

01674

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“Evaluación acrosomal del espermatozoide canino  
con microscopia antes y después de la congelación”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**JUAN GABRIEL CADENA LÓPEZ**

**TUTOR**

**MVZ, MPA Carlos Esquivel Lacroix**

**COMITÉ TUTORAL**

**PhD. Rosa María Páramo Ramírez**

**Dra. Ana María Rosales Torres**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Entrego a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Juan Gabriel Cadena López  
FECHA: 18. Junio. 2004  
FIRMA: [Firma]

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS ASESORES:**

**MVZ, MPA Carlos Esquivel Lacroix.**  
**Dra. Rosa María Páramo.**  
**Dra. Ana María Rosales Torres.**

Por su guía y apoyo para poder realizar este trabajo.

### **A MIS SINODALES**

**M en C Juan Arturo Rivera Rebolledo.**  
**Dra. Ma de Lourdes Juarez Mosqueda.**

Por su tiempo, conocimientos y valiosa asesoría en la revisión de este trabajo.

**Al Dr. Marco A. González,** por su asesoría y conocimientos brindados para la realización de este trabajo, y por su valioso apoyo en las técnicas de Laboratorio, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

**Al Dr. Luis Felipe Jiménez,** por su valioso apoyo y tiempo ofrecido con el microscopio de fluorescencia en el Laboratorio de microscopia confocal en el Instituto de Ciencias de la UNAM.

También quiero dar las gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Leptospira de la UAM – Xochimilco:

**MenS Nora Rojas,** por tú amistad, asesoría profesional y todo el tiempo brindado para la elaboración de esta tesis. Muy en especial te agradezco tú apoyo y confianza incondicional en los momentos críticos de este proyecto.

**Dra. Dolores Gaváldon,** por su asesoría y sobre todo por sus conocimientos y apoyo ofrecidos. Muy en especial le agradezco su confianza y amistad que me ha brindado.

**Dr. Luis Pedro Moles** por su tiempo y sobre todo por su paciencia y comprensión en los momentos difíciles de esta tesis y la gran amistad otorgada hacia mi persona.

**pQFB Patricia Meléndez,** por tú amistad y apoyo brindado en el Laboratorio.

## DEDICATORIA

### A MIS PADRES:

*Gustavo Cadena Camacho †*  
*Aída López Barajas †*

Gracias por todo tu amor, cariño y consejos mi adorable “madre” por toda la eternidad te amare.

### A MIS HERMANOS:

*Jorge, Jaime y Maribel:* Gracias por su amistad, confianza, consejos y apoyo para la realización de mis estudios de maestría. Solo quiero que sepan que son mi gran tesoro y que los amo mucho.

### A MI SOBRINA:

*Jocelyn:* Gracias por ser una niña muy linda llena de amor. Te quiero muchototote.

### A MI GRAN AMIGA Y NOVIA:

*Martha.* Solo quiero decirte que eres lo más bonito que me ha pasado en esta vida. Muchísimas gracias por todo el apoyo, paciencia y amor que me has brindado en los momentos difíciles de este proyecto. Te amo.

### A MI AMIGO:

*Miguel Ángel Cisneros Puebla. †* Gracias por todo. Solo quiero que sepas que un amigo como tú nunca se olvida. Te extraño mucho “Miguelon”.

## Resumen

Para este trabajo se seleccionaron 15 perros de 2 a 4 años, de un total de 63 que cumplieron con el criterio de inclusión en la evaluación del eyaculado, un mínimo de 75% de motilidad individual progresiva y un 95% de integridad acrosomal. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la pasta Orvus como protector de la membrana plasmática y acrosomal externa del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación. La integridad acrosomal, fue evaluada utilizando un marcador de membrana; Lectina *Pisum Sativum*, conjugada con isothiosinato de fluoroceina (FITC) para observar los espermatozoides en el microscopio de fluorescencia. Los eyaculados se dividieron en dos y cada porción fue diluida con el diluyente específico, el diluyente A, contenía Tris – Fructosa - Ácido cítrico - Yema de huevo – Glicerol y Estreptomina - Bencilpenicilina, y el diluyente B, los mismos ingredientes que el anterior, pero además pasta Orvus como crioprotector de la membrana acrosomal, la dilución fue 1:1 en ambos casos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) al comparar la motilidad individual progresiva de las dos diluciones antes del proceso de congelación. La integridad plasmática y acrosomal si fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el diluyente A diluido frío y descongelado; lo cual no sucedió en el diluyente B, diluido frío y descongelado no se observó diferencia significativa ( $p < 0.01$ ), en la integridad acrosomal. Con el diluyente B, si hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con pasta Orvus en comparación con el diluyente A, ya que los espermatozoides tuvieron mayor daño sobre la superficie de la membrana plasmática y acrosomal. Y que el uso de tinciones de superficie membranal como Lectinas *Pisum Sativum* FITC es una herramienta en el diagnóstico de integridad acrosomal en los mamíferos. Y que a pesar, de los buenos resultados obtenidos no se han alcanzado las condiciones ideales para que los espermatozoides estén íntegros al descongelado.

## Summary

For this work 15 dogs out of 63 between 2 to 4 years old complied with the criteria in terms of semen quality, a minimum of 75 % of progressive individual motility and 95% of acrosomal integrity. The objective of the study was to evaluate the effect of the Orvus paste like protector of the plasmatic membrane of the sperm during the process of freezing and defrosting. Acrosomal integrity, was evaluated using a membrane marker; Lectina Pisum Sativum, conjugated with isothiosinato of fluoroceina (FITC) to observe the sperm in the confocal microscope. The semen ejaculated was divided in two portions and each portion was diluted with the specific extender, the extender A, contained Tris Fruitful, Citric Acid, Egg Yolk, Glicerol and Estreptomycin – Bencilpenicilina. In the extender B was given additional Orvus paste like crioprotector to the plasmatic membrane. The dilution was 1:1 in both cases. There was not a statistically significant difference ( $p>0.01$ ) when comparing progressive individual motility of the two dilutions before the freezing process. Plasmatic integrity were statistically different ( $p<0.05$ ) in the diluted cold and defrosted extender To which did not happen in the extender B, diluted cold and defrosted. There was not a significant difference ( $p>0.01$ ), in acrosomal integrity. With the extender B, there was a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) with the extender with Orvus paste in comparison with the extender without, meaning that sperm had greater damage on the surface of the acrosomal membrane when it is frozen without any type of cryoprotector. Finally the use of specific stain for membranal surface as Lectinas Pisum Sativum FITC is a good tool in the diagnosis of acrosomal integrity in the mammals. Also conclusive is that of Orvus paste in the extender is necessary, to avoid acrosomal damage of canine sperm during the freezing process.

## INDICE

	Paginas
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor Canino</b>	
Testículo	6
Túbulos Seminíferos	7
Lamina Propia o Pared Externa del Túbulo	8
Epitelio Seminífero	8
Epiteliocitos Sustentaculares	9
Endocrinocitos Intersticiales	10
Espermatocitos	10
Espermatides	12
Células Intersticiales y Tejido Conectivo	14
Barrera Hemato – testicular	14
Conductos Excretores del Testículo	14
Rete Testis	15
Conductos Eferentes	15
Epidídimo	15
Conductos Deferentes	16
Uretra	16
Próstata	17
Pene	17
Prepucio	18
Erección	18
Eyaculación	18
<b>3. Anatomía y Fisiología del Espermatozoide Canino</b>	
Espermatozoide	21
Trasporte de los espermatozoides en el Aparato Reproductor de la Hembra	25
Sobrevivencia de los Espermatozoides	27
Modificaciones de la Membrana Plasmática del Espermatozoides	27
Dominios de Superficie de Membrana	29
Proteínas de la membrana plasmática	30
Daños a la Membrana Plasmática durante el Proceso de Congelación	32
<b>4. Evaluación del Semen Canino</b>	
Métodos de Colección de Semen	34
Evaluación del semen	35
<b>5. Diluyentes del Semen Canino</b>	
Características de un diluyente	38

	Paginas
<b>6. Crioconservación del Semen Canino</b>	41
<b>7. Crioprotectores de la Membrana Plasmática del Espermatozoide</b>	43
<b>8. Marcador de Membrana</b>	45
<b>9.-Planteamiento del Problema</b>	47
<b>10. Objetivo General</b>	47
<b>11. Objetivos Específicos</b>	47
<b>12. Material y Métodos</b>	
Selección de los Animales	48
• Colección de semen	49
• Evaluación Macroscópica	49
• Evaluación Microscópica	50
• Diluyentes	51
• Método de Congelación	52
• Evaluación post-descogelado	47
• Marcador de Membrana	53
• Microscopia	54
• Análisis estadístico	57
<b>13. Resultados</b>	58
<b>14. Discusión</b>	61
<b>15. Conclusiones</b>	66
<b>16. Literatura Citada</b>	68
<b>17. Anexos</b>	74

## INDICE DE CUADROS

	Paginas
<b>Cuadro 1</b> Enzimas de origen acrosomal	22
<b>Cuadro 2</b> Ingredientes utilizados en la congelación de semen canino	40
<b>Cuadro 3</b> Ingredientes y cantidades de los diluyentes A y B en la crioconservación de semen canino	52
<b>Cuadro 4</b> Raza, edad y color del eyaculado de los perros	74
<b>Cuadro 5</b> Volumen del eyaculado y concentración	75
<b>Cuadro 6</b> Porcentaje de motilidad progresiva primer muestreo	76
<b>Cuadro 7</b> Porcentaje de motilidad progresiva segundo muestreo	77
<b>Cuadro 8</b> Porcentaje de vivos y muertos en el primer eyaculado	78
<b>Cuadro 9</b> Porcentaje de vivos y muertos en el segundo eyaculado	79
<b>Cuadro 10</b> Porcentaje de acrosomas normales con Lectina FITC en el primer eyaculado	80
<b>Cuadro 11</b> Porcentaje de acrosomas normales con Lectina FITC en el segundo eyaculado	81

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Diagrama de la espermiogénesis	13
<b>Figura 2</b> Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide	31
<b>Figura 3</b> Evaluación morfológica del espermatozoide de perro	55
<b>Figura 4</b> Evaluación de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide de perro	56
<b>Figura 5</b> Diagrama de flujo de congelación y descongelación del semen canino	57
<b>Figura 6</b> Volumen del eyaculado por macho	82
<b>Figura 7</b> Concentración espermática por macho	83
<b>Figura 8</b> Porcentaje de Motilidad progresiva en el primer Eyaculado	84
<b>Figura 9</b> Porcentaje de Motilidad progresiva en el segundo Eyaculado	85
<b>Figura 10</b> Motilidad progresiva en fresco en el primero y segundo eyaculado	86
<b>Figura 11</b> Primer eyaculado: Porcentaje de espermatozoides vivos	87
<b>Figura 12</b> Segundo eyaculado: Porcentaje de espermatozoides vivos	88
<b>Figura 13</b> Porcentaje de espermatozoides vivos en semen fresco en el primer y segundo eyaculado	89

## 1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han mostrado que el semen canino es muy susceptible de sufrir daños estructurales durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Los daños más comunes durante este proceso son la ruptura de la membrana plasmática; de las membranas acrosomales la cual produce la liberación de enzimas y daño al núcleo (Dobrinsky *et al.* 1993; Tsutsui *et al.* 2000a y 2000b). Es por ello, que los estudios de semen canino en fresco o diluido buscan cumplir con las mejores condiciones para su conservación (England 1993, England and Plumer 1993, Dobrinsky *et al.* 1993, Ivanova-Kicheva *et al.* 1997, Tsutsui *et al.* 2000a,b,c), pretendiendo siempre conservar la integridad estructural de la membrana plasmática y del acrosoma. Este último contiene grandes cantidades de hialuronidasa y de enzimas proteolíticas, que son fundamentales para abrir el paso a los espermatozoides entre las células de la granulosa de manera que puedan alcanzar al óvulo y fecundarlo (Guyton y Hall 1997).

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada cuya función principal es el transporte del genoma nuclear hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está formado de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas; el acrosoma con la membrana acrosomal externa e interna, el cual se encuentra rodeando tres cuartas partes del núcleo; organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial y el flagelo), las que garantizan la interacción particular con el aparato reproductor de la hembra y el ovocito. La viabilidad celular espermática decrece substancialmente rápido después de la eyaculación.

El propósito de la crioconservación, es garantizar la sobrevivencia del espermatozoide; sin embargo, este ocasiona daños irreversibles a la membrana plasmática, aumentando su permeabilidad y causando la muerte celular o cambios parecidos a los que se ven durante la reacción acrosomal, lo que dificulta su

capacidad para interactuar con el ovocito durante la fertilización (Parks and Graham 1992, Oettle 1993).

La integridad de la membrana plasmática ha sido uno de los parámetros más estudiados, como límite celular (morfológica) y por su importancia y responsabilidad de hacer efectivas las interacciones entre espermatozoide – ovocito (funcional) (Alberts *et al.* 1994, Scott 1997). En la evaluación morfológica, se ha utilizado microscopía óptica (microscopio de contraste de fases), microscopía electrónica (transmisión o de barrido) y algunas tinciones como el verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina, azul tripán/Giemsa, el amarillo de naftol/eritrosina o la triple tinción (Tesarik *et al.* 1993, Rota *et al.* 1997, 1998, Sirivaidyapong 2000,). Estas evaluaciones estructurales han sido valiosas para determinar aspectos de integridad de superficie espermática. Además, aún cuando algunas técnicas morfológicas proveen información sobre detalles de los daños a la membrana plasmática, estos resultados no siempre están correlacionados con la fertilidad (Therein *et al.* 1998). La valoración morfológica microscópica de los espermatozoides proporciona información valiosa de la calidad de un eyaculado, aunque se ha observado que la presencia o ausencia de la membrana plasmática no está correlacionada con la motilidad del espermatozoide (Visconti *et al.* 1999).

Un gran avance en la evaluación estructural de los espermatozoides de toro crioconservados ha sido el desarrollo de marcadores fluorescentes para el ADN, enzimas intracitoplasmáticas y las lectinas como marcadores potenciales de membrana. En particular, el uso de fluoróforos simples o en combinación (6 diacetato carboxifluoreceína y yoduro de propidio C-FDA/PI), han mostrado ser de alto valor para determinar la integridad de los distintos compartimientos subcelulares (función mitocondrial, marcadores de ADN). Los fluoróforos han sido usados en conexión con microscopía de fluorescencia (Rota *et al.* 1998, Therein *et al.* 1998).

La integridad del acrosoma post-descongelado se determina morfológicamente, utilizando la microscopía óptica en muestras teñidas con triple tinción o tinción comercial de Spermac; la integridad del acrosoma correlaciona con la fertilidad del semen congelado (Rota *et al.* 1998, Tsutsui *et al.* 2000a y 2000b).

La frecuencia de espermatozoides crioconservados con membrana plasmática intacta puede ser fácilmente determinada usando una técnica sencilla y práctica pero laboriosa que utiliza lectinas, las cuales se adhieren a las glicoproteínas de la superficie de la membrana plasmática dando como resultado fluorescencia que permite observar la permeabilidad de las membranas o cuando hay reacción acrosomal (Sharon 1997, Wolfe 1998, Sirivaidyapong *et al.* 2000).

Uno de los factores que ha sido involucrado en la baja de viabilidad celular es el incremento de la concentración de electrolitos intracelulares, el cual se produce durante el descenso de temperatura (enfriamiento) del semen. Este aumento en la osmolaridad intracelular conlleva a la entrada de agua y a la formación intracelular de cristales de hielo. Estos últimos posiblemente estén lesionando la membrana plasmática, membranas acrosomales y al núcleo (England and Plumer 1993, Dobrinsky *et al.* 1993, Tsutsui *et al.* 2000a y 2000b).

La capacidad fertilizante del espermatozoide depende entre otras cosas, de la integridad del acrosoma, por ello una de las metas es la de mantener la integridad de la célula espermática. Para ello en los últimos años se han venido estudiado las características de los ingredientes de los diluyentes con la finalidad de mantener la estabilidad e integridad de la membrana plasmática y acrosomal. En el caso del semen de perro los estudios sobre los diluyentes se han encaminado a que estos logren conservar la osmolaridad y con esto obtener una mayor estabilidad estructural del espermatozoide. (Prasand and Mathai 1996).

De manera general para controlar la osmolaridad del diluyente se ha recurrido al empleo de carbohidratos, como la fructuosa y glucosa; para evitar un choque térmico se ha añade la yema de huevo y el glicero; otros ingredientes como citrato – tris, citrato de sodio, fosfatos, bicarbonatos, ácido cítrico evitan los cambios bruscos de pH; también se ha recurrido a la adición de antibióticos, con la finalidad de evitar el crecimiento de bacterias oportunistas, obteniendose buenos resultados con las penicilinas y la estreptomicina. (England 1993, England and Plumer 1993, Linde-Forsberg 2001).

Por otra parte, England (1999) reporta que para lograr mejores resultados en la congelación de semen canino es conveniente fraccionar y centrifugar a 600 - 800g el eyaculado. La pasta Orvus que se emplea en la congelación del semen incorpora azúcares y ayuda a mantener la osmolaridad y estabilidad estructural de la membrana plasmática del espermatozoide (Rota *et al.* 1997, Tsutsui *et al.* 2000a,b,c).

Adicionalmente, con el fin de incrementar la viabilidad espermática algunos investigadores han modificado algún o algunos de los pasos del proceso de congelación y descongelación del semen canino, así como la concentración de algún ingrediente. Estos estudios se basan solo en la motilidad espermática posdescongelado reportando que a mayor número de espermatozoides vivos hay mayor número de acrosomas íntegros (Rota *et al.* 1995, Prasand and Mathai 1996, Rota *et al.* 1997, Tsutsui *et al.* 2000a,b,c).

En la membrana de los espermatozoides existen oligosacaridos, glucoproteínas y radicales que han sido estudiados mediante la capacidad de unirse a proteínas de origen vegetal (lectinas); también poseen proteínas transportadoras en su membrana plasmática que le permiten captar hacia el interior de la célula, compuestos energéticos, como son la glucosa y la fructosa.

El presente estudio tuvo como objetivo mantener la osmolaridad del espermatozoide de perro y evitar así el daño de la membrana plasmática y acrosomal que se puede dar durante el proceso de congelamiento y descongelamiento, para ello se empleo pasta Orvus como crioprotector de la membrana plasmática del espermatozoide. Para la valoración microscópica de la membrana acrosomal existe información indica la posibilidad de utilizar como marcador de membrana la Lectina Pisum Sativum conjugada con isotiosianato de fluoresceína FITC, como en el espermatozoide humano (Guzmán y González 2004).

## **MARCO TEÓRICO**

### **2. Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor Canino**

Las gónadas masculinas, los testículos, están situados por fuera del abdomen dentro del escroto que es una estructura sacular derivada de la piel y de la fascia de la pared abdominal. Cada testículo descansa dentro de una vaina o extensión separada del peritoneo que pasa a través de la pared abdominal en el conducto inguinal (Hafez 1997, Stornelli *et al.* 1999).

Los espermatozoides salen del testículo por los ductos eferentes que conducen al conducto contorneado del epidídimo que se continúa en el conducto deferente. Las glándulas accesorias descargan su contenido dentro del conducto deferente (Hafez 1997, McDonald y Pineda 1989).

