

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO DEL ADICIONAR ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6  
A UN DILUYENTE PARA LA CRIOPRESERVACIÓN  
DE SEMEN EN EL PERRO DOMÉSTICO.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**LUIS EDUARDO MARÍN CABALLERO**

ASESORES:

MVZ MPA. JUAN ALBERTO BALCÁZAR SÁNCHEZ.  
MVZ DR. ANTONIO ISMAEL PORRAS ALMERAYA.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI ABUELITA ELENA.**

A usted que sin dudarlo, es y seguirá siendo el pilar más importante en mi vida, un ejemplo de orgullo, esfuerzo y templanza, usted que fue una de las personas que confió plenamente en mí, usted que con cada esfuerzo y dedicación fue forjando en mí el carácter y la fuerza para no darme por vencido, cada día que pasé a su lado me demostró que no existen los fracasos, que no hay tiempo de lamentarse sino de buscarle solución a nuestros problemas, a usted dedico esta tesis en forma de agradecimiento a todo el apoyo y cariño que me brindó, es suya también lo LOGRAMOS MAMI ELENA!!!!, la extraño mucho y la amaré siempre. †

### **A MI TIA ANA MARÍA.**

Para usted no hay palabras solo hechos, ejemplos de logros realizados, este es uno de ellos!!!, nunca olvidaré que el “Mundo de los niños” se construye minuto a minuto, más nos vale que al final del camino dejemos una huella invaluable,.... si no para que habremos vivido.†

### **A MI TIO JAVIER.**

A usted también dedico mi vida, a usted que fue un ejemplo de vida, usted que me enseñó que la vida hay que disfrutarla haciendo lo que nos gusta, cada detalle es importante y que si vamos a hacer las cosas hay que hacerlas siempre buscando la perfección, gracias!! por el apoyo incondicional; de imaginarme que esta tesis valiera muchos meses usted sería el que hubiera perdido, jajaja...†

### **A MI MADRE.**

A ti mami Con, que cada día que amanece agradezco a Dios por el privilegio de tenerte conmigo, no tendría el valor de abrir los ojos sin buscar la forma de agradecerte y retribuir todo lo que con tanto esfuerzo haz echo por mí, bendita seas mami por ser como eres, tierna, sincera, que sin importar la distancia confiaste en mí, siempre me diste hasta el centavo que no tuviste, no comiste porque sabías que yo no comía, no dormiste porque sabías que pasaba frío, te AMO de verdad, te AMO tanto, nunca te fallaré haré hasta lo imposible porque siempre te sientas orgullosa de tu Luisin... MIL GRACIAS!!!

### **A MI HERMANO.**

Danys, el señor de la casa, el amigo, la figura que sin merecer y sin importar las circunstancias tuviste que aceptar, tu que haz sido pieza fundamental en mi vida, tu que me enseñaste a trabajar, que me demostraste que la vida cuesta y cuesta mucho, que nada es fácil, a ti también dedico mi vida....cada instante, te quiero brother.

**A YOLA.**

A ti Amor, MI CHIKITA HERMOSA, a ti dedico mi tesis, tan sencillo como que no sabría que hacer sin ti, porque eres el amor de mi vida y así será siempre, porque haz estado cuando más lo necesite, porque reí hasta llorar y lloré y me consolaste, porque me enseñaste que el amor existe y vale la pena luchar por el. GRACIAS!! por el apoyo incondicional, la paciencia sobre todo, la fuerza a la no desesperación, gracias por todo lo maravilloso recibido a lo largo de estos 6 años.. TE AMO CHULETITA !!!.

## AGRADECIMIENTOS

**A DIOS:** Por que siempre has estado ahí, porque me has permitido culminar con este gran proyecto de vida, por la intensidad con que me has hecho vivir cada instante de mi vida.

**A DON ALDE:** Usted que me permite soñar y compartir cada vivencia a su lado, usted todo un ejemplo de esfuerzos y dedicación, de lucha y coraje, usted me enseñó que nada es fácil, pero que tampoco nada es imposible, nunca olvidaré que no tenemos la vida comprada y que por ello hay que vivirla al máximo.

**A MIS TIOS, pero en especial a GERA:** Por las atenciones y preocupaciones recibidas, por el apoyo moral, y económico que de manera desinteresada me brindaste, mil GRACIAS!! **TIA TERE:** Que por mucho ha sido lo que es, un ejemplo de esfuerzo y dedicación todo mi respeto para usted la quiero tanto.

**MIS PRIMOS:** A todos y cada uno de ustedes que confiaron en mi, gracias por compartir cada momento, luchan por sus ideales, lleguen hasta donde ustedes quieran, nada es imposible!!!

**A Liz y Mau:** Que a pesar de no pasar mucho tiempo con ustedes, los llevo siempre en la mente y en el corazón, luchan por ser mejores hijos cada día.

**A José Luis:** A Mi hermano del alma, mi confidente, que tan lejos o tan cerca siempre has estado ahí para escucharme, para llorar, para reír, GRACIAS!!! por disfrutar conmigo esta gran etapa de mi vida, por tu confianza, por tu tiempo y por tu amistad...esta también es por ti ToKayo!!..

**A MIS AMIGOS:** Yola, Mary, Regina, Alexis, Ithan, Bárbara, MaFer, Ever, Naive, Aaron, Cyn, Tovar, Isma, Bren, Marisol, Carla, Andrés, kike, Jonathan, Mariano, Salvador, etc. A todos y cada uno de ustedes por todos los maravillosos momentos, por permitirme formar parte de su vida, por ser más que amigos una familia, a ustedes que los llevaré siempre en el corazón, mis inolvidables amigos.

**A todos los que desinteresadamente me tendieron la mano:** KIM, Sra. Georgina Olmedo, Miguel Ramírez, Alma Huesca, Víctor Duarte, Rafael Astorga; a ustedes mi más sincero reconocimiento, de no haber sido por ustedes, mi vida no hubiese sido la misma, encontré en ustedes enseñanzas y ejemplos de vida...de corazón mil GRACIAS!!!!!!

**A mis asesores:** Dr. MPA J. Alberto Balcázar Sánchez, que más que mi asesor es mi amigo, muchísimas gracias por enseñarme todo lo que sé referente a Reproducción Animal y por permitirme formar parte de tu equipo. Al Dr. Ismael Porras Almeraya, por los comentarios hacia mi trabajo que siempre serán bien recibidos.

**A mi Jurado:** Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Joel Hernández Cerón, Dr. Jorge Hernández Espinosa, Dr. J. Alberto Balcázar Sánchez y Dr. Elizardo Valadez Franco, a ustedes que permiten la realización de este proyecto, muchas gracias!!

**A la UNAM:** Porque solo tu y yo sabemos lo mucho que me costo pertenecer a la máxima casa de estudios, el orgullo puma...hasta la muerte!!!

**A la FMVZ:** Sin ti no somos nada.. el día amanece y anochece y no estamos en otro lugar que no seas tu.. nuestra segunda casa.

**Al Departamento. De Reproducción:** Gracias a todos por la realización del proyecto, por proporcionarme el material y equipo necesario, mil gracias!! a la Dra. Rosa Páramo, Dra. Brenda Salgado, Dra. Susana, Dra. Anita. Dra. Clara Murcia. **A todos los Médicos Veterinarios Zootecnistas**, que contribuyeron a la realización de la tesis, aquellos que día a día construyen el carácter de personas con visión, por formar profesionistas que luchen por ser alguien en la vida y por tener en lo más alto el nombre de la UNAM, a todos ellos todo mi respeto y cariño.

**M**uerte y vida, existencia y no existencia,  
éxito y fracaso, holgura y pobreza,  
virtud y vicio, sabiduría e ignorancia,  
alabanza y vituperio, sed y hambre,  
calor y frío, se suceden,  
se transforman sin cesar y conforman el destino.  
Días y noches se suceden también  
sin que pueda saberse desde cuándo.  
Pero todos estos acontecimientos no deben perturbar  
el cuerpo ni el espíritu:  
basta con mantener la calma día a día,  
con vivir en paz con los otros,  
con adaptarse a las circunstancias, para así,  
desarrollar los dones naturales.

