.2.5. Colección de semen a partir del epidídimo	6
<b>1.3. EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO.</b>	<b>6</b>
1.3.1. Evaluación macroscópica	6
1.3.1.1. Macrocomposición del semen canino.	6
1.3.1.2. Volumen	7
1.3.1.3. Color	7
1.3.1.4. pH	7
1.3.2. Evaluación microscópica	7
1.3.2.1. Motilidad	7
1.3.2.2. Concentración	8
1.3.2.3. Morfología	8
1.3.2.4. Integridad funcional de membrana	8
<b>1.4. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN CANINO</b>	<b>9</b>
1.4.1. Diluyentes del semen canino	9
1.4.1.1. Tris(hidroximetil)aminometano (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	10
1.4.1.2. Ácido cítrico	10
1.4.1.3. Yema de huevo	10
1.4.1.4. Glicerol	15

1.4.2.	Técnicas para la conservación de semen canino	15
<b>1.5.</b>	<b>INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CANINA</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
2.1.	LOCALIZACIÓN	16
2.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	16
2.3.	RECOLECCIÓN DE DATOS	16
2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
<b>2.5.</b>	<b>MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS</b>	<b>16</b>
2.5.1.	Obtención semen	17
2.5.2.	Volumen, color y pH	17
2.5.3.	Preparación de las soluciones	17
2.5.4.	Refrigeración del semen	18
2.5.5.	Motilidad	18
2.5.6.	Prueba HOST	18
2.5.7.	Morfología espermática	18
2.5.8.	Concentración espermática	18
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
3.1.	OBTENCIÓN DE PARÁMETROS ANDROLOGICOS	20
3.2.	COMPORTAMIENTO DE PARÁMETROS ANDROLÓGICOS MICROSCÓPICOS EN EL TIEMPO	20
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>
	<b>ANEXO 1</b>	<b>30</b>



## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO PARA TABULAR RESULTADOS DE CADA EVALUACIÓN ESPERMÁTICA	23
--	----



## RESUMEN

La conservación mediante refrigeración de semen canino es una estrategia ampliamente usada para la conservación de muestras de semen de las pajillas, factor importante para su comercialización. Lograr la conservación procurando los mejores valores de parámetros de evaluación de la calidad del semen exige la necesidad de desarrollo de nuevas técnicas que permitan la optimización de la viabilidad del semen considerado. En este trabajo se evaluó la capacidad de la yema de huevo de gallina y de pata como conservante del semen canino bajo 4 parámetros: movilidad individual, vigor, viabilidad y aglutinación. Se midió el efecto de una concentración de 10% de yema en cada tratamiento durante 12 horas tomando datos puntuales cada hora. Al inicio del procedimiento se obtuvieron los valores iniciales de cada uno de los parámetros evaluados, siendo estos el patrón de comparación a usar con los datos obtenidos durante el resto del experimento. Para cada uno de los parámetros evaluados se encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha=0.05$ ) y que la yema de huevo de gallina producía resultados óptimos con respecto a la yema de pata. La diferencia de la viabilidad final entre tratamientos es de 0.2, de vigor es de 1 unidad, de movilidad es de 0.2 y de aglutinación de 0.2. Con estos resultados se comprueba que el tratamiento con yema de huevo de gallina produce mejores resultados con respecto a la yema de huevo de pata posicionando este material como un buen aditivo conservante de semen canino.

Palabras Claves: conservantes, inseminación artificial, motilidad espermática, semen, viabilidad.



## INTRODUCCIÓN

Los caninos domésticos se han consolidado como una importante especie para la compañía del hombre, por ende, el estudio de la fisiología reproductiva y la aplicación de biotecnologías con fines reproductivos, constituyen un tema importante a nivel investigativo en la Medicina Veterinaria.

Debido a esto, se ha venido desarrollando un creciente interés sobre esta área, la reproducción canina ha captado la atención de numerosos estudios. El desarrollo de la fecundación in vitro ha impulsado a la actualización en conocimientos, realizándose importantes descubrimientos en fisiología reproductiva canina, lo que ha estimulado el desarrollo de la IA (Inseminación artificial) y la criopreservación de semen canino.

Este creciente interés y la cada vez mayor relevancia comercial de la IA, han motivado a desarrollar y mejorar técnicas de evaluación y criopreservación del semen canino y las metodologías para realizar la IA. Dada la relevancia que este tema ha originado, se ve la imperiosa necesidad de implementar procedimientos biotecnológicos de vanguardia en la reproducción asistida para la especie canina en nuestro medio.

Entre estos procedimientos, el manejo de semen refrigerado presenta grandes beneficios, en técnicas como la inseminación artificial. Esta práctica ha aumentado su importancia y se ha consolidado como una herramienta importante para criadores y veterinarios, dado que la reproducción y crianza canina es una afición mundial y la IA permite establecer un mejoramiento genético donde se seleccionan las características deseadas en cada raza a la vez que es una opción económica, porque optimiza la accesibilidad al semen a largo plazo. En Colombia, esta biotecnología puede servir, para aumentar la heterogeneidad en las diferentes razas, debido a la limitada disponibilidad de reproductores con la que se cuenta (Bohórquez, 2005).

Los avances en esta tecnología, aumentarán la comercialización de ejemplares con alto valor genético, disminuyendo los costos de movilización de reproductores separados geográficamente, obviando problemas comportamentales y anatómicos que generen dificultades para la cópula y mejorando las condiciones sanitarias, evitando el contagio de enfermedades como la *Brucella canis*, una de las principales causas de infertilidad en machos a nivel mundial (Peña, et al 2006).

Igualmente, la criopreservación de semen e inseminación artificial canina puede utilizarse como modelo experimental sumamente útil en cánidos silvestres, especies en vías de extinción. Los bancos de semen reducen la necesidad de machos presentes y permiten preservar material genético que de otra forma se perdería.

Varios métodos de criopreservación de espermatozoides caninos, han sido desarrollados; sin embargo, la tasa de fecundación artificial es baja, posiblemente, porque presentan una vida útil muy corta luego de la descongelación y daños celulares. En vista de esto, diversas técnicas de evaluación de la calidad del semen canino se han implementado, con el fin de predecir su capacidad fecundante; entre otras: la determinación de parámetros espermáticos como la integridad de la membrana plasmática, la reacción

acrosómica, la morfología espermática, y la movilidad de los espermatozoides; siendo dichos factores igualmente utilizados para establecer los efectos de la criopreservación (Barrera, et al 2008).

En cuanto a uno de los procesos de criopreservación, la congelación, la literatura reporta que en dicho proceso se presentan múltiples inconvenientes a nivel celular, factores que afectan la capacidad fertilizante del semen: los cambios de sensibilidad específica de los espermatozoides ante la congelación y descongelación; la exposición a bajas temperaturas genera formación de cristales intracelulares de hielo y daños espermáticos por choque térmico; también la exposición de las células a soluciones con algún grado de toxicidad, como los agentes crioprotectores, los cuales evitan la formación de cristales intracelulares y alteraciones en la membrana celular, pero pueden tener efectos adversos sobre los espermatozoides, lo cual limita su función y disminuye la longevidad espermática (Holt, 2000). A pesar de que en el proceso de enfriamiento no se alcanzan las bajas temperaturas de la congelación si se pueden presentar cambios estructurales y funcionales en el momento de enfrentar el semen a un proceso de cambio brusco de temperatura.

Debido a los problemas que aún se presentan en la criopreservación de semen canino, se ve la necesidad de investigar y establecer técnicas que permitan mejorar la calidad del semen refrigerado. Actualmente, los reportes que se encuentran de estudios en semen canino, realizados en el país, no muestran datos que comparen adición de yema de huevo de gallina como diluyente, versus al de otras especies.