#### **Testículo**

Es una glándula tubular compuesta de secreción anfícina, es decir, presenta una sección endocrina y otra exocrina. Este se ubica fuera de la cavidad abdominal y se compone de los túbulos seminíferos, el tejido intersticial y la cápsula testicular o Túnica albugínea. Los testículos en su descenso desde la región lumbar arrastran los elementos de la pared abdominal que forman las capas escrotales que los recubren (Frandsen and Spurgeon 1998, Kretser *et al.* 1998).

Estas capas son de afuera hacia adentro:

- a) El escroto o piel.
- b) El dartos o capa de fibras musculares lisas, bajo la piel.
- c) La capa o fascia fibrocolagena, formada por tejido conjuntivo laxo.

d) La túnica vaginal parietal, revestida internamente por células mesoteliales planas.

e) La túnica vaginal visceral (túnica albugínea o cápsula testicular).

f) La túnica vascular que contiene los vasos sanguíneos.

Los testículos quedan suspendidos en las bolsas escrotales por los cordones espermáticos, que contienen a los ductos deferentes, la irrigación arterial, el drenaje venoso y linfático y las fibras del músculo cremaster. La irrigación e inervación del testículo llega a través del cordón espermático. En éste hay tres arterias: 1) la espermática, rama de la aorta que se divide en las epididimarias anterior y posterior; 2) la deferente, rama de la vesical inferior, y 3) La funicular, rama de la epigástrica.

Los testículos tienen dos funciones principales: la espermatogénesis, o producción de espermatozoides y la síntesis de las hormonas esteroideas sexuales. Ambas funciones son reguladas por el hipotálamo y la hipófisis; que a su vez son moduladas por la función testicular.

### Túbulos Seminíferos

Son alrededor de 250 o más y por el volumen que ocupan constituyen el componente testicular principal. Estos se hallan encerrados en lóbulos, individualmente o por grupos de cuatro. Un túbulo seminífero es una asa cerrada que se pliega sobre si mismo y cuyos dos extremos desembocan en la *rete testis*. Su histología está dada por el epitelio germinal, las células de sostén y la lamina propia. Las células de sostén son de un solo tipo, las células de Sertoli (epiteliocitos sustentaculares), mientras que el epitelio germinal incluyen varios tipos distinguibles morfológicamente: espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátides y espermatozoides (Carlson 1990,

Chavarria *et al.* 1994, Hafez 1997, Kretser *et al.* 1998, Weinbauer and Wesselg 1999).

#### Lámina Propia o Pared Externa del Túbulo.

Los túbulos seminíferos están rodeados por dos capas acelulares y dos capas celulares; estas últimas están situadas sobre una membrana basal que descansa sobre una capa de fibras de colágenas que contienen fibroblastos y otras células fusiformes que tienen similitudes con las fibras musculares lisas, pero por su forma atípica y su organización epiteloide reciben el nombre de células mioides o células contráctiles peritubulares. Se cree que las células mioides se encargan de los movimientos pendulares y peristálticos del túbulo que podrían participar en la progresión de los espermatozoides, sin embargo su principal función es servir como un filtro selectivo ya sea facilitando la entrada de algunas sustancias, impidiendo el acceso de otras o permitiendo su paso, de otras pero de forma más lenta; además son selectivas para algunas hormonas y participan de modo activo en la producción de líquido seminífero (Carlson 1994, Hafez 1997, Scott 1997).

#### Epitelio Seminífero

Los túbulos seminíferos están revestidos por un complejo epitelio estratificado formado por las células espermatogénicas en diferentes fases de diferenciación. El término espermatogénesis se refiere a el proceso de desarrollo y maduración de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos para que se produzcan los espermatozoides. Por conveniencia descriptiva, la espermatogénesis suele dividirse en tres fases principales: espermacitogénesis, meiosis y espermiogénesis. En el proceso de espermacitogénesis, las espermatogonias indiferenciadas, o células madres, se dividen por mitosis, para producir no sólo más espermatogonias sino también células que se diferencian dando origen a espermatoцитos primarios. (Kretser *et al.* 1998, Weinbauer y Wesselg 1999).

Durante la meiosis los espermatocitos sufren dos divisiones que reducen a un solo juego el número de cromosomas de cada especie y producen un grupo de espermatides con el contenido de material genético haploide. Posteriormente la espermiogénesis, las espermatidas sufren una serie notable de transformaciones citológicas que los convierten en espermatozoides (Hafez 1997, Frandson and Spurgeon 1998).

#### Epiteliocitos Sustentaculares (Células de Sertoli)

Son células columnares altas que se apoyan sobre la lámina basal y se extienden hasta la luz del túbulo seminífero. Su núcleo es oval, con pliegues profundos y presenta un nucléolo muy desarrollado. El contorno de las células de Sertoli es irregular, con muchas extensiones citoplásmicas que contactan con las células de Sertoli adyacentes, formando un entramado de citoplasma. Este entramado engloba las células en desarrollo del epitelio germinativo y forma uniones estrechas, que dividen el revestimiento del túbulo seminífero en los compartimentos basal y luminal. Las células de Sertoli son polifuncionales, con funciones de sostén, fagocitosis y secreción. Durante el desarrollo embrionario secretan la sustancia inhibidora de Muller (MIF por sus siglas en ingles). En los testículos sexualmente maduros secretan la proteína fijadora de andrógenos (ABP), a la que se unen la testosterona y la hidroxitestosterona, las cuales son necesarias en el túbulo seminífero para que se produzca una maduración normal de las células germinales. Esta célula también es productora de inhibina, la cual frena la secreción de FSH por parte del hipófisis con escaso o nulo efecto sobre la LH, además son consideradas como las mayores productores de lactato y piruvato, que son utilizados como fuente de energía del epitelio seminífero. (Hafez 1997, Karp 1997, Kretser 1998).

## Endocrinocitos Intersticiales (Células de Leydig)

Las células de Leydig sintetizan testosterona. La mayoría son grandes, poligonales, epitelioides y por lo general agrupadas; se destacan por su núcleo redondo, excéntrico con un nucléolo prominente, una membrana nuclear bien definida por la cromatina que tiene adosada. El citoplasma es eosinófilo, contiene vacuolas lipídicas y un retículo endoplásmico granular abundante y es rico en enzimas. (Karp 1997, Kretser 1998).

## Espermagotogonias

Son células situadas en la periferia de los túbulos seminíferos y aumentan su número por mitosis. Estas pueden ser divididas en tres grupos, aunque de manera general presentan un citoplasma claro debido a la escasez de organelos:

1. Espermátogonia A oscura: son las menos abundantes y se cree que son la célula madre del sistema. Su núcleo es oscuro ovoide, con una zona central más pálida y con uno o dos nucléolos ubicados en la periferia. Estas están en contacto con la membrana basal.
2. Espermátogonia A pálida: su núcleo es claro a causa de la cromatina teñida débilmente, con granulaciones y con uno o dos nucléolos visibles y adheridos a la membrana nuclear.
3. Espermátogonia B: en su núcleo la cromatina se acumula en forma de grumos contra el borde nuclear y contiene un nucléolo situado centralmente y a menudo con gránulos de cromatina asociados con él. (Carlson 1994, Hafez 1997, Kretser *et al.* 1998, Weinbauer y Wesselg 1999).

## Espermatocitos

Son producidos por las espermatogonias tipo B, las cuales son células diploides, mientras que los gametos, que contienen sólo un cromosoma de cada pareja, se llama haploide. La reducción de número de cromosomas de los gametos a la

mitad del número somático es para mantener el número constante de cromosomas de cada especie. Los espermatoцитos inician la meiosis y se clasifican en espermatoцитos primarios y secundarios. Estos últimos rara vez son visibles dada su corta vida.

Los espermatoцитos primarios al entrar en la profase de la primera división meiotica se clasifican en:

*Preleptoteno*: tienen una cromatina granulosa, bien coloreada y se confunde con la espermatogonia B, pero a medida que se separan de la lámina basal del epitelio germinal, van acumulando más citoplasma y se hacen claramente mayores.

*Leptoteno*: se observan filamentos en el núcleo (los cromosomas se hacen visibles y se preparan para la división), agrupados en un sector del núcleo como un ovillo deshilachado.

*Cigoteno*: los cromosomas homólogos que se han duplicado durante la interfase precedente, sufren un emparejamiento íntimo por medio de la formación del complejo sinaptonémico.

*Paquiteno*: los cromosomas homólogos están completamente emparejados con lo que se forman cordones cromosómicos más gruesos. Cada elemento paquiténico esta formado por cuatro cromátides. En esta fase tiene lugar la recombinación genética.

*Diploteno*: los cromosomas son más gruesos y cortos. Desaparece el complejo sinaptonemico.

Los espermatoцитos secundarios formados de cada espermatoцитo primario se dividen nuevamente por meiosis y forma cuatro espermátides que tienen ya una dotación haploide de cromosomas. (Hafez 1997, Carlson 1990, Remoni *et al.* 1992, Kretser *et al.* 1998, Weinbauer y Wesselg 1999).

## Espermatides

Son células haploides, que experimentan una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos (espermiogénesis), que les permiten alcanzar las características tan peculiares de un espermatozoide. Esta metamorfosis va desde una célula no móvil, hasta una célula potencialmente móvil al desarrollar un flagelo (Carlson 1990, Hafez 1997). De las cuatro células espermáticas que se desarrollan a partir de cada espermatocito primario dos contienen el cromosoma Y que producen descendencia masculina, y dos contienen el cromosoma X, que producen descendencia femenina, cuando se unen con el óvulo ver figura 1. (Hafez 1997).

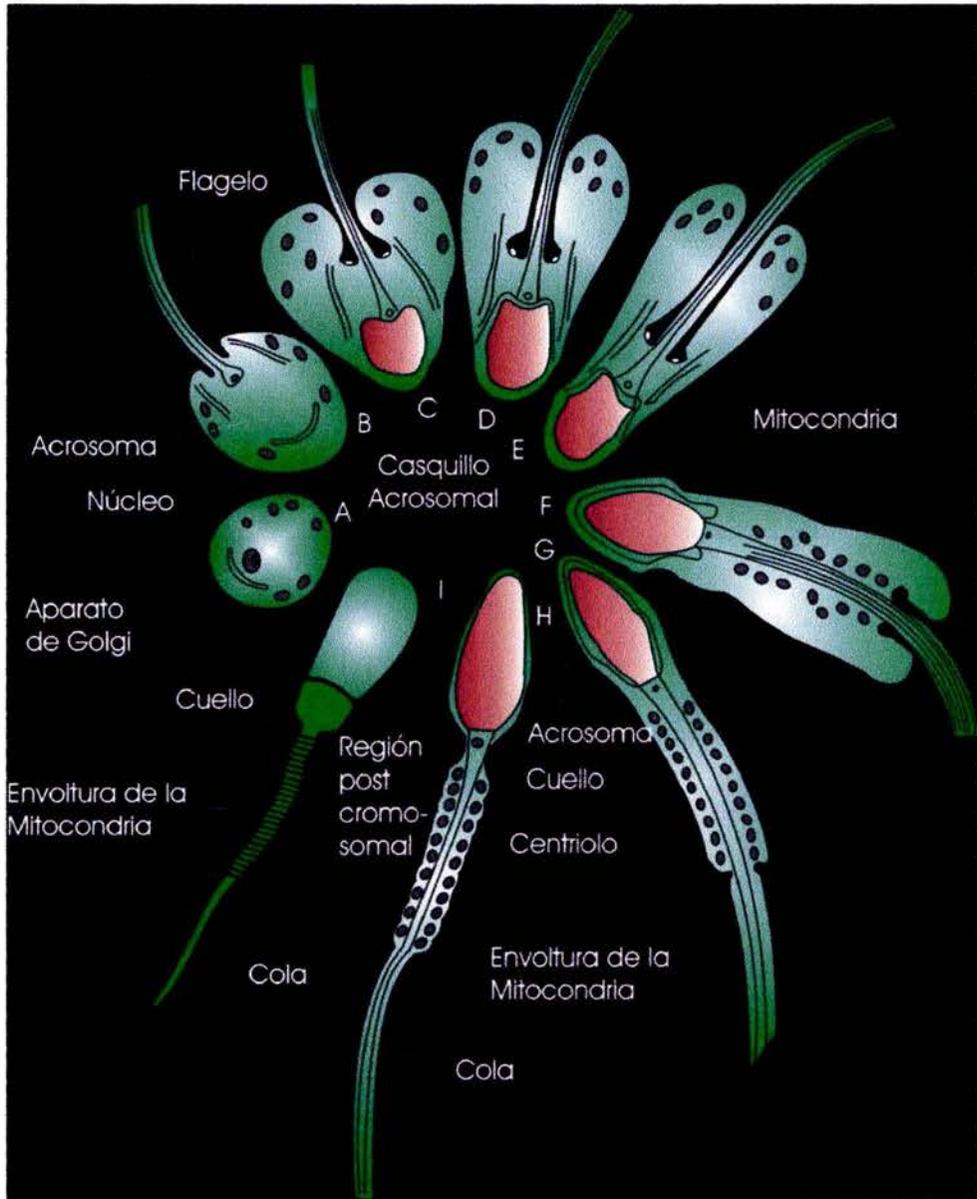


Figura 1. Diagrama de la Espermiogénesis.

## Células Intersticiales y Tejido Conectivo

Tejido localizado entre los espacios dejados por los túbulos seminíferos. El tejido conectivo sirve de sostén, es de tipo laxo y presenta células de Leydig, fibroblastos, macrófagos, leucocitos, células plasmáticas, etc. (Hafez 1997, Scott 1997, Kretser 1998).

## Barrera Hemato-Testicular

La falta acceso de colorantes y de otras moléculas grandes en los túbulos seminíferos se debe a la presencia de complejos de unión entre las células de Sertoli vecinas. La estructura de la barrera hemato-testicular en los mamíferos se inicia poco tiempo después del nacimiento, se presentan uniones intercelulares ("ocluyentes o GAP", "fuertes o estrechas" o TIGHT, "adherentes") entre las células de Sertoli, lo cual va a ayudar a la compartimentación del túbulo seminífero: basal y luminal. Esta barrera se establece por completo tanto estructuralmente como funcionalmente durante la pubertad. Con ello se favorece el mantenimiento de microambientes diferentes particularmente favorables para la diferenciación de las células germinales y para impedir que las proteínas de estas células puedan alcanzar la sangre e introduzcan la formación de anticuerpos. (Hafez 1997).

## Conductos Excretores del Testículo

Los túbulos seminíferos terminan en los túbulos rectos que desembocan en la *rete testis*, la cual actúa como una válvula que permite el paso de los espermatozoides en un solo sentido. Esta se vacía en los conductillos eferentes y estos lo hacen en el epidídimo y finalmente en los ductos deferentes. (Hafez 1997).

## Rete Testis

Es una compleja organización de conductor interconectados situados en el hilo o mediastino testicular y se extienden de un polo a otro. Las células que revisten a la *rete testis* son cúbicas o columnares con microvelocidades. Estas tienen la función de mover los fluidos de superficie. (Hafez 1997, Frandson and Spurgeon 1998).

## Conductos Eferentes

Los conductos de la *rete testis* se fusionan para formar de 3 a 15, conductillos eferentes con un aproximado 10 cm, que salen por el extremo superior del mediastino testicular, penetran en la túnica albugínea y entran en la cabeza del epidídimo. Allí se fusionan hasta originar el conducto epididimario. Los conductillos eferentes están revestidos por un epitelio cilíndrico simple ciliado y cúbico con o sin microvelocidades. El movimiento de los cilios impulsa a los espermatozoides hacia delante y las microvelocidades absorben parte del líquido testicular. (Hafez 1997).

## Epidídimo

Es una estructura tubular, con múltiples flexiones que recorre el testículo en su borde posterosuperior. Se divide en: cabeza, cuerpo y cola, y está última desemboca en el conducto deferente. Se sabe que los espermatozoides maduran y se almacenan en el epidídimo. Las células que revisten el epidídimo tienen la capacidad de secretar y absorber líquidos y sustancias de la luz epididimaria. Su estado funcional se ha tratado de evaluar por medio de sus productos de secreción. Los productos secretados en el epidídimo incluyen a la proteína, carnitina, lípidos, glicerolfosforilcolina (GPC), carbohidratos esteroides y otras pequeñas moléculas. Algunas de las proteínas específicas del epidídimo que se incorporan a la membrana del espermatozoide o que se adhieren a éste, son

andrógeno-dependientes. (Remoni *et al.* 1992, Frandson and Spurgeon 1998, Kretser 1998, Weinbauer and Wesselg 1999, Johnson *et al.* 2001).

Durante su paso por el epidídimo el espermatozoide adquiere la capacidad de moverse y de interactuar con el óvulo. En el caso del perro un espermatozoide puede recorrer el epidídimo de extremo a extremo en aproximadamente 14 a 20 días. La mayor parte de los espermatozoides se almacenan en la cola del epidídimo, donde pueden vivir por semanas o meses. Los espermatozoides no eyaculados son al final fagocitados en el epidídimo, como también ocurre en los animales vasectomizados (Hafez 1997, Johnson *et al.* 2001).

#### Conductos Deferentes

El conducto deferente es un tubo recto que se extiende desde la cola del epidídimo hasta su unión con el conducto de las vesículas seminales. Están compuestos por una pared muscular gruesa, que se conforma de tres capas cuya función es impulsar a los espermatozoides hacia delante. Este sirve de reservorio de las células espermáticas y tiene la capacidad de sintetizar colesterol, testosterona y dihidrotestosterona a partir de acetato (Weinbauer and Wesselg 1999, Johnson *et al.* 2001).

#### Uretra

Constituye el conducto final por el que se expulsan la orina y los espermatozoides al exterior. Está formada por tres zonas, la prostática, la membranosa y la esponjosa o peneana. Las fibras musculares lisas que posee están muy desarrolladas a nivel del orificio uretral interno y conforman el esfínter vesical. El funcionamiento correcto de este permite que el semen salga al exterior, si este mecanismo no es adecuado puede dar origen a la eyaculación retrógrada (es decir la entrada del semen hacia la vejiga) (Hafez 1997).

## Próstata

Se divide en tres lóbulos, los cuales a su vez se dividen en lobulillos, dentro de los cuales se hallan las glándulas que son de tipo túbulo alveolar compuesta. La secreción prostática se calcula que contribuye con un 20-30% del volumen del plasma seminal es incolora y su pH es ácido. La próstata tiene dos funciones principales: sirve como esfínter y segrega líquido hacia el eyaculado que sirve como diluyente y vehículo para transportar los espermatozoides durante la eyaculación. La fosfatasa ácida, es un producto de secreción de la próstata, hidroliza la fosforilcolina a colina interviniendo así en la nutrición del espermatozoide en el eyaculado (Guyton y Hall 1997, Hafez 1997, Scott 1997, Weinbauer and Wesselg 1999, Johnson *et al.* 2001).

## Pene

El pene puede dividirse en tres grandes áreas: los dorsales (cuerpos cavernosos), un tejido eréctil dispuesto en dos cilindros, un cilindro ventral central más pequeño (cuerpo esponjoso) a través del cual transcurre la uretra peneana y el glande o extremo libre. La estructura interna del pene (tejido eréctil), consiste de sinosidades vasculares separados por tabiques de tejido conectivo, derivados de la túnica albugínea, los cuales se hallan vacíos cuando el pene está flácido, pero se llenan de sangre durante la erección. La erección peneana antes de la cópula se debe a la penetración de más sangre por los troncos arteriales; el exceso hace aumentar el tamaño del órgano y lo vuelve turgente (Hafez 1997).

