

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DE SEMEN CANINO
CON DILUYENTE CaniPRO FREEZE A Y B”**

POR:

SAMANTHA ZULEIMA CORDOVA ALVARADO

TESIS:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**"MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DE SEMEN CANINO
CON DILUYENTE CaniPRO FREEZE A Y B"**

POR:

SAMANTHA ZULEIMA CORDOVA ALVARADO

ASESOR PRINCIPAL

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MVZ RODRIGO ISÍDRO SIMÓN ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**"MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DE SEMEN
CANINO CON DILUYENTE CaniPRO FREEZE A Y B"**


TESIS POR:

SAMANTHA ZULEIMA CORDOVA ALVARADO


Elaborado bajo la supervisión del comité particular y aprobado como requisito
parcial para optar por el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


JURADO



MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE



MVZ. SILVESTRE AVALOS MORENO
VOCAL



MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ
VOCAL



MC. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013

AGRADECIMIENTOS

El mundo en el que vivo y la naturaleza que me rodea, poder sentir el sol en la piel, el disfrutar del aire frío del invierno, agradecer la paciencia y la espera de esos árboles que florecen en primavera, maduran en el verano y después ven caer sus hojas sin por ello perder la belleza.

Me encantaría aprender esa paciencia, saber que la vida tiene un curso y nos muestra que todo lo que nace, florece y muere dejando huella, y no perseguirme a mí misma buscando que los resultados se den antes. Agradezco al agua, la risa que provoca en mi hijo, agradezco también el misterio de mi propio cuerpo.

A MI ALMA, TERRA, MATER: Llevare su nombre en alto. Me llevo de ti, cultura, amistad y conocimiento.

A MIS ASESORES: Por apoyarme en la redacción de esta tesis, su dedicación, conocimientos y orientación: MVZ Carlos Raúl Rascón Díaz, MC Juan Luis Morales Cruz y MVZ Silvestre Avalos Moreno.

A MIS AMIGOS: Vaya momentos de alegrías y sorpresas, y ya que la amistad es uno de los ingredientes en la receta de la vida: Areli, Esteban, Jessica, Juan Carlos, Jonathan, kleyver, Xicoténcatl, Gladys, Yizz, Leydi, Brenda, Pedro y a los no mencionados.

A MI COMPAÑERA BIBI: No existió mejor psiquiatra en el mundo que una cachorra lamiendo mi cara.

DEDICATORIA

MI PADRE CARLOS CORDOVA: valentía, integridad, tolerancia, amor, salud y felicidad son los principios de los cuales tú me aconsejaste para ser una mujer de verdad y siéntete orgulloso porque lo has conseguido, gracias por enseñarme que de mi depende mi felicidad.

MI MADRE GLORINDA ALVARADO: por ser una mujer autentica y guapa, tu amor incondicional, el saber que aun la vida te sorprende con sonrisas y lágrimas, te miro y miro a una mujer feliz, y verte contenta me llena de alegría, y la alegría trae consigo lo mejor de la vida.

A MIS HERMANOS: David Cordova, Carlos Cordova, Karla Cordova y Ernesto Cordova. La familia viene en paquetes, a mí me tocó el más grande y hermoso. Todos tienen algo muy especial que se siente en el corazón.

A MI HIJO: ELIÁN JASEF RUIZ CORDOVA

El regalo de verte crecer y observar tan de cerca como un ser se desarrolla y se convierte en esa persona dotada de alma, que pregunta y admira cada detalle de la vida. Gracias y disculpa por compartir el espacio de la Universidad.

LÁZARO RUIZ VIDAL: Sin ser lo que buscaba terminaste siendo lo que necesito y recuerda que el matrimonio es un verdadero arte y de las más profundas y enriquecedoras experiencias de la vida.

RESUMEN

Se realizó un estudio en la ciudad de Torreón, Coahuila, dentro de las instalaciones del Hospital de Pequeñas Especies y el laboratorio de Reproducción del C.B.R de la UAAAN UL; para determinar la motilidad existente en semen canino congelado utilizando el diluyente CaniPRO freeze A y B en relación 1:1.

Para este trabajo de investigación se ocuparon 5 machos de diferente, edad, peso y raza, clínicamente sanos.

Se utilizó el kit de diluyente CaniPRO freeze A y B, el cual viene con indicaciones e instrucciones para su utilización, basado en una relación de 1:3, por lo tanto con este método se tienen menor número de pajillas con el total del diluyente, para lo cual se optó por realizar la técnica 1:1 con la intención de obtener un mayor número de pajillas, con buena calidad tanto en la motilidad, concentración y morfo anomalías aunado a esto un menor costo de producción. y a su vez tener igual o mejor resultado al momento de la I.A y el tamaño de la camada.

Los resultados *in vitro* obtenidos en el estudio confirmaron que la dilución 1:1 mantiene concentraciones y motilidad optimas para la congelación de semen para posteriormente utilizarlo.

De esta manera obtuvimos un mayor número de pajillas por kit comercial.

Palabras clave: canino, semen, congelación, CaniPRO freeze A y B, motilidad.

CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- ANTECEDENTES.....	2
III.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Anatomía del aparato reproductor del macho.....	4
3.1.1. Órganos genitales del macho.....	4
3.1.2. Glándulas genitales accesorias.....	5
3.1.3. Genitales externos	6
IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	7
4.1. Hormonas Hipotalámicas	7
4.2. Hormonas Hipofisarias.....	7
v.- FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	8
5.1.1. Espermatogénesis	8
5.1.2. Control de la temperatura	9
5.1.3. Transporte de semen.....	9
5.1.4. Erección	10
5.1.5. Eyaculación	10
VI.- CARACTERÍSTICAS DE SEMEN CONGELADO	12
VII.- OBJETIVOS.....	14
VIII.- HIPÓTESIS.....	15
IX.- MATERIAL Y MÉTODOS	16
X.- RESULTADOS	20
modificación en relación 1:1	22
XI.- DISCUSIÓN	23
XII.- CONCLUSIÓN.....	24
XIII.- LITERATURA CITADA.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Identificación del macho canino.	18
Tabla 2.- Pasos consecuentes a la realización de la técnica.....	19
Tabla3.- Comparación macroscópica y microscópica del semen obtenido en fresco.....	19
Tabla 4.- Comparación microscópica del semen obtenido pos descongelado.	20
Tabla5.- Cantidad de machos a criopreservar con el total de kit de congelación tomando en cuenta la media de V.E con la técnica actual de CaniPRO freeze A y B	21
Tabla 6.- Cantidad de machos a criopreservar con el total de kit de congelación tomando en cuenta la media de V.E ml con técnica actual de CaniPRO freeze A y B relación 1:1..	22

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica2.- Comparación de conservación de % de motilidad y viabilidad con la receta actual (Carlos R 2012) y la modificación 1:1	21
Grafica 3.- Total de machos a criopreservar en comparación a la receta actual y a la modificación en relación 1:1	22

I.- INTRODUCCIÓN

Desde el primer nacimiento de una camada obtenida a partir de IA con semen congelado en 1969 (Seage, 1969), el interés demostrado por especialistas en reproducción y criadores estimuló el estudio sobre el área, dando como resultado la creación de bancos de semen en universidades y entidades privadas en diferentes lugares del mundo (Farstad, W. 2000). Estos bancos de semen proveen un reservorio de material genético de suma importancia en la preservación de caracteres fenotípicos de diversas razas, previniendo cualquier posibilidad de desaparición futura, tanto por motivos ecológicos o sanitarios.

Por otro lado la congelación de semen permite el uso de un reproductor luego de haber finalizado su vida reproductiva, optimizando su aprovechamiento. También es posible inseminar una hembra ubicada en una localización geográfica distante al hábitat del macho evitando las complicaciones y gastos que puede ocasionar el traslado de los animales (Fosberg, 2008). Por último, los conocimientos en la congelación de semen caninos pueden ser útiles en la congelación de semen de cánidos silvestres en vías de extinción lo que permitirá aumentar las posibilidades de preservación de estas especies (Farstad, W. 2000).

En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal utilizando diferentes tipos de diluyentes, el porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen congelado varía entre un 35-45 %. (Stornelli, 2007) Por otro lado los perros muestran una variabilidad en la cantidad seminal pos congelación. Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad, tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado.

II.- ANTECEDENTES

Dentro de las biotecnologías disponibles en caninos, la inseminación artificial (IA) es una de las más importantes para implementar el mejoramiento genético animal. Sin embargo no se trata de un método nuevo, ya que en 1787 fue idea por Lazzaro Spalanzani quien usó semen fresco. La IA canina puede realizarse usando diversas técnicas de inseminación y variados métodos de conservación seminal (Peña M. 2003).

Hasta hace poco tiempo se practicaba IA exclusivamente con semen fresco. Posteriormente se comenzó a utilizar semen refrigerado, y más tarde semen congelado. Al usar semen descongelado, se observó una baja fertilidad con inseminaciones intravaginales, con mayor éxito en la aplicación de la IA intrauterina transcervical o quirúrgica (laparoscopia, laparotomía) (Farstad, W. 2000). Los resultados de preñez obtenidos son muy diversos variando entre un 40% y un 70% (Nothling, 2006). Estos resultados tan dispares, se deben a diversos factores relacionados tanto con la calidad del semen utilizado, como con el momento de la inseminación (momento el ciclo estral de la hembra) y la técnica de IA empleada (Fosberg, 2008).

Es bien conocido el daño producido sobre los espermatozoides por las bajas temperaturas a las que son sometidos en el proceso de criopreservación. Las alteraciones físicas y químicas que se producen en la membrana celular del espermatozoide debidas a las modificaciones térmicas durante el enfriamiento y/o descongelamiento pueden comprometer parcial o totalmente la fertilidad (Hammerstedt, 2002). Los cambios más evidentes resultan en la pérdida de la motilidad espermática, así como pérdida de integridad acrosómica, lesiones que poseen gran correlación con el daño producido por el congelado y descongelado (Peña M. 2003). Múltiples factores afectan la integridad de las membranas del espermatozoide. Los más importantes están relacionados con las condiciones físico-químicas de los diluyentes, los métodos de congelación, y los métodos de descongelación. Estos dos últimos afectan principalmente al sistema de

membranas celulares, causando alteraciones estructurales, bioquímicas y funcionales en una proporción significativa. (England, 1990). La utilización de procedimientos de dilución y refrigerado, elección correcta del buffer y crioprotectores, tiempo suficiente de equilibrio, curvas apropiadas de congelado y descongelado que produzcan mínimo daño de la membrana espermática y una mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino, permitirán lograr mayores tasas de preñez. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forma parte de los factores que permiten lograr altos porcentajes de preñez y camadas de mayor número de cachorros (Hammerstedt, 2002).

Existen diversos trabajos sobre constitución de diluyentes, curvas y métodos de congelación así como uso de diferentes crioprotectores (England, 1990). Se han formulado distintos diluyentes, sobre la base teórica de un buen amortiguador de pH (Tris-ácido cítrico), un energético capaz de atravesar la membrana plasmática (fructosa, glucosa), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), crioprotectores penetrantes de membrana (glicerol, etilenglicol, sorbitol, manitol, inositol, DMSO, prolina, taurina, y otros), azúcares no permeables a través de la membrana plasmática, los cuales crean un medio hipertónico y consecuente deshidratación celular (lactosa, sacarosa, trealosa, rafinosa), moléculas hidrofílicas (proteínas nucleadoras de hielo, dextrano, proteínas anticongelantes), antioxidantes (catalasas, superóxido dismutasa) (England, 1990).