Este trabajo tiene por objeto, evaluar si la adición de yema de huevo de pata, mejora o no los índices de viabilidad espermática, comparados a los que muestre la yema de huevo de gallina, los parámetros se determinarán dentro de las primeras doce horas. Basados en estudios donde se utilizó huevo de pata y se comparó con el de gallina en la criopreservación de semen de diferentes especies como el caballo (Su et al, 2008), el toro (Warheed, 2012) o el búfalo (Andrabi et al, 2008); donde se demostró que los parámetros de motilidad y viabilidad fueron más altos y hubo una mejoría en la morfología de los espermatozoides analizados al usar yema de huevo de pata.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Comparar el efecto del uso como diluyente de la yema de huevo de pata frente a la yema de huevo de gallina sobre la viabilidad, motilidad y morfología de espermatozoides caninos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Comparar cambios de morfología entre espermatozoides diluidos con tris citrato + yema de huevo de gallina y tris citrato + yema de huevo de pata.
- Determinar cambios en la viabilidad de espermatozoides caninos diluidos con tris citrato + yema de huevo de gallina y tris citrato + yema de huevo de pata.
- Identificar posibles alteraciones en la motilidad del semen con cada uno de los dos diferente diluyentes utilizados.
- Determinar si la yema de huevo de pata ofrece un mayor efecto protector contra el choque térmico.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA

El aparato reproductor está compuesto por órganos que actúan conjuntamente para producir espermatozoides. Este esfuerzo implica al sistema neuroendocrino y al genital, conformado por testículos, epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias y pene (Cunningham, 2003).

El epidídimo proporciona el ambiente para la maduración de los espermatozoides y es órgano de almacenamiento. El plasma seminal, producido por la próstata protege y nutre los espermatozoides. El pene posee el hueso peniano y un bulbo de tejido esponjoso eréctil, que proporciona el “enganche” con la hembra durante la cópula (Johnston et al, 2001).

La pubertad, activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y se induce la espermatogénesis por efecto de la FSH y la testosterona. La producción diaria de espermatozoides en el perro está entre 11,7 y 16,7 millones por gramo de parénquima testicular; la frecuencia de eyaculación no afecta la producción diaria de espermatozoides (Cunningham, 2003).

#### 1.1.1. Características del semen canino

Compuesto por espermatozoides y plasma seminal, éste proporciona condiciones favorables a la motilidad, sobrevivencia y transporte de los espermatozoides (Ax et al, 2002).

El semen es eyaculado en tres fracciones: la primera, carece de espermatozoides, cumple una función profiláctica, despeja la uretra; la segunda fracción contiene una concentración elevada de espermatozoides, la tercera fracción, constituida por líquido prostático, brinda el mayor volumen al eyaculado (Johnston et al, 2001)

La concentración normal de espermatozoides es de 200 hasta 1000 millones/ml; ésta concentración depende de la cantidad de líquido prostático recogido (Farstad, 2000).

#### 1.1.2. Características del espermatozoide canino

El espermatozoide canino, tiene una longitud total de  $61.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , la longitud de la cabeza es de  $6.1 \pm 0.04 \mu\text{m}$  y un ancho de  $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , la pieza o segmento medio mide  $10.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$  y la cola mide alrededor de las  $50 \mu\text{m}$ ; está cubierto enteramente por la membrana plasmática y conformado por una cabeza y una cola que contiene el motor celular necesario para la motilidad. Sobre la cabeza se encuentra el acrosoma, contiene enzimas hidrolíticas necesarias para el proceso de fecundación del ovocito (Cunningham, 2003).



La membrana plasmática, que cubre al espermatozoide, es una bicapa lipídica. En los espermatozoides, la bicapa fluida de la membrana lipídica tiene un papel activo en la capacidad fecundante. Los movimientos progresivos del espermatozoide son del tipo ondulatorio empujando al espermatozoide hacia adelante (Cunha, 2002)

## **1.2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DEL SEMEN CANINO**

Con el fin de realizar los estudios referentes al manejo, calidad o inseminación artificial haciendo uso del semen canino se deben tener en la cuenta las siguientes consideraciones técnicas y procesos estandarizados:

### **1.2.1. Hembra señuelo**

Puede usarse una hembra en estro o en anestro, con esta última es necesario aplicar una feromona artificial. Conforme se inicia la eyaculación, la vagina artificial se retira poco a poco para evitar traumatismo (Tsutsui et al, 1988).

Las primeras dos fracciones del eyaculado se obtiene durante la fase de impulsos pélvicos de cópula e inmediatamente después de ella, respectivamente. La mayoría eyaculan líquido prostático durante varios minutos, el volumen de eyaculado depende de la duración del “enlace” (Tsutsui et al, 1988).

Si se va a utilizar el semen para inseminación artificial, se recolecta suficiente líquido prostático para aumentar el volumen de la muestra. Se evita líquido prostático excesivo, debido al potencial de efectos deletéreos sobre los espermatozoides (Oyarzún et al, 2008).

### **1.2.2. Manual**

Obtener una erección es la dificultad inicial. Debe retraerse con suavidad el prepucio y deslizarse para cubrir el glande y la porción proximal del pene hasta que se inicie la erección. Al iniciar ésta, se retrae el prepucio sobre el glande en crecimiento y se aplica presión digital suave (Tsutsui et al, 1988).

Durante la recolección manual, se aplica compresión constante alrededor de la circunferencia del pene, semejando las contracciones de la hembra. El semen se colecta dentro de un tubo de vidrio graduado a 37 °C, con ayuda de un embudo precalentado (Thomassen et al, 2006).

### **1.2.3. Electroeyaculación**

Permite obtener semen de animales que posean la vía neurológica implicada intacta. Sin embargo, está la necesidad de una anestesia general, a fin de evitar molestias. Se utiliza un electroeyaculador, el vástago es introducido en el recto con los electrodos ubicados

hacia ventral; el pene es exteriorizado y colocado dentro de un tubo. Se necesitan unos 80 estímulos de entre 2 y 5 voltios para lograr un eyaculado. Se ha demostrado que el voltaje de estimulación afecta la osmolaridad y pH del semen obtenido. También se ha comprobado que la electroeyaculación permite obtener un eyaculado de mayor volumen pero menor concentración espermática que la vagina artificial (Thomassen et al, 2006).

#### **1.2.4. Lavado vaginal post servicio**

No es ideal para realizar una evaluación seminal, pero puede utilizarse cuando no es posible realizar una recolecta mediante vagina artificial o es riesgosa una anestesia. Esta práctica es engorrosa ya que el macho realiza el servicio e inmediatamente después la hembra se seda para un lavado vaginal con solución salina a 37° C. Los espermatozoides recolectados por este método pueden sufrir alteraciones en este proceso (Muñoz et al, 2008).

#### **1.2.5. Colección de semen a partir del epidídimo**

Pueden obtenerse espermatozoides de la cola del epidídimo luego de la castración o pos mortem. El epidídimo debe lavarse con un diluyente de semen para obtener los espermatozoides (Hernández et al, 2004).

### **1.3. EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO.**

#### **1.3.1. Evaluación macroscópica**

##### *1.3.1.1. Macrocomposición del semen canino.*

El semen canino está caracterizado por presentar tres fracciones en el momento de la eyaculación; la primera fracción, la cual no posee espermatozoides, corresponde a la secreción uretral y glándula prostática; la segunda, procede del conducto deferente y es la fracción rica en espermatozoides aunque esta también se produce en bajas cantidades, y la última procede de la próstata y es, como la primera, sin espermatozoides pero se secreta una cantidad mayor, en comparación con las dos primeras fracciones (Corti, 2003).

La primera secreción tiene como finalidad servir de lubricante, su aspecto es acuoso y transparente y es posible obtenerlo en un intervalo de 30 a 50 seg, se obtienen entre 0.2 y 2 ml y no posee espermatozoides. La segunda fracción, rica en espermatozoides, tiene un aspecto viscoso, el tiempo de obtención es de 2 a 3 minutos, y tiene aproximadamente 400 millones de espermatozoides por ml. Finalmente se encuentra la tercera fracción la cual tiene una función protectora y como vehículo para los espermatozoides, es de color

claro blanquecino un volumen de 2 a 50 ml siendo la cantidad de espermatozoides mínima (Dumon, 2005).

#### 1.3.1.2. *Volumen*

Es muy variable, depende de la edad, talla, método utilizado para su obtención, frecuencia del procedimiento y cantidad de líquido prostático recolectado. Varía de 1 a 40 ml. El volumen no tiene correlación con la fecundidad, a menos que el animal no eyacule (Ax et al, 2002).