El glande del perro consta de dos partes: la porción larga del glande y el bulbo, ambas rodeadas de un hueso acanalado (*os penis*). La parte caudal del pene del perro (bulbo) generalmente se dilata desde el comienzo de la cópula, lo que explica las dificultades de separación hasta que la erección ha cedido (Hafez 1997, Johnson *et al.* 2001).

## Prepucio

El prepucio es una invaginación de la piel que rodea la extremidad libre del pene. La superficie externa es comparable a la superficie cutánea, en tanto que la interna está formada por una capa prepucial y otra peneana que cubre la superficie del extremo libre del pene (Hafez 1997, Johnson *et al.* 2001).

## Erección

La erección del pene es esencialmente el aumento de su turgencia debido a que, en cierto momento, hay más entrada que salida de sangre, con aumento de presión dentro del sistema circulatorio peneano. Como factores de este fenómeno hay vasodilatación de las arterias y reducción del drenaje venoso (Hafez 1997).

Al estar erecto el pene del perro, aumenta de diámetro así como de longitud, debido a la cantidad relativamente grande del tejido eréctil (cuerpos cavernosos) en comparación con el cuerpo esponjoso. (Hafez 1997, Johnson *et al.* 2001).

En el perro su erección termina después de haber entrado en la vagina de la perra. La distensión del bulbo, aunada a la presión ejercida por los músculos de la vulva y la vagina de la hembra, evita la separación de los perros durante el "coito", el cual se realiza hasta que el pene del perro se pone flácido después de la eyaculación (Hafez 1997).

## Eyaculación

La eyaculación es el paso del semen por la uretra peneana y es realizada por los músculos abdominales estriados, bajo el control de los componentes eferentes somáticos en los nervios del sacro. Las terminaciones nerviosas sensoriales del tegumento peneano y tejidos peneanos más profundos cumplen un papel esencial en el proceso de la eyaculación (Hafez 1997)

Durante la eyaculación por las contracciones del epidídimo caudal y conducto deferente, aumenta la tasa de flujo, esto es seguido de movimientos del líquido espermático de regreso al epidídimo, y de una reducción en la tasa de flujo de 10 a 20 horas después de la eyaculación (Hafez 1997).

Durante la eyaculación, el músculo bulboesponjoso comprime el bulbo peneano y así bombea sangre de éste al resto del cuerpo esponjoso del pene. Las ondas de presión que pasan debajo de la uretra peneana ayudan en el transporte del eyaculado (Hafez 1997).

La eyaculación es un reflejo por el que se contraen y vacían el epidídimo, la uretra y las glándulas sexuales accesorias del macho. El reflejo comienza principalmente por el estímulo del glande ya sea en la función natural o con medios mecánicos para recolectar semen destinado a la inseminación artificial (MaDonald y Pineda 1989, Frandson and Spurgeon 1998, Johnson *et al.* 2001).

Los componentes químicos del eyaculado de perro constan de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de la tercera parte del peso seco del espermatozoide lo forma el núcleo. La membrana acrosómica contiene varias enzimas, pero su contribución al peso total del espermatozoide varía por especies. El plasma seminal contiene ciertos componentes orgánicos como Fructosa, ácido cítrico, inositol, que son aportados por la próstata, así como otras sales minerales sodio, potasio, magnesio esto permite tener un pH de 6.3 a 7 para que los espermatozoides puedan sobrevivir (Johnston *et al.* 2001).

El proceso de desarrollo y maduración de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos para que se produzcan los espermatozoides. Por conveniencia descriptiva, suele dividirse en tres fases principales: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis, las espermatogonias indiferenciadas, o células madres, se dividen por mitosis, para producir no sólo más espermatogonias si no también células que se diferencian dando origen a

espermatocitos primarios. Durante la meiosis los espermatocitos sufren dos divisiones que reducen a un solo juego el número de cromosomas de la especie y producen un grupo de espermatidas. En la espermiogénesis, las espermatidas sufren una serie notable de transformaciones citológicas que los convierten en espermatozoides.

### **3. Anatomía y Fisiología del Espermatozoide Canino**

El semen es un líquido o suspensión celular semigelatinosa que contiene los gametos masculinos o espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor del macho. La porción líquida de esta suspensión, formada durante la eyaculación, se llama plasma seminal (Strom 1997, Kirk 1995, Johnston *et al.* 2001).

#### **Espermatozoide**

Es una célula haploide, la cual está compuesta por la cabeza, el cuello y el flagelo. (Carlson 1990, Remoni *et al.* 1992, Kirk 1995, Kretser *et al.* 1998, Weinbauer y Wesselg 1999).

#### **Cabeza**

Es elipsoide, un poco aplanada, contiene el núcleo, con una cromatina muy condensada. Debido a una clase especial de proteínas básicas denominadas protaminas. El núcleo, ocupa un tercio de la longitud de la cabeza. El extremo anterior del núcleo está recubierto del capuchón cefálico acrosómico. Este último es una estructura altamente especializada que contiene enzimas hidrolíticas que sirven para el proceso de penetración de la corona radiada y la zona pelúcida (Oettlé 1993, Kirk 1995).

**Acrosoma:** Cubre los dos tercios anteriores del núcleo y es un organelo en forma de capuchón, envuelto en una membrana que se adapta estrechamente a los contornos de la parte anterior del núcleo. Este se forma a partir del aparato de Golgi (Guyton y Hall 1997, Tsutsui *et al.* 2000<sup>a</sup>, Johnston *et al.* 2001).

El acrosoma consta de dos segmentos: 1) el segmento anterior o capa acrosomal, que es el más grueso y 2) el segmento ecuatorial más corto y delgado y en forma de media luna. El acrosoma contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas

(cuadro1), entre estas enzimas, la hialuronidasa es especialmente importante para abrir el camino entre las células de la granulosa de forma que el espermatozoide pueda alcanzar el óvulo. Las enzimas proteolíticas digieren los elementos estructurales de los tejidos que todavía permanecen adheridos al óvulo. (Guyton y Hall 1997, Rota *et al.* 1998).

Cuadro 1. Enzimas de origen acrosomal

Acrosina
Arilamidasa
Arilsulfatasa
Colagenasa
Fosfatasa
Fosfolipasa C
$\beta$ - Galactosidasa
Hialuronidasa
Peptidil peptidasa
Proacrosina
$\beta$ -N-Acetilglucosaminidasa
$\beta$ -N-Acetilhexosaminidasa
Catepsina D
Esterasa
Fosfolipasa A
$\alpha$ -L-Fucosidasa
$\beta$ -Glucoronidasa
Neurominidasa
Ornitindescarboxilasa
Proteinasa acida

La capacitación y la reacción acrosomal son dos procesos fisiológicos que el espermatozoide de los mamíferos debe sufrir. Antes de entrar en contacto la membrana plasmática del espermatozoide con la del ovocito, está primero de penetrar las células de la corona radiada y después la de la zona pelúcida. Para llegar a esta última, debe pasar por el proceso de reacción acrosomal por la cual se liberan las enzimas líticas que se encuentran almacenadas en el acrosoma. Inmediatamente después de la unión, la membrana acrosomal externa se fusiona en múltiples sitios con la membrana plasmática que recubre el acrosoma lo que resulta en la liberación inmediata de enzimas del acrosoma. La reacción acrosomal es inducida por la zona pelúcida que actúa como un ligando para uno o más receptores espermáticos. Las enzimas, abren una vía de penetración para el paso de la cabeza del espermatozoide a través de la zona pelúcida. La reacción acrosomal se relaciona con la unión de la membrana plasmática del espermatozoide con las diversas glucoproteínas ZP3, que se encuentran en la superficie de la zona pelúcida. La cabeza penetra primero en el espacio perivitelino situado por debajo de la zona pelúcida. Posteriormente, la membrana de la cabeza del espermatozoide y del ovocito se fusionan y el material genético penetra en el ovocito poco después comienza el desarrollo del embrión (Fraser 1998, Guyton y Hall 1997).

## Flagelo

El flagelo está formado por cuatro secciones denominadas cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal. El cuello se extiende entre la cabeza y la pieza media del flagelo. Es una región corta surcada longitudinalmente por las "columnas estriadas" (su número es de 9). Las columnas constituyen la "pieza de conexión" ya que son las encargadas de anclar el flagelo a la cabeza de la célula. Anteriormente las columnas convergen para dar origen al "*capitulum*" que se aloja en la fosa de implantación. Debajo del *capitulum* se encuentran los centriolos. (McDonald y Pineda, 1991; Remoni *et al.*, 1992; Carlson, 1994; Scott, 1997).

La región de la cola, ubicada entre el cuello y el anillo posterior es la pieza media. El corazón central de esta pieza media, junto con toda la longitud de la cola, esta recorrida por el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos en posición radial alrededor de un par central. En la pieza media, esta disposición de 9 + 2 microtúbulos está rodeada por nueve fibras densas o gruesas que hacen de las columnas estriadas. El axonema y las fibras densas asociadas de la pieza media, están cubiertas en su periferia por numerosas mitocondrias. (McDonald y Pineda 1991, Remoni *et al.* 1992, Carlson 1994, Scott 1997).

La pieza principal continúa en dirección posterior desde el anillo y se extiende hasta cerca del extremo de la cola. Se mantiene, el axonema, rodeado por las 9 fibras densas externas. Por fuera de las fibras existe una vaina fibrosa que presenta dos engrosamientos longitudinales prominentes o columnas que corren a lo largo de lo que es la superficie dorsal y ventral de la pieza principal. Las columnas longitudinales parecen estar conectadas de cada lado por numerosas costillas circunferenciales. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola (McDonald y Pineda 1991, Remoni *et al.* 1992, Oettlé 1993, Carlson 1994, Scott 1997).

La pieza terminal es esa porción de la cola, posterior a la terminación de la vaina fibrosa. Contiene solo el axonema cubierto por la membrana plasmática.

La gota citoplasmática, que suele encontrarse en los espermatozoides eyaculados, está compuesto de citoplasma residual. Aunque se considera anormal, está puede retenerse ya sea en el cuello, en el que recibe el nombre de gota proximal, o cerca del anillo, donde se denomina gota distal (ver figura 1). (McDonald y Pineda 1991, Remoni *et al.* 1992, Oettlé 1993, Carlson 1994, Scott 1997, Johnston *et al.* 2001).

## Pieza Media

La vaina mitocondrial, genera la energía necesaria para la motilidad espermática, y termina en el anillo. Estos organelos se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice (McDonald y Pineda 1991, Remoni *et al.* 1992, Oettlé 1993, Alberts *et al.* 1994, Kirk 1995).

Dentro de la pieza media del espermatozoide, se encuentran las mitocondrias que contienen los sistemas enzimáticos que efectúan el ciclo de Krebs, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, produciendo la energía necesaria en forma de ATP para movilidad de los espermatozoides (Guyton y Hall 1997, Karp 1995, Frase 1998).

## Transporte de los Espermatozoides en el Aparato Reproductor de la Hembra

*Sitios de deposito:* Si bien los espermatozoides son móviles en el aparato reproductor de la hembra, después de la eyaculación, el factor principal del movimiento de estos hacia los cuernos uterinos que es la actividad muscular de esos conductos. En condiciones normales, el semen es depositado en la vagina de la perra. Espermatozoides morfológicamente anormales llegan al oviducto, aunque siempre será en menor cantidad que los normales (Hafez 1997, Johnston *et al.* 2001).

El tiempo de supervivencia de los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra es de apenas unas horas. En el caso de la perra, el periodo de fertilidad en el conducto es de 30 a 48 horas. Aunque comúnmente la movilidad se considera sinónimo de fertilidad (capacidad de fertilizar el óvulo), la primera suele durar más tiempo que la segunda (Hafez 1997, Oettlé 1993, England 1999).

*Transporte Rápido:* El tiempo en el que los espermatozoides llegan a los cuernos uterinos es extraordinariamente corto y como se menciono anteriormente son

impulsados por las contracciones de los órganos reproductivos de la hembra (Johnston *et al.* 2001).

Los espermatozoides penetran las micelas del moco cervical, en donde algunos de ellos son transportados rápidamente por el canal cervical. Esta fase dura de 2 a 10 minutos y puede facilitarse gracias a la motilidad del espermatozoide, así como al aumento en la actividad contráctil del miometrio y mesosalpinx durante el cortejo y el coito (Hafez 1997, Johnston *et al.* 2001).

*Reservorios de los espermatozoides:* Un número abundante de espermatozoides queda atrapados en los pliegues mucosos de las criptas del cerviz, formando una reserva espermática. Cuanto mayor sea la cantidad de espermatozoides que entren en las criptas cervicales, mayor será el número de ellos podrán llegar al oviducto y por lo tanto aumentara la probabilidad de fecundación (Hafez 1997, Johnston *et al.* 2001).

*Capacitación y liberación lenta:* Después de establecerse en forma, los espermatozoides seran liberados de los reservorios en secuencias, por periodos prolongados. Esta liberación lenta asegura una disponibilidad continua de espermatozoides al oviducto para efectuar la fecundación del óvulo. Por otra parte, la población de espermatozoides (viables) es mantenida en el sitio de la fecundación, cerca de la unión istmo-ampular del oviducto. Sin embargo, son pocos los espermatozoides del eyaculado lleguen al sitio de fecundación (Hafez 1997, Johnston *et al.* 2001).

Como consecución de la capacitación espermática, así como de la reacción acrosómica, una hiperactivación del espermatozoide ocurre en el oviducto, al momento de la ovulación, y desempeña un papel trascendental en el transporte espermático final (Hafez 1997).

## Sobrevivencia de los Espermatozoides

Una vez presentada la eyaculación los espermatozoides tienen un periodo de vida. Ciertos componentes del plasma seminal estimulan su motilidad, en tanto que otros la inhiben. El moco cervical secretado en el momento de la ovulación proporcionan el medio apropiado para el mantenimiento de la actividad metabólica del espermatozoide (Linde-Fosberg *et al.* 1999, Mortimer *et al.* 1998).

Se conoce bastante acerca de la duración de la motilidad del espermatozoide, pero muy poco de la duración de la capacidad de fecundante, que se pierde mucho antes que la motilidad (Hafez 1997, Feldman y Nelson 2000).

Al viajar por las vías del aparato reproductor de la hembra, los espermatozoides se separan rápidamente del plasma seminal y se resuspenden en el líquido de los genitales femeninos. De tal manera que son solo unos pocos los que alcanzan el oviducto; por ello, es difícil estimar el tiempo de su supervivencia (Hafez 1997).

Durante el transporte al sitio de fecundación, los espermatozoides no solo se diluyen de manera significativa en las secreciones luminarias de las vías del aparato reproductor de la hembra, sino también son susceptibles a los cambios de pH de tales líquidos. De hecho, La acidez o alcalinidad excesiva del moco inmoviliza al espermatozoide; mientras que el moco moderadamente alcalino aumenta su motilidad (Hafez 1997).

## Modificaciones de la Membrana Plasmática del Espermatozoide

La membrana plasmática del espermatozoide es un factor importante en el proceso de la capacitación y la reacción acrosomal. En la membrana del espermatozoide, es de esencial significado la proporción y la cadena de los ácidos grasos de los fosfolípidos. Los lípidos tienen la característica de promover el flujo de la membrana, la permeabilidad y la fusión. La presencia de altos niveles de colesterol en la membrana es probablemente requerido para la prevención de una

capacitación prematura, y así promover la reacción acrosomal en el tiempo apropiado. (Ahluwalia *et al.* 1990, Parks and Graham 1992, Cross 1998, Wolfe *et al.* 1998, James *et al.* 1999)

Durante la capacitación del espermatozoide la membrana plasmática experimenta cambios fisicoquímicos, en el aparato reproductor de la hembra; ya que se ha observado que la membrana plasmática es donde se inicia la fusión espermatozoide – ovocito; los cambios que suceden en la membrana plasmática es la composición de los lípidos de superficie, estos preparan a la membrana plasmática para la reacción acrosomal: Hay un decremento en la proporción de colesterol en la membrana plasmática y un aumento en los lípidos fusogénicos. El colesterol puede actuar para sensibilizar a la membrana haciéndola menos permeable, con menos flujo y susceptible a la fusión. En suma, estos efectos directos sobre la bicapa lipídica, las alteraciones en las propiedades físicas de la membrana plasmática pueden influir en la movilidad, conformación y activación de enzimas y en el transporte de moléculas (Cross 1998, Visconti *et al.* 1999).

Se sabe que las secreciones del aparato reproductor de la hembra son capaces de promover la salida del colesterol del espermatozoide durante la capacitación espermática, con la influencia de estrógenos, la cantidad y/o actividad de los receptores de superficie de la membrana el colesterol promueve un aumento en el líquido intracelular, en fluidos del tracto reproductor y del fluido folicular. (Therein *et al.* 1998, Scialli y Zinaman 1993).

Con la pérdida de colesterol, la membrana plasmática incrementa su flujo y su permeabilidad. Un cambio en la permeabilidad de la membrana puede afectar la capacidad del espermatozoide para controlar la concentración intracelular del calcio y/o pH. De hecho, las proteínas transportadoras de la membrana tienen componentes hidrofóbicos que están en contacto con la bicapa lipídica; la composición lipídica puede ser influenciada por la permeabilidad de la membrana y las proteínas de ésta. De similar manera la actividad de otras proteínas de

membrana puede verse afectada, como son los receptores y los involucrados en las vías transducción de señal. Estas alteraciones pueden ser detectadas directamente por el uso de métodos bioquímicos (Cross 1998, Therein *et al.* 1998, James *et al.* 1998).

Por otra parte, los ácidos grasos insaturados de la membrana celular son más susceptibles al ataque de las especies reactivas de oxígeno. La peroxidación de los lípidos puede deberse a un aumento en la permeabilidad de la membrana o a una disminución en la homeostasis entre otros. Los factores que incrementan la peroxidación de los lípidos pueden ser tres: 1) aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno; 2) disminución en la actividad de sistemas protectores y/o 3) un aumento en la susceptibilidad de los lípidos (Karp 1995, Cross 1998, Therein *et al.* 1998, James *et al.* 1998).

#### Dominios de Superficie de Membrana

Los dominios de superficie se establecen durante la espermiogénesis, donde la espermatide sufre cambios morfológicos a espermatozoide. La formación final de los dominios se adquiere durante la maduración espermática en el epidídimo. Con la influencia de las células de Sertoli estableciendo los dominios de superficie en especial los de la membrana acrosomal. Los dominios están asociados a la región acrosomal y a la pieza media. Los dominios de superficie del espermatozoide mantienen la estabilidad y restricción de moléculas hacia el interior de la célula espermática. Una de las características del espermatozoide es que su membrana plasmática está subdividida regionalmente en diferentes dominios con diferentes funciones. La organización y la composición de la membrana plasmática varía entre las diferentes regiones de la superficie del espermatozoide, ya que el concepto de la membrana plasmática del espermatozoide es un mosaico que restringido por los dominios y es el reflejo de su función especializada en la superficie y la incorporación al interior de los componentes citoplasmáticos en el espermatozoide (Eddy and O'Brien 1994).

Los dominios que se conocen en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos son:

- a) Región acrosomal (Segmento principal)
- b) Región postacrosomal (Posterior a la cabeza)

La membrana plasmática y la región acrosomal se subdivide en:

- a) Segmento marginal (segmento apical, anterior a la cabeza), dominio por encima de la parte marginal del acrosoma.
- b) Segmento principal (Segmento acrosomal) dominio por encima de la mayor porción del acrosoma.
- c) Segmento Ecuatorial (acrosoma posterior) el dominio se encuentra en la parte posterior del acrosoma.