III.- REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Anatomía del aparato reproductor del macho

3.1.1. Órganos genitales del macho

Escroto

Es un saco membranoso dividido por un séptum medio en dos cavidades, ocupadas cada uno por los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático. Está situado entre la región inguinal y el ano (Sisson et al., 1993). Un musculo especial en la piel del escroto, el dartos, regula la proximidad de los testículos a la pared abdominal influyendo así sobre la temperatura (Allen, 1992). La red compleja del suministro de sangre también contribuye a mantener la temperatura de los testículos por debajo de la temperatura normal del cuerpo. Esto facilita el desarrollo óptimo de los espermatozoides (Daval, 2000)

Testículos

Los testículos del macho canino son relativamente pequeños, tiene forma oval o redondeada, su eje mayor es oblicuo y esta dirigido dorsal y caudalmente (Sisson et al., 1993). Atraviesan el canal inguinal entre los 4 y 5 días de edad (Cunningham, 1993) y alcanzan su ubicación en el escroto en 35 días (Allen, 1992).

Epidídimo

El epidídimo es largo, extremadamente enrollado sobre si mismo e íntimamente unido a lo largo de la parte dorsal de la superficie lateral del testículo (Sisson et al., 1993). Es una estructura formada por cabeza, cuerpo y cola. Los espermatozoides maduran en su paso a través de él, y en el perro, este recorrido se efectúa en 14 días (Allen, 1992).

Conductos deferentes

Los conductos deferentes son la continuación de la cola del epidídimo, con una ampolla estrecha en el perro y entra a la superficie cráneodorsal de la próstata (Cunningham, 1993). Este conducto trasporta los espermatozoides desde el

epidídimo hasta la uretra, y tiene un diámetro de 1mm aproximadamente (Allen, 1992)

Cordón espermático

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se juntan, se extiende oblicua y centralmente a través del canal inguinal y pasa junto al pene para terminar en el borde de inserción del testículo.

Está formado por las siguientes estructuras: Arteria testicular, venas testiculares, linfáticos que acompañan a las venas, plexo testicular de nervios autónomos, conductos deferentes, arteria y vena, haces de tejido muscular liso alrededor de los vasos, capa visceral de la túnica vaginal.

Canal inguinal

Los vasos espermáticos y el conducto deferente penetran en el abdomen a través de un espacio estrecho en los músculos de la pared abdominal, que se conoce como canal inguinal (Allen, 1992).

3.1.2. Glándulas genitales accesorias

Glándulas vesiculares

Las glándulas vesiculares no están presentes en el perro (Cunningham, 1999).

Próstata

Allen (1992) considera a la próstata como la única glándula accesoria en el perro. La próstata es relativamente grande y a menudo esta alargada, especialmente en animales viejos. Es de color amarillento y con una estructura densa. Se localiza a la altura del borde craneal del pubis o cerca de él, rodeando el cuello de la vejiga y la uretra (Sisson et al., 1993). Es una estructura bilobulada en la entrada de la pelvis. La uretra atraviesa la glándula antes de llegar a la base del pene. La próstata aumenta de tamaño según avanza la edad. Esta glándula produce una secreción transparente que es expulsada al interior de la uretra; esta secreción es

conocida como fluido prostático, y constituye la primera y tercera fracción del eyaculado; tiene poder bactericida (Allen, 1992).

3.1.3. Genitales externos

Pene

Está compuesto de raíz cuerpo y glande. En su parte distal existen dos cuerpos cavernosos visibles separados por un tabique medio, en su parte craneal hay un hueso, el *os penis*, que es el hueso rodeado por el glande (Allen, 1992). En los perros grandes alcanza una longitud de 10 cm. o más. Está considerado como una parte del cuerpo cavernoso que se ha osificado (Sisson et al., 1993).

El glande se extiende sobre toda la longitud del pene; su parte craneal llamada *pars longa glandis*, es cilíndrica, con un extremo puntiagudo, constituye las tres cuartas partes distales del glande y termina en la abertura de la uretra; caudalmente existe un alargamiento redondeado, llamada bulbo del glande, que sin erección es difícil apreciar, pero que en cuanto en pene se encuentra en erección consiste en un abultamiento más o menos esférico responsable de la fijación del pene en la vagina de la perra durante el apareamiento (Allen, 1992).

Prepucio

El prepucio forma una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene (Sisson et al., 1993). Cubre completamente el pene no erecto (Allen, 1992). La capa mas externa es ordinariamente integumento. Las capas internas son delgadas, de color rojizo y aglandulares. Presentan una mucosa que se continúa con la mucosa del pene en el glande peniano. En estas capas hay muchos nódulos linfáticos, que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Allen, 1992).

Uretra

Este conducto tiene la misión de transportar tanto la orina como el semen al extremo del pene (Allen, 1992). La parte pelviana de la uretra es relativamente grande. Su primera porción se extiende desde la vejiga y está cubierta por la próstata (Sisson et al., 1993).

IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

4.1. Hormonas Hipotalámicas

Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH)

Es producida en el hipotálamo (en la base del encéfalo) y transportada hasta la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos. Esta hormona determina de forma selectiva la liberación de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Hormona Luteinizante (LH) (Allen, 1992; Ruckebusch et al., 1991), estas dos hormonas (FSH y LH) participan en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (Ruckebusch et al., 1991).

4.2. Hormonas Hipofisarias

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es sintetizada y liberada en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch et al., 1991). En el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos en la espermatogénesis (Allen, 1992; Ruckebusch et al., 1991).