Zhuang Zi  
*Palabras del Tao.*

## CONTENIDO

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>GRÁFICAS .....</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>COLCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>35</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>37</b>



## INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen de perro es una herramienta útil que permite el almacenamiento de material genético por periodos de tiempo ilimitado, es por ello que se han desarrollado diversos protocolos para lograr la preservación de semen de perro.<sup>9,22</sup> En la última década, ha existido un creciente interés en el desarrollo de nuevos procesos de criopreservación para el semen del perro doméstico, debido a que con la inseminación intrauterina se han obtenido mejores tasas de fertilización, que al realizarlo por vía vaginal (método tradicional)<sup>26</sup>

Los ingredientes utilizados para la preservación de semen de perro se han clasificado en naturales y sintéticos; en el caso de los naturales se encuentran: el agua de coco, leche descremada, yema de huevo, entre otros; dentro de los sintéticos están: el hidroximetil amino-metano TRIS, glucosa, fructosa, ácido cítrico, el ácido N-2-Hidroximetilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES), 3-N-morfolino, ácido propano sulfónico (MOPS), y el glicerol.<sup>3,19</sup> Tradicionalmente los diluyentes a base de lactosa y yema de huevo, son los más utilizados para la criopreservación de semen de perro<sup>22,30</sup>, además de que se utilizan ampliamente en otras especies como: el bovino<sup>20</sup>, el equino<sup>15</sup> y el suino<sup>29</sup>, diluyentes a los cuales se agregan además diferentes porcentajes de glicerol, carbohidratos u otras sustancias para aumentar la vida fértil de los espermatozoides.<sup>22</sup>

Recientemente se ha observado que la adición de aditivos con efecto antioxidante a los diluyentes utilizados para la criopreservación, mejora significativamente el número de células espermáticas vivas<sup>23</sup>. Dentro de los ingredientes utilizados se encuentra la vitamina E, la cual en combinación con el selenio actúan con un

efecto clave en la calidad del semen; se ha visto que en especial el selenio juega un papel importante en una adecuada movilidad y morfología del espermatozoide<sup>23</sup>. En el cerdo se ha observado un incremento en la calidad del semen cuando se añaden ácidos grasos Omega 3 y 6 en la dieta<sup>39</sup>, ya que estos ácidos grasos son componentes importantes de los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides, siendo el ácido linoléico, el que se encuentra en mayor cantidad en la mayoría de los mamíferos.<sup>23</sup>

Se conoce que el ácido alfa-linolénico, precursor del Omega 3, y el ácido linoléico del cual se deriva el Omega 6, se integran otorgando estabilidad a la membrana y mantienen la movilidad espermática y la apariencia normal del acrosoma.<sup>23</sup> No existen estudios sobre la aplicación de los ácidos grasos Omegas 3 y 6 directamente en el diluyente destinado a la criopreservación del semen de perro.

Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de los ácidos grasos Omega 3 y 6, a un diluyente para la criopreservación de semen de perro.

## RESUMEN

**MARIN CABALLERO LUIS EDUARDO. EFECTO DE LA PRESENCIA DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6 EN UN DILUYENTE PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN EL PERRO DOMÉSTICO** Bajo la supervisión del MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez, Dr. Antonio Porras Almeraya).

Se utilizaron cinco perros adultos de entre 2 y 5 años de edad clínicamente sanos sin importar su raza, los cuales se colectaron por método manual con ayuda de un cono de látex. En cada eyaculado se evaluó: el volumen, la concentración espermática, movilidad progresiva y morfología. Cada eyaculado se dividió en dos partes iguales, una parte se diluyó en: Lactosa y yema de huevo enriquecida con ácidos grasos en proporciones de (8.1mg) de Omega 3 y (4.1mg) de Omega 6 por ml., diluyente "A" y la otra parte en: Lactosa y yema de huevo sin ácidos grasos omega 3 y 6, diluyente "B"; de manera que al obtener una dilución final y esta fuese congelada. Posteriormente se pudo evaluar la movilidad espermática postdescongelamiento. El método de congelación utilizado fue el de en forma de pellet. Para este fin el semen se congelo utilizando una placa de 5 kg de hielo seco a  $-79^{\circ}\text{C}$ , y nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para la evaluación de la recuperación espermática después de la congelación se utilizaron tres muestras (pellets) por eyaculado de cada uno de los diluyentes; estos fueron colocados en viales de cristal color ambar, conteniendo cada uno 0.15ml de solución salina fisiológica, mantenidos a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María durante 15 segundos. Se realizaron grabaciones de las muestras previamente descongeladas y se proyectaron a expertos en el área de reproducción, a fin de obtener una evaluación final del proyecto con ayuda de formatos para registros. Mediante una prueba estadística no paramétrica utilizando muestras relacionadas, se evaluaron los resultados de la

recuperación espermática y se encontró diferencia significativa  $P= 0.042$  entre ambos diluyentes, siendo superior la movilidad espermática postdescongelamiento del semen diluido en el medio "A", que en el medio "B". Concluyendo de esta forma que bajo las condiciones referidas, se mantiene una buena movilidad espermática postdescongelamiento en el diluyente que contiene Lactosa y yema de huevo enriquecida con ácidos grasos omega 3 y 6 al congelar semen de perro en forma de pellet, en comparación a la movilidad espermática con el diluyente que no contiene ácidos grasos omega 3 y 6.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **CRIOPRESERVACIÓN**

La técnica de criopreservación del semen tiene como finalidad la preservación de las células espermáticas por debajo de  $-196^{\circ}\text{C}$ , y que al momento de su descongelación continúen viables con la capacidad de fertilizar<sup>27</sup>. Sin embargo, estos resultados están influenciados por diversos factores, tales como: edad, condición corporal, condiciones y métodos de colección, curva de enfriamiento, técnica de empaqueo y método de descongelado, en el cual aproximadamente un 50% de los espermatozoides muere<sup>53,54</sup>

### **COLECCIÓN DE SEMEN**

En perros el método de colección más utilizado para el cual se utiliza un cono de látex, en el que se adapta un tubo de vidrio estéril en uno de sus extremos<sup>25</sup>. El cono de látex, es una imitación de la vagina de la hembra, la presión y masaje en el bulbo y glande es dada por la mano del operador; al iniciarse solo se requiere de un ligero masaje en el bulbo aproximadamente de 5 a 8 segundos, el desvaine del pene se da con ayuda del cono de látex. Este es un método rápido, limpio y fácil de realizar, siendo la primera fracción del eyaculado la de mayor volumen y mejor concentración espermática<sup>12</sup>. Se recomienda que al momento de la colección, el eyaculado sea cubierto de los rayos de luz, y la temperatura se mantenga entre  $35-37^{\circ}\text{C}$ , esto con el fin de evitar un choque por frío en los espermatozoides, y que repercuta en un decremento de la tasa de supervivencia espermática postdescongelamiento<sup>12,30</sup>.

### **EVALUACIÓN DEL SEMEN**

La evaluación del semen se realiza con el fin de valorar la viabilidad espermática y predecir así la fertilidad del macho<sup>9</sup>. Es por ello que una vez colectado el semen, se debe determinar cuidadosamente tanto la cantidad como la calidad del eyaculado<sup>12</sup>, esto va a depender de algunos factores, tales como: la edad, estado de salud y condición corporal, libido, nivel de estrés y si existe la presencia de alguna hembra en celo. La calidad del eyaculado se evalúa mediante las características espermáticas de movilidad, morfología y concentración<sup>12,28</sup>. Además hay que tomar en cuenta otras características como son el volumen, color, olor y pH, las cuales se evalúan inmediatamente después de la colección.

### **COLOR DEL SEMEN**

Es el primer aspecto que se valora pues se realiza inmediatamente después de la colección del semen, en el mismo recipiente en el que fue colectado<sup>12</sup>; el color debe ser blanco-lechoso.<sup>12,18</sup> La coloración opaca es indicativa de una alta concentración de espermatozoides, mientras que muestras translúcidas contienen pocos espermatozoides. Por otra parte, un color amarillo es indicativo de contaminación por orina al momento de la colección; el color rosáceo o gris son indicativos de la presencia de sangre por lesiones en pene y prepucio. Otros colores que se presenten son debidos a contaminaciones por infecciones del sistema urinario o reproductor<sup>12</sup>.

### **VOLUMEN DEL EYACULADO**

El volumen también se mide directamente en el tubo en que se colectó el semen, por lo que este deberá estar graduado para facilitar su determinación.

Por el método de colección manual, el volumen de eyaculado de semen en el perro se encuentra en un rango de aproximadamente 1-20ml, aunque varía dependiendo de la raza y la talla del animal; así como de la edad, frecuencia de colección, condición corporal del animal, y habilidad del operador<sup>12,30</sup>.

### **MOVILIDAD INDIVIDUAL**

Es una de las pruebas más extensamente utilizadas para la determinación de la calidad del semen<sup>30</sup>, se realiza observando al microscopio la movilidad individual progresiva de los espermatozoides contenidos en una muestra. Para su observación, se coloca una gota sin diluir sobre un portaobjetos, limpio y seco, previamente calentado a una temperatura de 37°C, se le coloca un cubreobjetos y es observado al microscopio óptico con el objetivo de 10x.

### **VIGOR ESPERMÁTICO**

La estimación dada como “vigor”, se define como la tasa de movimiento espermático, es considerada subjetiva y se realiza con calificaciones que van de 0 a 5, de las cuales las muestras con valor de 4-5 son consideradas para congelación e inseminación artificial, mientras que las de valor 3 ó menos no se recomiendan para la criopreservación<sup>12</sup>, ya que pueden presentar una viabilidad menor en caso de ser utilizados para congelación en pellets o en pajillas<sup>12,30</sup>. A continuación se presenta un cuadro con las diferentes clasificaciones de vigor espermático.

### **TABLA DE CLASIFICACIÓN.**

<b>Vigor</b>	<b>Equivalencia</b>	<b>Espermatozoides</b>
<b>activos %</b>		

<b>0</b>	<b>Muerto</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	<b>Muy pobre</b>	<b>Alrededor del 10%</b>
<b>2</b>	<b>Pobre</b>	<b>20 - 40%</b>
<b>3</b>	<b>Regular</b>	<b>45 - 65%</b>
<b>4</b>	<b>Bueno</b>	<b>70 - 85%</b>
<b>5</b>	<b>Muy bueno</b>	<b>90%</b>

### **Cuadro 1. Clasificaciones de vigor espermático.**

Por otra parte otro parámetro que se evalúa es el movimiento lineal progresivo que presentan los espermatozoides, tanto antes, como después de congelado; esta valoración es muy importante sobre todo cuando el semen va a ser utilizado en programas de inseminación artificial.

