



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EVALUACIÓN DE TRES AZÚCARES (FRUCTOSA, TREHALOSA Y SACAROSA) EMPLEADOS EN UN DILUTOR PARA MANTENER LA CALIDAD DEL SEMEN CANINO REFRIGERADO A 5°C.”

Tesis para optar el título profesional de:  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Presentado por:  
KRIZIA HERNANDEZ- MOREY BOHL  
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA- PERÚ

2018

## Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 17:00 horas del 11 de Diciembre de 2018, en el Auditorio del Campus Villa I, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 078-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2018**, presidido por el Dr. Alexei Santiani Acosta, Mg. Boris Lira Mejía, M.V.Z. Yurie Arias Guerrero y la Mg. Shirley Evangelista Vargas como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis **"EVALUACIÓN DE TRES AZUCARES (FRUCTOSA, TREHALOSA Y SACAROSA) EMPLEADOS EN UN DILUTOR PARA MANTENER LA CALIDAD DEL SEMEN CANINO REFRIGERADO A 5°C"**.

El presidente concedió el uso de la palabra a la Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Hernandez - Morey Bohl Krizia**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, la bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... *Dieciséte* ..... (17)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 18:00hrs.



.....  
**Dr. Alexei Santiani Acosta**  
*Presidente*



.....  
**Mg. Boris Lira Mejía**  
*Miembro*



.....  
**M.V.Z. Yurie Arias Guerrero**  
*Miembro*



.....  
**Mg. Shirley Evangelista Vargas**  
*Director - Observador*

023-2018

T // (51) 610 6400  
 opción 2  
[www.cientifica.edu.pe](http://www.cientifica.edu.pe)

Campus  
 Panamericana Sur  
 km 19 - Lima 42

**INDICE**

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Inseminación artificial en caninos.....	3
2.1.1. Causas del empleo de inseminación artificial en caninos.....	3
2.1.2. Comportamiento indeseable.....	3
2.1.3 Problemas anatómicos.....	4
2.1.4 Problemas de origen adquirido .....	4
2.2 Colección y evaluación seminal en caninos.....	4
2.2.1 Volumen y color.....	5
2.2.2 pH.....	5
2.2.3 Concentración.....	5
2.2.4 Motilidad.....	6
2.2.5 Viabilidad.....	6
2.2.6 Especies reactivas de oxígeno .....	6
2.3 Empleo de dilutores de semen .....	7
2.3.1 Componentes orgánicos del dilutor.....	8
2.3.1.1 Yema de huevo .....	8
2.3.1.2 Leche.....	8
2.3.1.3 Azúcares.....	9

A. Glucosa y Fructosa.....	9
B. Trehalosa.....	10
C. Sacarosa.....	11
2.4 Transporte de semen canino.....	11
2.5 Especies reactivas de oxígeno y su influencia sobre parámetros seminales	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Locación y animales.....	14
3.2 Metodología experimental.....	14
3.3. Métodos experimentales.....	15
3.3.1 Colecta de la muestra .....	15
3.3.2 Manejo inicial del eyaculado .....	16
3.3.3 Preparación del dilutor.....	16
3.3.4 Dilución y refrigeración.....	17
3.4 Evaluación de las características seminales.....	17
3.4.1 Motilidad.....	17
3.4.2 Viabilidad espermática.....	17
3.4.3 Evaluación de peróxido de hidrogeno .....	18
3.5 Análisis estadístico.....	19
IV. RESULTADOS .....	20
V. DISCUSIÓN.....	22
VI. CONCLUSIONES.....	25
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	26
VIII ANEXOS.....	31

## RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar tres azúcares (Fructosa, trehalosa y sacarosa) empleados en un dilutor básico de fácil preparación, con el fin de determinar cuál de ellas conserva mejor la calidad del semen refrigerado a 5°C. Los 15 eyaculados de perro fueron distribuidos en 3 alícuotas cada uno. Estas alícuotas fueron diluidas con un dilutor en base a leche descremada + yema de huevo, con un azúcar distinto a evaluar (Fructosa, Trehalosa y Sacarosa). Los tres tratamientos fueron evaluados a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración y se evaluaron los siguientes parámetros: motilidad, viabilidad y producción de peróxido de hidrogeno. En ninguno de los tres tratamientos se encontraron diferencias significativas entre los azúcares para la variable de motilidad ( $p=0.0962$ ) y se obtuvieron resultados aceptables para ser utilizados para inseminación artificial solo hasta las 24 horas, en el caso de Fructosa (60.33%) Trehalosa (64.46%) y para Sacarosa (47.66%). Con respecto a la viabilidad espermática, no hay diferencias significativas entre los azúcares ( $p=0.2592$ ) encontrándose resultados aceptables para las tres azúcares solo hasta las 24 horas de refrigeración por encima del 50%, para el caso de Fructosa (64.26%), Trehalosa (64.20%) y sacarosa (54.66%). Finalmente, tampoco hay diferencia significativa entre los azúcares en cuanto a la producción de peróxido de hidrogeno ( $p=0.7980$ ) pero hubo una tendencia al aumento considerable de la producción de peróxido de hidrogeno a las 48 horas con respecto a las 24 horas. Se concluye que, a las 24 horas de refrigeración, las muestras tienen parámetros aceptables para la inseminación artificial (mayores valores de motilidad, viabilidad espermática y menor producción de peróxido de hidrogeno), en comparación con las 48 horas. Además, el empleo de cualquiera de los 3 azúcares no influirá en la conservación de las características espermáticas. Es posible emplear un dilutor de fabricación casera para el transporte de espermatozoides de canino.