Hormona Luteinizante (LH)

Es producida en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch et al., 1991). En el macho es la responsable de la estimulación de las células intersticiales (células de Leydig) en el testículo para producir testosterona y dihidrotestosterona, y por lo tanto se le conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) (Allen, 1992; Ruckebusch et al., 1991).

Al inicio de la pubertad, los niveles altos de Hormona Luteinizante inducen a los testículos para producir testosterona, que llevará a la maduración de los espermatozoides (Davol, 2001).

Andrógenos

Son producidos por células en los testículos que forman pequeños islotes entre los túbulos seminíferos; estas son las células intersticiales o células de Leydig (Allen, 1992). La conversión de testosterona a dihidrotestosterona inducirá el desarrollo de la glándula próstata, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Allen, 1992; Davol, 2001). Después, los testículos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino (Daval, 2001). Los efectos adicionales de la testosterona incluirán la inducción de otras características físicas del género así como los rasgos de conducta, incluyendo la conducta de apareamiento y marcando de territorio con orina (Allen, 1992; Davol, 2001).

v.- FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

5.1. Fisiología de la reproducción del macho

El testículo es el órgano de apoyo para el sistema reproductor masculino; sin embargo hay que recordar que todas las funciones testiculares se encuentran influenciadas por el sistema neuroendocrino (Cunningham, 1999).

5.1..1. Espermatogénesis

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (células germinativas masculinas) en los tubos seminíferos de los testículos (Allen, 1992; Cunningham, 1999; Davol, 2001). Las células llamadas espermatogonias, que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal (mitosis) para dar origen a muchos espermatocitos. Los espermatocitos se dividen posteriormente mediante meiosis, por lo que el número normal de cromosomas queda reducido a la mitad (39) en las células resultantes que son llamadas espermátidas y se describen como haploides (con la mitad del número normal de cromosomas; las células con 78 cromosomas son llamadas diploides; en este número se incluyen los dos cromosomas sexuales). Las espermátidas se transforman en espermatozoides mediante un complejo reagrupamiento de los organelos; básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y

centriolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma queda en las células de Sertoli que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos que regulan la metamorfosis de espermatida a espermatozoide (Allen, 1992; Cunningham, 1999).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10-12 meses (Allen, 1992). El semen se guarda en los compartimientos extragonadales del epidídimo y el conducto deferente (Cunningham, 1999; Davol, 2001). La cantidad de semen reservada dependerá de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones.

El ciclo de la espermatogénesis, es decir, desde la división del espermatogonio hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tarda 8 semanas; durante 2 de éstas semanas los espermatozoides maduran en el epidídimo (Allen, 1992).

5.1.2. Control de la temperatura

La espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos. Según Allen (1992), Cunningham (1999) y Davol (2001) existen mecanismos que mantienen los testículos del perro más fríos que el resto del organismo ya que los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal, el músculo cremáster puede influir sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo, el músculo dartos en la pared escrotal puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia, sobre la posición de los testículos y la disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retorno sanguíneo en el plexo pampiniforme.

5.1.3. Transporte de semen

Los espermatozoides llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo; presentan una gota de citoplasma residual en el cuello. Las células maduran durante su paso a lo largo del epidídimo que se debe posiblemente a la producción constante de más semen en el testículo. Al entrar en el conducto deferente la gota (perla) se mueve hacia el extremo distal de la pieza media o es expulsada del espermatozoide, que ahora se considera maduro (Allen, 1992). Una vez maduros, los espermatozoides

emigran de los testículos al epidídimo donde se almacenan. Un extremo del epidídimo se adelgaza en el conducto deferente, el tubo a través del cual el espermatozoide maduro pasa para dejar el escroto (Daval, 2001).

5.1.4. Erección

Es un acontecimiento psicossomático en el que intervienen los sistemas vascular, neurológico y endocrino (Cunningham, 1999). Consiste en la tumescencia del pene como resultado de una acumulación de sangre en sus tejidos provocada por la constricción del retorno venoso (Allen, 1992; Cunningham, 1999). Los factores que estimulan la erección en la mayoría de los animales son el olor de una hembra en celo (estro) y la asociación entre rutina y coito, las vías mediante las que tales estímulos inician la erección son probablemente nerviosos, aunque no se conocen completamente (Allen, 1992). Lo primero que aparece es un engrosamiento del bulbo del glande. Entonces el collar del glande se engruesa parcialmente. Este engrosamiento se propaga a todos los espacios cavernosos. Cuando el pene está completamente erecto, el epitelio está muy tenso y las venas superficiales son prominentes (Sisson et al., 1993).

En los perros solamente se produce una ligera erección antes del coito; la penetración se ve favorecida por la rigidez del hueso peniano y la erección total se produce una vez que el pene ha sido introducido en la vagina de la perra (Allen, 1992), el bulbo del glande se alarga tanto que no puede ser retirado de la vagina (Allen, 1992); por tanto, el macho y la hembra quedan enlazados juntos durante 5 ó hasta 60 minutos (Sisson et al., 1993). Sólo después de disminuir la erección puede separarse el macho de la hembra (Allen, 1992). La erección disminuye porque después de la eyaculación se produce un aumento en el tono del músculo liso mediado por el nervio simpático a nivel sacro, aumentando la salida de sangre de los espacios cavernosos, además de producir una contracción del músculo retractor del pene que retira el pene hacia el interior del prepucio (Cunningham, 1999).

5.1.5. Eyaculación

Las contracciones del músculo uretral impulsan los fluidos procedentes de los conductos deferentes y de la próstata hacia la uretra (Allen, 1992), es decir durante la eyaculación, el espermatozoide se arrastrará del epidídimo a través del conducto deferente y se combinará con líquido seminal, secretado por la glándula de la próstata, en la uretra de la próstata antes de expelerse (Davol, 2001). El perro eyaculará el semen en tres fragmentos (Davol, 2001).