#### 1.3.1.3. *Color*

Este puede variar de blanco opalescente a opaco; la intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un semen claro e incoloro sugiere azospermia; amarillo sugiere presencia de orina; verde con o sin grumos o coágulos, sugiere infección; un tinte rojo insinúa presencia de sangre. Cualquier agente que modifique el color puede alterar concentración, motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Johnston, 1991).

#### 1.3.1.4. *pH*

El pH generalmente se mide con tiras reactivas, el normal va de 6.3 a 6.7. Un aumento en el pH se vincula con una eyaculación incompleta o inflamación de testículos, epidídimos o próstata (Johnston, 1991).

### **1.3.2. Evaluación microscópica**

#### 1.3.2.1. *Motilidad*

Se refiere al porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra; la proporción con motilidad total y progresiva, es estimada subjetivamente. El resultado se expresa en porcentaje. La motilidad progresiva de avance refleja la viabilidad y capacidad de fecundar; una muestra normal de semen debe tener más del 70% de espermatozoides con motilidad vigorosa de avance (Peña et al, 2006).

De manera individual se evalúa a los espermatozoides; es normal cuando el espermatozoide presenta movimiento progresivo y avanza con rapidez. Debe estudiarse otra muestra de semen, siempre que se encuentre un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles o muertos (Ax et al, 2002).

La movilidad masal se examina en una muestra no diluida, y se determina la existencia de "oleadas", movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior

dispersión de los espermatozoides; estas ondas se consideran como indicio de buena vitalidad y alta concentración de espermatozoides (Lincovil et al, 2010).

#### 1.3.2.2. *Concentración*

La concentración es determinada, generalmente, a través del conteo manual de las células espermáticas. La concentración de espermatozoides se establece, multiplicando el número de espermatozoides por mililitro de semen (determinado en una cámara de Neubauer) por el volumen total recolectado, normal es de 200 millones hasta más de 1000 millones (Ax et al, 2002).

#### 1.3.2.3. *Morfología*

La morfología está implicada en problemas de fertilidad. Su evaluación se hace en un frotis seminal coloreado; los colorantes comúnmente utilizados son Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Giemsa.

Se observan anomalías espermáticas individualmente en cabeza, pieza media y cola. Un semen normal presenta más del 70% de espermatozoides con morfología normal, a mayor porcentaje de espermatozoides anormales, menor fertilidad. Las anomalías comunes, son: macrocefalia, microcefalia, cabeza doble, gota citoplasmática proximal y distal, cabezas sueltas, colas enrolladas (Oettlé, 1993).

#### 1.3.2.4. *Integridad funcional de membrana*

La integridad de la membrana es importante para que un espermatozoide finalice la fecundación, ya que esta permite el paso de agua para un restablecimiento del equilibrio osmótico entre los fluidos extra e intracelulares; el flujo de agua al interior de la célula produce un aumento del volumen celular (hinchazón), y posterior doblamiento de la cola; las células con una membrana, física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma de la cola (Holt, 2000).

El test hiposmótico (HOST), fue elaborado para evaluar la actividad bioquímica de la membrana espermática; se somete a los espermatozoides a un medio con presión osmótica más baja que la fisiológica, para causar entrada de agua a la célula. Se ha demostrado correlación entre el HOST y la motilidad de esperma congelado (Sánchez et al, 2002).

Igualmente, los colorantes vitales permiten diferenciar espermatozoides vivos de muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de éstos (Tello et al, 1988).

## **1.4. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN CANINO**

En la criopreservación, células o tejidos son congelados o enfriados, con el fin de detener funciones vitales y mantener vivas las células, pero en un estado de suspensión; se trata de la interrupción de cualquier actividad biológica (Woods et al, 2004).

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, las cuales son conocidas 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 una temperatura cercana a los 0°C y cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento, siendo destacable el hecho de que es el choque térmico lo que altera la funcionalidad del espermatozoide y no la baja temperatura en si misma; 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 (Watson, 2000). 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).

El choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis & col., 1993). Dentro de una temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (Drobnis & col., 1993). Algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los lípidos no-bicapa, se organizan de manera hexagonal, formando un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). De esta manera, la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen. Éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a agregarse (Drobnis & col., 1993). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas; como se ha demostrado mediante microscopía electrónica (Drobnis & col., 1993). Debido a esto se presenta una afección de las funciones de las proteínas como en el caso de aquellas que están involucradas en el transporte iónico de la membrana (Watson, 2000). Dichos cambios estructurales y sus consecuentes perturbaciones fisiológicas, resultan ser la explicación más aproximada al visible daño que sufren los espermatozoides durante los procesos de enfriamiento, todo ello explicado desde la funcionalidad de la membrana.

### **1.4.1. Diluyentes del semen canino**

Las sustancias usadas como crioprotectores en la refrigeración, las sustancias penetrantes y no penetrantes más adelante referidas, tienen como fin proteger al semen de los efectos críticos ocurridos en el proceso y al mismo tiempo permitir la supervivencia

de los espermatozoides fuera del tracto reproductivo, además de aumentar el volumen de la dosis inseminante. Un buen diluyente debe realizar las siguientes funciones: a) contener nutrientes como reserva de energía, b) proteger del efecto nocivo del enfriamiento rápido por medio de lipoproteínas presentes por ejemplo en la yema de huevo c) ajustar las alteraciones del pH, d) promover una presión osmótica y concentración de electrólitos normales, e) incrementar el volumen del semen y g) poseer crioprotectores que reduzcan los daños a las células durante la congelación y descongelación (Barrera et al, 2008; Yildiz, 2000).

La dilución busca una concentración espermática prefijada, con un número calculado de espermatozoides por pajilla y de proporción entre diluyente y células espermáticas. Una dilución excesiva genera pérdida permanente de la motilidad, de la actividad metabólica y de la capacidad fecundante de la célula espermática (Silva, 2007).

#### 1.4.1.1. *Tris(hidroximetil)aminometano (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>*

El Tris es una amina primaria, con la reactividad típica, la cual es utilizada para la preparación de soluciones tampón las cuales a su vez son de vital uso en los ensayos con sistemas biológicos. Para el caso particular del semen canino Holt, 2000, reporta que este es capaz de regular la concentración de iones hidrógeno y neutraliza los productos de desecho del metabolismo de los espermatozoides, reduciendo además el metabolismo de la fructosa para preservar energía celular.

#### 1.4.1.2. *Ácido cítrico*

El ácido cítrico es usado frecuentemente junto con el TRIS como parte del diluyente, siendo esta sustancia un contribuyente en la preservación del pH. Los iones citrato, presentes en el ácido cítrico, forman sales llamadas citratos con muchos iones metálicos, estas sales generan unas condiciones de tolerancia al cambio del pH en la solución. Adicionalmente a ello el ácido cítrico funciona como un antioxidante, característica que lo hace útil pensando en mitigar los cambios de pH en la solución donde se encuentran los espermatozoides (Silva, 2007).

#### 1.4.1.3. *Yema de huevo*

El uso de criopreservantes del semen de perro ha estado limitado por la ocurrencia de daños en la estructura y función de los espermatozoides, las cuales están atribuidas al choque frío durante la criopreservación, afectando directamente su viabilidad. Tales daños pueden ser prevenidos mediante la inclusión de sustancias crioprotectoras en conservantes para el enfriamiento y/o congelamiento del esperma. Dichos crioprotectores son clasificados en dos tipos: penetrantes y no penetrantes.

Los crioprotectores penetrantes, como el glicerol, el dimetil sulfoxido, el etilen glicol y propilen glicol, causan en los lípidos y proteínas de la membrana una reorganización que

resulta en el incremento de la fluidez, siendo mayor la deshidratación a bajas temperaturas, reduciendo la formación de hielo intracelular e incrementando la supervivencia en la criopreservación (Holt Wv; 2000). Estos efectos sobre la estructura de la membrana resultan ser críticos si se piensa en congelar o refirgerar el semen, es importante comprender que aunque los cambios de temperatura para ambos procesos son diferentes, el riesgo debido a los cambios estructurales de los lípidos persiste, esto debido a que dichos cambios no dependen de la temperatura. El inconveniente que presentan estos crioprotectores penetrantes es que estos diluyen tanto azúcares como sales, llevando consigo un decrecimiento en la osmolaridad lo cual afecta la motilidad del espermatozoide, ya que este es bastante sensible a los cambios osmóticos (Amirat L. et al). Por otro lado, la yema de huevo, la leche desgrasada, trehalosa, amino ácidos, dextranos y sacarosa son crioprotectores no penetrantes (Songsasen N. et al). Estos crioprotectores se caracterizan porque actúan extracelularmente, alterando la membrana plasmática, o actuando como soluto, bajando la temperatura de enfriamiento del medio y disminuyendo la formación de hielo extracelular (Songsasen N. et al).