Los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimientos:

- 1.- Movimiento lineal progresivo
- 2.- Movimiento circular o rotatorio
- 3.- Movimiento oscilatorio o convulsivo, sin progresión, ni cambio de posición <sup>12,28,29</sup>

La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides, puede variar por factores como: el método de colección del semen, los factores ambientales, el intervalo entre colecciones, el manejo del semen después de la colecta y por variaciones propias del semental. La determinación de la movilidad es un método relativamente sencillo para conocer la calidad del semen.

En el caso de la congelación del semen la movilidad de los espermatozoides del eyaculado o de la suspensión diluida se valora en varios campos en el microscopio óptico, utilizando una muestra mantenida a 37°C durante todo el procedimiento.



La movilidad individual se valora generalmente en porcentaje de (0-100%). Para la inseminación artificial solo deben usarse aquellos eyaculados que presenten altas proporciones de espermatozoides con una movilidad progresiva mayor al 85% <sup>12,28,29</sup>.

## **CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA**

La concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen de un eyaculado expresado en ml, de esta depende directamente el grado de dilución del mismo, en caso de utilizar el semen para inseminación o congelación <sup>12,30</sup>. En el perro la concentración normal es de 100 - 500 millones de espermatozoides por mililitro<sup>14,22</sup>.

El calculo de la concentración puede realizarse mediante la ayuda de un hematocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas, aunque cada método varía en rapidez<sup>12,30</sup>. En cuanto a la valoración de la concentración basada en la consistencia o apariencia del semen los valores obtenidos dependen de los constituyentes del mismo, (espermatozoides y plasma seminal). Por su parte el método del colorímetro es rápido y seguro, se basa en la cantidad de luz que pasa a través de la muestra, sin embargo resulta caro y poco práctico para utilizarse como técnica de campo.

En comparación con los métodos anteriores, aunque el método de hemocitometría es lento tiene la ventaja de ser; cuantifica el número de espermatozoides en una muestra de tamaño definido, para posteriormente calcular el total del eyaculado<sup>12</sup>. Este es barato y de fácil adquisición y permite la evaluación del semen realizando diferentes diluciones, para ello se requiere de cualquier solución que inmovilice rápidamente a los espermatozoides para su

conteo<sup>12,31</sup>, de manera rutinaria se puede utilizar una solución de fuscina, en una dilución 1:200 (semen:solución).

## **MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES**

El examen morfológico es una prueba que se recomienda realizar en cualquier programa o examen reproductivo general. Normalmente, cada eyaculado contiene una proporción de espermatozoides anormales, sin embargo si esta proporción es alta (mayor al 20%) la fertilidad del semen colectado disminuye<sup>12,30</sup>. La determinación de anormalidades espermáticas es realizada con ayuda de un frotis del semen teñido con varios colorantes, siendo el más utilizado la tinción eosina-nigrosina. Esta tinción permite observar, además de espermatozoides vivos y muertos, a todas aquellas células que presenten anomalía como: espermatozoides decapitados, macrocefálicos, microcefálicos, cola enroscada, cabeza alargada, colas dobles, sueltas o fracturadas y con acrosomas anormales. Las anomalías pueden ser consideradas primarias o secundarias, de las cuales, las primarias se deben a fallas producidas durante la espermatogénesis, en tanto que las secundarias ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo o por mal manejo del eyaculado.<sup>12</sup>.

## **DILUCIÓN DEL SEMEN**

Esta se realiza por razones técnicas ó biológicas.

A) Razones técnicas: Las razones técnicas para realizar la dilución del semen, se emplean en inseminaciones artificiales ya con ello los sementales de gran valor tanto económico como genético pueden utilizarse para inseminar a muchas más hembras que las que podría cubrir por monta natural. Sin embargo al utilizar la técnica de inseminación artificial, tanto el volumen, como el número

de espermatozoides que contiene una dosis (pellet) se reduce al mínimo esto es 200 millones de espermatozoides por ml, para inseminación intrauterina en perros.

- B) Razones biológicas: Las razones biológicas de la dilución consisten en proporcionar nutrientes a los espermatozoides, un medio que evite los cambios de pH, que proporcione un ambiente isotónico y que además los proteja del choque térmico por frío al momento de refrigerar y posteriormente congelar el semen <sup>18,12</sup>.

Para la dilución del semen de perro se han desarrollado varios diluyentes en los que se incluyen amortiguadores sintéticos combinados con azúcares, yema de huevo, leche, glicerol y otras sustancias<sup>12,45</sup>.

Por su origen, los ingredientes utilizados como componentes de los diluyentes se han agrupado en naturales y sintéticos; mientras que por la función que realiza en el diluyente pueden ser: (amortiguadores de pH, estabilizadores de membrana, nutrientes, crioprotectores, etc).

Los amortiguadores actúan dando estabilidad a la membrana. Estos amortiguadores mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo<sup>32</sup>. El Tris es uno de los amortiguadores más utilizado y ha sido evaluado como diluyente para semen de toro, cerdo, carnero, etc.<sup>32</sup>.

Los azúcares son componentes importantes de los diluyentes, ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante su almacenamiento, como es el caso de la glucosa y de la fructosa. Así mismo los azúcares actúan manteniendo o incrementando la presión osmótica de manera

extracelular en el espermatozoide, lo que permite mantener la integridad de la membrana espermática al almacenamiento por un largo periodo<sup>6,12,32</sup>.

En la composición normal del semen de perro, se encuentra presente la fructosa y el ácido cítrico que una de sus funciones es proporcionar una fuente de energía, aunque otros azúcares como la manosa y la glucosa pueden ser metabolizados cuando son incluidos en el diluyente.

## **TIPOS DE CRIOPROTECTORES**

Con la finalidad de preservar por tiempos prolongados el semen de perro, es necesario la utilización de un diluyente con una solución crioprotectora; las cuales se clasifican en: A) penetrantes y B) No penetrantes o extracelulares.<sup>40</sup>

**A) Penetrantes:** Son sustancias de bajo peso molecular tales como; el glicerol (G), dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes. Todos estos compuestos tienen la función de deshidratar a la célula al penetrar a ésta, dando protección al citoplasma. Por tal motivo, la protección otorgada por estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular del agua, reduciendo al mínimo el daño celular causado por la congelación de solutos presentes en el medio durante el enfriamiento<sup>40</sup>.

**B) No penetrantes o extracelulares:** Son sustancias de peso molecular alto como: el polivinilpirrolidona (PVP), ficoll, dextranosorbitol, (fructosa, sacarosa, glucosa, lactosa, trealosa y rafinosa). Estos compuestos sin la necesidad de penetrar a la célula, extraen el agua libre intracelular al utilizar diferencias de presión osmótica. Sin embargo, si el agua no sale lo suficientemente rápido del

espermatozoide, se da la formación de cristales intracelulares que pueden dañar fácilmente la membrana espermática.<sup>18</sup>

Independientemente de cual vaya a ser el crioprotector a utilizar en la criopreservación del semen de perro, se tomaran en cuenta ciertas propiedades que deberá cumplir el diluyente para su preparación como: evitar cambios de pH, osmolaridad, contener una fuente de energía, y sustancias que den protección a la membrana espermática durante el enfriamiento<sup>42</sup>. Para esto último, la yema de huevo ha sido incluida en la elaboración de algunos diluyentes, ya que posee una fracción lipoproteica en su composición. Estudios recientes informan que estas lipoproteínas se unen fuertemente a la membrana plasmática, otorgando protección a los espermatozoides contra el choque por frío.<sup>43</sup>

El llamado choque por frío se presenta cuando se desciende la temperatura de 30°C a 0°C. Ocasionando entre otros daños alteraciones en la membrana, pérdida de la movilidad, cambios en la actividad metabólica y de la capacidad de fecundante de los espermatozoides. Es por ello que se recomienda que el descenso de la temperatura sea realizado lentamente. Sin embargo un enfriamiento demasiado lento también puede inducir un estrés sobre la membrana espermática. Otro estrés sobre la membrana ocurre por debajo de los 0°C. Así otra zona crítica al momento del enfriamiento se encuentra entre -15° y -25° C, ya que a estas temperaturas se comienzan a formar cristales intracelulares de hielo, logrando que por el mismo fenómeno de cristalización del agua todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela y exponiendo de esta forma a la célula al llamado: “efecto solución”<sup>18</sup>.

Durante esta fase, si el tiempo de exposición de la célula a soluciones hipertónicas es demasiado largo, el agua se difundirá hacia el exterior con la finalidad de equilibrar la concentración de sales tanto interna como externamente, sucediendo así la deshidratación celular.<sup>44</sup>

## **LA LACTOSA COMO CRIOPROTECTOR**

La lactosa es un disacárido formado por la unión de una glucosa y una galactosa unidos por un enlace glicosídico ( $C_{12}, H_{22}, O_{11}$ ). A pesar de que no se percibe por el sabor dulce es llamada el azúcar de la leche.

Por varios años se ha creído que los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación<sup>3,5</sup>. Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía del daño producido a nivel de la membrana espermática por la cristalización del hielo<sup>3,5</sup>.

Diversos protocolos han informado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado de espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con lactosa<sup>4,7</sup>. Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce su interacción específica con la membrana espermática<sup>39</sup>.