Palabras clave: Canino, espermatozoide, dilutor, semen refrigerado

## ABSTRACT

The present study was designed to evaluate three sugars (fructose, trehalose and sucrose) used in a basic diluent of easy preparation, in order to determine which of them preserved the quality of cooled semen at 5 ° C. The 15 dog ejaculates were distributed in 3 aliquots each. These aliquots were diluted with a skimmed milk and egg yolk based dilutant, with a different sugar to evaluate (Fructose, Trehalose and Sucrose). The three treatments were evaluated at 0, 24 and 48 hours of refrigeration, and the following parameters were evaluated: motility, viability and production of hydrogen peroxide. No significant differences were found in neither three treatments between the sugars for the motility variable ( $p = 0.0962$ ), and acceptable results were obtained to be used for artificial insemination only up to 24 hours, in the case of Fructose (60.33%) Trehalose (64.46%) and for Sucrose (47.66%). Regarding the sperm viability, there are no significant differences between sugars ( $p = 0.2592$ ), finding acceptable results for the three, only up to 24 hours of cooling above 50%, for the case of Fructose (64.26%), Trehalose (64.20%) and sucrose (54.66%). Finally, there is no significant difference between the sugars in terms of the production of hydrogen peroxide ( $p = 0.7980$ ) but there was a tendency to a considerable increase in the production of hydrogen peroxide at 48 hours compared to 24 hours. It is concluded that there are better results at 24 hours, obtaining better values of motility, sperm viability and lower production of hydrogen peroxide. Moreover, the use of any of the three sugars will not influence the conservation of the spermatic characteristics. It is possible to use a homemade dilutor for the transport of canine sperm during the short time (less than 24 hours). In conclusion, after 24 hours of refrigeration, the samples have acceptable parameters for artificial insemination, compared to 48 hours, since there are higher values of motility, sperm viability and lower production of hydrogen peroxide. In addition, the use of any of the 3 sugars will not influence the conservation of sperm characteristics. It is possible to use a homemade dilutor for the transport of canine sperm.

Key words: Canine, spermatozoon, dilutor, refrigerated semen

<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1.- Composición de los dilutores utilizados en cada grupo experimental .....	16

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1.- Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la viabilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración .....	20
Tabla 2.- Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la motilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración. ....	21
Tabla 3.- Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la producción de peróxido de hidrógeno espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración. ....	21

<b>LISTA DE FIGURAS:</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1: forma de alicuotar cada muestra de semen para los tres tratamientos a evaluar. ....	15
Figura 2: Evaluación de la viabilidad espermática canina.....	18
Figura 3: Evaluación de la producción de peróxido de hidrógeno en muestras de semen canino.....	19

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la crianza de perros es una afición de distribución mundial, por lo que la conservación de semen y la inseminación artificial se han convertido en temas de importancia en la medicina veterinaria. Por ello, es necesaria la investigación y la búsqueda de nuevos protocolos para preservar el semen y tratar de afectar lo menos posible la calidad del semen (Flores *et al.*, 2010)

Hoy en día el avance en la biotecnología reproductiva animal aplicada a caninos nos hace buscar un dilutor que implique un menor costo económico, práctico y que conserve adecuadamente la calidad del semen, para así tener mayor éxito para la inseminación artificial, empleando semen refrigerado. Como indica Sirivaidyapong *et al.*, (2000) ha sido demostrado que la composición de los dilutores para conservar semen canino puede afectar el tiempo de almacenamiento y calidad espermática. Por lo tanto, Yildiz *et al.* (2000), propone que los azúcares sirven como fuente de energía para la célula espermática, también permiten el mantenimiento de la presión osmótica y cumplen una acción crioprotectora, por ello, la inclusión de azúcares en los dilutores sirve para la preservación de semen canino.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar tres azúcares (fructosa, trehalosa y sacarosa) suplementadas en un dilutor de refrigeración para semen canino y lograr diferenciar cuál de los tres azúcares conserva mejor la calidad del semen, por lo tanto, se podrá tomar como base los resultados obtenidos, para poder diseñar protocolos de inseminación artificial a larga distancia y además dichos protocolos incluye insumos de

fácil consecución, bajo costo y de una manera sencilla se aborda el tópico de la reproducción canina con programas de biotecnologías actualizadas.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Inseminación Artificial en caninos.**

Con el paso del tiempo se han desarrollado diversas técnicas en busca de la mejora reproductiva en diferentes animales domésticos, donde se han desarrollado diversas tecnologías, por ejemplo; inseminación artificial, transferencia de embriones, criopreservación, entre otras. Por lo tanto estas tecnologías nos han permitido tener diversas herramientas las cuales nos permiten acceder a manipular la actividad reproductiva de los animales domésticos, con el fin propagar la carga genética de animales superiores en menor tiempo. (Madrid, 2014)

Es por ello que se considera que la inseminación artificial tiene como objetivo la mejorar genética de la especie. Así mismo, se puede emplear cuando se presentan problemas que interfieren con la monta natural. Esto se puede dar por un comportamiento anormal o indeseable, prevenir la transmisión de enfermedades venéreas o problemas anatómicos adquiridos. (Paramo, 2005)

#### **2.1.1. Causas del empleo de la inseminación artificial en caninos:**

Existen varias causas por las cuales se prefiere la inseminación artificial sobre la monta natural en caninos.

#### **2.1.2. Comportamiento indeseable:**

Este comportamiento afecta a ambos sexos que se manifiesta como agresividad o timidez. La presentación más común en la hembra consiste en rechazar a ser montada lo que genera que ella se siente cada vez que el macho se acerca, esto sucede en perras que son bastante consentidas por los dueños, que paran en brazo de los dueños como los yorkshire terrier, poodle etc. (Paramo, 2005)

### **2.1.3. Problemas anatómicos:**

Los problemas de anatomía son los propios de la raza en particular o con los cuales nació el perro.