La yema de huevo es uno de los crioprotectores no penetrantes más comúnmente usado (England, 1993), sin embargo, la yema de huevo posee otras sustancias que pueden tener efectos negativos sobre la movilidad espermática.

La capacidad de la yema de huevo como sustancia crioprotectora es atribuida al contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se adhieren a la membrana celular del espermatozoide (Bergeron et al.2004), formando una capa interfacial entre los ácidos grasos y el agua (Anton, 2003). Las lipoproteínas de baja densidad podrían promover la entrada de fosfolípidos y colesterol dentro de la membrana celular, formando un complejo con las proteínas seminales del plasma, haciéndolas indisponibles para funcionar en la membrana (Manjunath et al; 2002). La utilización de lipoproteínas de baja densidad ha sido exitosa en cerdos y en toros (Moussa; 2002). De la misma manera se han hecho ensayos con semen de perro utilizando dichas lipoproteínas dando resultados benéficos en cuanto a la motilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana, siendo evaluado en semen congelado y semen enfriado (Valera J. et al; 2008).

La utilización de ciertos componentes de la yema de huevo in conservantes crea óptimas condiciones para el sometimiento de espermatozoides a la criopreservación. Se debe entonces evaluar el tipo de huevo, la fracción de lipoproteínas de baja densidad, la concentración de la yema de huevo y las lipoproteínas por aparte para determinar los ingredientes óptimos en la preparación del conservante. La remoción de fracciones perjudiciales de la yema de huevo puede potencialmente beneficiar la duración del espermatozoide durante el proceso de congelamiento (Beverly J. et al; 2012).

#### 1.4.1.3.1. Tipos de yema de Huevo usados en criopreservación

Los conservantes de semen congelado usados en muchas especies, cerdos, cabras, sementales, toros, perros, incluyen yema de huevo de gallina (Dobrinski et al. 1993). El huevo de gallina es una fuente preferida de yema debido a que es de fácil adquisición. Sin embargo, actualmente se conocen otros tipos de yema que se han venido utilizando para el mismo fin. La yema de huevo de codorniz frente a la yema de huevo de gallina fue

comparada en semen de burro poitou en una concentración de 0.0, 2.5, 10 y 20%. El estudio encontró que un 10% de concentración de yema de codorniz mejora el porcentaje de motilidad en comparación con un 10% de concentración de yema de huevo. Después de la comparación de dos tipos de yema, los investigadores encontraron que estos poseen similar composición excepto en la composición de fosfatidilcolina, para la cual el huevo de codorniz posee significativamente más, adicionalmente el huevo de codorniz tiene menos fosfatidiletanolamina y una baja relación de ácidos grasos polinsaturados con respecto a los ácidos grasos saturados (Silva & Verstegen. 1995). Otro estudio compara la yema de huevo de paloma con la yema de huevo de gallina en toro Sahiwal. Los conservantes con yema de paloma contienen concentraciones de 5,10, 15 y 20% comparada a una de 20% de yema de huevo de gallina. Este estudio encontró que el conservante con 20% de yema de huevo de paloma o gallina tuvo similares resultados después de la descongelación. A medida que la concentración de yema de huevo de paloma decreció también lo hizo el porcentaje de motilidad, viabilidad e integridad de la membrana (Trimeche et al. 1997). Un estudio idéntico fue hecho con yema de huevo de pato sobre semen de Búfalo Nili-Ravi. Este estudio encontró una significativa diferencia en los dos conservantes, yema de huevo de gallina y de pato, a una concentración del 20%. El conservante de pato mejoró significativamente la motilidad después del descongelamiento y redujo los traumas y daños en la cola del espermatozoide (Jamil-ur-Rahman. 2011).

Un estudio más completo se hizo comparando yema de huevo de pato, gallina, pavo, perdiz y omega-3 de pollo. No solamente se hizo el estudio comparando el post-congelamiento sino también se examinó la composición de colesterol, grasas saturadas, grasas monoinsaturadas, grasas polinsaturadas, grasas trans, omega-3, omega-6 y omega-9. Aunque este estudio encontró diferencias entre las diferentes composiciones de los tipos de huevos, solamente la sustitución de yema de huevo de perdiz mostró un significativo incremento en la motilidad comparado la yema de huevo de gallina. La composición de yema de huevo de perdiz fue más alta en colesterol, grasas saturadas y omega-6, por otro lado fue más baja en grasa monoinsaturada, grasas trans y omega-9 comparado a los otros tipos de yemas (Clulow JR et al. 2007). En contraste a los estudios mencionados inicialmente, ha habido varios reportes que no muestran diferencias cuando se usa yema de huevo de pato en comparación de la yema de huevo de otras especies. La posible explicación para los resultados diferentes puede ser la dieta del animal productor de la yema o el método de preparación de la mezcla de la yema de huevo lo cual produce entonces más o menos lípidos con el conservante (17; 81).

#### 1.4.1.3.2. Yema de huevo de gallina

Composición:

Proteínas: 17.5%

Lípidos: 32.5%



Agua: 48% de agua

Minerales: 2% de minerales.

Rico en vitaminas, aunque carece de vitamina C:

Vitamina A: 144 µg,

Tiamina: 0.66 mg

Riboflavina 0.5 mg

Ácido pantoténico

Ácido fólico

Igualmente, es rica en fosfolípidos, en especial fosfatidilcolina o lecitina y ácidos grasos omega tres. Colina: 225 mg y 424 mg de colesterol

Minerales:

Calcio: 50 mg

Fósforo: 172 mg

Hierro: 1.2 mg

Magnesio: 10 mg

Potasio: 126 mg

Zinc: 1 mg

#### 1.4.1.3.3. Yema de huevo de pata

Aunque si bien la composición de la yema de huevo de pata es muy similar a la de la de gallina, existen notables diferencias con respecto a la cantidad de vitaminas y colesterol que contiene la de huevo de pata con respecto a la de gallina (Avilés y Camiruaga, 2006).

Composición:

Proteínas: 13%

Lípidos: 32.5%

Agua: 48% de agua

Minerales: 2% de minerales.

Carbohidratos: 0.70 gms

Colesterol: 680 mg

Azúcar: 0.70 gms

Vitaminas:

Vitamina A: 740 µg,

Tiamina: 0.16 mg

Riboflavina 0.53 mg

Vitamina B3: 4.53 mg

Vitamina B5: 1,86 µg.

Vitamina B6: 0.25 mg

Vitamina B9: 80 µg.

Vitamina B12: 5.40 µg.

Vitamina D: 5 µg.

Vitamina E: 0.74 mg

Vitamina K: 0.30 µg.

Minerales:

Calcio: 63 mg

Fósforo: 178 mg

Hierro: 2.7 mg

Magnesio: 16 mg

Potasio: 150 mg

Zinc: 1,40 mg

Yodo: 13 mg

Sodio: 100 mg

#### 1.4.1.4. *Glicerol*

Es un crioprotector, capaz de mejorar la sobrevivencia celular después de la congelación y descongelación; los crioprotectores pertenecen a dos grupos: 1) aquellos que penetran en las células y 2) permanecen en el medio extracelular. Adicionar glicerol, reduce substancialmente las injurias de la criopreservación; sin embargo, su adición y remoción, también causan alteraciones en las células espermáticas (Watson, 2000).

#### 1.4.2. **Técnicas para la conservación de semen canino**

La refrigeración a 4°C conserva el semen canino, la limitante es el escaso tiempo que éste puede almacenarse, 4 ó 5 días. El potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura (Barrera et al, 2008).