Recientemente se ha informado que la adición de lactosa mejora la movilidad de los espermatozoides mantenidos a 37°C y que a 5°C la supervivencia es mejor cuando azúcares como la fructosa, glucosa, lactosa o sacarosa son combinados con una simple solución electrolítica<sup>12, 45</sup>.

Sin embargo se requieren más estudios para determinar las relaciones entre la temperatura de almacenamiento, curvas de equilibrio, el metabolismo y la permeabilidad de los espermatozoides a varios azúcares<sup>32</sup>.

### **ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6 PRESENTES EN LA YEMA DE HUEVO**

Algunos otros componentes como la yema de huevo, han sido incluidos en la elaboración de diluyentes sintéticos con el fin de proporcionar protección a los espermatozoides contra el choque por frío, propiedad que le es conferida por poseer una fracción fosfolípida y una lipoprotéica en su composición<sup>32,34</sup>.

La fracción lipoprotéica no dializable de la yema de huevo proporciona la mejor protección a los espermatozoides del semen de perro durante la congelación<sup>32,34</sup>, lo que sugiere que su baja densidad es probablemente la fuente de protección, ya que se unen fuertemente a la membrana plasmática de los espermatozoides<sup>23,32,35</sup>. ■

Los ácidos grasos omega , están formados por cadenas de átomos de carbono pares, es decir el átomo más pequeño es el que contiene 2 carbonos y la cadena puede prolongarse hasta 22 carbonos. Algunos de estos ácidos que se consumen de forma cotidiana ya que se encuentran presentes en semillas, aceites vegetales e incluso en la yema del huevo. Se les considera Omega 3 ó 6, debido a la posición de la doble ligadura dentro de la cadena carbonada contando a partir del grupo metilo (CH<sub>3</sub>).

Estudios desarrollados en el cerdo, muestran que al agregar estos ácidos en la dieta se ven mejoras en la movilidad de los espermatozoides<sup>39</sup>. Cabe mencionar que estos ácidos son componentes importantes de los fosfolípidos de

la membrana de los espermatozoides, siendo el omega 3 el que se encuentra en mayor cantidad<sup>39</sup>.

## **ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)**

Los radicales libres de oxígeno causan un grave daño al reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Sus substratos moleculares más frecuentes son hacia los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos <sup>2,5</sup>. Entre las especies reactivas de oxígeno, conocidas como “ROS” por sus siglas en inglés, destacan fundamentalmente <sup>8</sup> el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este último es la principal especie reactiva, y aunque no es un radical libre, es la molécula que más se ha involucrado en el daño de los espermatozoides de equino<sup>7,8</sup>

La reacción de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados se denomina lipoperoxidación y es generada por una reacción en cadena<sup>36</sup>. En la célula espermática las ROS inducen daño en los fosfolípidos de la membrana y en el ADN principalmente, por lo que se les ha relacionado con la infertilidad. Además se ha observado que la producción de ROS es mayor en espermatozoides inmaduros con retención citoplásmica y anomalías morfológicas de la cabeza <sup>38</sup>.

## **PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

Los dominios de la membrana plasmática de la célula espermática cumple un papel importante en los procesos de maduración, capacitación y fecundación<sup>55</sup>,



sin embargo, las ROS pueden dañarla <sup>52</sup>, por lo que una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidativo que causa la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, modificando su fluidez y a la permeabilidad de la misma, lo que puede conducir al espermatozoide a un proceso de muerte celular <sup>5</sup>

Durante la congelación y descongelación se forman radicales libres con el consecuente perjudicial de las células <sup>5</sup>. Además, la generación de ROS por los espermatozoides dañados tiene un importante impacto sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides en almacenamiento <sup>5</sup>.

Este estrés ocasionado con la congelación, es asociado a los cambios de temperatura a que los espermatozoides son sometidos durante el proceso de enfriamiento, los ingredientes del medio, los mismos crioprotectores y finalmente el proceso de descongelación <sup>48,49</sup>. El daño provocado por las bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática y acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema. Generalmente, estas áreas son más sensibles que la parte locomotora del espermatozoide <sup>48,49</sup>.

Con base en lo anterior se puede considerar que un área prometedora de estudio es el posible pre-tratamiento contra los procesos de peroxidación de los espermatozoides, así como el medio de dilución para proteger o conservar la integridad de su membrana durante el proceso de congelación y descongelación <sup>26</sup> ya que se sabe que los metabolitos generados por las ROS durante los procesos oxidantes trastornan la fusión espermatozoide-ovocito, alteran la movilidad espermática y dañan la integridad del ADN <sup>2</sup>.

## CONGELACIÓN DEL SEMEN

Una criopreservación adecuada del semen, permite hacer un uso óptimo de los sementales permitiendo un mejor manejo del material genético a futuro. Es por eso que la finalidad de preservar el semen, es detener o disminuir las reacciones metabólicas, prolongando así su capacidad de fertilización. Este método consiste en disminuir la temperatura del semen hasta  $-196^{\circ}\text{C}$  mediante la utilización de nitrógeno líquido, ello permite que las reacciones metabólicas de los espermatozoides queden detenidas, y con ello la producción de ácido láctico metabólico por parte de ellos mismos, el cual, al acumularse en el semen, provoca que descienda el pH, reduciendo de esta forma irreversiblemente la viabilidad de los espermatozoides<sup>12,28</sup>. Se ha demostrado que la yema de huevo reduce la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el mismo durante la conservación del semen a  $4^{\circ}\text{C}$ <sup>11,28,44</sup>.

Además de la yema de huevo existen otros agentes crioprotectores como lo son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) ya sea solo o en combinaciones, los cuales se han clasificado como agentes penetrantes<sup>9,51</sup>. La protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular y en la reducción al mínimo de daño debido a los solutos concentrados en el medio durante el enfriamiento. Se menciona además que el glicerol permite que la formación de cristales de hielo se de en forma de capas, en lugar de agujas que provoque cortes a los espermatozoides lisándolos ocasionando su muerte<sup>16,17</sup>.

La cantidad de glicerol necesario para proteger a los espermatozoides varía dependiendo el método de congelación y la composición del diluyente, sin

embargo ya varios autores determinaron que entre el 4% y 6% son las combinaciones más satisfactorias<sup>16,17</sup>

Existe una gran gama de métodos de empacado, tales como las ampollitas, tubos de aluminio, pajillas, pellets, etc.<sup>12,14,22</sup>. Se han informado datos muy diversos sobre los resultados obtenidos sobre estos métodos, algunos autores recomiendan la congelación en pajillas<sup>50</sup>, mientras que otros recomiendan como mejor método a los pellets<sup>30,47</sup>. Aunque cabe mencionar que ambos métodos tienen resultados similares de nacimientos cuando el semen es depositado intrauterinamente<sup>20</sup>. Debido a la dificultad que representa el inseminar intracervicalmente con semen congelado-descongelado por la anatomía en las perras además de los bajos coeficientes de fertilidad y prolificidad que esto representa. Los programas comerciales de inseminación artificial en perros se vieron muy limitados durante mucho tiempo<sup>11,29,31</sup>; recientemente con el uso de la inseminación artificial vía intrauterina por la técnica de laparoscopia, los índices de fertilidad que eran bajos, se han visto mejorados en un 75%<sup>11,29,31</sup>. Las ventajas que se han podido obtener con el uso de la inseminación intrauterina por medio de laparoscopia, ha provocado que nuevamente se retome el uso de la congelación del semen tanto en pellets<sup>30,35</sup> como en pajillas<sup>17</sup>.

## **DESCONGELACIÓN DEL SEMEN**

La fase de descongelación es tan importante para la supervivencia de los espermatozoides como la fase de enfriamiento previo a la congelación<sup>33</sup>. Tomando en cuenta lo anterior, el uso de la descongelación rápida es requerida para evitar la recristalización o la formación de hielo intracelular presente en los espermatozoides<sup>33</sup>. Como norma general se menciona que cuanto más rápido se

congele el semen, más rápidamente se debe descongelar a una temperatura no inferior a los 37°C<sup>12,29,32</sup>. La descongelación a una temperatura por arriba de los 37°C puede mejorar la recuperación de espermatozoides viables, pero existe el peligro de la exposición del semen a temperaturas por encima del nivel crítico, que pueden ser fatales para los espermatozoides<sup>12, 32</sup>. Además la descongelación dependerá mucho del método utilizado para la congelación del semen, si la criopreservación fue realizada en forma de pellets, puede hacerse en solución salina fisiológica (solución de descongelación), o simplemente descongelarlo en seco, utilizando tubos de vidrio mantenidos en baño María<sup>12,29,32</sup>. Sin embargo debe advertirse que aunque la solución provee efectos benéficos sobre la recuperación de los espermatozoides, puede no ser el medio óptimo, para el mantenimiento de la viabilidad de los mismos<sup>12,29,31</sup>.

La solución de descongelación no debe exceder la relación 1:3 (volumen del pellet + volumen de la solución), debido a la composición del diluyente pre-congelado y la solución descongelante<sup>12,29</sup>.