Por ejemplo, en caso de hembras se puede observar estrechez vestibulo-vaginal, el cual origina dolor a la hembra a la hora de la penetración, lo cual hará que no acepte más la monta. Así mismo, se puede observar en la práctica que existen muchas hembras con la vulva muy pequeña y mal posicionada, lo cual genera dificultad para el macho en la monta y este intento constante puede originar irritación del pene. (Paramo, 2005)

Por otro lado, se puede observar que razas el bulldog inglés, bulldog francés o el dashhound, presentan problemas para reproducirse por presentar los miembros posteriores cortos lo cual les dificulta la monta del macho. (Paramo, 2005)

### **2.1.4. Problemas de origen adquirido:**

Estos problemas ocurren normalmente en los perros de edad avanzada donde son más propensos a sufrir problemas articulares, columna etc. Además, están los que se presentan en cualquiera edad; como el sobrepeso en el macho, que dificulta la monta, ya que la hembra no va a poder sostenerlo en el acto. Otros de los problemas adquiridos, son por transmisión de enfermedades venéreas; entre las enfermedades más conocidas transmitidas por la copula, se encuentran: brucelosis, leptospirosis, tumor venéreo transmisible y micoplasma. (Paramo. 2005)

## **2.2 Colección y evaluación del semen canino**

La colección de semen puede ser realizada por procedimiento manual, que es el más popular ya que no requiere de implementos especializado y es de bajo costo. Es recomendado dejar un descanso sexual de 5 días al macho reproductor para tener una muestra de mejor calidad. A la hora de hacer la colección de semen se debe tener en cuenta la libido y la facilidad de manejo del macho, por lo tanto, es beneficioso utilizar a una perra en celo para la colección de muestra ya que facilita la obtención del semen. Aunque en muchos casos no hay presencia de la hembra para la colección de semen se pueden utilizar feromonas comerciales en caso del que macho sea renuente. El equipamiento es mínimo, se utiliza un recipiente estéril para colectar el semen, pueden ser tubos de vidrio, cubiertas de jeringas estériles. (Bonilla *et al.*, 2007)

Como parte del manejo inicial del semen se deberá tener en cuenta un análisis minucioso en fresco de manera obligatoria a fin de determinar la motilidad y concentración. (Bonilla *et al*, 2007). Esta evaluación básica debe ser realizada rutinariamente a fin de descartar una posible infertilidad del macho.

### **2.2.1 Volumen y color:**

El eyaculado canino tiene variaciones en cuanto al volumen y concentración espermática, esto causado principalmente por las variaciones de tamaño entre los ejemplares de la especie canina y por supuesto entre las diferentes razas y no tiene relación con la fertilidad del animal. El semen canino se halla conformado por dos elementos: un elemento celular conformado por los espermatozoides y un elemento líquido denominado plasma seminal, formado prioritariamente por la secreción prostática. Cabe resaltar que el semen es eyaculado en tres fracciones (Carlotto, 2011).

El semen de los caninos tiene una coloración blanco lechoso, el aspecto da una idea de la concentración espermática, mientras más blanco lechoso, mayor será la concentración. Con respecto al volumen, éste va a variar dependiendo de la raza, edad y tamaño. Este puede variar desde 1ml hasta 40ml (Dinatolo, 2011).

### **2.2.2 pH**

El pH del semen canino va a depender de cuanto líquido prostático se ha obtenido en la muestra, este tiene una variación entre 6.3 a 7. Cuando hay alteraciones en los testículos como inflamación o no hay una recolección completa el pH será menor afectando así la motilidad espermática. Se cree que el fluido alcalino de líquido prostático favorece la motilidad espermática y ayudar a neutralizar la acidez de la vagina en la eyaculación. (Bonilla *et al.*, 2007).

### **2.2.3 Concentración**

La concentración debe ser calculada de cada eyaculado para así poder conocer el número total de espermatozoides presentes en el semen. El método para hacer este cálculo puede ser empleado por la cámara de Neubauer. En el perro oscilan entre 300-2000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10<sup>6</sup> esp/mL (Álamo, 2007)

### 2.2.4 Motilidad

La motilidad se mide por los espermatozoides en movimiento. Se considera la motilidad masal y la motilidad individual. Esta motilidad puede afectarse cuando hay cambios de temperatura o por la presencia de sustancias toxicas, como detergente en el equipo recolector. El valor normal de motilidad en semen fresco es de 85-95%. Se ha demostrado que  $200 \times 10^6$  espermatozoides móviles en semen fresco, es un adecuado valor para tener tasas de fertilidad similares a los de monta natural. (Álamo, 2007)

### 2.2.5 Viabilidad

Las técnicas más utilizadas para evaluar la viabilidad espermática son los métodos de tinción vital , la cual va a permitir poder distinguir los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos debido a la membrana plasmática y su permeabilidad a los colorantes, por lo tanto los espermatozoides que tengan una membrana plasmática intacta no van a permitir que el colorante internalice la célula y un espermatozoide con una membrana no funcional si permite el pasaje del colorante y la célula se tiñe (Álamo, 2007).

La evaluación de la viabilidad espermática debe realizarse en microscopio con aceite de inmersión a un aumento de 1000X. Se evalúan 100 espermatozoides y se determinan como vivos o muertos. Los espermatozoides muertos ser verán de color rosado por la tinción de la eosina (Bonilla et al., 2007).

### 2.2.6 Especies reactivas de oxígeno

Hay gran variedad de propuestas para medir el estrés oxidativo, donde se determina el daño causado por radicales libres, dentro de los cuales se incluyen medición de lípido, proteínas y ADN oxidados (Sánchez *et al.*, 2004, Chihuailaf et al., 2002)

En cuanto a la medición de estrés oxidativo se encuentra la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS), en las cuales existen varias técnicas para medir ROS, dentro de las técnicas más utilizadas se encuentra la fluorescencia de la diclorofluoresceína, que es la oxidación de la 2-7-diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto fluorescente 2-7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) por la presencia de peróxido de hidrógeno, y permite utilizar esta reacción como indicador específico como formación de esta especie reactiva, este método se utiliza ampliamente en la detección de peróxido de hidrógeno. La

fluorescencia producida por la DCF se mide 498nm de excitación y 522 de emisión (Sánchez *et al.*, 2004).