### 1.5. **INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CANINA**

En la cópula natural, el macho eyacula dentro de la vagina; en la IA el depósito del esperma puede realizarse intravaginalmente o intrauterinamente, dependiendo del uso de semen fresco, refrigerado o congelado, y de los equipos disponibles. Cuanto más al interior del tracto genital se insemina, menos espermatozoides son necesarios para lograr la fertilización (Bohórquez et al, 2005).

La IA intravaginal se realiza con semen fresco o refrigerado, depositado en la vagina, mediante un catéter. Cuando se trabaja con semen congelado, la IA es usualmente intrauterina. La IA intrauterina transcervical puede realizarse mediante un catéter que penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. La hembra no necesita sedación (Stornelli y De La Sota, 2006).

En la IA intrauterina quirúrgica, se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21. El número de inseminaciones en esta práctica es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (Tsutsui et al, 1988).

La Inseminación con semen refrigerado se utiliza en perras en estro, una vez obtenido el semen, se realiza un fraccionamiento de las fases del eyaculado a fin de obtener una fracción que contenga la mayor cantidad de espermatozoides posibles (Stornelli y De La Sota, 2001).

El esperma refrigerado a + 4 °C aumenta su fecundación durante varios días, aunque es preferible utilizar semen refrigerado en las 48 horas que siguen a su recolección, si el eyaculado es mayor a 1.5 ml se realiza una primera inseminación con la mitad y una segunda a las 24 o 48 horas (Sánchez et al, 2007).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. LOCALIZACIÓN**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de la Salle, ubicada en la ciudad de Bogotá.

### **2.2. POBLACIÓN Y MUESTRA**

Las muestras se tomaron de un individuo canino macho de 5 años de edad, de 35 kilogramos de peso. La toma de muestras se realizó en 4 oportunidades diferentes, obteniendo un promedio de 30 muestras con aproximadamente 200 millones de espermatozoides cada una, 13 serán refrigeradas utilizando como diluyente tris citrato + yema de huevo de gallina y 13 se refrigerarán utilizando como diluyente tris citrato + yema de huevo de pata y 4 para evaluar semen fresco como control para realizar comparaciones.

### **2.3. RECOLECCIÓN DE DATOS**

Se llenará en un formato (ANEXO 1) los datos obtenidos en las diferentes evaluaciones de las muestras analizadas, para llevar un registro y posteriormente realizar su análisis.

### **2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis de los datos se utilizaron técnicas de regresión lineal con el fin de ajustar una función lineal al comportamiento de las variables analizadas (motilidad, vigor, aglutinación y viabilidad) en función del tiempo (Varela, Corcini y Ulgium 2008). Dentro de los cálculos de estadísticos y pruebas ejecutadas en la regresión se calcularon los coeficientes de correlación, un test ANOVA en cada variable con el fin de determinar la significancia del modelo lineal para la explicación del patrón de variación de los datos obtenidos y un test t-student sobre los parámetros estimados del modelo lineal para determinar la significancia estadística de estos (Devore, 2005). Para verificar las diferencias estadísticas entre los dos tratamientos evaluados se realiza una prueba t-student de comparación de medias asumiendo heterocedasticidad entre las dos muestras (Bernardo, 1981). Todos estos cálculos se realizaron mediante el software Microsoft Excel 2010.

### **2.5. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS**

Antes de proceder a la toma de muestras se realizó el examen clínico completo incluido el aparato reproductor del canino macho.

### **2.5.1. Obtención semen**

Se llevó a cabo manipulación digital en el macho para la obtención de semen, con ayuda de una hembra en celo para mejorar la libido y aumentar la cantidad de semen recolectado, el cuál se recogerá en un recipiente precalentado a 37°C.

### **2.5.2. Volumen, color y pH**

Al inicio de cada día de estudio se evaluaron las características macroscópicas como volumen, color y pH , en semen fresco. El volumen se estimó en un frasco aforado y precalentado a 37°C, el pH de estableció por medio de tiras reactivas y el color se determinará subjetivamente por los investigadores.

### **2.5.3. Preparación de las soluciones**

Se prepararon las muestras de acuerdo a las siguientes características:

- Preparación del diluyente:
  - Muestra 1
    - Agua destilada 25ml
    - Triladyl 8.3 ml
    - Yema de huevo de gallina 8.3ml
  - Muestra 2
    - Agua destilada 25ml
    - Triladyl 8.3 ml
    - Yema de huevo de pata 8.3ml

Se mezclaron cada una de las preparaciones en un tubo de ensayo, agitando suavemente para homogenizar la mezcla. Se llevan luego a la criadora a 37°C por una hora. El paso a seguir es la toma de la muestra de semen del canino macho de la raza bulldog de cuatro años de edad; antes de realizar el procedimiento al canino se le realiza un examen físico comprobando su buen estado de salud e integridad de los órganos reproductivos. Realizamos la toma de semen a través de la manipulación manual. Se colecta la fracción uno y la fracción 2 del eyaculado en un vaso de precipitación; el volumen de la toma de eyaculado dada por el canino es de 2ml.

#### **2.5.4. Refrigeración del semen**

Se procesaron las muestras de semen en dos grupos, cada uno con un diluyente diferente.

Muestras refrigeradas: se les añadió el respectivo diluyente, luego fueron llevadas a una temperatura de 4°C. Se prepararon entre 13 a 15 tubos de 0.25 ml con una concentración aproximada de 200 millones de espermatozoides en cada uno.

#### **2.5.5. Motilidad**

Se evaluó una muestra de un micro tubo congelado y uno refrigerado cada hora para determinar los porcentajes de motilidad total y motilidad progresiva; colocando 20µl de cada uno, en una lámina portaobjetos pre-calentada (37°C) y cubriendo luego con un cubreobjetos, observándose posteriormente a 10X y 40X; el resultado obtenido se expresará en porcentajes (0-100).

#### **2.5.6. Prueba HOST**

En la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática se utilizará el Test hiposmótico. El procedimiento consiste en incubar 50 µl de la muestra de espermatozoides en 500µl de la solución hiposmótica durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente una gota de la suspensión resultante será extendida en un portaobjetos, la lámina se teñirá con tinción Wright. Se evaluarán 200 espermatozoides por lámina utilizando el objetivo de 100x. Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (HOST +) los que reaccionaron al estrés hiposmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de la misma, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (HOST-). Los resultados se expresarán en % de espermatozoides con membrana funcional (HOST+).

#### **2.5.7. Morfología espermática**

Para la evaluación de la morfología espermática se teñirá el extendido de espermatozoides con Tinción Wright. Luego, se evaluarán 200 espermatozoides por lámina a un aumento de 100x con aceite de inmersión. Se evaluarán individualmente, en cuanto a anomalías que haya en la cabeza, pieza intermedia y cola. Los resultados se expresarán en % de espermatozoides normales.

#### **2.5.8. Concentración espermática**

La concentración espermática se determinará a través del conteo de los espermatozoides en la Cámara de Neubauer. Se coloca en un tubo de ensayo de vidrio de 5ml, una dilución (muestra/agua destilada) de 1:50 (utilizada para el conteo de espermatozoides en

semen canino) homogeneizándose por 5 segundos en forma manual. En la cámara de Neubauer se localizarán los 9 cuadrantes primarios y se cubrirán con un cubreobjetos. Se colocará aproximadamente 10 $\mu$ l de la dilución en la cámara, hasta que toda la zona se llene, sin sobrepasarse. Se llevará la cámara al microscopio utilizando el objetivo de 40x, se localizará la zona de conteo (cuadrante principal central que contiene 25 cuadrantes secundarios) y se contarán 5 cuadrantes secundarios (4 esquinas y 1 central). El resultado se expresará en millones de espermatozoides/ml.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. OBTENCIÓN DE PARÁMETROS ANDROLOGICOS

De esta muestra de semen fresco se toma una gota y se realiza el examen andrológico (micro y macro):

Macro		Micro	
Volumen fracción 1 + fracción 2	2ml	Motilidad individual	85%
Color	blanco opalescente	Vigor	4/4
Olor	sg	Concentración espermática	510 Millones (cámara de N)
Aspecto	denso	Morfología	22% anormalidades de cola
		Viabilidad	84% (Eosina Nigrosina)

Tabla 1: Análisis andrológico macroscópico y microscópico de la muestra de semen utilizada para los experimentos.