## **HIPÓTESIS.**

Si los ácidos grasos omega 3 y 6 son adicionados a un medio para la criopreservación del semen en el perro doméstico, la movilidad espermática se mantendrá aún después de la descongelación.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos omega 3 y 6, utilizando un diluyente a base de lactosa y yema de huevo para la criopreservación de semen en el perro doméstico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Departamento de Reproducción, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **ANIMALES**

Para la colección del semen se utilizaron un total de 5 perros adultos, los cuales contaban con una edad aproximada entre 1 y 5 años, cada animal se sometió a un examen clínico completo, esto incluyó cuadro de vacunación y desparasitación, condición corporal, evaluación de genitales, considerando además una buena libido para una adecuada colección del semen.

### **COLECCIÓN DEL SEMEN**

De cada perro se obtuvo un eyaculado, se implementó el método manual con ayuda de un cono de látex conectado a un tubo graduado de vidrio estéril<sup>25</sup>, se obtuvo solamente la primera y segunda fracción del eyaculado. Al momento de obtener el eyaculado se cuidó que el tubo no estuviera en contacto con la luz y fue colocado inmediatamente en el baño María a 35°C, para igualar la temperatura con la del diluyente previamente colocado en el mismo.

### **EVALUACIÓN DEL SEMEN**

Cada eyaculado colectado fue evaluado en las siguientes características: color, volumen, movilidad, morfología y concentración espermática<sup>7</sup>. Para la congelación del semen solamente se utilizaron los eyaculados que contaran con un color blanco lechoso, volumen de 3 ml o más, movilidad espermática mayor o igual al 80%, además de 80% de células morfológicamente normales.<sup>12</sup> y una

concentración espermática promedio de  $300 \times 10^6$  espermatozoides /ml. De cada eyaculado colectado se tomo una gota y se evaluó al microscopio, para determinar el porcentaje de movilidad progresiva<sup>7</sup>. La concentración espermática se evaluó mediante un hematocitómetro, utilizando una solución de fuscina en una dilución 1:200(semen:solución)<sup>19,20</sup> La determinación de las anormalidades se determinó utilizando un frotis del semen teñidos con esosina-nigrosina <sup>19</sup>

## DILUCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

Se utilizaron dos diluyentes:

**Diluyente "A".**- Lactosa y yema de huevo enriquecida con Omega 3 y 6<sup>56</sup>

**Diluyente "B".**- Lactosa y yema de huevo sin Omega 3 y 6, las formulas de ambos diluyentes se presenta en el ANEXO 1.

Cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales y diluidos a una proporción 1:1 (eyaculado:diluyente), una parte con el diluyente A y la otra con el diluyente B, respectivamente. Una vez diluido el semen se colocó en un baño María a 35°C y posteriormente fue llevado al refrigerador a 4°C por 4 hrs.<sup>23</sup>

Por separado los diluyentes "A" y "B" fueron adicionados a diferentes concentraciones de glicerol. Los cuadros 1 y 2 muestran la forma en la que se prepararon ambos diluyentes.

Tubo 1	Glicerol 0.6ml + diluyente A
Tubo 2	Glicerol 0.9ml + diluyente A
Tubo 3	Glicerol 1.0ml + diluyente A
Tubo 4	Glicerol 1.5ml + diluyente A

Cuadro 1

Tubo 1	Glicerol 0.6ml + diluyente B
Tubo 2	Glicerol 0.9ml + diluyente B
Tubo 3	Glicerol 1.0ml + diluyente B
Tubo 4	Glicerol 1.5ml + diluyente B

Cuadro 2

Una vez realizado este proceso los ocho tubos fueron colocados en un vaso de precipitado que contenía agua a 35°C y llevados al refrigerador para realizar el periodo de equilibrio de 4hrs, junto con el semen ya previamente diluido.

A cada hora del periodo de equilibrio, se tomó una alícuota de los tubos que contenían las diferentes concentraciones de glicerol y fueron adicionados a los eyaculados en equilibrio; de esta manera al final del periodo la dilución del semen quedó en 1:4 a una concentración final de glicerol del 4%.

## **ELABORACIÓN DE LOS PELLETS**

Posterior al periodo de equilibrio se procedió a elaborar los pellets realizando pequeños agujeros sobre una placa de hielo seco con la ayuda de una plancha metálica especial, ya realizadas las perforaciones, se depositó 0.1ml de semen diluido (con una concentración aproximada de 200 millones de espermatozoides /dosis) en cada uno de los orificios.

Este método es considerado como de "ultracongelamiento", por la rapidez con la que se obtiene la criopreservación del material genético<sup>18</sup>.

Pasados 3 minutos, cuando los pellets mostraron una ligera escarcha en su superficie fueron vaciados en tubos de plástico (gobelets) los cuales fueron identificados previamente; estos se colocaron en bastones contenedores dentro del termo con nitrógeno líquido.

## **DESCONGELACION DE LOS PELLETS**

Para la evaluación final del semen criopreservado, se tomaron tres pellets de cada diluyente preparado; de los cuales solo se evaluó la movilidad progresiva individual.

La descongelación se llevó a cabo en pequeños frascos de vidrio ámbar (viales) en los que se colocó 0.3ml de solución salina fisiológica (para obtener un volumen total de 0.4ml al descongelado por pellet), todo esto se realizó con ayuda



de un baño María a 35°C durante 15 segundos, tiempo en el que tardó en descongelarse el pellet.

Posteriormente, con una pipeta Pasteur se tomó una pequeña gota de cada muestra y se colocó en un portaobjetos, el cual fue previamente calentado en una termoplatina eléctrica a 37°C, antes de ser observado y evaluado al microscopio de luz.

### **EVALUACIÓN DEL SEMEN POSTDESCONGELAMIENTO**

La evaluación de la movilidad postdescongelamiento, se realizó con base a grabaciones realizadas durante la observación de las muestras. Estas fueron realizadas por un grupo de personas expertas en evaluación de semen empleando unos formatos de registro (véase en ANEXO 2), en los que se les otorgó una calificación a cada una de las grabaciones antes mencionadas.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Una vez obtenidos las calificaciones de movilidad espermática postdescongelamiento dadas por los expertos, estas fueron graficadas y analizadas mediante la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon.

## RESULTADOS

En el cuadro 3 se presentan los promedios de movilidad progresiva individual y la concentración espermática del semen fresco obtenida de los diferentes eyaculados; observando que el promedio fue de 85% y de  $40.5 \times 10^6$  cels/ml, respectivamente.

Número de Macho.	Número de eyaculados.	Concentración espermática por eyaculado ( / $10^6$ ).	Porcentaje de Movilidad espermática individual.
1	1	53.5	85
2	1	37	80
3	1	35	85
4	1	42	85
5	1	35	90
<b>Promedios</b>		<b>400.5</b>	<b>85%</b>

**Cuadro 3.- Concentración espermática y porcentaje de movilidad de los eyaculados recién obtenidos.**

En el cuadro 4, se presentan los promedios de los porcentajes de movilidad progresiva obtenidos en los eyaculados al descongelamiento en los tratamientos "A" y "B".

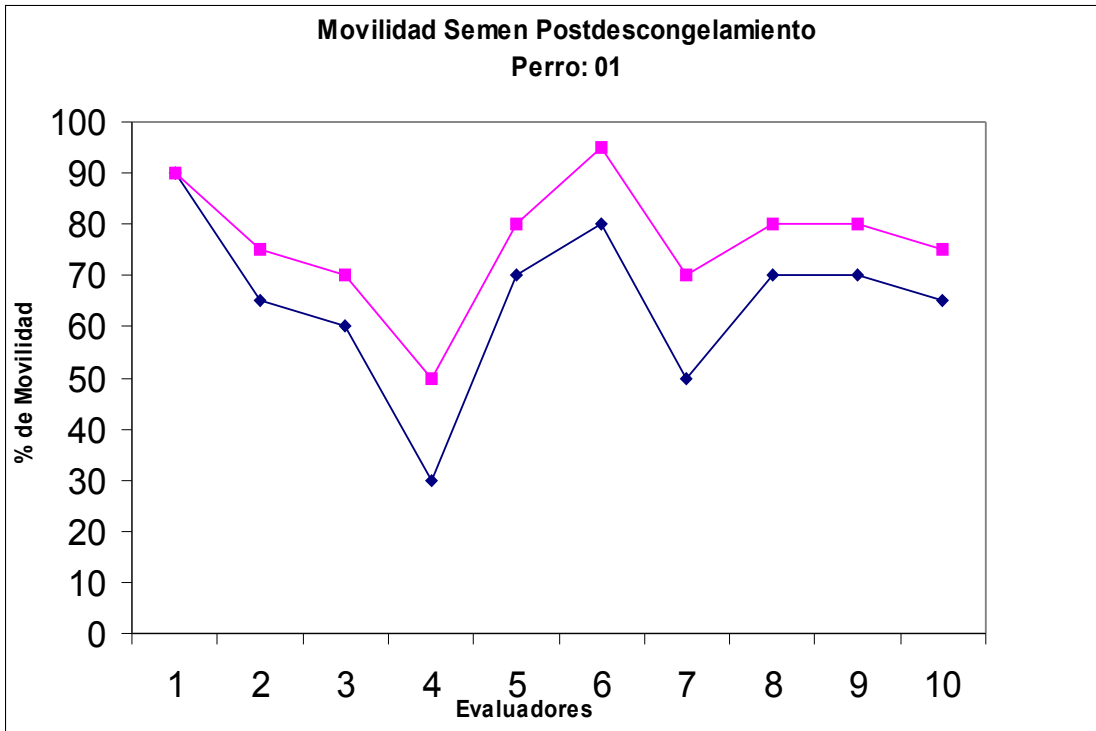
Número de Macho	Porcentaje de Movilidad de los espermatozoides al descongelado (diluyente A)	Porcentaje de Movilidad de los espermatozoides al descongelado (diluyente B)	Diferencia de la movilidad al descongelamiento entre ambos diluyentes.
1	76.5%	65.0%	11.5%
2	74.0%	60.0%	14%
3	73.5%	62.2%	11.3%
4	76.9%	72.3%	4.6%
5	83.7%	65.1%	18.6
<b>Promedios</b>	<b>76.92</b>	<b>64.92</b>	<b>12%</b>