- *Primera fracción*

Es la fracción preespermática que es un volumen pequeño de fluido claro (Davol, 2001) que se elimina durante la excitación sexual inicial. Su volumen es variable aunque generalmente es de unos 0,5 ml. Puede ser eyaculada mientras el perro está empujando al intentar introducir su pene en la vagina de la perra, o puede ser expulsada tras la penetración. Procede de la próstata y su función puede ser la de lavar la vagina de restos de orina (Allen, 1992).

- *Segunda fracción*

Es eyaculada generalmente después de la penetración, cuando el macho deja de empujar (Allen, 1992), sin embargo hay quien afirma que durante la eyaculación de este segundo fragmento, el perro empujará vigorosamente (Davol, 2001). Esta porción del eyaculado es rica en espermatozoides y su volumen suele ser de 0,5 a 1 ml. (Allen, 1992; Davol, 2001). Procede de los conductos deferentes y es depositada en la mitad anterior de la vagina al completarse la erección del pene (Allen, 1992). Durante y poco después de la eyaculación de esta fracción, el perro desea instintivamente girar, e incluso intentará caminar encima del brazo de la persona que realiza la recolección si se esta realizando la recolección de semen por medio de una vagina artificial (Allen, 1992; Davol, 2001).

- *Tercera fracción:*

Procede de la próstata, suele ser expulsada mientras los perros permanecen en pie, grupa con grupa y unidos (Allen, 1992; Davol, 2001). Su volumen puede ser de 15 a 20 ml. en razas grandes y depende probablemente del tiempo que

permanecen unidos. La función de la tercera fracción del eyaculado consiste probablemente en arrastrar a la segunda fracción, rica en espermatozoides, desde la vagina craneal hacia el útero de la perra (Allen, 1992), sin embargo, no siempre es favorable el efecto de la tercera fracción sobre los espermatozoides ya que se trata de fluido prostático (Davol, 2001). Al final de la eyaculación se produce la desinflamación del pene y su retirada de la vagina (Allen, 1992).

Las características de semen en fre4sco son: volumen eyaculado: 2 a 30 ml, color: blanco opalescente, pH: 6.3-7, motilidad: mayor a 70 %, concentración; 50 - 200 x10⁶/ml, morfo anomalías: 30 % (Pàramo, 2006).

VI.- CARACTERÍSTICAS DE SEMEN CONGELADO

Mediante el agregado de diluyentes, el semen puede ser congelado y de esta manera conservado y transportado. Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas de los espermatozoides y prolongan su longevidad. Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad. Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (Stornelli et al., 2007). Sin embargo, el congelar el semen produce un aumento inmediato en el número de anomalías del cromosoma y una disminución subsecuente en la viabilidad del semen (Borges et al., 2001). Las tasas de preñez obtenidas utilizando semen congelado son de 35-45% (W. Edward, 1992). Según (Foster, 2001) la tasa de parición con este mismo semen es de 45.1% y el tamaño de camada es de 2.8+/- 1.0.

La congelación del semen debe permitir realizar posteriormente una inseminación artificial con éxito, ahora bien el esperma es un medio vivo, luego frágil y mortal y su congelación necesita de técnicas complejas, además para proteger el curso de las etapas que han de descender su temperatura en nitrógeno líquido (-196°C) y la recuperación brutal de temperatura en el momento de la descongelación es necesario la mezcla con un diluyente apropiado (Borges et al., 2001).

El diluyente para congelación es un medio, en el cual el espermatozoide está protegido de los cambios de temperatura y donde su fecundidad está preservada suficientemente a las bajas temperaturas de la conservación (Borges et al., 2001). Las propiedades ideales de un diluyente son: una isotonicidad, un poder nutritivo, un poder tampón eficaz, un poder antioxidante, una acción estabilizante, una acción protectora, una actividad antibacteriana, una buena actitud a su conservación bajo una forma fácilmente utilizable (Stornelli et al., 2007).

El porcentaje de motilidad y viabilidad espermática obtenido, con la utilización del extender CaniPRO freze A y B con las indicaciones del producto, realizado por Rairez (2013), se situó alrededor del 55-90% con un promedio de 71%, y la viabilidad en 70%, con una media de volumen espermático de 2.5 ml, cabe mencionar que no existió diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de su investigación.

Se descongela en un baño maría alrededor de 37°C, la descongelación se obtiene en 45 segundos.

Después de la descongelación conviene verificar la motilidad examinando una gota en el microscopio, en la especie canina y en el estado actual de nuestros conocimientos las muestras no suelen tener más del 50% de espermatozoides móviles después de la descongelación (Borges et al., 2001).

El porcentaje de resultados depende de la técnica de inseminación, la inseminación intravaginal permite tener gestaciones en el 55% de los casos, la inseminación intrauterina aumenta el porcentaje hasta el 70% (Stornelli et al., 2007).

VII.- OBJETIVOS

Congelar semen canino, utilizando el diluyente CaniPRO freeze A y B en relación 1:1 dependiendo del volumen de semen obtenido.

VIII.- HIPÓTESIS

La congelación de semen canino con el diluyente CaniPRO Freeze A y B mantiene la motilidad y viabilidad del mismo una vez procesado en relación de 1:1.

IX.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en la ciudad de Torreón, Coahuila, dentro de las instalaciones del Hospital de Pequeñas Especies y el laboratorio de Reproducción del C.B.R de la UAAAN UL; para determinar la motilidad existente en semen canino congelado utilizando el diluyente CaniPRO freeze A y B en relación 1:1.