Al cumplir la hora el diluyente en la incubadora a 37°C, se realiza la mezcla del diluyente y el semen del canino en proporciones uno a uno (1 ml de semen X 1 ml de diluyente) se mezcla hasta homogenizar, y se llevan los preparados a refrigeración a 4°C por una hora, cumplida esta hora tomamos con una pipeta plástica de precisión una gota de la preparación y la depositamos en una lámina la cual ha sido precalentada a 37°C y de nuevo llevamos esta laminilla con la gota a la criadora a 37°C por 1 minuto, realizamos este procedimiento para las dos preparaciones triladyl – yema de huevo de gallina, triladyl – yema de huevo de pata, y registramos datos de motilidad individual, vigor, viabilidad y aglutinación, esta medida se toma como hora cero y luego cada hora se realiza el mismo procedimiento recolectando los datos para cada preparación.

#### 3.2. COMPORTAMIENTO DE PARÁMETROS ANDROLÓGICOS MICROSCÓPICOS EN EL TIEMPO

Luego de obtener las muestras se tomaron datos de los parámetros andrológicos cada hora durante 12 horas. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 2:

Observamos que los valores de movilidad individual con yema de gallina comienzan en un 90% y al final del periodo de muestreo obtenemos un valor de 65%. Para el tratamiento con yema de pata el valor inicial es de 95% y desciende hasta un 50% después de las 12 horas de tratamiento. Es importante resaltar que los valores en la hora



0 del experimento son 5% menores a los observados 1 hora después de corrido el experimento. Los valores de vigor en la muestra tratada con yema de gallina tiene un valor inicial de 4 y al final del experimento termina con un valor de 3; el valor inicial de vigor para el tratamiento con yema de pata inicia en 4 pero termina en un valor de 2, lo que representa una pérdida pronunciada de la velocidad de movimiento espermático con respecto al observado en el tratamiento con gallina.

Tabla 2: medición de los parámetros andrológicos de los tratamientos tris- yema de gallina y tris-yema de pata durante 12 Horas.

hora	Tratamiento							
	Tris-Yema gallina				Tris-Yema pata			
	Movilidad individual	Vigor	Viabilidad	Aglutinación	Movilidad individual	Vigor	Viabilidad	Aglutinación
0	0.85	4	0.84	0	0.9	4	0.84	0
1	0.9	4	0.84	0.05	0.95	4	0.84	0.05
2	0.9	4	0.84	0.1	0.9	4	0.84	0.1
3	0.9	4	0.84	0.1	0.7	3	0.84	0.3
4	0.75	4	0.84	0.2	0.65	3	0.84	0.4
5	0.75	3	0.83	0.2	0.65	3	0.8	0.4
6	0.75	3	0.83	0.23	0.65	3	0.8	0.4
7	0.7	3	0.83	0.23	0.6	3	0.75	0.43
8	0.7	3	0.8	0.25	0.6	3	0.75	0.43
9	0.7	3	0.8	0.25	0.6	3	0.75	0.43
10	0.68	3	0.8	0.25	0.6	3	0.7	0.43
11	0.65	3	0.8	0.25	0.55	2	0.65	0.48
12	0.65	3	0.8	0.3	0.5	2	0.65	0.5

Los valores de viabilidad tanto en el tratamiento con yema de huevo y con yema de pata inician con un valor de 84%. Al final del experimento parece haber una reducción significativa de la viabilidad en el tratamiento que usa yema de pata como criocervante. En cuanto al porcentaje de aglutinación es evidente que a pesar de iniciar el experimento con un porcentaje nulo de aglutinación el tratamiento con yema de pata muestra un mayor valor de aglutinación final.

Para comprobar si existen las diferencias estadísticas que se sospechan (en cada uno de las variables estudiadas) se realiza todo el análisis de regresión lineal. Mediante el uso de la herramienta VBA para análisis de datos del software EXCEL 2010 se graficaron y calcularon los parámetros y principales estadísticos para cada una de las variables analizadas. Los datos y graficas obtenidas fueron las siguientes:

Tabla 3: p-valor sobre el modelo lineal y coeficiente de determinación estimados para cada uno de los parámetros evaluados.

Parametro evaluado	Diluyente			
	Gallina		Pata	
	Valor crítico de F	R <sup>2</sup> ajustado	Valor crítico de F	R <sup>2</sup> ajustado
Movilidad	9.82E-06	0.827862745	2.62E-05	0.732142857
Vigor	0.000275101	0.688311688	0.00011691	0.732142857
Viabilidad	1.43E-05	0.815820543	1.15E-06	0.882871537
Aglutinación	5.61E-06	0.844321158	9.13E-05	0.743643275

Se encuentra que para todas las variables consideradas la regresión lineal es un modelo que explica a variación de los datos. Estos valores son muy significativos para los parámetros de movilidad, viabilidad y aglutinación y aunque con un p-valor menor pero igualmente significativo ( $\alpha=0.05$ ) el vigor parece comportarse de manera lineal con respecto al tiempo. Esto se comprueba mediante la evaluación de los coeficientes de correlación ajustados que nos indican con valores superiores a 0.8 un buen ajuste de los datos a una función lineal. En el caso del vigor este queda con un valor mucho más bajo tanto en los tratamientos de pata como de gallina. Es importante notar que los datos del tratamiento con yema de gallina muestran un comportamiento que se ajusta mucho mejor a una función lineal que los datos del tratamiento con yema de pata.

También se estimaron el valor de los parámetros de la regresión lineal para la movilidad, vigor, viabilidad y aglutinación con respecto al tiempo. Los parámetros estimados fueron los siguientes:

Tabla 4: estimaciones de los parámetros de regresión lineal para las cuatro variables de estudio.

Variable	parametro	tratamiento					
		Gallina			Pata		
		Coefficientes	Error típico	Probabilidad	Coefficientes	Error típico	Probabilidad
movilidad	Intercepción	0.895	0.021	1.23E-13	0.880	0.034	3.42E-11
	hora	-0.022	0.003	9.82E-06	-0.033	0.005	2.62E-05
Vigor	Intercepción	4.044	0.148	1.86E-11	3.934	0.174	1.41E-10
	hora	-0.110	0.021	2.75E-04	-0.143	0.025	1.17E-04
Viabilidad	Intercepción	0.903	0.011	1.25E-16	0.877	0.013	7.94E-16
	hora	-0.105	0.014	1.43E-05	-0.017	0.002	1.15E-06
Aglutinación	Intercepción	-0.214	0.050	1.33E-03	0.105	0.045	3.93E-02
	hora	0.525	0.065	5.61E-06	0.038	0.006	9.13E-05

Puesto que la movilidad, vigor y viabilidad son variables que decrecen con el tiempo el parámetro de regresión para la pendiente en cada una de estas variables es negativo, a diferencia de la aglutinación cuya comportamiento es el aumento de este en el tiempo y por lo tanto un parámetro de regresión para la pendiente positivo. Con excepción del parámetro de regresión del punto de corte para la aglutinación los demás parámetros mostraron significancia en su determinación. El punto de corte para la aglutinación es de 0 por lo que se asume que estadísticamente la aglutinación en el tiempo 0 iniciado el experimento es de 0%.

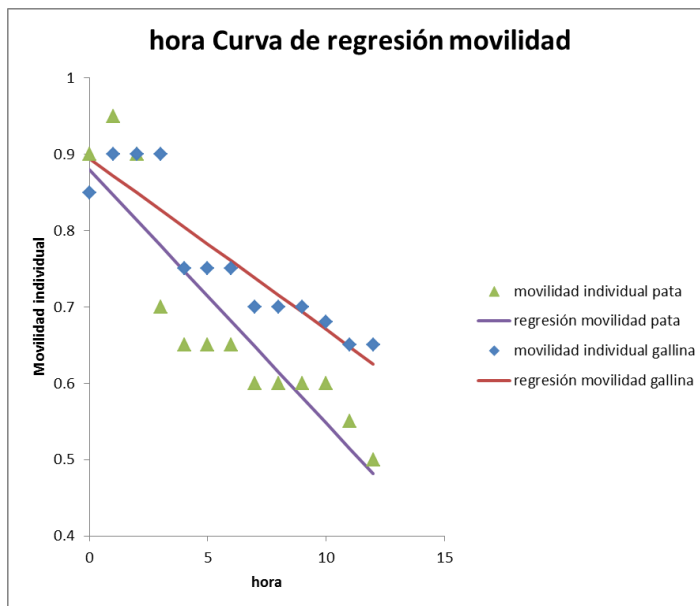


figura 1: Curvas de regresión para la movilidad en el tiempo en los tratamientos con yema de pata y yema de gallina.