**Cuadro 4.- Muestra los promedios de los porcentajes de movilidad post-descongelado y diferencia para ambos diluyentes.**

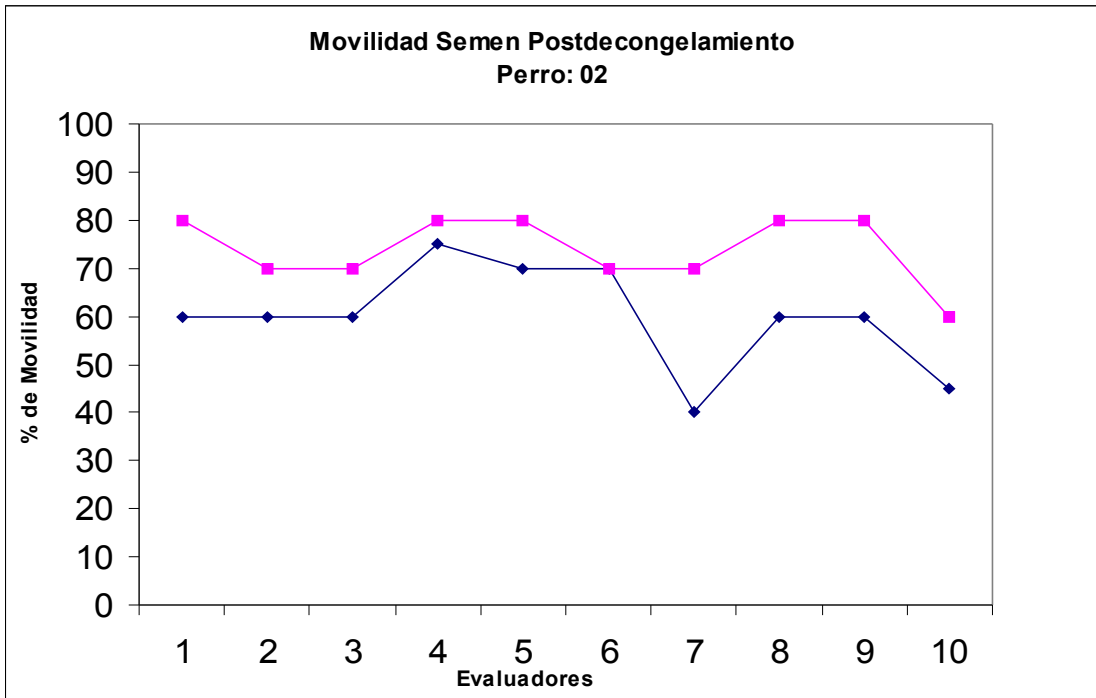
Al comparar la movilidad promedio al descongelamiento entre los dos diluyentes empleados se obtuvo que esta fue superior en el diluyente "A" (**76.92**),

en comparación al diluyente "B" (**64.92**), encontrando una diferencia estadística significativa de  $P = 0.042$ . Una vez obtenidos las calificaciones otorgadas para la movilidad postdescongelamiento, estas fueron graficadas y se presentan a continuación:

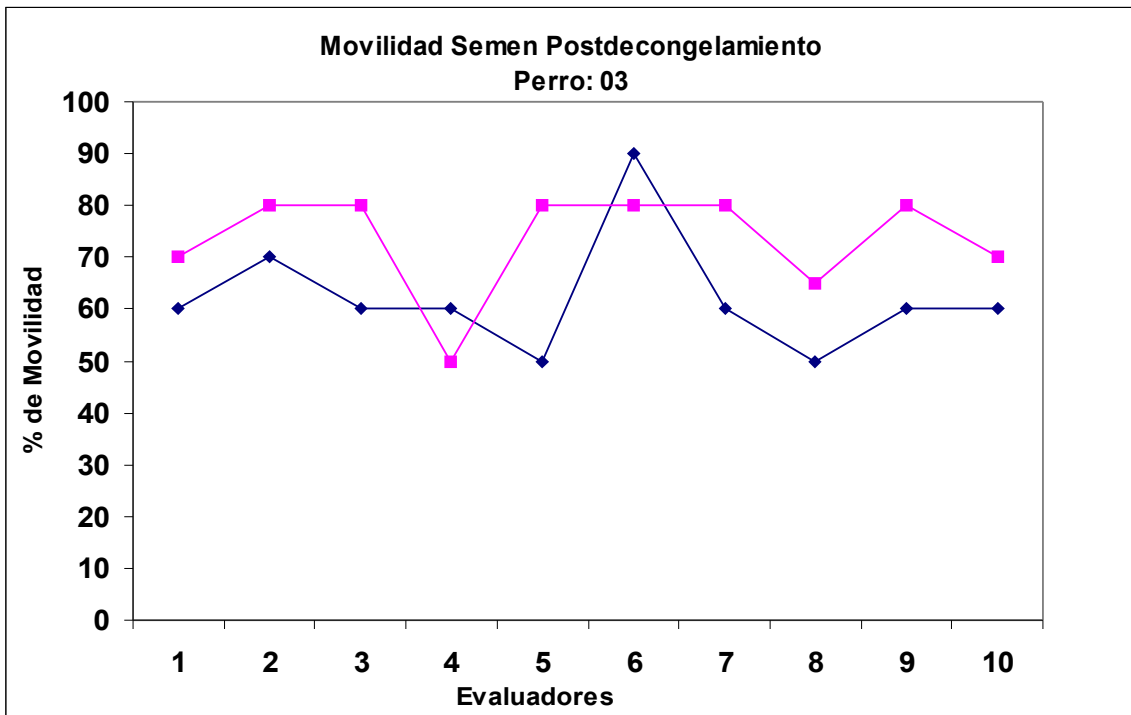
## Gráficas.



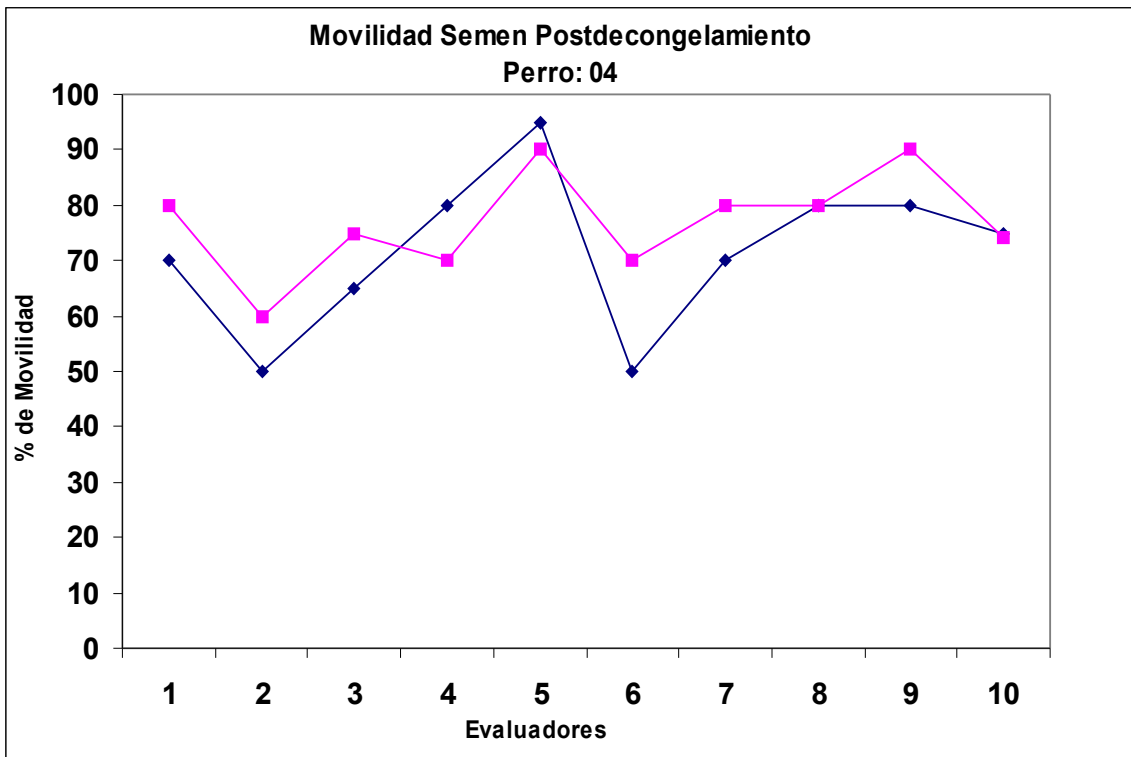
Gráfica 1. Porcentaje de movilidad postdescongelamiento otorgada por los evaluadores para los diluyentes "A" (-■-) y "B" (-◆-), en la cual uno de los evaluadores considera que ambas movilidades son similares.