Los dominios que se encuentran en los segmentos marginal y principal se refieren al acrosoma anterior y a la membrana acrosomal. La región postacrosomal incluye dominios de superficie de la membrana plasmática (Eddy and Obrien 1994)..

Entre las regiones acrosomal y postacrosomal esta delimitada por una banda (anillo subacrosomal), y es la que le da forma al espermatozoide y une la cabeza con el cuello.

Los dominios se encuentran separados entre la cabeza y el flagelo por unas fibras densas del annulus y el axonema del flagelo (Eddy and Obrien 1994).

#### Proteínas de la Membrana Plasmática

Las proteínas de la membrana son importantes en la capacitación espermática y en la reacción acrosomal, incluyendo a las receptoras de transducción de señal y transportadores. La actividad de las proteínas puede alterarse por un desarrollo anormal de los lípidos. La función normal de las moléculas transportadoras de la

membrana es esencial para la función normal del espermatozoide, de manera particular, el calcio y el pH están involucrados en la capacitación y en la reacción acrosomal. Un incremento en los niveles de calcio y de protones durante la capacitación da como resultado un decremento en la longevidad una reacción acrosomal prematura. (Cross 1998, Therein *et al.* 1998, James *et al.* 1998, Zabludovsky *et al.* 1999).

Las concentraciones anormales de calcio, pH y/o AMPc pueden inhibir la fertilización por alterar la capacitación y la reacción acrosomal, ocasionando además otros defectos intracelulares que modifican la motilidad espermática, ya que el axonema es muy susceptible inclusive a los pequeños cambios en la concentración intracelular de estos factores. (Zabludovsky *et al.* 1999, Mortimer *et al.* 1998).

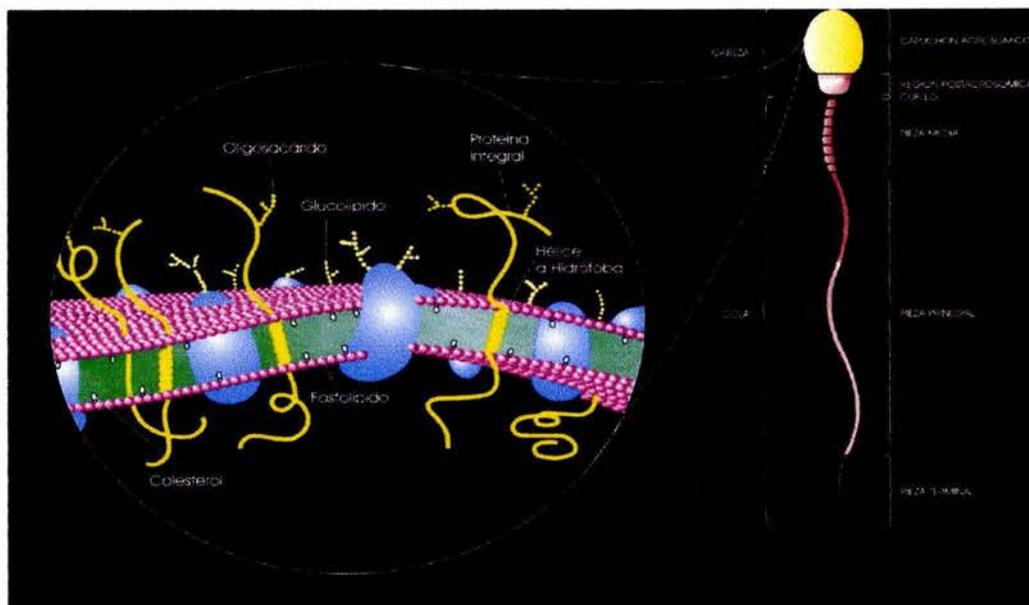


Figura 2. Estructura de la Membrana Plasmática del Espermatozoide.

## Daños a la Membrana Plasmática en el Proceso de Congelación

La superficie de la membrana plasmática de las células eucariotas son estructuras dinámicas que poseen carbohidratos unidos mediante enlaces covalentes a los componentes lipídicos y proteínicos. Los componentes lipídicos de la membrana constituyen la barrera de permeabilidad, mientras que las proteínas funcionan como un sistema de transporte que actúan como conductos en la permeabilidad selectiva de la célula. Según la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidratos de la membrana plasmática varía. El 8% de los carbohidratos se unen a los lípidos para formar glucolípidos y el restante 92% se une a proteínas para formar las glucoproteínas. Los carbohidratos de la membrana, poseen propiedades de reconocimiento celular (Karp 1995).

Las membranas espermáticas realizan la función de mantener íntegra a la célula ya que esta ayuda al mantenimiento de energía y a la transmisión de información genética. Una de las propiedades más importantes en la membrana plasmática del espermatozoide son los lípidos: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol.

El problema que se ha encontrado para mantener viables a las células espermáticas *in vitro* es que durante los procesos de congelación-descongelación de espermatozoides ocurren cambios fisiológicos en las mismas que conducen a la pérdida de la viabilidad de la membrana plasmática pierde su funcionalidad y aumenta la permeabilidad lo cual conlleva a la muerte celular. Al microscopio el daño se observa en forma de quistes acrosómicos con rebordes y distribución irregular de la membrana plasmática. Con mayor frecuencia los quistes acrosómicos ocurren en el extremo apical, en donde se denominan acrosomas en forma de pezón, estos suelen estar llenos de líquido extracelular. Se ha comprobado que las anomalías de la membrana plasmática y de la membrana del acrosoma, son causas de una baja viabilidad en el semen de toro, cerdo, carnero y el hombre. En el caso del hombre los defectos acrosómicos son

consecuencia de espermatozoides que se encuentran imposibilitados de competir para la fecundación (Kirk 1995, Oettle 1993, Silva *et al.* 1996).

Las alteraciones de la membrana plasmática y los daños acrosomales que se originan después de que el espermatozoide sale del testículo, por ejemplo los cambios de temperatura menores a 37°C se clasifican como secundarias. También se pueden observar espermatozoides inmaduros, los que presentan la gota citoplasmática en el cuello del espermatozoide pero esto es ocasionado por un rápido tránsito de las células espermáticas por el epidídimo. La integridad de la membrana plasmática y acrosomal son de suma importancia para la reacción acrosomal que normalmente solo ocurre cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida, aunque esto no siempre sucede. Al parecer, la reacción del acrosomal del espermatozoide del perro sigue el mismo patrón básico que el de la mayor parte de los mamíferos. (Kirk 1995, Oettle 1993, Kretser *et al.* 1998).

Por último, se ha observado que la mayor parte de la destrucción de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa ocurre durante el proceso de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento a temperaturas de -15 a -60°C a vapores de nitrógeno líquido, ya que es cuando se produce mayor cristalización extracelular en el medio y no durante el proceso de congelación en el nitrógeno líquido (Parks y Graham 1992).

#### **4. Evaluación del Semen Canino**

El eyaculado del perro esta constituido por tres fracciones bien diferenciadas, la primera fracción que proviene de la próstata de color transparente no contiene espermatozoides, la segunda fracción su color varia entre gris a blanco lechosa, esta proviene del epidídimo y contiene la mayor concentración de espermatozoides, la tercera fracción proviene de la próstata y es de color transparente con menor cantidad de espermatozoides. Del volumen total del eyaculado, la primera fracción ocupa un 2 a 3%, la segunda de 6 a 7% y la última un 90%.

#### **Métodos de Colección de Semen:**

Existen tres métodos: Manipulación digital, vaginal y electroeyaculación.

- a) Manipulación digital.- Se utiliza con mayor frecuencia ya que es sencilla de realizar y no afecta la cantidad y calidad del eyaculado. Este debe ser colectado en tubos graduados y sí se desea congelar se debe obtener únicamente la segunda fracción del eyaculado del perro que es rica en espermatozoides) (England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Stornelli, A. et al. 1999).
- b) Vaginal.-Funciona con una bomba manual y temperatura colocando agua en está vagina, proporciona estímulos pulsátiles dando como resultado la eyaculación. La única desventaja es que se encuentra es cuando se quiere obtener un eyaculado fraccionado.
- c) Electroeyaculación.- Solo se emplea para trabajar cánidos de zoológicos, con fines de investigación. Ya que es traumática y es necesario anestesiarse al animal y la calidad del eyaculado es baja.

### **Evaluación del semen.**

Después de ser colectado el semen, se mantiene a 37° C; y esta se determina mediante una evaluación:

Macroscópica, está evaluación incluye todas aquellas características que puedan ser observadas.

- a) Volumen.- El semen debe ser colectado en tubos graduados. El volumen varía por factores como la edad, tamaño del perro, frecuencia de colección y época del año. Los rangos de volumen van de 1 hasta 40 ml.
- b) Color.- El color normal del semen varía de gris a blanco lechosa, esto depende directamente a la concentración espermática. Algunas razas de perros como el Doberman Pinscher, Pastor Alemán, Cobrador Dorado y Schnauzer Miniatura es frecuente ver sangre en el eyaculado, que puede deberse a fallas de coagulación. La presencia de cualquier secreción extraña como orina, sangre o pus afectan la motilidad y viabilidad del espermatozoide.

Microscópica, está evaluación se realiza con ayuda de herramientas de laboratorio.

- a) Motilidad.- Se hace una observación de la muestra al microscopio para evaluar el movimiento progresivo del espermatozoide, está se mide de 0 a 100%. Una muestra normal para congelar debe tener como mínimo 75% de motilidad progresiva.
- b) pH.- El pH normal del semen canino se encuentra en un rango de 6.4 a 7 y depende del líquido prostático, cuya finalidad es incrementar la motilidad espermática.
- c) Vivos y Muertos.- Para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, se utilizan colorantes como Wright, giemsa, tinta china, pero se obtiene una menor calidad de imagen en comparación con eosina-

nigrosina. En un frotis de semen se interpreta considerando que los espermatozoides no teñidos se encuentran vivos, mientras los espermatozoides teñidos se encuentran muertos. El porcentaje se evaluó de 0 a 100 (numero de células vivas y muertas). También se calcula el porcentaje de anormalidades primarias (desprendimiento de las cabezas, colas dobles, gota citoplasmáticas proximales y piezas medias dobles); y el porcentaje de anormalidades secundarias (colas y cabezas normales desprendidas y colas enrolladas) (Stornelli *et al.* 1999).

- d) Acrosomas Normales.- Para está evaluación morfológica, se ha utilizado microscopia óptica (microscopio de contraste de fases), microscopía electrónica (transmisión o de barrido) y algunas tinciones como el verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina, azul tripán/Giemsa, el amarillo de naftol/eritrosina o la triple tinción (Tesarik *et al.* 1993, Rota *et al.* 1997, 1998, Sirivaidyapong 2000), las lectinas sirven como sustancia de elección para la identificación y localización o estudio de la distribución de los carbohidratos sobre la superficie de la célula (Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999). El porcentaje se evalúa de 0 a 100 (numero de células teñidas de membranas plasmáticas intactas y células espermáticas con ruptura de la membrana plasmática), el porcentaje normal en espermatozoides de perro son el 90 a 95% (England 1999, Rota *et al.* 1999; Tsutsui *et al.* 2000 a, b, c).

Una vez que el semen ha sido analizado y se desea congelar se diluye. Al semen diluido se le va reduciendo gradualmente la temperatura de 37° C en un lapso de 1.5-3 horas hasta alcanzar 5° C con el objeto de estabilizar a los espermatozoides para su posterior congelación a -196° C (England 1999, Linde-Forsberg 1995, Rota *et al.* 1997, Peña *et al.* 1998, Rota *et al.* 1999, Peña and Linde-Forsberg 2000 a, b, Johnston *et al.* 2001).

La técnica de descongelación aun se le han hecho modificaciones pero los mejores resultados se han obtenido a 37-40° C por 45 a 60 segundos (England, 1999; Linde-Forsberg, 1995; Peña, et al., 1998; Peña and Linde-Forsberg, 2000 a, b; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1999; Tsutsui, et al., 2000 a, b, c).

## 5. Diluyentes del Semen Canino

Los diluyentes son medios líquidos que ayudan a prevenir la muerte celular de los espermatozoides eyaculados. Estos ayudan a mantener la presión osmótica del medio, contienen sustancias tampón para mantener un pH similar al del eyaculado, se adicionan crioprotectores de la membrana plasmática y cuentan con sustancias coloidales para mantener el metabolismo, viabilidad y longevidad, evitando así la muerte celular.

### Características del Diluyente

Un diluyente debe cumplir con la función de mantener viable al espermatozoide, por lo que este deberá tener las siguientes características:

- I. Deben de tener sustancias que eviten el choque térmico, que puede ser, yema de huevo y la leche descremada cuando el semen se preserva a 4° C, y se le añade glicerol cuando el semen se congela.
- II. Agentes nutritivos que son sustancias capaces de proporcionar la energía necesaria para el metabolismo del espermatozoide, como son la leche descremada, yema de huevo.
- III. Azúcares que se usan como substrato de energía exógena, como componente osmótico, entre ellos se tiene la fructosa y la glucosa.
- IV. Amortiguadores de pH, estos ingredientes tienen como objetivo el proteger al espermatozoide de cambios en el pH, entre estos están el citrato – tris, citrato de sodio, fosfatos, bicarbonatos, ácido cítrico (England 1993).
- V. Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano, se han obtenido buenos resultados con las penicilinas y estreptomina.
- VI. Protector del acrosoma, pasta Orvus (OEP), aumenta la resistencia al congelamiento y es importante para la motilidad y viabilidad (Tsutsui *et al.* 2000 a, b, c).

La dilución de semen con algunos tipos de diluyentes, puede lograr la preservación temporal de este, que va de 12 a 48 horas a temperaturas de refrigeración (5°C). Sin embargo, el semen congelado se ha mantenido hasta por nueve años con poca o ninguna variación en la viabilidad a la descongelación en el caso del toro no así con el semen de cerdo y del perro (Linde-Forsberg 1995, Tsutsui *et al.* 2000 a, b).

**Cuadro 2. Ingredientes utilizados en los diluyentes para la congelación de semen canino.**

Componentes	Rango	Autores
Tris	2.4 – 3.025 gr	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Farstad, 1996; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993; Oettle, 1993; Peña, et al., 1998; Peña and Linde-Forsberg, 2000a; Peña and Linde-Forsberg, 2000b; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Silva, et al., 1995; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c; Linde-Forsberg, 2001.
Ácido Cítrico	1.4-1.7 gr	Dobrinski, et al., 1993; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Oettle, 1993; Peña, et al., 1998; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Silva, et al., 1995; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c.
Citrato de Sodio	1.45 – 2.6 gr	England, 1993; Farstad, 1996; Pinto, et al., 1999.
Glucosa	0.8 – 1.25 gr	England, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Rigau, et al. 2001.
Fructuosa	1.25 – 2 gr	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993; Oettle, 1993; Peña, et al., 1998; Rota, et al., 1995; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c; Rigau, T, et al. 2001.
Lactosa	11 -15 gr	England, 1993; Farstad, 1996; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993;
Yema de Huevo	3 –20%	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Farstad, 1996; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993; Peña, et al., 1998; Peña and Linde-Forsberg, 2000b; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c.
Glicerol	2 – 8%	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Farstad, 1996; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Peña, et al., 1998; Peña and Linde-Forsberg, 2000a; Peña and Linde-Forsberg, 2000b; Rota, et al., 1998; Silva, et al., 1995; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c; Linde-Forsberg, 2001; Hewitt, et al., 2001.
Benzilpenicilina	0.06 –0.1gr	Rota, et al., 1998; Linde-Forsberg, 2001.
Penicilina	500 – 1000 UI / ml	England, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997.
Estreptomicina	100 mg	England, 1993; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998.
Pasta Orvus	0.5 –2%	Peña and Linde-Forsberg, 2000a; Peña and Linde-Forsberg, 2000b; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c.
pH	6.5 – 7.0	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Farstad, 1996; Peña, et al., 1998; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c.
Agua destilada	100 ml	Dobrinski, et al., 1993; England, 1993; Farstad, 1996; Fontbonne and Badinand, 1993; Ivanova-Kicheva, et al., 1997; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993; Oettle, 1993; Peña, et al., 1998; Peña and Linde-Forsberg, 2000a; Peña and Linde-Forsberg, 2000b; Rota, et al., 1995; Rota, et al., 1997; Rota, et al., 1998; Silva, et al., 1995; Strom, et al., 1997; Tsutsui, et al., 2000a; Tsutsui, et al., 2000b; Tsutsui, et al., 2000c.

Modificado por Cadena, L.J.G. 2004.

## 6. Crioconservación del Semen Canino

Al pensar en la crioconservación del semen se deben poner en claro que el objetivo es mantener los siguientes requerimientos y propiedades del espermatozoide para que pueda cumplir su función de fertilizar al óvulo:

- 1.- Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.
- 2.- Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor de la hembra, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización.
- 3.- Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito.
- 4.- Capacidad de movimientos progresivos.

En estudios anteriores de congelamiento de semen se ha observado que la habilidad del espermatozoide para mantener la viabilidad a  $-196^{\circ}\text{C}$ , depende de evitar el daño a la membrana plasmática y membrana acrosomal externa e interna que ocurren durante el congelamiento y descongelamiento, al pasar la célula una temperatura crítica entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-60^{\circ}\text{C}$  durante la cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriamiento, tales como formación de cristales intra y extracelulares (Rota *et al.* 1998). El daño que ocurre se puede detectar por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, pérdida de motilidad, por la disminución de energía o realizando movimientos en círculos, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Hafez 1997, Fontbonne and Badinand 1993, Rota *et al.* 1999).

Hay alteraciones irreversibles en la membrana plasmática causada durante el enfriamiento y el descongelamiento, como son disturbios en los fosfolípidos y en la estructura proteica, con lo que se aumenta la permeabilidad y ocasionan el desprendimiento de la membrana acrosoma externa con lo consiguiente la

liberación de las enzimas acrosomales (Rota *et al.* 1995, England and Ponzio 1996, Farstad 1996).

Uno de los factores que puede dar resultados variables en la congelamiento de semen canino es realiza modificaciones de los diferentes componentes en los diluyentes ver Cuadro 2; y también se pueden presentar por las variaciones en el periodo de equilibrio; hay estudios que han modificado los tiempos con rangos de 30 minutos hasta 2 horas. (Rota *et al.* 1995, Dobrinski *et al.* 1993, Peña and Linde-Fosberg 2000b).

## 7. Crioprotectores de la Membrana Plasmática del Espermatozoide

Se adicionan con el fin de prevenir o retardar las alteraciones no deseadas en la estructura y función de las membranas de los espermatozoides. Las principales sustancias utilizadas son albúmina sérica bovina (BSA), hidroxitolueno butilado (BTH), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), pasta Equex, glicerol, pasta Orvus. (Prasand and Mhatai 1996, Rota *et al.* 1998). Con la misión de estabilizar la membrana plasmática que pierde su elasticidad característica durante el enfriamiento (England 1993, England and Plumer 1993).