En los que respecta a los fluorocromos, los más utilizados se encuentran: el yoduro de propidio (YP), el bromuro de etidio, el naranja de acridina, el Hoechst 33342, el naranja de tiazol, la mitramicina y la cromomicina A3. Los dos son los que más se utilizan, estos fluorocromos se excitan a longitudes de onda de 488 nm. y se unen de forma estequiométrica al ADN de doble cadena, donde se intercalan entre la doble hélice (Matas, 1997, pp 19).

Una vez teñidos los espermatozoides y vistos al microscopio los que producen ROS se tiñen de color verde, mientras que los vivos no se tiñen y los muertos serán observados de color rojo.

### **2.3 Empleo dilutores de semen canino**

Los dilutores de semen contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia espermática fuera de tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis de inseminación. Para ello las muestra de semen deben ser diluidas lo más pronto posible, dentro de un recipiente estéril y tapado, en un sitio sin luz a grados de temperatura propios del ambiente en el cual se encuentre, para evitar el shock térmico y enfriamiento o recalentamiento, también se debe evitar demasiado movimiento o sobreexposición ambiental, es decir, sobreexposición al aire o a la luz solar directa. (Bonilla *et al.*, 2007)

Las funciones que tienen los dilutores son las siguientes:

- Contribuir con una nutrición que requieren los espermatozoides para el metabolismo aeróbico y anaeróbico.
- Proporcionar lipoproteínas y/o lecitinas que cuiden a los espermatozoides del “choque térmico”.
- Aumente el eyaculado para mayor cantidad de porciones por inseminación.
- Se utiliza como buffer contra las modificaciones del pH que se originan en razón del incremento del metabolismo en las células espermáticas.
- Conservar las continuas presiones osmóticas y el cálculo electrolítico en el medio que cubre a las células espermáticas, y en contribuye a generar sustancias que eviten el desarrollo bacteriano. (Santa Cruz, 2011; López, 2015)

Actualmente se encuentran dilutores de excelentes y de fácil utilidad, solamente será de utilidad adicionarles agua y yema de huevo como sustancias aditivas. (Santa Cruz, 2011)

### **2.3.1 Componentes orgánicos del dilutor**

Estos componentes previenen el shock térmico de las células espermáticas al inicio de la refrigeración. Los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides de diferentes especies frente al descenso de temperatura son: yema de huevo y leche. (Pineda *et al.*, 2007).

#### **2.3.1.1 Yema de huevo:**

La yema de huevo es un componente básico que está en casi todos los diluyentes por su papel protector y conservador de los espermatozoides está ligado a los compuestos lípido-proteicos y lipídicos de la yema de huevo, igualmente contiene glucosa que puede ser metabolizada por los espermatozoides, ciertas proteínas, vitaminas hidrosolubles y liposolubles las cuales poseen un cierto grado de viscosidad que pueden beneficiar a las células espermáticas (Vargas, 2015).

Los huevos utilizados deben ser del día (siendo lo ideal de 24 horas de puesto), deben ser lavados con jabón líquido y luego ser introducidos por 5 minutos en alcohol, con el fin de evitar la contaminación del semen. (López, 2015)

#### **2.3.1.2 Leche:**

La leche es un componente comúnmente utilizado como diluyente de semen en la mayoría de las especies, y tiene un buen rendimiento tanto *in vitro* como *in vivo* (Díaz, 2015).

Dentro de los componentes de la leche se encuentran las proteínas, estas “tienen acción amortiguadora a los cambios de pH y también actúan como quelantes para cualquier metal pesado que pueda estar presente” (Salamon *et al.*, 2000). Sin embargo la principal proteína de la leche es “la caseína, tiene acción antioxidante por lo tanto acción protectora de los espermatozoides durante el proceso de enfriamiento” (Foote, 2002). Por otro lado, la lactenina que es otra proteína que también está presente en la leche, tiene efecto tóxico para los espermatozoides, por lo que es necesario calentar la leche a temperaturas mayores a los 90°C, para que se inactive la proteína. Por lo que el uso de leche tratada con altas

temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon *et al.*, 2000)

La adición de yema de huevo a la leche descremada mejora la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento en la refrigeración, como así también su fracción de fosfolípidos proporciona protección a los espermatozoides y membrana acrosomal contra golpe de frío. También ha sido especulado que la leche y la yema de huevo tienen un efecto sinérgico, de protección sobre el espermatozoide a causa de su acción análoga en el secuestro de proteínas del plasma seminal. (Vargas, 2015)

### **2.3.1.3 Azúcares:**

La suplementación de azúcares al dilutor ayuda a incrementar el sustrato energético de los espermatozoides. (Sánchez *et al.*, 2002). Además de servir como fuente de energía para el espermatozoide, ayudan a mantener la presión osmótica y desempeñando una acción crioprotectora. (Yildiz *et al.*, 2000). Los azúcares que mayormente son empleados para la congelación de semen de especies domesticas son: la lactosa, la fructosa, la glucosa, la sacarosa, la rafinosa y la trehalosa (Rossi, 2012), Además Se ha comprobado en otras especies que los azúcares como la glucosa, trehalosa, y sacarosa en un dilutor reducen el daño acrosomal. Por otro lado, la fructosa y xilosa, mejoran la motilidad junto con la viabilidad y porcentajes de acrosoma intacto. Además, la trehalosa, xilosa y fructosa tiene aumento significativo de las tasas de espermatozoides activos totales en comparación con otros azúcares. Por lo tanto, la suplementación de diferentes tipos de azúcares va a variar en su capacidad de protección en los espermatozoides. (Yildiz *et al.*, 2000) Por lo tanto es de gran importancia la adición de azúcares al dilutor para mantener los niveles adecuados de motilidad espermática e integridad funcional de membrana (Flores *et al.*, 2002)

#### **a. Glucosa y fructosa:**

Son sustancias no penetrantes que actúan osmóticamente, lo cual promueve que se presente una deshidratación celular durante la disminución de la temperatura, que impide la formación de grandes cristales de hielo intracelular. Diversos estudios sostienen que estas sustancias disminuyen el efecto de la elevada concentración intracelular de solutos, y por ende son más seguros en congelaciones rápidas (Muiño *et al.*, 2008).