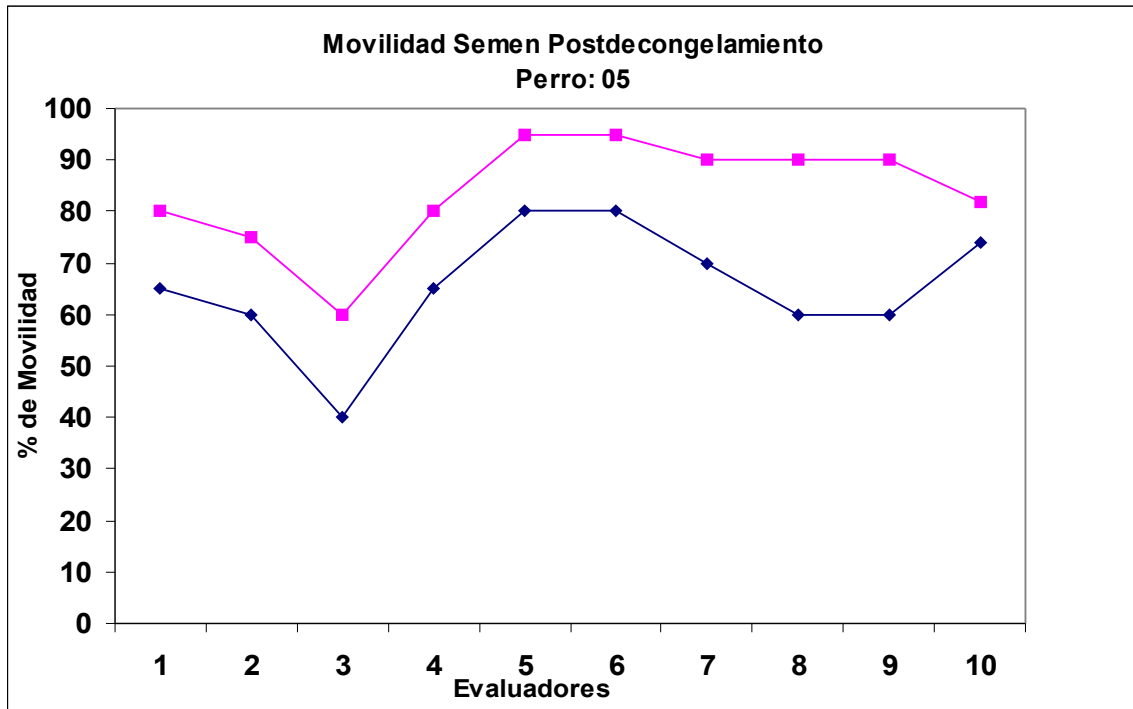
Gráfica 2. Porcentaje de movilidad postdescongelamiento otorgada por los evaluadores para los diluyentes "A" (-■-) y "B" (-◆-), en la que un evaluador considera que las dos movilidades son similares.



Gráfica 3. Porcentaje de movilidad postdescongelamiento otorgada por los evaluadores, en la que dos de ellos consideran mayor la movilidad del diluyente "B" (-◆-), respecto al diluyente "A" (-■-).



Gráfica 4. Porcentaje de movilidad postdescongelamiento otorgada por los evaluadores, en la cual dos de ellos consideran mayor la movilidad del diluyente "B" (-◆-), respecto al diluyente "A" (-■-) y solo uno que ambas movilidades son similares.



Gráfica 5. Porcentaje de movilidad postdescongelamiento otorgada por los evaluadores, la cual muestra una gran diferencia del diluyente "A" (■-), respecto al diluyente "B" (-◆-).

## DISCUSIÓN

La movilidad del semen criopreservado con el diluyente adicionado con ácidos grasos omega 3 y 6 fue mejor para mantener la movilidad en los espermatozoides del perro doméstico al descongelamiento.

Los daños que se producen en las membranas durante la refrigeración a 5°C y en la congelación son a veces difíciles de detectar utilizando análisis laboratoriales de rutina, es por ello que se recomienda el uso de técnicas innovadoras y específicas, como es el caso de pruebas de termorresistencia, integridad acrosomal, marcadores fluorescentes, tinciones de CTC, azul de anilina, microscopía electrónica, citometría de flujo, actividad enzimática, etc.; capaces de detectar la severidad del daño provocado por la congelación-descongelación a las funciones espermáticas y capacidad de fecundación. Ambos procesos de conservación inducen fases de transición lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, causando alteraciones en su estabilidad y estructura que pueden lesionar e incluso matar a la célula. También es reconocido que el glicerol habitualmente incorporado en los diluyentes de congelación, interfiere con la fertilidad <sup>6</sup>. Quinn y White, 1966, comprobaron que la susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro, equino y de cerdo entre los más sensibles, donde se manifiestan alteraciones en la fluidez de la membrana espermática dando lugar al movimiento excesivo de iones, por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidenciaron alteraciones tan marcadas.

Los efectos específicos de la adición de los ácidos grasos omega 3 y 6 en los medios de congelación no han sido reportados cuando se adicionan

directamente en el diluyente, sin embargo en especies como la porcina se han observado resultados interesantes al administrar ácidos grasos esenciales (AGE) en la dieta de los machos, como mejoras en cuanto al porcentaje de células vivas y movilidad espermática <sup>38,39</sup>. Estudios realizados en Brasil por (Rodríguez et al., 2005), coinciden con los resultados y menciona que al estar presentes los AGE en dietas de perros adultos, tanto la movilidad individual progresiva como la concentración espermática mejoran de manera significativa.

Por lo contrario (Rosas et al., 2006), sugieren que altos niveles de AGE diarios en la dieta del perro (124mg y 184mg), ocasionan severos daños a nivel testicular como daños en el epitelio seminífero y disminución tanto de la movilidad como de la concentración espermática. Otros estudios realizados en ratas con deficiencias de AGE entre la séptima y novena semana de edad, se encontró que la espermatogénesis se detiene por completo existiendo una degeneración del epitelio seminífero.

El proceso de congelación y descongelación de células espermáticas reduce la viabilidad de los espermatozoides. Los cambios de temperatura a los que son sometidos provocan un choque por frío, lo que ocasiona que una cantidad considerable de células sean dañadas afectándose la movilidad, la viabilidad, y la fertilidad y otra parte mueran. Los radicales libres ó ROS generados por el proceso de congelación-descongelación y por el metabolismo celular dañan la membrana plasmática espermática, que al estar formada por ácidos grasos poliinsaturados es altamente susceptible a una lipoperoxidación. Aunque los espermatozoides son protegidos por sistemas de defensa antioxidante, estos pueden ser rebasados bajo situaciones en las que las ROS son generadas en exceso, lo que conduce al



estrés oxidante, por lo cual puede resultar benéfico el adicionar antioxidantes a los diluyentes definidos para preservación de semen de los machos reproductores.

El ingrediente fundamental de esta trabajo fue la yema de huevo, la cual tiene como finalidad proporcionar protección antioxidante a los espermatozoides contra el daño producido a su membrana espermática dada por la formación de radicales libres, además del choque por frío, propiedad que le es conferida por poseer una fracción lipoproteica en su composición<sup>32,34</sup>, lo que sugiere que su baja densidad es probablemente la fuente de protección, ya que se unen fuertemente a la membrana plasmática de los espermatozoides<sup>23,32,35</sup>

Es por ello que en el presente trabajo se utilizó huevo de gallina enriquecido con ácidos grasos omega 3 y 6 en proporciones de (490mg) y (250mg)<sup>56</sup> respectivamente; las cuales fueron suplementadas con estos aditivos en su dieta. La yema de huevo ya enriquecida con ácidos grasos fue añadida directamente en el diluyente con lactosa, obteniendo cantidades de 8.1mg para el omega 3 y 4.1mg para el omega 6 por ml., pasando de una dilución 1:1 a una dilución 1:4 en el periodo de equilibrio.

En futuros trabajos se sugiere evaluar la capacidad de fertilidad de las células espermáticas, que fuesen criopreservadas en un medio enriquecido con ácidos grasos omega 3 y 6.

## **CONCLUSIÓN**

La utilización de un diluyente con lactosa y yema de huevo enriquecido con ácidos grasos omegas 3 y 6 para la técnica de congelación de semen de perro en forma pellet, mantiene una mejor movilidad al descongelamiento en comparación al que no los contiene.