El mecanismo de acción en casi todos los crioprotectores de membrana es muy similar por ejemplo, el glicerol es una molécula de tres carbonos, cada uno de ellos posee un grupo oxidrilo (OH). Cada OH se combina con el hidrógeno del grupo carboxilo de un ácido graso, de esta manera el ácido graso se "ensambla" con el glicerol desprendiéndose agua (OH (del alcohol) + H (del carboxilo)  $H_2O$ ). De la unión del glicerol con un ácido graso se forma un monoglicérido, con dos ácidos grasos es un diglicérido, y con tres ácidos grasos un triglicérido. Como existen setenta ácidos grasos distintos que pueden combinarse los que pueden ser o no saturados existe una variedad muy grande de triglicéridos. Entre los triglicéridos más conocidos están las grasas y aceites (Prasand and Mhatai, 1996; Rota, *et al.* 1998; Peña *et al.* 1998). El 1,2-propilenglicol y el glicerol, ayudan tanto para prevenir la ruptura de la membrana durante la formación de hielo extracelular e intracelular, y para disminuir el punto eutéctico del medio.

La pasta Orvus tiene el mismo mecanismo de acción que los demás crioprotectores ayudando a mantener su elasticidad de la membrana plasmática y ayuda a incorporar azúcares, y facilita el intercambio de agua, induciendo una cristalización controlada. Las soluciones acuosas enfriadas rápidamente presentan el fenómeno de sobreenfriamiento y desestabilización de las membranas y la

formación de hielo a temperatura de  $-7^{\circ}\text{C}$  (Prasand and Mhatai 1996, Rota *et al.* 1998, Hewitt *et al.* 2001).

Las velocidades de enfriamiento deben de ser lentas, disminuir  $1^{\circ}\text{C}$  cada 2 a 5 minutos. Los espermatozoides son células esféricas de la parte craneal, de manera que la relación superficie de membrana plasmática respecto a volumen no permite intercambios rápidos de solutos. El enfriamiento lento durante la congelación facilita el equilibrio osmótico (England and Plumer 1993, Rota *et al.* 1995, Rota *et al.* 1998).

#### Estabilizadores de la membrana

Se ha documentado que la pasta Orvus sirve para la protección de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa del espermatozoide, con la misión de estabilizarla y mantener su elasticidad y mantener así su potencialidad de fecundar al óvulo. Además aumenta la resistencia y mantiene la osmolaridad de los espermatozoides al momento de la congelación y descongelación (Tsutsui *et al.* 2000 a, b., Rota *et al.* 1998).

## 8. Marcador de Membrana

Las lectinas se encuentran en las plantas y se unen específicamente a los azúcares de la superficie de las membranas celulares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con su sustrato y a las de los anticuerpos con sus antígenos (Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999).

Las lectinas sirven como sustancia de prueba para la identificación y localización o estudio de la distribución de los carbohidratos sobre la superficie de la célula (Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999).

Contienen al menos dos sitios de unión de ahí que puedan enlazarse en primer lugar a carbohidratos específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada (Koehler 1983; Hernández *et al.* 1999). Poseen interesantes propiedades que convierten a esta clase de proteínas en herramientas invaluableles en los laboratorios biológicos, por lo que se utilizan en numerosas investigaciones que incluyen: estudio de la estructura de las membranas, detección de transformaciones malignas, unificación de glicoconjugados, en la purificación de glicoconjugados, estudios citogenéticos, así como también en ensayos histoquímicos, enzimáticos y en el tipaje de grupos sanguíneos (Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999).

Cualquier definición de lectina deberá tener en cuenta los siguientes aspectos:

- a) Son glicoproteínas
- b) Las lectinas contiene varios sitios de combinación con glicoproteínas

Las interacciones de estas proteínas con células pueden ser inhibidas en muchos casos por carbohidratos, por lo que se ha llegado a la conclusión de que ellas se enlazan a sacáridos de la superficie celular, lo que ha provisto a los científicos de

útiles marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática.

Dentro de los estudios de membrana se ha reportado en la literatura el uso de lectinas para estudiar los estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y de esta forma detectar cambios y/o analizar la distribución subcelular de epitopes y terminales glicoproteicos (Koehler 1983, Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999).

Otros estudios con lectinas en espermatozoides se ha hecho para comprobar la maduración de los espermatozoides en el epidídimo uniéndose a dominios y carbohidratos de superficie (Eddy and Obrien 1994).

Se ha observado que las lectinas se distribuyen al azar sobre las células normales, mientras que en las células cancerosas aparecen unidas en grupos sobre la superficie. Si las moléculas de lectina se encuentran agrupadas debe ser por sus receptores glucosídicos han sido agrupados (Koehler 1983, Sharon 1997, Hernández *et al.* 1999).

Las lectinas conjugada con isotiocinato de fluoresceína (FITC) se ha usado como marcadores específicos de azúcares en la membrana del espermatozoide del humano, toro, hamster y el perro (Koehler 1983, Sirivaidvapong *et al.* 2000). El uso de la Lectina *Pisum Sativum* FITC se une a azúcares de superficie como son la manosa, glucosa y ácido sialico que están distribuidos predominantemente sobre la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide. Otras lectinas específicas como la Fucosyl tienen afinidad sobre la región postacrosomal del espermatozoide del cerdo del bovino.

## **9. Planteamiento del Problema**

El uso de la pasta Orvus como estabilizador de membranas es capaz de proteger la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa durante el proceso de la congelación y descongelación del espermatozoide canino.

## **10. Objetivo General**

Evaluar la eficacia de la pasta Orvus como protector de la membrana plasmática y así determinar que se mantiene la membrana acrosomal externa del espermatozoide antes y después del proceso de la congelación.

## **11. Objetivos Específicos**

1. Evaluar el semen canino macroscópica y microscópicamente durante su obtención en fresco.
2. Valorar la motilidad de los espermatozoides caninos antes y después de la congelación.
3. Evaluar la integridad de la membrana plasmática y membrana crosomal externa de los espermatozoide caninos antes y después de la congelación.
4. Establecer el porcentaje de acrosomas normales de los espermatozoides antes y después de la congelación.

## 12. Material y Métodos

### Selección de los Animales

En el periodo comprendido de diciembre de 2002 a octubre de 2003, se analizaron 63 perros sexualmente maduros, aparentemente sanos y mantenidos con alimento balanceado, a los cuales se les tomaron tres muestras de semen con lapsos de ocho días entre cada una. Todas fueron obtenidas en consultorios de la práctica privada de pequeñas especies.

Para la congelación del eyaculado de perro, fue necesario la evaluación macroscópica como microscópica del semen tomando en cuenta dos parámetros importantes durante la evaluación microscópica que son motilidad progresiva y porcentaje de acrosomas normales, ya que se ha visto que durante el proceso de congelación hay cambios fisicoquímicos de la membrana plasmática que ocasiona que un gran número de espermatozoides sufran muerte celular.

A las muestras de semen fresco se les aplicaron criterios de inclusión y exclusión los cuales fueron: primer criterio de inclusión la motilidad progresiva la cual no debía ser menor de 75% y las anomalías acrosómicas no debieron ser mayores del 5%; el criterio de exclusión fue que todas las muestras que no cumplieron con estos dos requisitos se eliminaron (Dobrinski 1993, Tsutsui *et al.* 2000<sup>a</sup>).

En segundo criterio de inclusión fue que la motilidad progresiva no debió ser menor de 65% y los acrosomas anormales no mayores al 10%, a las muestras se les agregó un diluyente y se evaluó en frío y el criterio de exclusión fue el mismo que el anterior.

En el periodo de octubre a diciembre de 2003, se obtuvieron dos eyaculados de cada macho para su análisis. El primer eyaculado se obtuvo para verificar que el animal contaba con las características de inclusión.

### **El experimento se dividió en dos fases:**

#### **Primera fase**

El semen fue analizado del primero y segundo eyaculado, 15 muestras para el primer eyaculado y 15 muestras para el segundo, las cuales fueron divididas en dos alícuotas para aplicarles el diluyente A y B lo que dio un total de 60 muestras de semen para los dos eyaculados (cuadro 3).

Las muestras se evaluaron en fresco (37°C), diluido en frío (5°C) y descongelado (37°C durante 1 minuto). Todas ellas fueron obtenidas y procesadas en clínicas privadas y en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Microscopía confocal del Instituto de Ciencias de la UNAM.

#### **Colección de Semen**

El semen se colectó por medio de la masturbación, obteniéndose el eyaculado en tubos graduados y manteniéndose a una temperatura de 37°C (England, 1993; Linde-Forsberg, 1995; Stornelli, et al. 1999)

#### **Evaluación del Semen**

Después de ser colectado el semen, se mantuvo a 37°C (baño María) y su evaluación se determinó mediante un examen macroscópico y otro microscópico.

- **Evaluación Macroscópica**

Esta evaluación incluye todas las características que puedan ser determinadas como: volumen, color y pH.

- Evaluación Microscópica

a) Concentración de Espermatozoides

Se hizo un recuento de espermatozoides utilizando el hemocitómetro. La dilución para el recuento de espermatozoides se preparó de la siguiente forma: la pipeta de Thomas se llenó de semen hasta la marca de 0.5. El semen se diluyó con una solución de azul de metileno hasta la marca de 101, se mezcló invirtiendo la pipeta varias veces, se eliminaron las tres primeras gotas, posteriormente se llenó la cámara de Neubauer y se contaron los espermatozoides de los cuatro cuadros de las esquinas y del cuadrado central, considerando solamente las cabezas que se encontraban en el interior de los cuadros. El hemocitómetro tiene dos cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se divide entre dos para sacar el promedio. Cada cuadro tiene una superficie conocida 1mm, como también lo es la profundidad entre la cámara y el cubreobjetos 0.1 mm, lo que permite calcular el número de células por unidad de volumen. El factor de dilución fue 1:100 ( $10^6$ ) Se realizó al momento de obtener la muestra en fresco.

b) Motilidad Espermática

Con una alícuota de semen en portaobjetos, colocando encima un cubre objetos y observando al microscopio con objetivo de 10X y 40X, Se obtuvo mediante la observación al microscopio, evaluándose los movimientos progresivos en un rango de 0 a 100 dependiendo de la motilidad y el recorrido en línea recta de los espermatozoides.

c) Porcentaje de Espermatozoides Vivos y Muertos

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, se utilizó una gota de colorante eosina-nigrosina con una gota de semen y se realizó un frotis y se interpretó considerando que los espermatozoides no teñidos se encuentran vivos, mientras los espermatozoides teñidos se encuentran muertos; esto fue realizado en tres etapas, primero al momento de obtener la muestra fresco, después

cuando el eyaculado ya había sido diluido y mantenido en frío y finalmente al momento de ser descongelado (figura 3).

#### d) Morfología de los Espermatozoides

Después de contabilizar los espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina se calculó el porcentaje de anomalías primarias (desprendimiento de las cabezas, colas dobles, gota citoplasmáticas proximales y piezas medias dobles) y el porcentaje de anomalías secundarias (colas y cabezas normales desprendidas y colas enrolladas) (figura 3).

#### e) Evaluación Acrosomal

En las muestras se evaluó la integridad acrosomal en fresco, diluido y descongelado por la unión de un marcador de membranas de superficie Lectina Pisum Sativum FITC, la cual tiñe la membrana plasmática del espermatozoide. Se observaron al microscopio de fluorescencia. El porcentaje se evaluó de 0 a 100 (número de células teñidas de membranas plasmáticas intactas y células espermáticas con ruptura de la membrana plasmática); esto fue realizado en tres etapas, primero al momento de obtener la muestra fresco, después cuando el eyaculado ya había sido diluido y mantenido en frío y finalmente al momento de ser descongelado (figura 4).

### **Segunda Fase**

#### Procesamiento de Semen

El semen se dividió en dos fracciones una con el diluyente A (sin pasta Orvus) y la otra con el diluyente B (con pasta Orvus) (cuadro 3) la proporción en la dilución fue 1:1, se utilizó el mismo volumen de diluyente para la misma cantidad de semen.

#### Diluyentes

Los diluyentes fueron elaborados en Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM y contaron con las características e ingredientes mínimos

necesarios para la sobrevivencia del espermatozoide durante el congelamiento y descongelamiento; sin embargo, el diluyente B contó con un ingrediente extra el cual fue la pasta Orvus, que se utilizó como crioprotector de membrana plasmática y de fosfolípidos de superficie que son necesarios para la protección del acrosoma.

Cuadro 3. Ingredientes y cantidades de los diluyentes A y B en la crioconservación de semen canino.

<b>Ingredientes</b>	<b>Diluyente A*</b>	<b>Diluyente B**</b>
Tris	3.025 g	3.025 g
Fructosa	1.25 g	1.25 g
Ácido cítrico	1.7 g	1.7 g
Agua destilada	100 ml	100 ml
Yema de huevo	20 ml	20 ml
Glicerol	5 ml	5 ml
Estreptomicina	100 mg/100ml	100 mg/100ml
Bencilpenicilina	0.06 g	0.06 g
Pasta orvus	-----	1 ml

(\*Peña and Linde\_Fosberg 2000b; \*\*Róta *et al.*, 1995; \*\*Rota *et al.*, 1997; \*\*Tsutsui *et al.*, 2000 a, b, c).

#### Método de Congelación

Para realizar el proceso de congelación, el semen fue centrifugado a 700 g por 5 minutos para separar el plasma seminal del paquete celular espermático y así obtener una mejor viabilidad de los espermatozoides, posteriormente se agregaron los diluyentes A y B y se mantuvieron en baño María a 37°C, a continuación se disminuyó la temperatura progresivamente de 1°C en 1°C durante 60 minutos hasta alcanzar 5°C y por último se mantuvo en un periodo de equilibrio a la misma temperatura durante 120 minutos. Las muestras que resistieron el periodo de enfriamiento fueron envasadas en pajillas francesas de plástico de un volumen de

0.5 ml previamente identificadas con nombre, raza, edad y fecha. Una vez llenadas las pajillas fueron selladas con alcohol polivinílico (figura 3).

Las pajillas se colocaron en un gobelette en vapores de nitrógeno líquido iniciado a una altura de 12 cm, se bajaron 8 cm en 10 minutos hasta llegar a  $-145^{\circ}\text{C}$  (lo que equivale a disminuir 8 milímetros por minuto) los últimos 4 cm en 10 minutos  $-179^{\circ}\text{C}$  y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido a  $-197^{\circ}\text{C}$  (Dobriski *et al.*, 1993).

#### Evaluación Post-descongelado

La descongelación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos y se efectuó la evaluación de motilidad, viabilidad y porcentaje de membranas plasmáticas.

#### Marcador de Membrana

La integridad fue evaluada siguiendo la metodología descrita por Tesarik *et al.* (1993). Los espermatozoides fueron lavados dos veces por centrifugación con la solución Medio de Esperma Humano Hepes (HSM-H) solución buffer y el paquete celular resultante se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  del mismo medio para posteriormente realizar el frotis en un portaobjetos. Los frotis se dejaron secar a temperatura ambiente y después fueron fijados mediante su inmersión en metanol absoluto durante 30 segundos. Después de secados a temperatura ambiente, los frotis fueron cubiertos de una solución de Lectina Pisum Sativum Fluoroceinada conjugada con isothiosinato de fluoresceina FITC (Sigma) a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  en una solución amortiguadora de fosfatos de 0.05M pH 7.4 y posteriormente incubados en cámara húmeda de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Al final de ese periodo fueron lavados con agua destilada cinco veces y se aplicó un medio de montaje fluorescente (Dako). La evaluación de la integridad o reacción acrosomal se realizó con un microscopio de fluorescencia, determinando el porcentaje de espermatozoides con el patrón de fluorescencia en la superficie de la membrana plasmática y el segmento ecuatorial del espermatozoide.

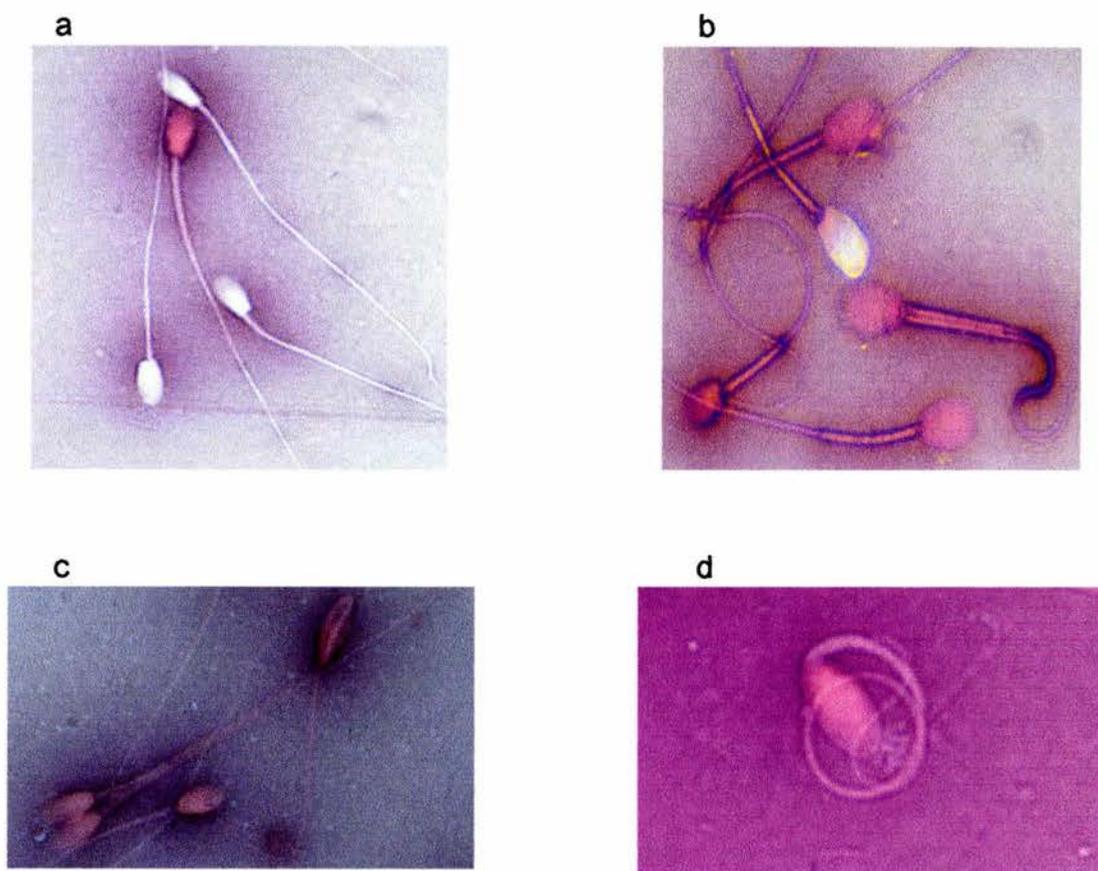
Para el análisis de unión de Lectina Pisum Sativum conjugada con isothiosinato de fluoresceína usada para cuantificar la integridad de la membrana plasmática y acrosómica del espermatozoide se considero que si la superficie de la membrana se tiño completamente, así como la presencia de una banda de fluorescencia exclusivamente en la parte media ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, esto indica que la integridad de la membrana acrosomal está intacta (figura 4).