Los azúcares que se hallan en los diluyentes poseen un efecto positivo sobre la viabilidad de los espermatozoides, esto principalmente por su aporte energético al espermatozoide,

los cuales son capaces de metabolizar glucosa, fructosa y manosa por vía oxidativa y tiene acción crioprotectora, favoreciendo la manutención del equilibrio osmótico (Cortés, 1997). Además, el efecto benéfico de la suplementación de fructosa al dilutor mejora la viabilidad la tasa de supervivencia en espermatozoides de caninos. (Baquero *et al.*, 2004).

**b. Trehalosa:**

“La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido;  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; PM= 342,31) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa”. (Mascorro *et. al.*, 2005, pp. 193)

Esta azúcar se halla presente en bacterias, algas, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas. Estas entidades, se caracterizan por sobrevivir en estado de casi total deshidratación, pudiendo resistir condiciones extremas de elevadas o bajas temperaturas, condiciones de salinidad y hasta radiación y más adelante recuperan sus funciones vitales al rehidratarse (Mascorro *et al.*, 2005). Además, hoy en día la trehalosa se utiliza de diferentes formas como: sustituto del azúcar, protector de células, tejidos y órganos, estabilizador y preservador de moléculas complejos, osmoprotector en plantas, usos médicos entre otros (Iturriaga *et al.*, 2009)

La trehalosa facilita a los prótidos, ante situaciones de estrés, conserven de manera sobresaliente su actividad biológica. Esto debido a que la trehalosa sustituye al agua que se halla próxima a las proteínas, por lo cual forma una variedad de cápsula, que preserva la disposición terciaria y la actividad de la proteína al deshidratarse. (Rossi, 2012)

Rossi (2012) señala que “Se han hecho diferentes estudios sobre el efecto crioprotector de la trehalosa en la viabilidad espermática, especialmente en especies como la ovina y bovina”. Además se indica que el valor de la trehalosa reside en que es un crioprotector no permanente que preserva la estructura membranosa de los espermatozoides contra el estrés oxidativo y daños frente al shock de frío que se produce con la reducción de temperatura (Hu *et al.*, 2010).

La trehalosa tiene la propiedad de actuar en conjunto con los lípidos de membrana, con lo cual limita la etapa de transición. Su acción crioprotectora posee un efecto estabilizador de membrana, con lo cual hace que ésta sufra menos con los cambios de temperatura. Como otros azúcares actúa a nivel extracelular manteniendo la presión osmótica y la integridad de membrana. (Rossi, 2012)

Otros estudios, marcan que el diluyente que contiene trehalosa mejora la acción antioxidante y reduce el estrés oxidativo procedente de la criopreservación. Es así que, la trehalosa suscita la deshidratación celular, con lo que reduce el efecto negativo del flujo de agua de la membrana en el momento que ocurre la congelación y la formación de cristales de hielo. (Yildiz *et al.*, 2000)

### c. Sacarosa.

La sacarosa es un “disacárido no permeable de alto peso molecular, conocido también como O-  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructuofuranosido” (Mayes, 1997, pp. 78). En diluyentes sin glicerol, la motilidad después del descongelamiento de los espermatozoides de carnero fue más alta en presencia de sacarosa que en presencia de glucosa, indicando un efecto crioprotector de los disacáridos (Aisen *et al.*, 2000). En lo que respecta a esta azúcar, “tiene acción protectora sobre la integridad de la membrana y la estructura proteica durante la deshidratación y rehidratación celular” (Leslie *et al.*, 1995). Molinia *et al.*, (1994) indica que no hay diferencia significativa entre el tipo de azúcar (sacarosa y trehalosa) usado en un dilutor sobre los parámetros de motilidad luego de descongelamiento de espermatozoides de ovinos.

## 2.4 Transporte de semen canino

En los últimos años, se ha vuelto un procedimiento común, el transportar material biológico ya sea a lugares cercanos o lejanos. Mayormente las muestras son enviadas como semen refrigerado tardando de 12 a 48 horas, por lo tanto son muestras que van a ser utilizadas inmediatamente para inseminación para perras que se encuentren en celo (Hendricks *et al.*, 2010).

Por otro lado, como indica Peña *et al.*, (2006) y Hendricks *et al.*, (2010) “para poder transportar semen congelado se necesita de nitrógeno líquido para poder almacenar la muestra”. Sin embargo, si se quiere enviar muestras congeladas en nitrógeno líquido a territorios lejanos en transporte aéreo, esta se encuentra sujeto a regulación como material peligroso y en consecuencia, el transporte de muestras congeladas de semen resulta muy complejo y difícil de realizar (Bielanski 2005). En cambio cuando “se trata de semen refrigerado no existen este tipo de restricciones “(Hermansson *et al.*, 2006). Por tanto, sería muy interesante valorar la posibilidad de remitir muestras refrigeradas y una vez llegada a destino, congelar esas muestras para su almacenamiento a largo plazo para un uso posterior.

En lo que respecta a la refrigeración de semen, este proceso se realiza en temperaturas entre los 4 y 6 °C. (Goodman y Cain, 1993).