El semen se recolecto manualmente, tomando en cuenta el menor número de personas para evitar estrés en el canino. Para este trabajo de investigación se ocuparon 5 machos de diferentes; edades, pesos y razas, clínicamente sanos.

En los perros se realizó un examen andrológico completo, para así saber si los machos se encontraban en óptimas condiciones para su reproducción.

Para la colección del semen, se utilizó únicamente la fracción rica en espermatozoides del eyaculado (segunda fracción).

Una vez colectado el semen se evaluó macros y microscópicamente cuidando que cumpliera con las características y los criterios mínimos para su proceso.

Material utilizado para la Toma y procesamiento de la muestra del semen:

- CaniPRO freeze A&B.
- Guantes látex
- Microscopio.
- Vaso de precipitado
- Matraz erlenmeyer
- Cámara de conteo espermático Spermacue (minitube).
- Pipetas
- Porta objetos y cubre objetos
- Tubos graduados
- Centrifuga
- Pajillas de .5 ml
- Termo de nitrógeno liquido

- Yema de huevo
- Hilera graduada
- Micropipeteador

La técnica original consiste en los siguientes pasos:

Paso 1: lavar el semen con el CaniPRO freeze – Parte A. Para esto, diluir 1 parte de semen en 3 a 5 partes de CaniPRO freeze – Parte A (es decir 1 ml de semen en 3 a 5 ml de CaniPro freeze – Parte A). Centrifugar a 800 rpm 10-15 minutos. Después de la centrifugación, desechar el sobrenadante y re-suspender el botón seminal al volumen original del eyaculado utilizando CaniPRO freeze – Parte A.

Paso 2: Lentamente agregar la parte A, utilizando 1 parte de semen por 1 parte de Freeze – Parte A (2 ml de semen, y agregar 2ml de CaniPRO freeze –Parte A). Colocar .3 ml de yema de huevo. Enfriar el semen diluido a 4° C por dos horas mínimo.

Paso 3: Después de enfriar por dos horas mínimo, agregar freeze – Parte B, que debe ser pre-enfriado a 4° C. La adición de freeze – Parte B que contiene glicerol es absolutamente requerida para el proceso de congelación. El volumen de – Parte B a agregarse debe ser la misma cantidad del volumen de semen colectado (si la fracción rica colectada fue de 2 ml, se debe agregar 2 ml de Parte B).

-Llenar las pajillas.

-Sellar pajillas

- Colocar las pajillas en el rack sobre el Nitrógeno Líquido (4 – 5 cm arriba del nivel de N2) por 20 minutos.

-Pasados los 20 minutos sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido.

-Color las pajillas en el bastón y en termo de nitrógeno líquido.

La técnica modificada de 1:1 consistió en los siguientes pasos:

- Según el volumen se semen obtenido.
- Se agrega a la muestra 1:1 ml de diluyente “A” (2 ml de semen, y agregar 2ml de CaniPRO freeze –Parte A).
- Centrifugar a 800 RPM por 5 minutos.
- Tirar sobrante.
- Agregar .3 ml de yema de huevo.
- Colocar en refrigeración 4°C, durante 2 horas.
- Agregar 1:1 ml de diluyente “B” (si la fracción rica colectada fue de 2 ml, se debe agregar 2 ml de Parte B).
- Empajillar y sellar.
- Colocar las pajillas en la parrilla., colocar la parrilla dentro de la hielera por 20 minutos.
- Pasados los 20 minutos sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido.
- Color las pajillas en el bastón y en termo de nitrógeno líquido.

Formula de dilución y concentración para la obtención de número de dosis:

$$\frac{\text{V.E (concentración)(motilidad): Número de pajillas}}{\text{Concentración deseada}}$$

Tabla 1.- Identificación del macho canino.

MACHO	RAZA	NOMBRE	EDAD
1	Basset-hound	Arrogante	4 Años
2	Pastor alemán	Bambino	8 Años
3	Basset-hound (2)	Churro	5 Años
4	Bóxer	Dante	2 Años
5	Doberman	Jim	3 Años

Tabla 2.- Pasos consecuentes a la realización de la técnica.

Macho	V.E	Entra a centrifuga	Retiro de sobranadante	V.E después de centrifugar	Canipro freeze A	Canipro freeze B	Pajillas obtenidas
1	2	SI	NO	2	2	2	11
2	2	SI	SI	1.25	1.25	1.25	4
3	4	SI	SI	1	1	1	6
4	1	NO	NO	1	1	1	5
5	3.5	SI	SI	1.5	1.5	1.5	8

V.E: Volumen espermático

Tabla3.- Comparación macroscópica y microscópica del semen obtenido en fresco.

Macho	V.E (ml)	Conc. x10⁶/ml	%M	%V
1	2	293	85	75
2	2	376	85	70
3	4	306	85	70
4	1	384	85	80
5	3.5	238	85	80
Media	2.5	319	85	75