### Microscopía

Las observaciones que se realizaron para determinar la captación de lectinas por la membrana plasmática de los espermatozoides fueron:

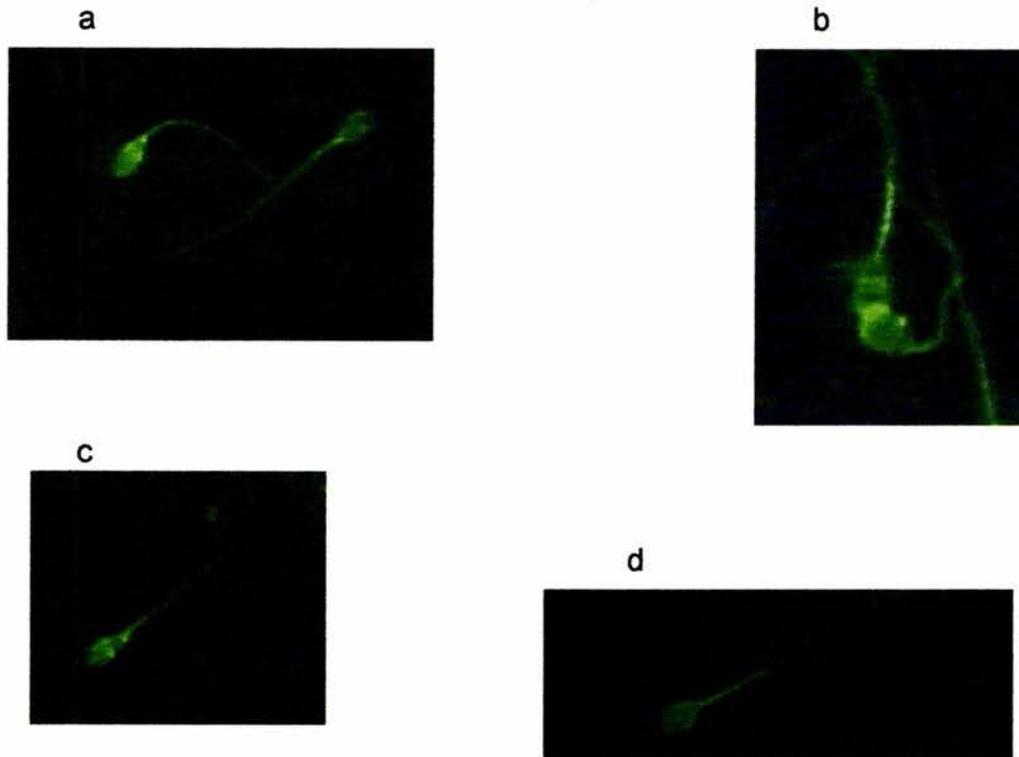
- a) Porcentaje de espermatozoides teñidos región post-acrosomal.
- b) Intensidad de fluorescencia observada como indicador de la intensidad de receptores.

Figura 3. Evaluación morfológica de espermatozoides de perro.



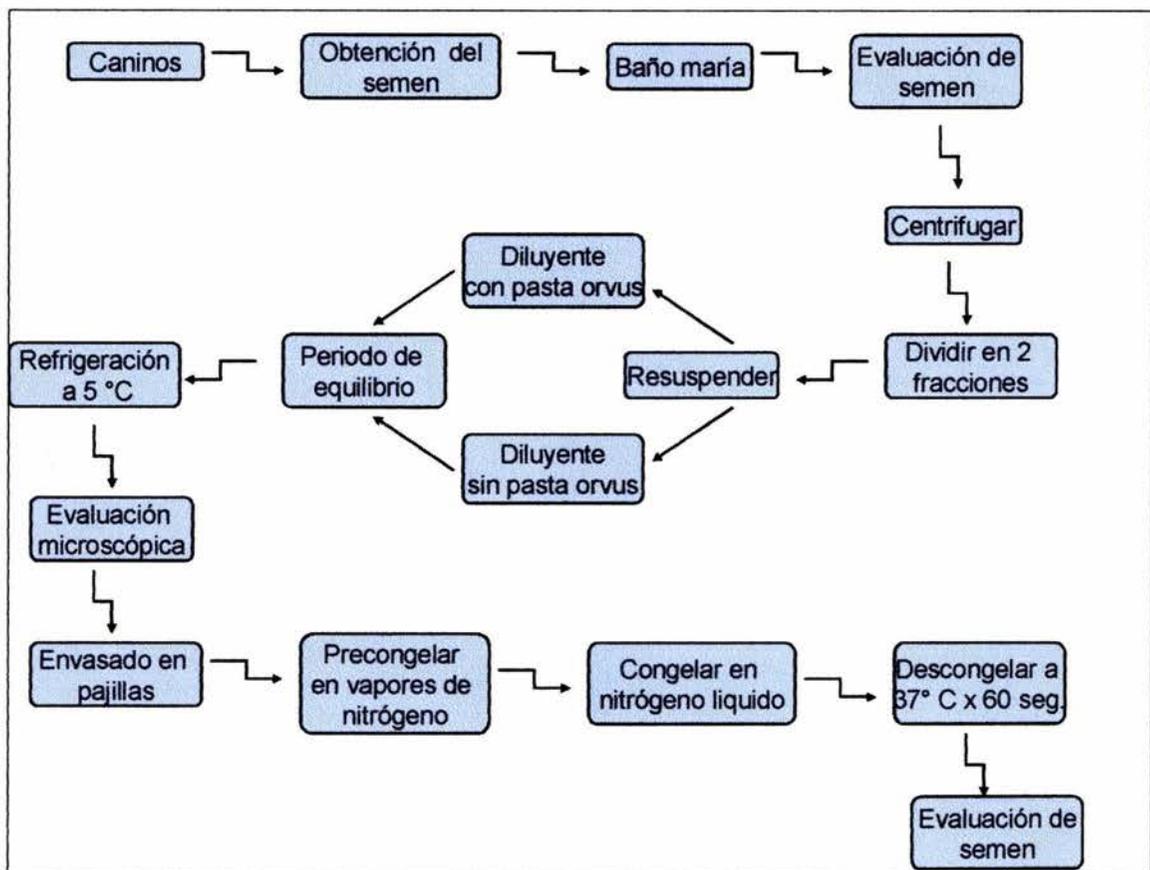
- a) Tinción eosina nigrosina, es un colorante de fondo que destaca la morfología del espermatozoide, en el cual se observa los espermatozoides vivos y un espermatozoide muerto.
- b) Tinción eosina nigrosina, se observan espermatozoides muertos ya que el colorante penetra la célula espermática.
- c) Anormalidad primaria, espermatozoide de doble cabeza en un mismo flagelo.
- d) Anormalidad secundaria, el flagelo está enrollado sobre la cabeza del espermatozoide.

Figura 4. Evaluación de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide de perro.



- a) Espermatozoides teñidos con Lectina Pisum Sativum FITC, se observa fluorescencia en región ecuatorial intacta.
- b) Espermatozoides teñidos con Lectina Pisum Sativum FITC, se logra observar fluorescencia en la porción apical del núcleo (acrosoma) y ligeramente una banda en la zona ecuatorial.
- c) Espermatozoide con ausencia parcial de la membrana plasmática, ya que solo hay fluorescencia en la zona ecuatorial del núcleo.
- d) Espermatozoide muerto, ausencia de la membrana plasmática y acrosomal, ya que no hay fijación de la tinción en la superficie plasmática.

Figura 5. Diagrama de flujo de congelación y descongelación de semen canino.



### Análisis Estadístico

Se utilizó un análisis estadístico de tablas que se determina como porcentiles de t de Student para comprobar si existe diferencia donde los valores de  $p < 0.05$  tienen significancia.

### 13. Resultados

Considerando los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

1. De los 63 perros muestreados y evaluados se encontró que sólo 52.4% (33/63) cumplieron los primeros criterios.
2. De los 33 animales seleccionados, 28.6% (18/33) no cumplieron ni superaron el segundo criterio de inclusión.
3. Lo que se representa que de los 63 animales muestreados 76.2% (48/63) no alcanzaron alguno de los parámetros o bien no resistían el proceso de dilución y enfriamiento.
4. Sólo el 23.8% (15/ 63) cumplieron con los criterios para el procesamiento de las muestras.

Las razas de los perros que resultaron seleccionados fueron: Pastor Alemán (2), Rottweiler (3), Labrador (1), Mastín Napolitano (1), Blood Hound (1), Cocker Spaniel (1) y Golden Retriever (1), así como Criollos (4), las edades oscilaron entre los 2 a 4 años (cuadro 4).

#### Colección y evaluación de semen

Después de ser colectado el semen, los resultados de la evaluación macroscópica fueron los siguientes:

- a) Volumen en el primero y segundo eyaculado fue similar para cada uno de los 15 perros. La media en el volumen de las muestras analizadas para el primer eyaculado fue 8.06 ml, para el segundo eyaculado una media de 8.1 ml (cuadro 5).

Cabe mencionar que los animales se trabajaron con un intervalo de 2 semanas (figura 6).

- b) Color del eyaculado, las muestras presentaron tres coloraciones diferentes; blancas, grisáceas y blanco lechosas en 5 animales para cada una de ellas. El pH de las 15 muestras analizadas osciló entre el 6.6 a 6.8 (cuadro 4).

Por lo que se refiere a la evaluación microscópica:

- a) La concentración expresada en millones de espermatozoides por ml en el *primer eyaculado* tuvo una media de 14.9 ml  $\pm$  1.83 y en el *segundo eyaculado* con una media de 14.2 ml  $\pm$  1.82 (cuadro 5, figura 5).
- b) El porcentaje de motilidad de los espermatozoides en fresco fue con una media de 81.6%  $\pm$  3.08 para el primer eyaculado de las 15 muestras (figura 8), en semen diluido y frío con el diluyente A la media fue de 63%  $\pm$  3.16, y para el diluyente B fue de 63%  $\pm$  2.53 y en el semen descongelado la media para el diluyente A fue de 46%  $\pm$  4.30 y para el B fue de 55%  $\pm$  4.62 (cuadro 6, figura 6). Para el segundo eyaculado en las muestras en fresco la media fue de 82%  $\pm$  2.53 (figura 8), para las muestras diluidas en el diluyente A la media fue de 68%  $\pm$  3.61 y para el B fue de 67.3%  $\pm$  4.16 y en las muestras del semen descongelado para el diluyente A presentaron una media del 47.6%  $\pm$  5.62 y en el diluyente B fueron 57.3%  $\pm$  4.57 (cuadro 7, figura 7).
- c) El porcentaje de espermatozoides vivos fue el siguiente: para el primer eyaculado en el semen fresco se obtuvo una media de 90.5%  $\pm$  4.12 (figura 11), en el eyaculado en frío con el diluyente A se obtuvo una media de 83.2%  $\pm$  4.21 y para el diluyente B fue de 84%  $\pm$  4.37 y para el eyaculado descongelado con diluyente A la media fue de 77.2%  $\pm$  4.87 y con el diluyente B la media fue de 81  $\pm$  4.34 (cuadro 8, figura 9). Durante el segundo eyaculado en fresco la media fue 89.2%  $\pm$  3.84 (figura 11), diluido y frío con el diluyente A la media fue 83.5%  $\pm$  4.64 y para el descongelado la media fue de 76.5%  $\pm$  4.94; con respecto al diluyente B, diluido y frío la

media fue  $84\% \pm 4.59$  y al descongelado la media fue de  $80.6\% \pm 4.37$ , para ambos diluyentes no se observó diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) (cuadro 9, figura 10).

- d) El porcentaje de membranas plasmáticas íntegras fue para el primer eyaculado de las muestras en fresco una media del  $96.8\% \pm 1.52$ , para el semen diluido y frío con el diluyente A la media fue de  $90.5\% \pm 1.64$  y en descongelado fue de  $86.3\% \pm 1.44$  y con el diluyente B para el semen diluido y frío se presentó una media de  $96.2\% \pm 1.47$  en semen descongelado mostró una media de  $93.8\% \pm 1.68$  (cuadro 10). Para el segundo eyaculado las muestras en fresco presentaron una media de  $97.06\% \pm 0.96$ , en el semen diluido y frío para el diluyente A los resultados mostraron  $91.46\% \pm 1.59$  y en el semen descongelado fueron  $87.33\% \pm 1.17$  y con respecto al diluyente B éste mostró una media en el semen frío de  $94.8\% \pm 1.32$  y para el semen descongelado fue de  $92.8 \pm 1.80$  (cuadro 11). No se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) en el diluyente B; sin embargo, si se obtuvo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el diluyente A. Entre los diluyentes A y B si hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de membranas plasmáticas y acrosomales íntegras, en el proceso de diluido y descongelado.

## 14. Discusión

Durante el proceso de congelación hay cambios fisicoquímicos de la membrana plasmática ocasionando que el espermatozoide no sea capaz de competir con aquellos espermatozoides que tengan íntegra su membrana, si la lesión va más allá de la plasmática y perfora la membrana acrosomal o hay una reacción acrosomal espontánea se liberan las enzimas acrosomales proteolíticas que ayudan digerir los elementos estructurales de los tejidos que todavía permanecen adheridos al óvulo. Otra enzima importante como la hialuronidasa que es indispensable para abrir el camino entre las células de la granulosa de forma que el espermatozoide pueda alcanzar el óvulo, si las lesiones en la membrana plasmática suceden durante el proceso de congelación y descongelación ocasiona la muerte celular del espermatozoide (Guyton y Hall 1997, Rota *et al.* 1998). Es por ello, que un eyaculado que se desee congelar debe ser de buena calidad tomando en cuenta parámetros macroscópicos y microscópicos.

La evaluación macroscópica consta de:

- a) El volumen está determinado por la raza, talla del perro; sin embargo, el volumen del primer eyaculado da un promedio de  $8.06 \pm 1.859$  ml y el segundo eyaculado un promedio de  $8.1 \pm 1.692$  ml. Durante el presente estudio estos resultados son similares a los reportados por England (1993, 1999) y por Johnston *et al.* (2001), ya que indican un rango de 6 a 11 ml de acuerdo a las raza y talla de perros utilizados (cuadro 4, figura 4).
  
- b) El color normal del semen canino varía de gris transparente hasta blanco lechoso, dependiendo directamente de la concentración espermática. En cuanto a esta característica macroscópica de los eyaculados obtenidos en el estudio es semejante a los mencionados por England (1993) y Johnston *et al.* (2001) (cuadros 4 y 5).

La evaluación microscópica consta de:

a) La motilidad progresiva debe ser mayor a 75% ya que al momento de procesar el eyaculado con el diluyente y pasar por un periodo de equilibrio y ser congelado y descongelado su motilidad disminuye hasta un 20%, de acuerdo a los estudios por Dobrinski (1993). Los eyaculados en fresco, tuvieron una motilidad espermática progresiva superior al 75%, este dato coincide con lo recomendado por Dobrinski (1993), Oettlé (1993), Linde-Fosberg (1995), Tsutsui *et al.* (2000 a,b y c), Sirivaidyapong *et al.* (2000) y Rigau *et al.* (2002) ya que han observado que para congelar un semen de perro este debe ser superior a 75%. Los eyaculados diluidos y descongelados con el diluyente A mostraron una motilidad progresiva que fue similar a los estudios por Dobrinski (1993), Oettlé (1993), Linde-Fosberg (1995), Tsutsui *et al.* (2000 a,b y c). Rota *et al.* (1998 y 1999), Tsutsui *et al.* (2000a, b y c). en el que obtuvieron un mayor porcentaje de motilidad progresiva post descongelado utilizando la pasta Orvus; Sin embargo, estos estudios valoraron motilidad, tiempo de sobrevivencia y la integridad de la membrana acrosomal del espermatozoide está se evaluó con la triple tinción obteniéndose buenos resultados.

Al analizar los diluyentes A y B en el proceso de diluido y frío, la motilidad progresiva presenta resultados similares con otros estudios por Linde-Fosberg (1995), Rota *et al.* (1998), Peña and Linde-Forsberg (2000a y b) y no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.01$ )

La motilidad progresiva de los eyaculados diluidos y descongelados con los dos diluyentes A y B se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, la motilidad no es un sinónimo de semen de buena calidad y esto lleva a coincidir con los estudios de Dobrinski (1993), England (1993), Rota *et al.*

(1998); ya que no todas las muestras de semen de perro se pueden diluir o congelar.

- a) En cuanto a espermatozoides vivos en fresco, diluido y descongelado los porcentajes encontrados son superiores a lo reportado en otros estudios cuando se utilizan diferentes crioprotectores de membrana, así como también cuando se emplea la pasta Orvus. (Peña and Linde-Forsberg 2000a y b).

Los espermatozoides no teñidos se encuentran vivos, mientras los espermatozoides teñidos se encuentran muertos por la ruptura de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa. (Rota *et al.* 1998). Tanto en el primero como en el segundo eyaculado de los 15 perros no existe diferencia en el porcentaje observado de espermatozoides vivos en relación a los parámetros establecidos para la congelación.

Cuando se congelan espermatozoides se recomienda considerar 80% de viabilidad (England 1999, Tsutsui *et al.* 2000 a,b y Linde-Fosberg 2000).

Las características del espermatozoide que se correlacionan de manera estrecha con la fecundidad son concentración, motilidad progresiva y la morfología espermática. Con la finalidad de que los machos se consideren aceptables o aptos para la crianza o reproducción, su análisis debe superar los criterios antes mencionados.

- b) La concentración esta determinada por el número de espermatozoides por mililitro de semen, y es una característica variable por que tiene relación con el volumen del eyaculado. Durante el estudio, la concentración promedio de espermatozoides en los 30 eyaculados fue de  $14 \times 10^7$ /ml, por lo que se ubica dentro de los rangos de 10 a  $20 \times 10^7$  /ml reportado por Dobrinski (1993), England (1999), Ivanova-Kicheva *et al.* (1997) y Johnston

*et al.* (2001). Es importante la determinación precisa del número de los espermatozoides por mililitro de semen, ya que en base a esto se determina en cuantas dosis puede dividirse y por lo tanto decidir a cuantas hembras puede inseminarse con un número óptimo de células espermáticas.

- c) El uso de la pasta Orvus es viable sobre la membrana plasmática ya que con estos resultados podemos garantizar que la membrana acrosomal externa del espermatozoide se encontró intacta en más células espermáticas del diluyente B. La adición de la pasta Orvus más glicerol como crioprotectores de membrana plasmática y acrosomal al diluyente cumplen con su finalidad durante el proceso de congelación y descongelación con una motilidad progresiva superior al 70% y 80%. Al realizar un análisis estadístico ( $p < 0.05$ ), se observó que se existe una diferencia significativa entre ambos diluyentes (cuadro 9 y 10).

Es importante considerar que los crioprotectores son esenciales en la sobrevivencia de las células durante la criocconservación, se ha encontrado que presentan efectos protectores y osmóticos sobre la membrana plasmática en el proceso de congelación y descongelación. Para evaluar la integridad y estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal externa se empleo la Lectina Pisum Sativum FITC. Las lectinas son proteínas específicas que se unen a los glucolípidos que se encuentran en la superficie de la membrana del espermatozoide, cabe mencionar que esta unión solamente ocurre cuando la membrana esta intacta y completa, por lo tanto, si existe una lesión o ruptura parcial de esta no se lleva a cabo la unión y en el espermatozoide se observa la ausencia de un segmento de dicha membrana, mientras que cuando la ruptura es total no se observa fluorescencia en todo el espermatozoide.

Los espermatozoides congelados con el diluyente A sin pasta Orvus, al añadirles las Lectinas Pisum Sativum FITC la tinción de la superficie de la membrana plasmática fue escasa y se lograron observar núcleos fluorescentes, indicando que existía daño membranar. Al emplear el diluyente B, el cual contenía pasta orvus, se identifico menor porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas. Se determinó que sí existía diferencia estadística entre el diluyente A y B lo cual indica que un mayor número de espermatozoides contaron con la integridad acrosomal observándose más células con fluorescencia superficial (figura ) (cuadro 10).