Por lo tanto, la refrigeración y la congelación del semen van a disminuir la actividad metabólica de los espermatozoides y conllevaba a preservar la viabilidad espermática. Sin embargo, ambos procedimientos muestran ventajas y limitaciones. (Meyers, 2006). Por otro lado, Hammerstedt et al., (1990) menciona que “el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática (plasmalema) al daño causado por los cambios de temperatura (shock térmico)”. En líneas generales “el semen canino es altamente estable durante el proceso de refrigeración, permitiendo el mantenimiento de niveles aceptables de calidad seminal a corto plazo” (Verstegen *et al.*, 2005; Ponglowhapan *et al.*, 2004).

Diversos estudios han confirmado que en un diluyente en base a Tris-glucosa-huevo puede preservar el semen canino a 4 °C durante 5-7 días (Verstegen *et al.*, 2005; Nizanski *et al.*, 2009) y luego de este lapso de tiempo, ira disminuyendo la calidad espermática. Sin embargo, Peña *et al.*, (2006) “señala que el semen refrigerado solo debería utilizarse las primeras 48 horas de refrigeración para obtener mejores resultados” en la inseminación artificial y numerosos estudios han confirmado que el periodo de conservación y el tipo de recipiente que contiene el semen influyen marcadamente sobre la viabilidad del semen refrigerado (Pinto *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2009).

En general, la refrigeración de semen a 5 °C va a conservar mejor la calidad espermática en comparación al mantenimiento en temperatura ambiente. Sin embargo durante la curva de enfriamiento los espermatozoides van a sufrir shock térmico, afectando así su capacidad fecundante (Mattos *et al.*, 1997).

Dentro del shock térmico lo que experimentan los espermatozoides es estrés oxidativo, que es el daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes tanto estructurales como fisiológicos, generando menos sobrevivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides luego de ser eyaculados. El estrés oxidativo está formado por una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) o radicales libres, los cuales aumentaran durante el manejo y manipulación de la muestra seminal, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides (Córdova *et al.*, 2009).

## 2.5 Especies reactivas de oxígeno y su influencia sobre los parámetros seminales

Los ROS son moléculas derivadas de oxígeno formados como productos intermediarios (Argawal, *et al.*, 2004). La producción celular de ROS fue observada por primera vez en espermatozoides de mamíferos a finales de los años cuarenta (Tortolero *et al.*, 2005),

En condiciones normales los niveles fisiológicos los ROS son esenciales para la función reproductiva normal, actuando como intermedios metabólicos, en la regulación de genes y en la facilitación de la capacitación espermática y la reacción del acrosoma. (Argawal, *et al.*, 2011)

Sin embargo, cuando hay un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema antioxidante para metabolizarlas y prevenir o reparar el daño provocado por las mismas, se da el efecto conocido como estrés oxidativo. Todos los componentes celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares son blancos potenciales de las ROS, el daño provocado por las ROS depende no solo de la cantidad y naturaleza de las mismas, sino también de factores como la temperatura, tensión del oxígeno y la composición del ambiente que lo rodea (Hammoud *et al.*, 2008). Los principales efectos nocivos de ROS sobre la función espermática son: La pérdida de motilidad, incremento de peroxidación lipídica y fragmentación del ADN espermático. (Santiani, 2013).

Las principales ROS que se conocen que tienen relación con la funcionalidad de los espermatozoides son: Anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y la mayoría de radicales hidroxilos ( $-OH$ ), cuya presencia en el ambiente espermático está relacionado con el aumento de espermatozoides muertos (Córdova *et al.*, 2009)

Se ha demostrado que durante el descenso de la temperatura que se da como parte del proceso de criopreservación de semen, los niveles de especies ROS se incrementan significativamente (Santiani, 2003) Diferentes estudios indican que la disminución de temperatura, aumenta la formación de ROS y los niveles de óxido nítrico aumentan durante el proceso de descongelamiento de espermatozoides, estos soportan un aumento en los niveles de peróxido de hidrogeno intracelular (Santiani, 2013)

Por ello consideramos que es posible que mayores cantidades de ROS podrían estar asociadas a mayores concentraciones de espermatozoides caninos defectuosos (Cassani *et al.*, 2005).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LOCACIÓN Y ANIMALES**