## ANEXOS.

### Anexo 1.

#### FÓRMULA DEL DILUYENTE "A"

La fórmula del diluyente que se utilizó en este trabajo es la siguiente:

Lactosa_____	5.5g
Glicerol_____	4ml
Yema de huevo enriquecida con Omega 3 (250mg) y 6 (490mg)	10ml
Sulfato de estreptomicina_____	0.005g
Penicilina_____	0.006g
Agua destilada_____ cbp	50ml

#### FÓRMULA DEL DILUYENTE "B"

La fórmula del diluyente que se utilizó en este trabajo es la siguiente:

Lactosa_____	5.5g
Glicerol_____	4ml
Yema de huevo sin Omegas 3 y 6_____	10ml
Sulfato de estreptomicina_____	0.005g
Penicilina_____	0.006g
Agua destilada_____ cbp	50ml

**Anexo 2.** Formato para el registro de los evaluadores, con el cual se otorgaron porcentajes de movilidad postdescongelamiento.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL**



## Evaluación del semen descongelado

Nombre del Evaluador: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
Nombre del Animal : \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
Fecha de congelado: \_\_\_\_\_ Diluyente: **Lactosa - yema de huevo**  
Congelado como: Pajilla: \_\_\_\_\_ Pellet: **X**  
Tiempo de Descong.: **15 seg.** Temperatura Descong: **35° C**  
El medio en el cual fueron descongelados los pellets: **Solución Salina Fisiológica**

VIABILIDAD POSTDESCONGELAMIENTO

1er Video

2do Video

Movilidad progresiva expresada en % :

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### ESCALA DE EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO

**0% = SIN MOVIMIENTO.**

**20% = LIGERA ONDULACIÓN O VIBRACIÓN DE LA COLA, SIN PROGRESIÓN.**

**40% = PROGRESIÓN LENTA, INCLUYENDO DETENCIÓN Y COMIENZO DE MOVIMIENTO.**

**60% = MOVIMIENTO PROGRESIVO CONTINUO Y MODERADA VELOCIDAD.**

**80% = MOVIMIENTO PROGRESIVO RÁPIDO.**

**100%= MOVIMIENTO PROGRESIVO MUY RÁPIDO, EN EL CUAL LAS CÉLULAS SON DIFÍCILES DE SEGUIR VISUALMENTE.**

**OBSERVACIONES:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## LITERATURA CITADA.

- 1.- Acott, T.S. and Hoskins, D.D.: Bovine sperm forward motility protein partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 253: 6744-6750 (1987).
- 2.- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046
- 3.- Axner E. Sperm Morphology is Better in the second ejaculate than in the first domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia *Teriogenol* 47:929-934, 1997.
- 4.- Bamba, K., Sone, M.: Factors affecting the quality of board semen stored by means of dialysis. *J.Reprod. Sci.*, 62: 193-197 (1980).
- 5.- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 181-190.
- 6.- Battista M.,Parks J.,Concannon P. Canine Sperm Post-thaw survival following freezing in straws or pellets using Pipes, Lactosa, Tris or Test Extenders. *Proc 11<sup>th</sup> Int Congr Anim Reprod* 1988;3:229-231
- 7.- Bharat C.D. and Romamohana R.A.: Preservation of ram semen, *Indian Vet. J.* 1980; 57:130-134
- 8.- Bohorquez R Curso Teórico-práctico sobre teriogenología e inseminación artificial en pequeños animales, SOVEMEVEPA, capítulo Guayana, Puerto Ordaz, Venezuela, Cap. 6,2-16 pp, 2003.
- 9.- Bustamante, G.:Congelación de semen de ovino. En: Memorias del curso de actualización: Aspectos de producción Ovina. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México,1980, 116-122.ed. PADEP, México,D.F. (1981<sup>a</sup>).
- 10.- Dott, H.M., Harrison, R.A.P., and Foster, G.C.A.: The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J. Reprod. Fétil.*, 55: 113-124, (1979).

- 11.- Estienne M.J. and A.F. Harper. 2006 Nutrición y alimentación del verraco. Av Tecnol Porc.3:22-38
- 12.- Evans G. and Maxwell WMC Salamon's Artificial insemination of sheep and goats: Butterworhts Pty Limited, Sydney Australia 1990.
- 13.- Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction, Animal Reproduction Science 60-61, 375-387 pp. 2000.
- 14.- Farstad W., Andersen-Berg K. Factors Influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. J Reprod Fertil 1989;39:289-292.
- 15.- Foote RH. Extenders for freezing dog semen. Am J Vet Res 1964; 25:37-40.
- 16.- González H.G.: Congelación de semen caprino en pajillas francesas de 0.5ml evaluándolo a diferentes ritmos de descongelación. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet.y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México,D.F.,1990.
- 17.- Gram. J.K.: Effect of seminal plasma on the motility of epididymal an eyaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology, 41: 115-1162 (1994).
- 18.- Hafez ESE: Estudios del semen en reproducción e inseminación artificial en animales 5ª ed. Editado por: Hafez ESE., 491-518 Ed. Interamericana McGraw -Hill, México, D.F. 1989.
- 19.- Hancock JL The morfology of boar spermatozoa. Journal of research Microscopy Society, v76, p84-87, 1957.
- 20.- Hunton, J.R., Flecker, S.E. and Maxwell, W.M.C.: Intra-uterine insemination with pellet or straw-froen ram semen. Proc. Aust.Soc. Reprod. Biol., 19:41, Abstr. (1987)
- 21.- Hutchison R. Maximizing Conception Rates Using Fresh Cooled or frozen canine semen, Tufts'Canine and feline Breeding and Genetics Conference, North Ridgeville, Oh, October 2-6, USA, 2003.
- 22.- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N.,Somlev B. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminium tubes using three extenders. Theriogenology 1997;48:1343-1349.

- 23.- Jones, R.C. and Martin, I.C.A.: The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 35, 311-320 (1973).
- 24.- Klug EA., Günzel H. Merkt UD. Krause: Untersuchungen von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma *Dtsch, Tierärztl, Wsch*, 1977; 84:236-238.
- 25.- Kutzler M.A. Semen collection in the dog. *Dog Collection Erection Ejaculation Theriogenology* 2005; 64:747-754
- 26.- Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- 27.- Linde-Forsberg C. Archiving canine pregnancy by using frozen or chilled extended And frozen-thawed semen in the dog. *Sem Vet Med Surg* 1995; 10:48-58.
- 28.- Mathur, A.K., Srivastava, R.S. and kalra, D.B. : Pellet freezing of ram semen. *Indian J. Anim. Sci.*, 59: 1529-1531 (1989).
- 29.- Mathur, A.K., Srivastava, R.S. and Rataw, P.S. : Effect of larger pellet volumes frozen on round and flat glass surfaces on cryosurvival of ram spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.*, 63 (4): 427-429 (1993).
- 30.- Maxwell, W.M.C. Curnok, R.M., Logue, D.N. and Reed, H.C.B.:Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report *Theriogenology*, 1980; 14:83-89.
- 31.- Maxwell, W.M.C., Butler, L.G. and Wilson, H.R.: Intrauterine insemination of ewes with frozen semen. *J. Agric Sci Camb*, 1984; 102:233-235.
- 32.- Maxwell, W.M.C. and Salamon, S.: Liquit storage of ram: a review. *Reprod. Fertil Dev.*,5, 613-638 (1993).
- 33.- Mazur P. Freezing living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247, C125-C142.
- 34.- Medina-Navarro R, Lifshitz A, Wachter N, Hicks JJ (1997) Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. *Arch. Med.* 28: 205-208

- 35.- Molina, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 727-737 (1994b).
- 36.- Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A (1999) Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell Sci.* 112: 11-20.
- 37.- Nagase H., Niwa UT: Deep freezing bull semen in concentrated pellet from 5. *Int Kongr für Fortpfl Haustierbesamung*, Trient, 1964; 410-415N.
- 38.- Paulenz H. O. Taugbol P.O. Hofmo and K. Saarem 1995. A preliminary an the effect dieaty supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen *Vet Res Communications* 19:273-284
- 39.- Penny, P. C., R. C. Noble, A. Maldjian, S. Ccerolini. 2000. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News and Information* 21:119-126.
- 40.- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26: 341-354, (1989).
- 41.- Salamon, S.O and mushtaq, A.M.: Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21:355-360 (1968).
- 42.- Salamon, S.: The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 459-468 (1970).
- 43.- Salamon, S. and Visser, D.: Effect of composition of Tris-based diluyent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Sci.*, 25: 605-618 (1972).
- 44.- Salamon, S.: Deep freezing of boar semen. III. Effects of centrifugation, diluyent and dilution rate, pellet volume and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26 :231-237 (1973).



- 45.- Salamon, S. and Maxwell, W.M.C.: Frozen storage of ram semen II. Cause of low fertility after cervical insemination and meths of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*,38: 1-36 (1995b).
- 46.- SPSS version 13.0 (Statistical Package for Social Sciences) © 2004.
- 47.- Scmehl, M.K., Vazquez, I.A. and Graham, E.F.: The effect of nonpenetrating cryoprotectant added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thawing motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23 :512-517 (1986).
- 48.- Rodriguez AC, Ruíz CM, Nardo CDDD, Souza FF, Rosal FM, Souza DB, Neto HA. The effect of food suplementes whit omegas 3 and 6 in fresh semen quality of dogs. Centro Universitario Río Prieto. Brasil, 2005.
- 49.- Rosas ML. Efecto de los ácidos grasos omega 3 y 6 sobre la calidad seminal del perro (*canis lupus familiaris*). Tesis de Maestria en Ciencias de la Producción y Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico D.F., 2006.
- 50.- Silva A., Cardoso R., Uchoa D., Silva L. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenol* 59(3-4):821-9, 2003.
- 51.-Snedeker, W.H. and Gaunya, W.S.: Dimethyl sulfoxide as a protective agent for freezing bovine semen. *J. Anim.Sci* 30: 953-956 (1970).
- 52.- Thomas PGA, Larsen RE, Hahn CN. A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 1993; 40:1199-1205.
- 53.- Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-492.
- 54.- Watson P.F. and Marin, I.C. A.: A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*,28: 99-101 (1972).
- 55.- Wolfe CA, James PS, Mackie AR, Ladha S, Jones R (1998) Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1506-1514.
- 56.- [http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_07/huevo\\_enero07.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_07/huevo_enero07.pdf)