Las propiedades físicas del espermatozoide son importantes para su funcionamiento *in vivo*, cuando la viabilidad espermática se ve afectada puede originar una reducción en la habilidad del espermatozoide para interactuar con el óvulo. La composición de la membrana plasmática del espermatozoide es un factor importante en el proceso de capacitación y de la reacción acrosomal (Wolfe *et al.* 1998; James *et al.* 1999). Por lo que la conservación de las proteínas de superficie son importantes como dominios para la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosomal. La remoción y absorción de los componentes de la membrana plasmática como proteínas de superficie, se sabe que es un prerequisite para la capacitación.

En la evaluación acrosomal se determinó que si existió diferencia significativa entre el uso de pasta Orvus en el diluyente B con respecto al diluyente A que no contenía dicha pasta

## 15. Conclusión

La biología estructural de la membrana plasmática del espermatozoide ha tomado especial interés en el área de la biología reproductiva de los mamíferos. En general la membrana espermática no difiere mucho en comparación con las membranas biológicas en cuanto a su estructura en mosaico fluido donde existen interacciones de proteínas – lípidos. Está constituida por fosfolípidos, glicolípidos y esteroides. La adición de un crioprotector como la pasta Orvus al diluyente de semen canino puede ayudar a dar estabilidad en el proceso de congelación y descongelación.

Los últimos estudios en semen canino para el uso de ingredientes y metodologías de congelación con diluyentes, han llevado a una polémica sobre el uso de ciertas sustancias que incrementan la motilidad progresiva al descongelado. El uso de la pasta Orvus es recomendable durante la congelación y descongelación del semen canino.

El uso de marcadores de superficie membranal como la Lectina Pisum Sativum FITC es una nueva herramienta para la valoración de la integridad de la membrana plasmática y con ello la integridad acrosomal del espermatozoide en los mamíferos. Sin embargo, a pesar, de los buenos resultados recientemente obtenidos en el proceso de congelación no se han alcanzado las condiciones ideales para que los espermatozoides estén íntegros al descongelado. Por lo que se quizá se debe de continuar en estudios de este tipo.

Para aumentar el éxito en las técnicas *in vitro* en la crioconservación de gametos, es necesario perfeccionar las técnicas de evaluación permanente de los espermatozoides. En este sentido, los espermatozoides de buena calidad pueden ser utilizados después de descongelados, tomando en consideración el porcentaje de acrosomas normales, ya que de ello dependerá el mejor manejo de los gametos en la especie canina y otros mamíferos, y sobre todo en aquellos

animales en peligro de extinción. Por lo tanto es recomendable el uso de la pasta Orvus, ya que este crioprotector ayuda a mantener mayor número de células espermáticas íntegras durante el proceso de congelación y descongelación del semen canino y que estos espermatozoides son capaces de fecundar un óvulo.

## 16. Literatura Citada.

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología Molecular de la Célula*. 3ª ed. Barcelona: Omega; 1994.
2. Ahluwalia A, Farshori P, Jamuar M, Baccetti B and Anderson W A. Specific localization of lectins in boar and bull spermatozoa. *Surmicrosc Cytol. Pathol.* 1990; 22 (1): 53-63
3. Carlson MB. *Embriología Básica de Patten*, 5ª ed. México D. F. McGraw-Hill Interamericana 1990.
4. Carlson MB. *Human Embryology and Developmental*. 1a ed. Ciudad USA: Mosby. 1994.
5. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59:7-11.
6. Chavarria ME, Rosado AG, Reyes AF. Algunos aspectos sobre la regulación bioquímica en el testículo. *Perinatol Reprod Hum* 1994; 5: 52-7.
7. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD and Post K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *Journals of Reproduction and Fertility*. 1993; 47: 291-296.
8. Eddy ME and Obrien AD. The espermatozoon. In: Knobil E and Neil JD. *The Physiology of Reproduction*. Second Edition Revent Press, New York. 1994: 29-62.
9. England GCW. Cryopreservación of dog semen: a review. *Journals of Reproduction and Fertility*. 1993; 47: 243-255.
10. England GCW. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 1999; 52: 981-986.
11. England GCW. and Ponzio, P. Comparison of the quality of frozen. Thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 1996; 46: 165-171.
12. England GCW. and Plummer J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journals of Reproduction and Fertility* 1993; 47: 261-270.
13. Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal reproduction Science*. 1996; 42: 251-260.

14. Feldman EC y Nelson RW. *Endocrinología y Reproducción en Perros y Gatos*. 2ª edición. México D. F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2000.
15. Frandson DR and Spurgeon LT. *Anatomía y fisiología de los animales domésticos*. 6ª Edición. México D.F. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1998.
16. Frase LR. Sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl1): 9-12.
17. Fontbonne A and Badinand. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *Journals of Reproduction and Fertility*, 1993 47 (Suppl): 531-532.
18. Guyton CA y Hall EJ. *Tratado de fisiología médica*. 9ª Edición. México D. F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1997.
19. Guzmán GAM y González MMT. Lack of voltaje-dependent calcium channel opening during the calcium influx induced by progesterona in human sperm. Effect of calcium channel deactivación and inactivación. *Journal of Andrology*. 2004 25: 117-122.
20. Hafez ESE. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 8ª Edición. México. Editorial McGraw- Hill, 1997.
21. Hernández DP, Martín GO, Rodríguez de Pablos VY y Ganem BFA. Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 1999; 15 (2): 91-95.
22. Hewitt DA, Sheldon IM and England GCW. Criopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 2001; 67: 101-111.
23. Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N and Somlev B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology*, 1997; 48: 1343-1349.
24. James PS, Wolfe CA, Mackie A, Ladha A, Prentice A, Jones R. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved. *Hum Reprod* 1999; 14: 1827-32.

25. Johnston S, Rott KMV and Olson PNS. Canine and Feline Theriogenology. 1a edición. USA: W.B. Saunders Company. 2001.
26. Karp G. Biología celular y molecular. 4a edición. México D. F. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1995.
27. Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D and Wrefrod N. Spermatogenesis. Hum Reprod 1998; 13 (Supl 1): 1-8.
28. Kirk WR. Terapéutica veterinaria de pequeños animales. XII edición. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1995.
29. Koehler JK. Lectins as probes of spermatozoon surface. Archives of Andrology. 1981; 6: 197-217.
30. Linde-Forsberg C. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. In: Recent advances in small animal reproduction. Eds. PW Concannon, G. England and J. Verstegen. 2001.
31. Linde-Forsberg C. Artificial Insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 1995; 1: 48-50
32. Linde-Forsberg C and Fosberg M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. Journals of Reproduction and Fertility 1993; 47: 313-323.
33. Linde-Forsberg C, Ström Holst B and Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology 1999; 52: 11-23.
34. Mc Donald LE y Pineda MH. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. 4ta edición. Mexico D.F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1989.
35. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 2138-46.
36. Oettlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. Journals of Reproduction and Fertility 1993; 47: 257-260.

37. Parks JE and Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992; 38: 209-222.
38. Peña A, Barrio, LA and Herradón PG. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 1998; 50: 163-174.
39. Peña A and Linde-Forsberg C. Effects of equex, one or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000a; 54: 859-875.
40. Peña A and Linde-Forsberg C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000b; 54: 703-718.
41. Pinto CRF, Paccamonti DL and Eilts BE. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 1999; 52: 609-616.
42. Prasandth V and Mathai E. Freezing of buck semen with different glycerol concentrations. *Journal of Veterinary and Animal Science* 1996; 27: 86-90
43. Remohi J, Pellicer A, Bonilla-Musoles F. *Avances en Reproducción Asistida*. 3a edición Madrid, España: Editorial Díaz de Santos; 1992.
44. Rigau T, Farre M, Ballester J, Mogas T, Peña A and Rodriguez-Gil J. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 2001; 56: 801-815.
45. Rijsselaere T, Van-Soom A, Maes D and De Kruif A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002; 57: 1669-1681.
46. Rota A, Strom B and Linde-Fosberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 1995; 44: 885-900.
47. Rota A, Strom B, Linde-Fosberg C and Rodriguez-Martinez H. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093-1101.

48. Rota A, Peña AI, Linde-Fosberg C and Rodríguez-Martínez H. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science* 1999; 57: 199-215.
49. Rota A, Linde-Fosberg C, Vannozzi J, Romagnoli S and Rodríguez-Martínez H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Animal Reproduction Science* 1998; 55: 355-360.
50. Scialli A, Zinaman MJ. *Reproductive Toxicology and Fertility*. McGraw-Hill; 1993.
51. Scott FG. *Developmental Biology*. 5a edición USA: Sinaver Associates Inc. Publishers 1997.
52. Sharon N. Lectinas. *Investigación y Ciencia* 1997; 11: 90-100.
53. Silva LDM, Onclin K, Lejeune B and Verstegen JP. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*. 1996; 138: 154-157.
54. Silva LDM, Onclin K, Snaps F and Verstegen JP. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 1995; 43: 615-623.
55. Silva LDM and Verstegen JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 1995; 44: 571-579.
56. Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM and Colenbrander B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 2000; 53: 789-802.
57. Ström B, Rota A and Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 247-256.
58. Stornelli A, Corrada Y y Gobello C. Evaluación del semen canino. *Veterinaria Argentina* 1999; 158: 630-637.

59. Tesarik J, Mendoza C and Carreros A. Fast acrosome reaction measure a highly sensitive method for evaluating stimulus – induced acrosome reaction. *Fert. Steril.* 1993; 59: 424-301.
60. Therein J, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 1998; 59 :(17) 68-76.
61. Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T and Kawakami E. Effects of Orvus ES Paste on canine spermatozoa longevity after freezing and thawing. *Journal Veterinary Medical Science* 2000a; 62: 533-535.
62. Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komorita K, Shimizu N, Nagakumo K and Kawakami E. Effects of addition of Orvus ES Paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *Journal Veterinary Medical Science* 2000b; 62: 537-538.
63. Tsutsui T, Hase M, Tanaka A, Fujimura N, Hori T, Ito T and Kawakami E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of Orvus ES Paste-supplemented egg Yolk Tris-fructose citrate. *Journal Veterinary Medical Science* 2000c; 62: 603-606.
64. Visconti PE, Satewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon JG. Roles of bicarbonate, cAMP and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of Hamster sperm. *Biol Reprod* 1999; 61:76-4.
65. Weinbauer GF and Wesselg J. Paracrine control of spermatogenesis. *Andrología* 1999; 31: 249-2.
66. Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladka S and Jones R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1506-14.
67. Zabludovsky N, Eltes F, Har-Even D, Geva E, Berkovitz E, Amit A, Barak Y, Bartoov B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters an IVF out come. *Andrología* 1999; 31: (9) 1-8.

## 17. ANEXOS

### Cuadros

Cuadro 4. Raza, edad, color y pH de los eyaculados de los perros

N°	Raza	Edad	Color del eyaculado	pH
1	Pastor Alemán	4 años	Grisáceo	6.6
2	Pastor Alemán	2.5 años	Grisáceo	6.6
3	Rottweiler	3 años	Blanco	6.7
4	Rottweiler	4 años	Blanco	6.8
5	Rottweiler	3 años	Grisáceo	6.8
6	Labrador	2 años	B. lechoso	6.6
7	Mastín Napolitano	2 años	B. lechoso	6.7
8	Blood Hound	2 años	Blanco	6.7
9	Criollo	2 años	B. lechoso	6.8
10	Criollo	4 años	Grisáceo	6.7
11	Criollo	3 años	Blanco	6.6
12	Criollo	2.5 años	B. lechoso	6.6
13	Criollo	3.5 años	Grisáceo	6.8
14	Cocker Spaniel	2 años	Blanco	6.7
15	Golden Retriever	2 años	B. lechoso	6.7

Cuadro 5. Volumen del eyaculado y concentración de espermatozoides por perro en el primero y segundo eyaculado

N° perros	Volumen en ml		Concentración millones/ml	
	1er eyaculado	2do eyaculado	1er eyaculado	2do eyaculado
1	9.5	9	15 x 10 <sup>7</sup>	15 x 10 <sup>7</sup>
2	8.5	8.5	17 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
3	8	8.5	14 x 10 <sup>7</sup>	12 x 10 <sup>7</sup>
4	10.5	10	13 x 10 <sup>7</sup>	13 x 10 <sup>7</sup>
5	8	8	14 x 10 <sup>7</sup>	12 x 10 <sup>7</sup>
6	9	8.5	16 x 10 <sup>7</sup>	17 x 10 <sup>7</sup>
7	11	11	17 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
8	9	9	12 x 10 <sup>7</sup>	13 x 10 <sup>7</sup>
9	5	5.5	18 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
10	5	5	13 x 10 <sup>7</sup>	13 x 10 <sup>7</sup>
11	10	10	15 x 10 <sup>7</sup>	14 x 10 <sup>7</sup>
12	6.5	7	17 x 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>7</sup>
13	7.5	7.5	14 x 10 <sup>7</sup>	14 x 10 <sup>7</sup>
14	6	6	13 x 10 <sup>7</sup>	11 x 10 <sup>7</sup>
15	7.5	8	16 x 10 <sup>7</sup>	15 x 10 <sup>7</sup>
media	8.06	8.1	14.93	14.2
D.E.	1.859	1.692	1.83	1.82

Cuadro 6. Porcentaje de motilidad progresiva 1er muestreo

Porcentaje de motilidad progresiva					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	80	65	65	55	65
2	85	60	60	45	55
3	80	65	60	45	60
4	85	60	60	40	50
5	75	65	65	45	50
6	85	65	65	50	55
7	80	60	60	45	50
8	80	70	65	50	55
9	85	60	60	50	55
10	80	60	65	40	50
11	85	65	65	45	60
12	80	60	65	40	55
13	85	65	65	50	60
14	80	60	60	45	50
15	80	65	65	45	55
<b>Media</b>	81.66	63	63	46	55
<b>D.E.</b>	3.086	3.162	2.535	4.309	4.629

A\* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

B\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

se encontró diferencia significativa entre el diluyente A y B respecto a la motilidad progresiva post descongelado ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 7. Porcentaje de motilidad progresiva 2do muestreo

Porcentaje de motilidad progresiva					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	80	70	70	60	65
2	80	65	65	50	60
3	85	65	70	55	60
4	85	70	60	40	50
5	80	75	75	50	60
6	80	65	65	50	55
7	85	65	65	45	55
8	80	70	65	45	55
9	80	70	65	50	60
10	85	65	65	40	55
11	80	65	65	45	60
12	80	70	70	40	55
13	85	75	75	50	65
14	80	70	70	50	50
15	85	65	65	45	55
<b>Media</b>	82	68.3	67.3	47.6	57.33
<b>D.E.</b>	2.535	3.618	4.169	5.627	4.577

A\* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

B\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

se encontró diferencia significativa entre el diluyente A y B respecto a la motilidad progresiva post descongelado ( $p < 0.05$ )

Cuadro 8 Porcentaje espermatozoides vivos en el primer eyaculado

Porcentaje de espermatozoides vivos					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	95	85	85	77	79
2	90	84	85	80	82
3	85	80	80	75	78
4	90	85	86	76	81
5	95	89	90	85	88
6	98	90	91	85	89
7	89	80	81	75	77
8	87	82	84	74	80
9	85	80	80	70	76
10	95	89	90	83	85
11	93	85	85	82	84
12	88	75	75	70	73
13	85	79	80	74	79
14	92	85	85	78	82
15	91	81	83	74	82
media	90.5	83.2	84	77.2	81
D.E.	4.12	4.216	4.375	4.872	4.342

A\* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

B\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

se encontró diferencia significativa entre el diluyente A y B respecto a los espermatozoides vivos post descongelado (p<0.05)

Cuadro 9 Porcentaje de espermatozoides vivos en el segundo eyaculado

Porcentaje de espermatozoides vivos					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	90	85	85	77	79
2	88	82	80	75	78
3	85	83	82	75	78
4	90	84	86	77	82
5	95	90	90	85	88
6	95	90	91	84	88
7	89	80	81	73	78
8	85	82	83	74	81
9	85	80	80	70	77
10	95	89	90	82	86
11	90	84	85	79	82
12	85	73	75	69	72
13	85	80	80	70	77
14	93	89	89	79	81
15	89	82	83	79	82
media	89.2	83.5	84	76.5	80.6
D.E.	3.844	4.642	4.598	4.94	4.371

\* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

se encontró diferencia significativa entre el diluyente A y B respecto a los espermatozoides vivos post descongelado ( $p < 0.05$ ).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 10 Porcentaje de Membranas plasmáticas y acrosomales normales, con Lectina Pisum Sativum FITC en el primer eyaculado.

Porcentaje de acrosomas normales					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	98	94	98	89	96
2	97	93	97	86	95
3	95	90	95	84	90
4	95	88	94	85	92
5	97	91	96	88	94
6	96	90	96	87	95
7	98	90	97	87	95
8	99	92	98	88	95
9	99	91	97	86	94
10	98	91	98	86	95
11	95	89	94	86	92
12	95	90	95	85	93
13	95	88	94	84	92
14	97	91	97	87	95
15	98	90	97	87	95
Media	96.8	90.5	96.2	86.3	93.8
D.E.	1.521	1.641	1.473	1.447	1.684

A\* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

B\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

Se encontró diferencia significativa entre los diluyentes A y B en el porcentaje de acrosomas normales para el diluido en frío y descongelado ( $p < 0.05$ ). Para el diluyente "B" estadísticamente no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en diluido frío y congelado.

Cuadro 11 Porcentaje de Membranas plasmáticas y acrosomales normales, con Lectina Pisum Sativum FITC en el segundo eyaculado.

Porcentaje de acrosomas normales					
N° perro	Fresco	Diluido en frío		Descongelado	
		A*	B**	A*	B**
1	99	94	97	88	95
2	97	94	93	87	94
3	96	90	93	85	92
4	96	89	94	86	91
5	96	90	94	89	92
6	97	91	95	86	94
7	98	92	96	89	94
8	98	93	96	88	91
9	98	93	96	88	94
10	97	92	93	88	90
11	96	89	94	87	91
12	96	91	94	87	92
13	97	91	96	86	92
14	97	91	95	88	95
15	98	92	96	88	96
<b>Media</b>	97.06	91.46	94.8	87.33	92.86
<b>D.E.</b>	0.9611	1.5976	1.3201	1.1751	1.8073

A \* Sin agregar al diluyente pasta Orvus

B\*\*Agregando pasta Orvus al diluyente

Se encontró diferencia significativa entre los diluyentes A y B en el porcentaje de acrosomas normales para el diluido en frío y descongelado ( $p < 0.05$ ). Para el diluyente "B" estadísticamente no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) en diluido frío y congelado.