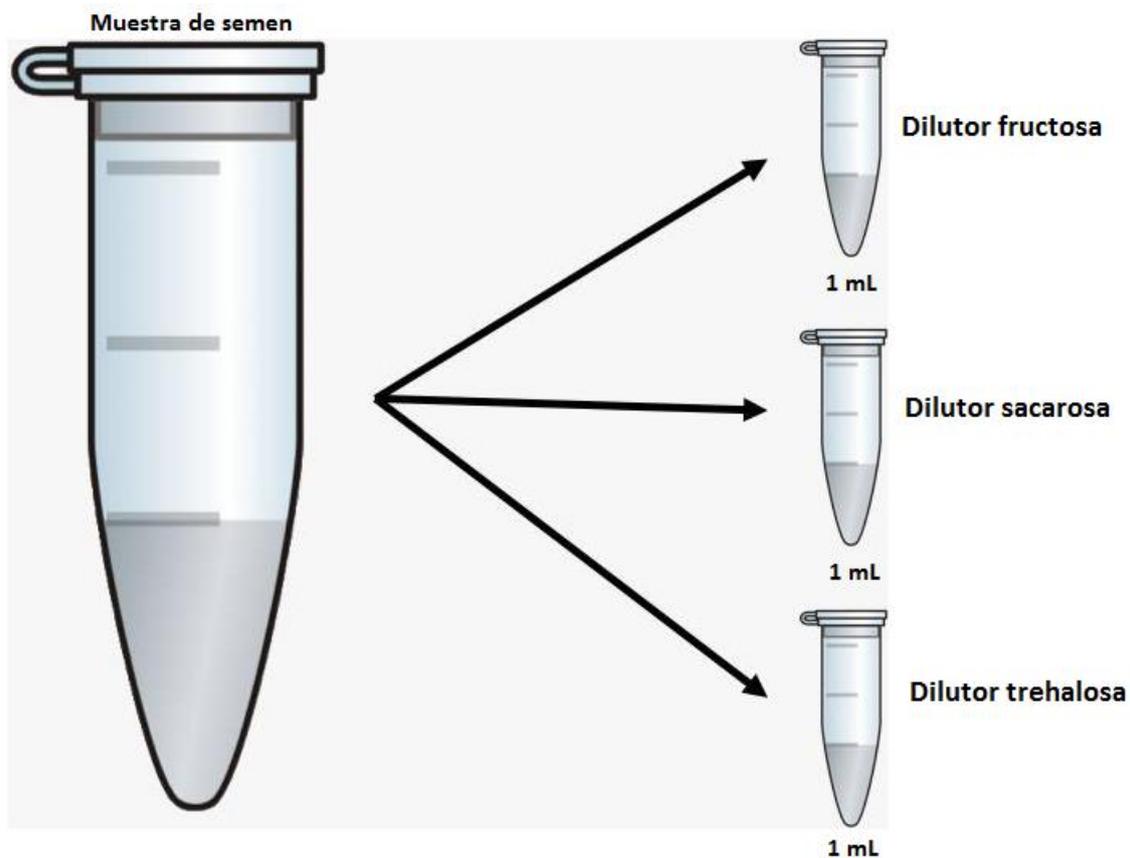
Se trabajó con 15 eyaculados provenientes de perros de la raza afgano, con un rango de edad entre 1 a 6 años. Las muestras fueron obtenidas en el criadero ubicado en el distrito de Surco en la ciudad de Lima y se trabajaron en el Laboratorio de Biotecnología animal de la Universidad Científica del Sur, ubicado en Villa El Salvador en la ciudad de Lima, Perú.

#### **3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Con el fin de probar si existe influencia de la azúcar presente en el dilutor (leche descremada + yema + azúcar), en que cada eyaculado (n=15). Fue dividido en tres alícuotas iguales de 0.5mL, posteriormente cada una de las alícuotas fueron distribuida al azar en uno de los tres grupos experimentales. Los grupos experimentales

- Grupo: Dilutor Fructosa
- Grupo: Dilutor Trehalosa
- Grupo: Dilutor Sacarosa

Los tres grupos fueron evaluados a las 0, 24 y 48 horas en los cuales fueron evaluados 3 parámetros seminales; motilidad, viabilidad y evaluación de especies reactivas de oxígeno, que sirvió para determinar la calidad de semen.



**Figura 1:** Forma de alicuotar la muestra de semen canino para los tres tratamientos a evaluar.

### 3.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1 Colecta de la muestra

La colecta del semen se realizó en el criadero de los perros raza afgana, luego fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de reproducción de animal de la Universidad Científica del Sur. Previo a la colecta se limpió la zona peneana, con el fin de eliminar posibles contaminante. Al momento de hacer la colecta de semen un asistente se encargó de sostenerle la cabeza del animal para evitar que este se moviera y otra persona hizo la manipulación manual del pene del perro hasta obtener el eyaculado. La eyaculación fue colectada en un beaker de vidrio y luego se almacenó en un tubo prolipropileno de 15 ml temperado.

### 3.3.2 Manejo inicial del eyaculado

Inmediatamente obtenida la muestra se procedió a evaluar las características básicas del semen, con el objetivo de determinar si era apta para el estudio. Las características que se evaluaron fueron microscópicas y macroscópicas del eyaculado. Dentro de las características macroscópicas que son las que se ven a simple vista, se evaluó el color, el volumen del eyaculo que se determinó por observación directa del tubo colector de semen graduado y el pH por cinta colorimétrica.

Posteriormente se pasó a evaluar las características microscópicas que fueron evaluadas en el laboratorio de biotecnología animal. Donde se evaluó la motilidad que es expresada en porcentaje, a través de los movimientos de los espermatozoides en una lámina porta objeto temperada mediante microscopio a objetivo 40X. Por último, la concentración espermática, mediante la cámara de Neubauer para el conteo de espermatozoides.

### 3.3.3 Preparación del Dilutor

Se emplearon 3 dilutores que fueron diferentes en su composición.

- Dilutor fructosa: este dilutor se preparó a base de leche descremada (50mL), yema (2.5 mL ) y fructosa a una concentración final de 50 mmol.
- Dilutor trehalosa: En el segundo dilutor se empleó leche descremada ( 50 mL) , yema de huevo (2.5 mL) y trehalosa a una concentración final de 50 mmol.
- Dilutor sacarosa : El tercer dilutor fue hecho en base a leche descremada ( 50 ml) , yema de huevo (2.5 mL) y sacarosa a una concentración final de 50 mmol.

**Cuadro 1: Composición de los dilutores utilizados en cada grupo experimental**

	<b>Dilutor Fructosa</b>	<b>Dilutor trehalosa</b>	<b>Dilutor sacarosa</b>
<b>Leche (ml)</b>	50	50	50
<b>Huevo (ml)</b>	2.5	2.5	2.5
<b>Fructosa (mmol)</b>	50	X	X
<b>Trehalosa (mmol)</b>	X	50	X
<b>Sacarosa (mmol)</b>	X	X	50

Lo primero que se hizo fue temperar la leche hasta llegar a una temperatura de 37°C, luego en un vaso de vidrio se midió 40 ml de leche donde se añadió el azúcar correspondiente (Fructosa, Trehalosa o Sacarosa) posteriormente se procedió a completar el volumen de 50 mL, se homogenizó y una vez mezclado se le retiró el 5% del volumen total de la mezcla que fue 2.5mL y se le repuso el mismo valor en yema de huevo y se volvió a homogenizar la mezcla.