V.E: Volumen espermático M: Motilidad V: Viabilidad

X.- RESULTADOS

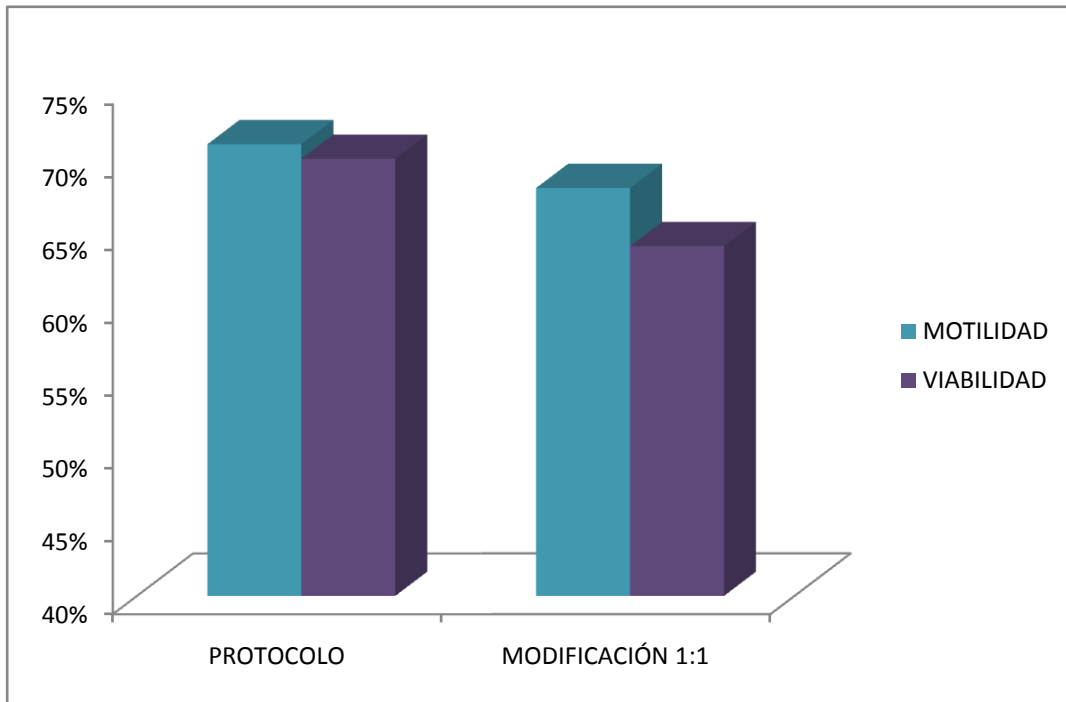
En el transcurso de 2 semanas se procedió a descongelar 1 pajillas de cada macho, la cual se selecciono al azar. Se obtuvieron pajillas con variantes por macho desde 11 a 4 pajillas. Al analizar microscópicamente la concentración existente, se obtuvo una media de $201 \times 10^6/\text{ml}$, con motilidad media de 68 % y viabilidad de 64 %, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.- Comparación microscópica del semen obtenido pos descongelado.

Macho	V.E (ml)	Conc. $\times 10^6/\text{ml}$	%M	%V	Pajillas obtenidas
1	2	237	70	70	11
2	2	274	75	70	4
3	4	290	60	60	6
4	1	155	60	55	7
5	3.5	184	75	65	9
Media	2.5	228	68	64	7

V.E: Volumen espermático M: Motilidad V: Viabilidad

Después de comparar los resultados obtenidos en este estudio, con los datos citados en el trabajo realizado por Rairez, (20013) en la cual la media de Volumen espermático al igual que este trabajo fue de 2.5 ml. Mismo que nos sirve para comprobar en la gráfica 2, que la diferencia entre ambos para motilidad es de 3 % y para viabilidad es de 6 %. Es decir la motilidad y viabilidad se mantuvo en un rango óptimo comparada con otros experimentos, a pesar de modificar la técnica recomendada por el protocolo.



Grafica2.- Comparación de conservación de % de motilidad y viabilidad con la receta actual (Carlos R 2012) y la modificación 1:1

Al realizar la técnica como se indica el kit de CaniPro freeze A y B en relación 1:4 con la parte- A, y tomando la media de 2.5 de volumen espermático se puede criopreservar a solo 2 muestras de macho canino, ya que el kit solo trae 20 ml, de los cuales se necesitan 10 ml por animal, que se muestre en la tabla 5. En cambio con la modificación 1:1 podemos criopreservar 4 muestras, ya que solo se necesita agregar la misma cantidad de semen recolectado, que es lo que nos indica la tabla 6.

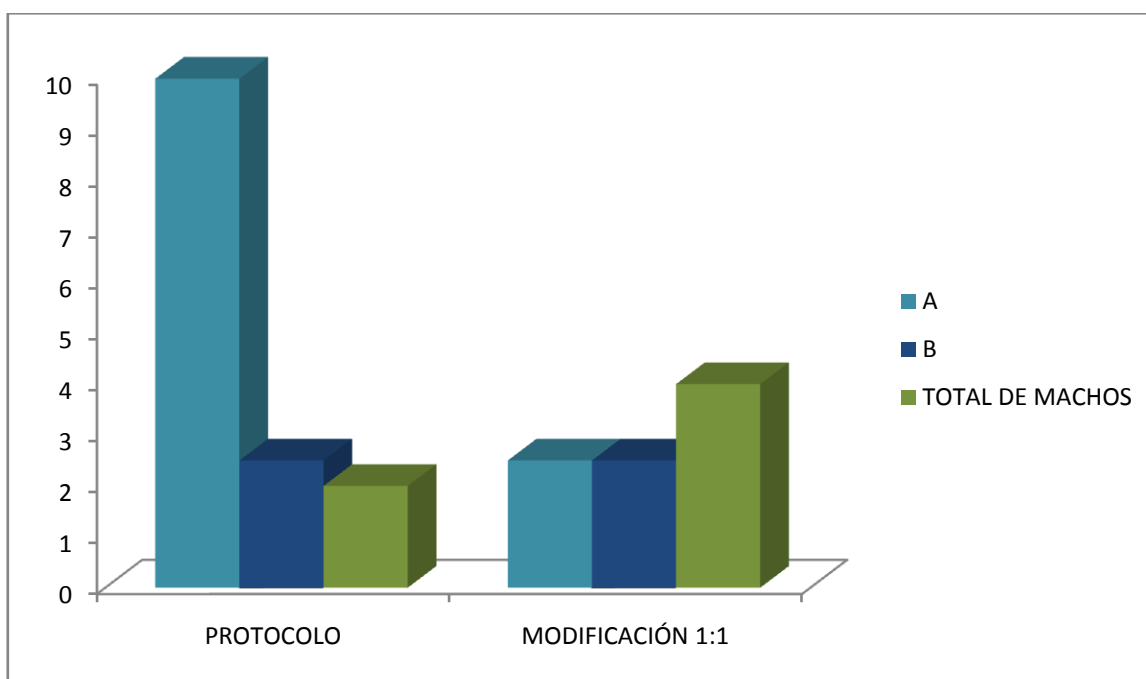
Tabla5.- Cantidad de machos a criopreservar con el total de kit de congelación tomando en cuenta la media de V.E con la técnica actual de CaniPRO freeze A y B