Como podemos ver en la figura 1 el comportamiento de la movilidad muestra diferencias en la pendiente de la curva. Puesto que nuestro interes radica en la evaluación de la efectividad de estos dos tratamientos para la conservación de muestras de semen canino los análisis e interpretaciones de los resultados se haran en base solamente a las pendientes de las curvas de regresión. Vemos claramente uqe en la movilidad los comportamientos son diferentes entre tratamientos, siendo el tratamiento con yema de gallina mas efectivo puesto que al finalizar el experimento obtenemos una mayor movilidad individual que en el tratamiento con yema de pata. La diferencia estimada de la movilidad al final del experimento es de 18% entre los tratamientos.

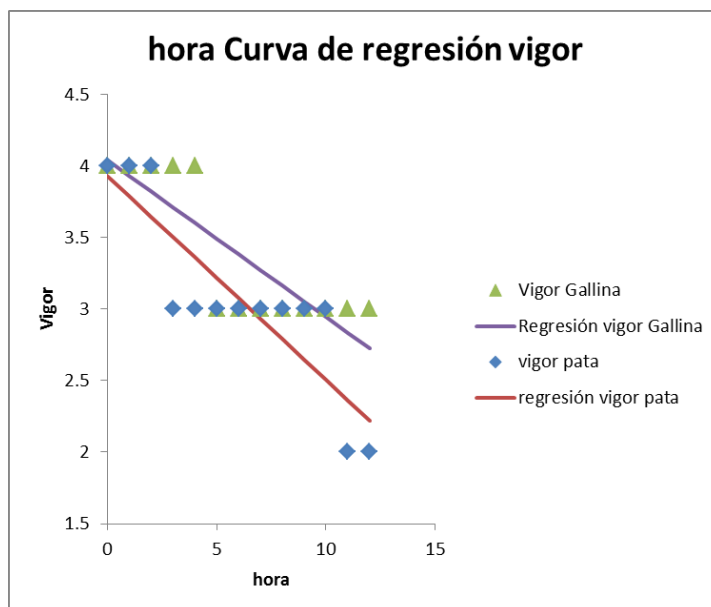


Figura 2: curva de regresión para la evaluación del vigor con respecto al tiempo en los tratamientos de yema de gallina y yema de pata.

Se encontró de la inspección de la grafica de regresión que los comportamientos de vigor para ambos tratamientos puede llegar a mostrar diferencias significativas (figura 2). Es importante notar que al graficar los resultados la gran mayoría de los datos se ubican en el valor 3 de vigor. Los datos agrupados en este punto podrian indicar otro tipo de comportamiento del vigor, posiblemente porque la variable evaluada es ordinal o su comportamiento es no lineal. Esto nos lleva a concluir que en el momento de realizar los análisis de diferencias entre tratamientos con respecto a las variables ordinales, si se encuentran diferencias significativas estas deben ser tratadas discretamente.

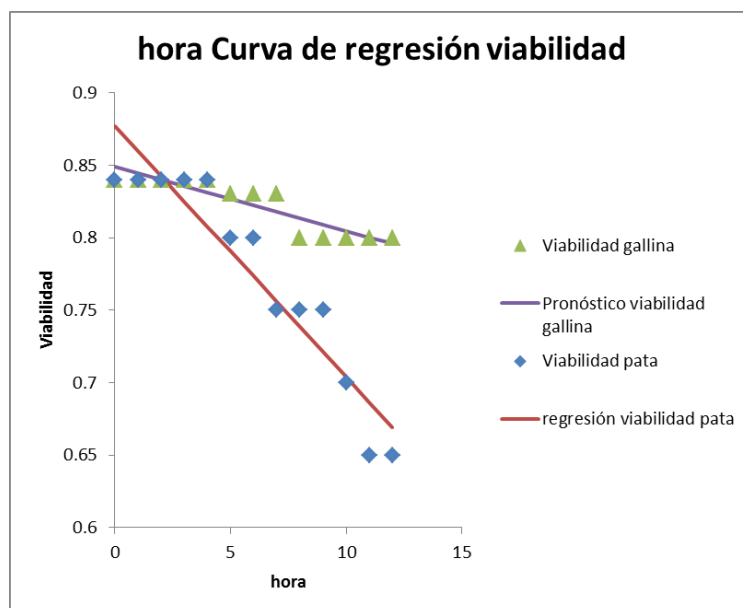


Figura 3: curva de regresión para la viabilidad espermática en los tratamientos con yema de gallina y yema de pata.

Existen claras diferencias en el comportamiento de la viabilidad entre los tratamientos de yema de gallina y yema de pata (figura 3). Estas diferencias corresponden tanto a la pendiente de decreción de la viabilidad como los puntos de corte en tratamientos. La viabilidad espermática obtenida con el tratamiento de yema de pata sufre una variación mucho mas marcada que la mostrada con el tratamiento con yema de gallina. En cuanto a los puntos de corte la diferencia es significativa; estas diferencias pueden deberse al método de preparación o diferencias causadas por los tratamientos (BENCHARIF, 2013).

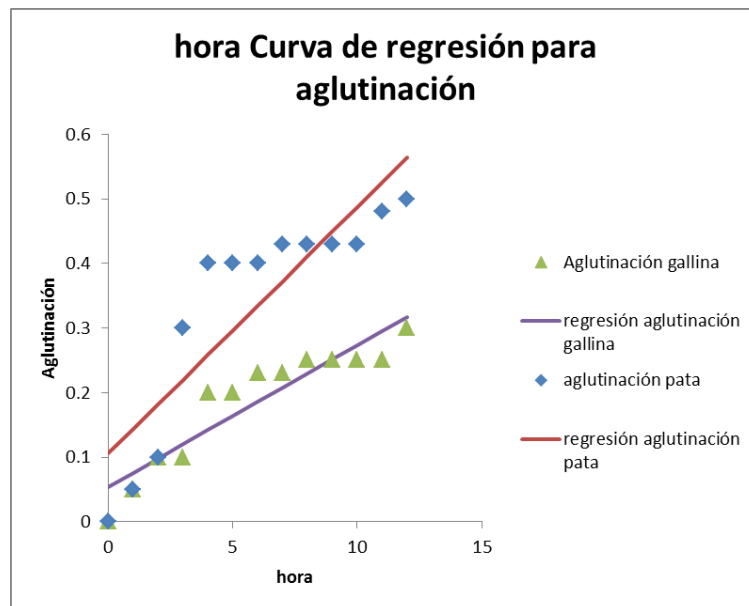


figura 4: curva de regresión para aglutinación de los tratamientos de yema de pata y yema de gallina.

Al evaluar el proceso de aglutinación espermática para los diferentes tipos de tratamientos encontramos diferencias entre tratamientos en el comportamiento de la variación respecto al tiempo. El cambio en el porcentaje de aglutinación en el tratamiento con yema de gallina es menor que el mostrado en el tratamiento con yema de pata. A pesar de que el cambio en la variación de los tratamientos es diferente podemos ver que los datos después de la quinta hora de iniciado el experimento parecen ser paralelos entre tratamientos. Este comportamiento puede llegar a indicar una variación no lineal del porcentaje de aglutinación en el tratamiento con yema de huevo o a errores en la determinación de aglutinación en las primeras 5 horas. Si fuese la explicación el segundo caso es podríamos decir que los tratamientos serian equivalentes y el problema a solucionar vendría a ser ahora la homogenización de las condiciones iniciales de preservación con el fin de optimizar los valores iniciales.

Finalmente se evaluaron diferencias entre los diferentes tratamientos mediante el uso de un test t-student para la comparación de medias heterocedásticas (varianzas diferentes en los tratamientos). Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 5: Estimación de diferencias del parámetro hora en las variables de movilidad, vigor, viabilidad y aglutinación sometidas a los tratamientos de congelamiento con yema de gallina y yema de pata.