## Figuras

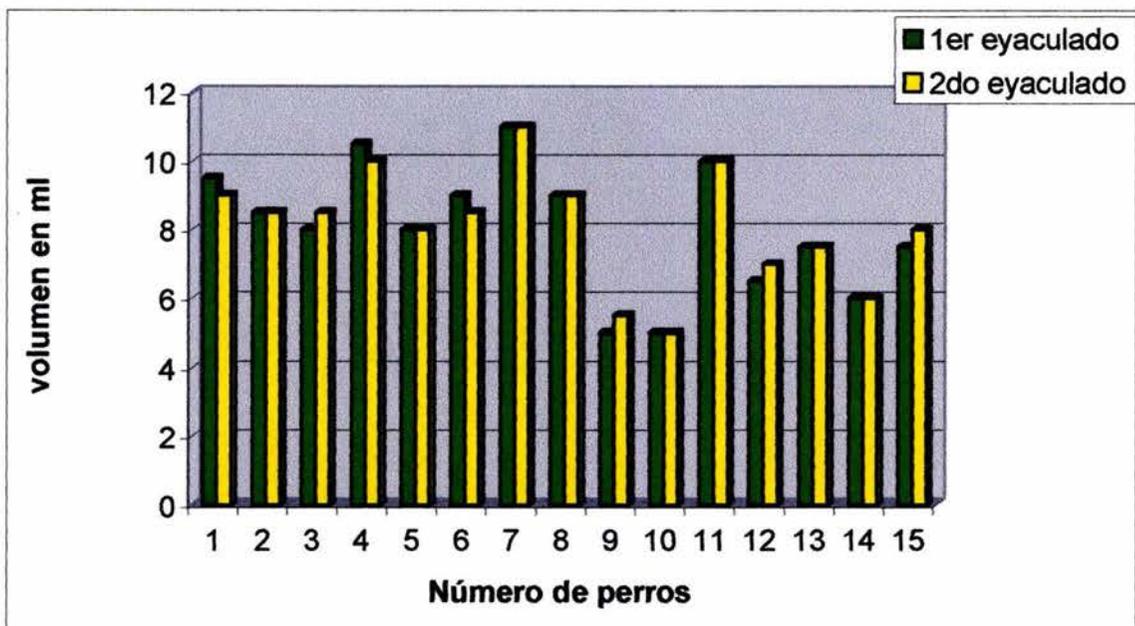


Figura 6. Volumen en mililitros del eyaculado uno y dos por cada perro muestreado.

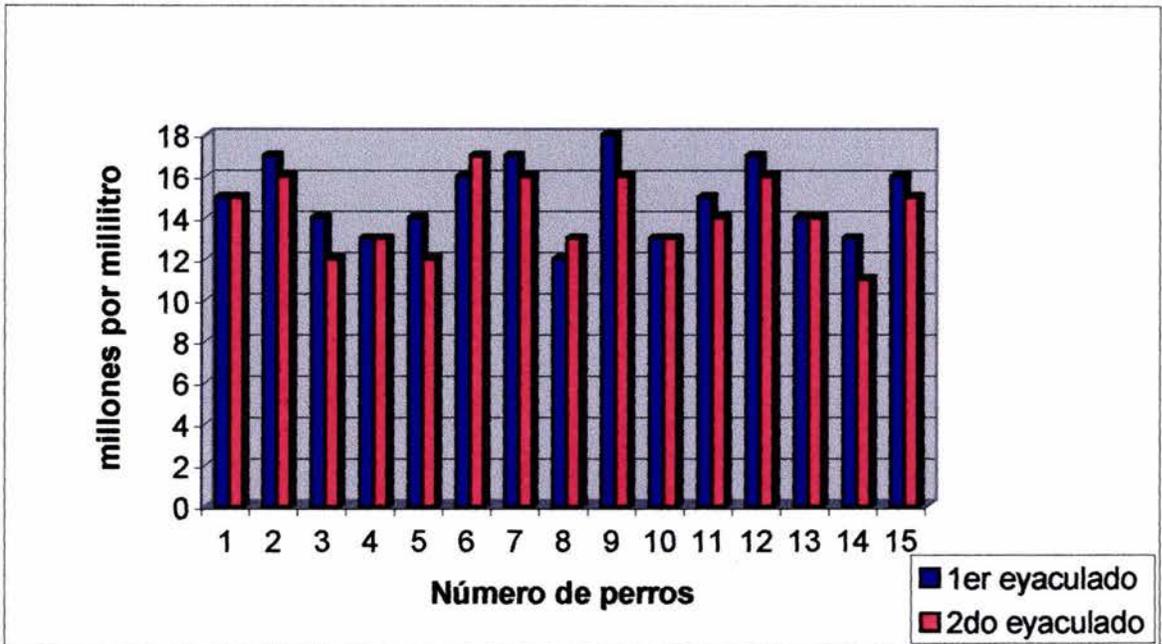


Figura 7. Concentración espermática en millones por mililitro de cada uno de los animales en el primero y segundo eyaculado.

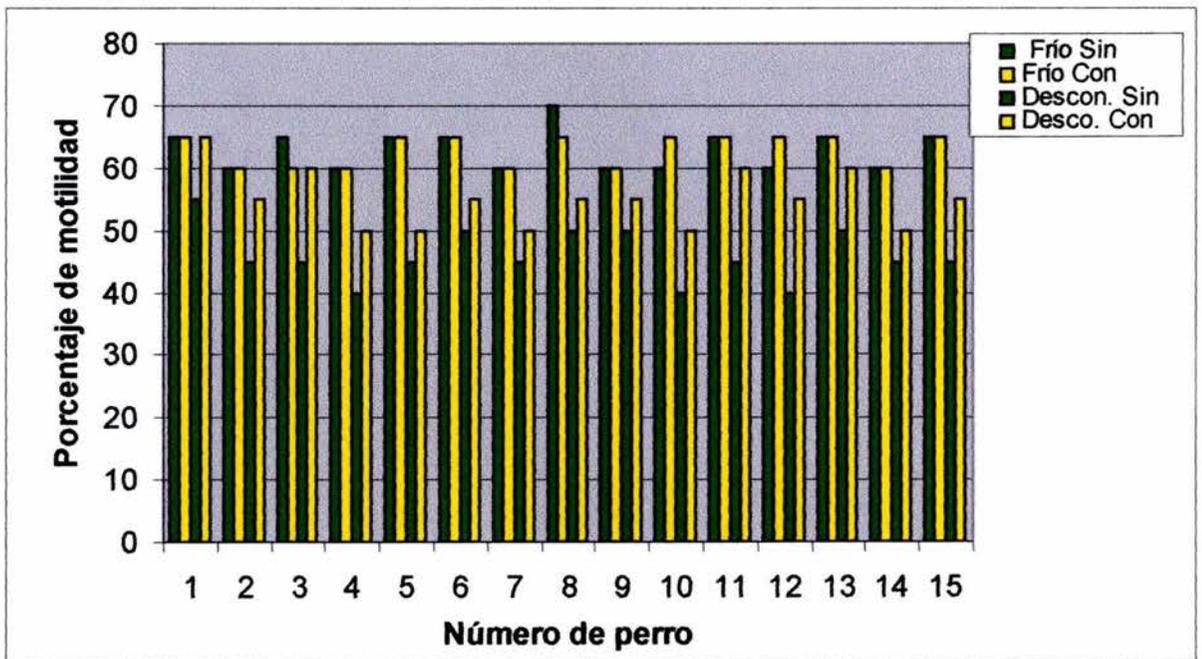


Figura 8. Porcentaje de motilidad progresiva en el primer eyaculado del semen frío y descongelado comparando el uso de la pasta Orvus.

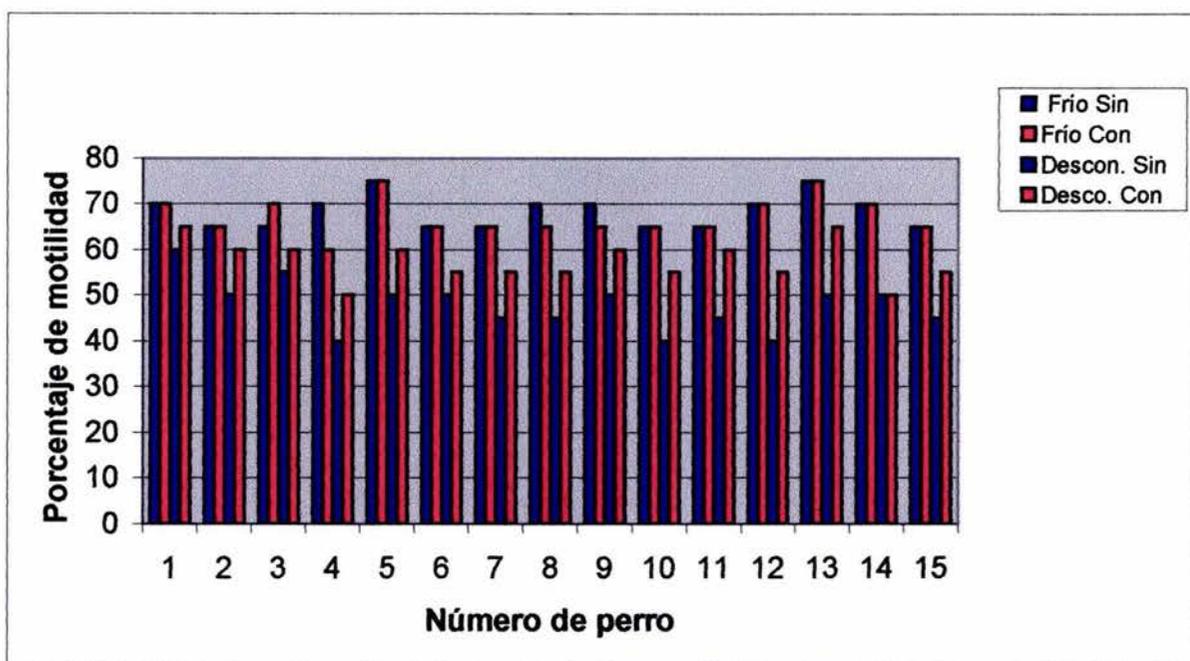


Figura 9. Porcentaje de motilidad progresiva en el segundo eyaculado del semen frío y descongelado comparando el uso de la pasta Orvus.

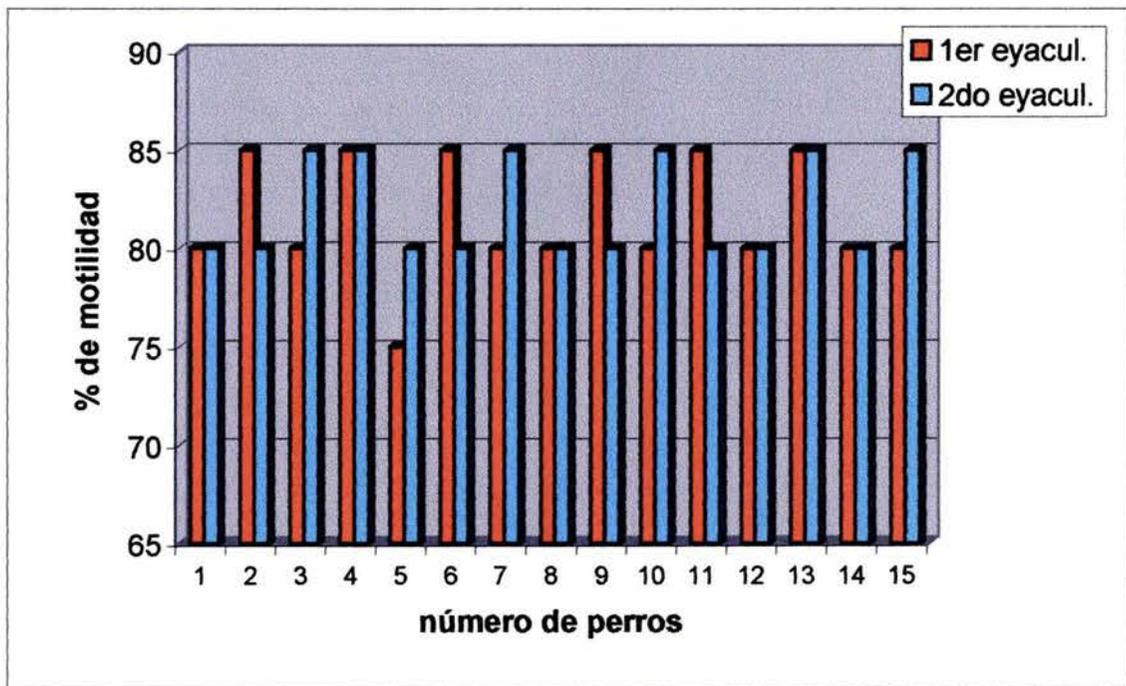


Figura 10. Porcentaje de motilidad progresiva en el semen fresco (0-100%) por cada uno de los perros en el primero y segundo eyaculado.

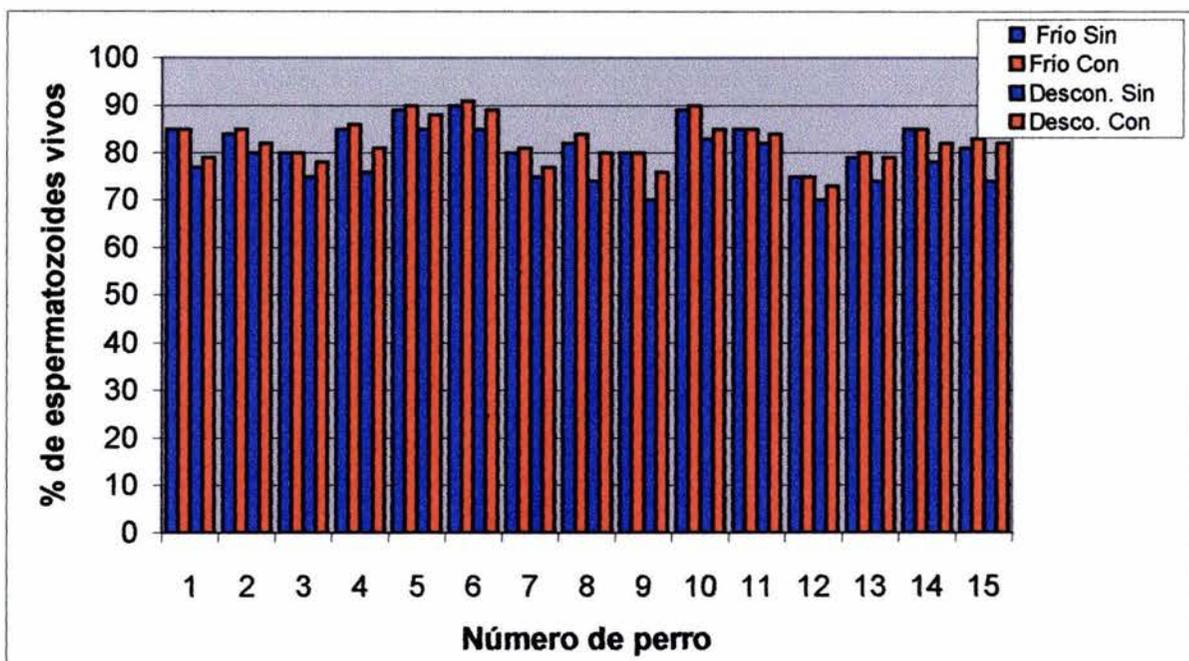


Figura 11. Porcentaje de espermatozoides vivos en el primer eyaculado del semen frío y descongelado comparando el uso de la pasta Orvus.

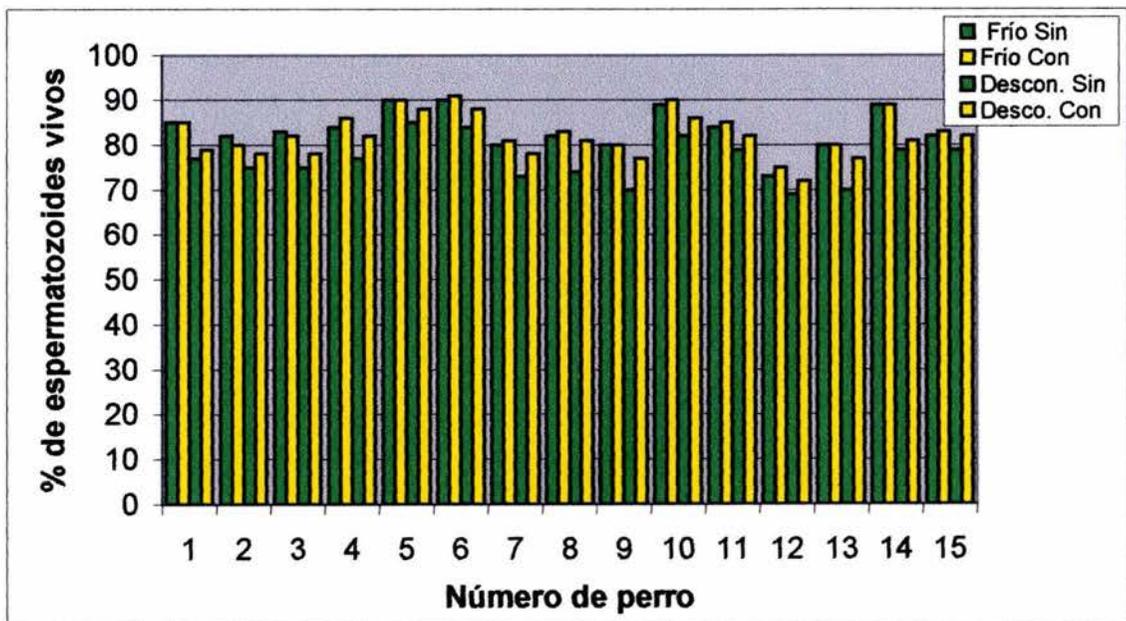


Figura 12. Porcentaje de espermatozoides vivos en el segundo eyaculado del semen frío y descongelado, comparando el uso de la pasta Orvus.

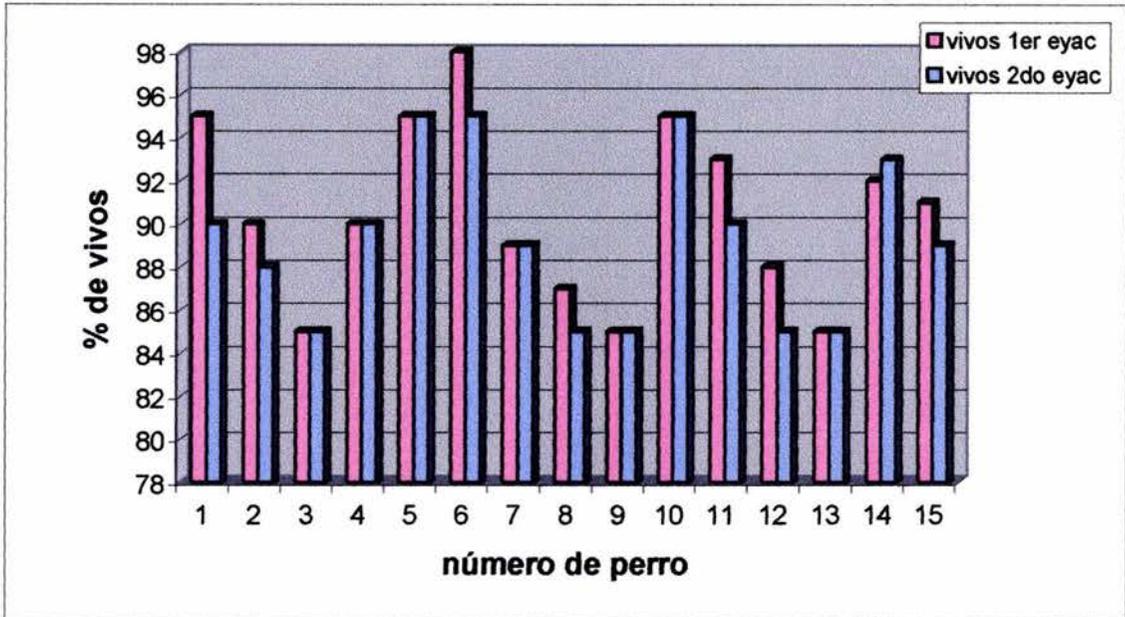


Figura 13. Porcentaje de espermatozoides vivos de los perros durante el primero y segundo eyaculado de semen.