Total de kit CaniPRO freeze en ml		A en relación 1:4	B	Total de machos a criopreservar
A	B			
20	10	10 ml	2.5 ml	2

Tabla 6.- Cantidad de machos a criopreservar con el total de kit de congelación tomando en cuenta la media de V.E ml con técnica actual de CaniPRO freeze A y B relación 1:1

Total de kit CaniPRO freeze en ml		A en relación 1:1	B en relación 1:1	Total de machos a criopreservar
A	B			
20	10	2.5 ml	2.5 ml	4

Se muestra en la grafica 3, que la utilización de diluyente A es mucho mayor con el protocolo, en comparación a la modificación 1:1. Por este motivo es mucho mayor el costo con la técnica indicada en el protocolo y con menor número de animales a criopreservar.



Grafica 3.- Total de machos a criopreservar en comparación a la receta actual y a la modificación en relación 1:1

XI.- DISCUSIÓN

Este trabajo experimental muestra que los resultados obtenidos después de descongelar y conservar semen canino con el kit de CaniPRO freeze en relación 1:1, demuestran claramente que existen variaciones no significativas en la calidad seminal post-descongelación a los resultados obtenidos en por otros autores.

La motilidad de CaniPRO freeze en relación 1:1 oscilaba entre un 60-75 % durante el periodo experimental, siendo nuestros resultados comparables a los resultados obtenidos en otros trabajos que utilizan otras técnicas para congelar y conservar semen canino en las cuales en el transcurso de años este parámetro no es inalterable durante la congelación, pero no por ello falta aun corroborar que esta técnica continúe con el parámetro seminal durante la congelación en meses.

La motilidad es el parámetro más frecuente mente determinado para la evaluación de la calidad del seminal de semen canino congelado. Además otros estudios muestran una correlación positiva entre el porcentaje de motilidad y morfo anomalías. Se puede afirmar que la motilidad podría ser un buen indicador de la calidad seminal post-descongelación, y por tanto, ser un parámetro básico para determinar la capacidad fértil del semen canino tras la congelación.

Con respecto a la viabilidad espermática, en la congelación, los valores medios de espermatozoides vivos eran prácticamente similares a los de otros autores como Rairez, 2012. En la mayoría de los estudios, tras la congelación, el porcentaje de viabilidad de semen canino era de 75%. Estos resultados indican que la viabilidad individual tiene menos influencia sobre el porcentaje de viabilidad pos-congelación que el porcentaje de de motilidad.

XII.- CONCLUSIÓN

Cada especialista en reproducción ha desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal utilizando diferentes tipo de diluyentes. Por otro lado los perros muestran una variabilidad en la cantidad seminal pos congelación. Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad, tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado

Dado a que la motilidad se mantuvo en un rango optimo comparada con otros experimentos, a pesar de modificar la técnica recomendada por el protocolo.

Utilizando la dilución 1:1 también obtuvimos un mayor número de pajillas por kit comercial con un aproximado de 60 pajillas con una concentración cada una de 200 millones de células espermáticas, y con un volumen aproximado 2.5 ml.

XIII.- LITERATURA CITADA

ALLEN, E. 1992 Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.

BORGES N. S., Brown, R. 2001 An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Probl vet med.* 4(3):p. 445-52.

CUNNINGHAM S. 1993. *Veterinary Endocrinology and reproduction.* 2nd Ed. Leaend Febiger.

DAVOL, P. A. 2000. *Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the male dog.* <http://www.labbies.com/reproduction4.htm>. (consulta: 13 de Marzo 2013).

ESQUIVEL, L. C. 2002 *Reproducción en pequeñas especies. Memoria de la XII de ciencia animal: 28 de Octubre-2 de noviembre; Torreón Coahuila. México.* Formato electrónico

EDWARD C, Feldman, Richard w, Nelson; 2000; *Endocrinología y reproducción en perros y gatos; segunda edición, editorial McGraw- Hill interamericana.*

ENGLAND GCW. 1990 Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 193, 47: 243-255

FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53 (1): p.86-175.

FOSBERG CL. 2004 Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 196, 10 (1): 48-58

HAMMERSTEDT RH. 2002 Grahah JK, Nolan, JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 190, 11 :73-88

HUTCHISON, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster kennel club show. <http://www.amchessieclub.org/conception.html>

NOTHLING. 2006 JO, Volkman DH. Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. J. Reprod. Fertil. p. 325-327.

PEÑA M. 2003 AI. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis Doctoral.

RUCKEBUSCH, Y., L. P. Phaneuf y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. México, D.F. El manual Moderno, S.A. de C.V. P.609-16.

SEAGER, SWJ. 1969. Successful pregnancies using frozen semen in dog. A.I. Digest.

SISSON, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5 Ed. Tomo II, México: Salvat.P. 1728-41.

STORNELLI, M. A., Y L. Sota. 2007. Inseminación artificial con semen fresco. Refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. ANALECTA VETERINARIA, 21,1: p.1728-41.