Valores p-valor para la diferencia de medias entre tratamientos				
Estadístico	Parámetro			
	Movilidad	Vigor	Viabilidad	Aglutinación
p-valor	1.35E-06	0.001238801	4.56E-11	4.02E-12

Se verifica estadísticamente que los tratamientos difieren en cada una de las variables de estudio. Estas diferencias corroboran lo anteriormente discutido y mostrado en las graficas anteriores.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison of Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*; 61: 895-907.
- Andrabi, S.M.H., Ansari, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A. y Akhter, S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Science Reproduction*; 104.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgarrondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona. 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83, 175–183.
- Avilés, J. P. y Camiruaga, M. (2006) Manual de crianza de patos. Universidad Católica de Temuco, Fundación para la Innovación Agraria. Chile. 84 pp.
- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M.E. 2002. Evaluación del semen. En: E.S.E., Háfiez (ed.), Reproducción e inseminación artificial en animales (pp. 375-386). México: 7ª ed., MacGraw-Hill.
- Barrera, M., Villegas, J., Sánchez, R. y Risopatrón, J. 2008. Efecto de la refrigeración sobre parámetros funcionales en espermatozoides de canino. XV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Pucón Chile.
- Bencharif, L. Amirat, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, G. Delhomme, M.-L. Langlois, P. Barrière, M. Larrat, D. Tainturier. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70 1478–1488.
- Bergeron, A., Crête, M.H., Brindle, Y., Manjunath, P., 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70, 708–717.
- Beverly J. Purswell, Chair, Sherrie G. Clark, William H. Eyestone. 2012. Evaluation of Different Concentrations of Egg Yolk in Canine Frozen Semen Extender. Thesis submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Biomedical and Veterinary Sciences. Blacksburg, Virginia.
- Bohórquez, R., De Ondíz, A., Palomares, R. y Gallardo, F. 2005. Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino: reporte preliminar. Unidad de Reproducción Animal, Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Clulow, J.R., Maxwell, W., Evans, G. y Morris, L. 2007. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal* 85, 232–235.
- Corti González, Lorella Mabel. 2003. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*Canis familiaris*), en ova recuperadas de perras en celo inducido. 71 h.

- Cunha, I.C.N. 2008. Exame andrológico do cao. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, 1, 49-65.
- Cunningham, J.G. 2003. *Fisiología veterinaria 3ª ed.*. Madrid: Elsevier.
- England, G.C. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, 247–255.
- Drobnis, e.z.; crowe, I.m.; berger, t.; Anchooguy, t.j.; overstreet, J.W.; Crowe, J.H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transicions in cell membranes: a demosntration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* 265: 432-437.
- Dobrinski I, Lulai C, Barh AD, Post K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on postthaw viability of dog semen. *Journal of reproduction and Fertility*: 291 – 296.
- Douglas C. Montgomery. 2012. *Design and analysis of experiments*. WILEY Eighth Edition.
- Dumon, C. (2005). *Vademecum of reproduction pathology in the dog (in french)*. Ed.Med'com, Paris, p. 223
- Farstad, W. 2000. Assiste reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53, 175-186.
- Hernández, P.J.E., Gutiérrez, R.Y., Fernández, R.F. y Gómez N.N.E. 2004. Obtención y caracterización de espermatozoides procedentes de tres zonas del epidídimo de caninos. *Rev Salud Animal*, 26, 53-57.
- Holt, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.
- Holt Wv. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction Science*; 55: 671-684.
- Jamil-ur-Rahman Hea. 2011 Effects of different levels of pigeon egg yolk in extenders on the Post-Thaw semen quality of sahiwal Bulls. *Pakistan Veterinary Journal*; 32: 315-318.
- Jay L. Devore. 2005. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias.*. Editorial Thomson.
- Johnston, S.D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 21, 545-551.
- Johnston, S.D; Kustritz, M.V.R. y Olson, P.N.S. 2001. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W.B.Saunders.
- Lincovil, C., Barrera, M., Risopatrón, J. y Villegas, J. 2010. Efecto protector del plasma seminal sobre la funcionalidad de espermatozoides caninos refrigerados a 4 °C. XXI Reunión Anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. La Serena, Chile.
- Moussa, M., Marinnet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695–1706.



Muñoz, M., Treulén, F., Oyarzún, J., Sepúlveda, N., Sánchez, R. y Risopatrón, J. 2008. Efecto de diferentes fracciones proteicas del fluido seminal sobre la congelación de espermatozoides canino. XIX Reunion Anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Septiembre, Chillán.

Oettlé, E.E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil*, 47, 257-260.  
Oyarzún, J. I., Risopatrón, J. y Sánchez, R. 2008. Efecto del plasma seminal sobre la capacitación espermática en caninos. XIX Reunion Anual Sociedad Chilena de Reproduccion y Desarrollo, Septiembre, Chillán.

PARKS, J.E. & GRAHAM, J.K.1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* 38: 209-222.

Peña, F.J., Núñez-Martínez, I. y Morán, J.M. 2006. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, (Suppl. 2), 21–29.

Rota, A., Rota, A., Martine, M., Milani, C. y Romagnoli, S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 45, 29-37.

Sánchez, A., Rubilar, J. y Gatica, R. 2002. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch med vet*, 34, 131-134.

Sánchez, A., Rubilar, J. y Gatica, R. 2007. Congelación de semen canino y evaluación de la fertilidad potencial. Instituto de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Extraído el 4 de Agosto de 2013 desde URL:<http://www.veterinaria.uchile.cl/publicacion/congresoxi/produccion/J40PRO~1.DOC>

Schafer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D. y Aurich, C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66, 173-182.

Silva, A.R. 2007. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (Suppl.1), 119-127.

Silva LDM, Verstegen JP. 1995. Comparissons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*; 44: 571-579.

Stornelli, M. y De La Sota, R. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*, 21(1), 58 – 66.

Stornelli, M. y De la Sota, R. 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 29 – 38.

Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leibo SP. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*; 44: 79-90.

Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X., y Tang, X. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal reproduction science* 104: 3, 212-219.

Tello, I., De los Reyes, M. y Bernal, A. 1988. Descripción de algunas características seminales en caninos de raza ovejero alemán. *Avances en Cs. Vet* 3, 52-56.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J.A., Berg, K.A. y Farstad, W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology*, 66, 1645-1650.

Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Criobiology*; 385 – 393.

Tsutsui, T., Tezuka, T., Shimizu, T., Murao, I., Kawakami, E. y Ogasa, A. 1988. Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50, 193-198.

Valera Junior; Corcini C.D; R.R. Ulgium; Alvarenga M.V.F; Bianchi I; Deschamps J.C. 2008. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal reproduction science* 115 (2009) 323-327.

Verstegen, J.P., Onclin, K. y Iguer-Ouada, M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64 (Suppl. 3), 720–733.

Waheed, S., Ahmad, N., Hafez, NuJ., Muhammad, NuR. y Sajid Iqbal, Y. 2012. Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Animal Reproduction Science*, 131:2, 95-99.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60-6, 481-492.

Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y. y Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 146-156.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. y 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.

Yu, I., Songsasen, N., Godke, R.A. y Leibo, S.P. 2002. Differences among dogs in reponse of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44, 62-78.

**FORMATO PARA TABULAR RESULTADOS DE CADA EVALUACIÓN ESPERMÁTICA**

FECHA: \_\_\_\_\_

HORA: \_\_\_\_\_

MUESTRA Nº: \_\_\_\_\_

DILUYENTE UTILIZADO \_\_\_\_\_

TIEMPO DE REFRIGERACIÓN \_\_\_\_\_

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS	VALORES NORMALES
VOLUMEN		2.5 – 3.0
COLOR		Blanco opalescente / opaco
pH		6.3 – 7.0
MOTILIDAD (%)		≥ 70%
MORFOLOGÍA NORMAL (%)		≥ 70%
MORFOLOGÍA ANORMAL (%)		≤ 30%
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA		200 millones o más
MEMBRANA FUNCIONAL (HOST+) (%)		≥ 70%

OBSERVACIONES:

EVALUADOR:  
\_\_\_\_\_