### **3.3.4 Dilución y refrigeración**

Finalmente se pasó hacer la dilución de cada eyaculado (15 muestras) cada una de ellas se alicuotó en 3. Para que cada uno de estos 3 subgrupos fueron mezclados en una dilución de 1:1 con el dilutor correspondiente (1 mL de semen con 1 mL del dilutor) y se almacenó en un tubo de polipropileno de 15mL y se llevaron inmediatamente a refrigeración (5 °C). Donde luego paso a ser evaluado cada 24 horas (24 y 48 horas). Previa homogenización se tomó 100ul de semen diluido y se colocó en la estufa a 37 °C por 5 minutos para la evaluación de los parámetros correspondientes

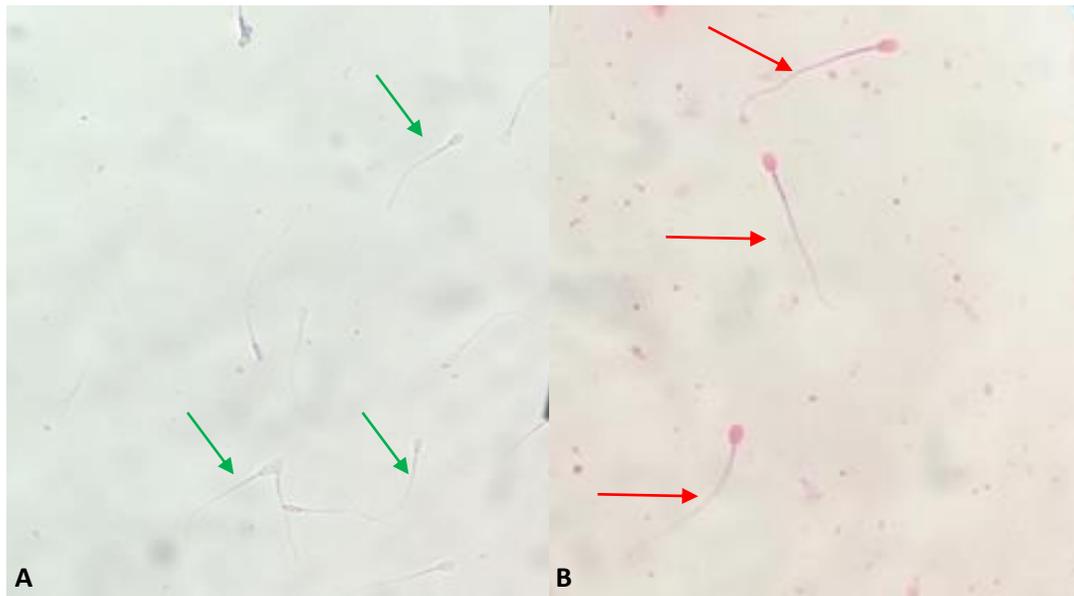
## **3.4 Evaluación de las características seminales**

### **3.4.1 Motilidad**

La motilidad fue uno de los parámetros a evaluar en el experimento, donde se colocó 25 µl de la muestra en una lámina portaobjeto templada y se observó a objetivo 40x, donde se determinó el porcentaje de los espermatozoides móviles, sobre el total de espermatozoides de campo, evaluando un total de 5 campos. Esta evaluación se hizo con los tres grupos experimentales a las 0, 24 y 48 horas.

### **3.4.2 Viabilidad espermática**

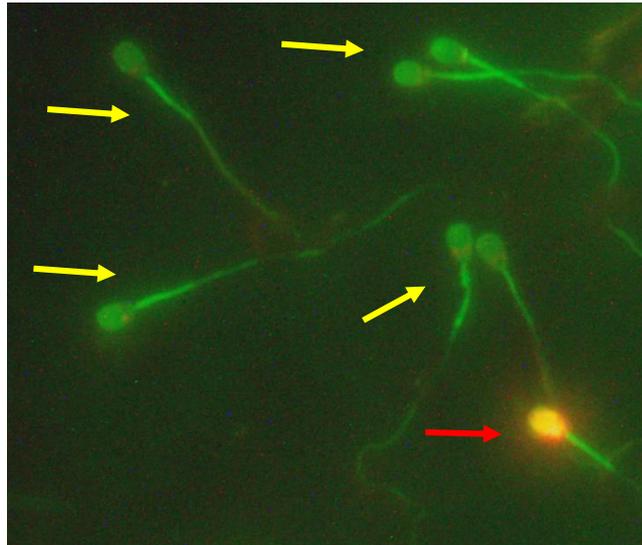
Esta prueba se hizo mediante la tinción de eosina, donde se puso una gota 10 µl de semen sobre el extremo de una lámina portaobjeto y se añadió encima otra gota 10 µl de eosina y se hizo un extendido de esta para luego pasar a observar al microscopio a objetivo 40X, donde se contabilizó los espermatozoides vivos y los muertos en un total de 5 campos, los que se observaron de color rosado eran los espermatozoides muertos mientras que los no teñidos fueron los vivos. La viabilidad espermática fue evaluada con los tres grupos experimentales a las 0, 24 y 48 horas.



**Figura 2: Evaluación de la viabilidad espermática canina; las flechas verdes señalan espermatozoides vivos y las flechas rojas señalan espermatozoides muertos teñidos por eosina.**

### 3.4.3 Evaluación de Producción de Peróxido de Hidrógeno

Para determinar el porcentaje de espermatozoides que producen ROS se lavo la muestra diluida con el fin de retirar tanto el plasma seminal como el dilutor. Se tomo 200  $\mu\text{l}$  y se agregó 1.5ml de PBS temperado que luego fue centrifugado a 600 G por 5 minutos. Luego con una pipeta se extrajo el sobrenadante, teniendo cuidado de no alterar el pellet formado. Luego se suspendió con 500  $\mu\text{l}$  de PBS. Se tomó 1  $\mu\text{l}$  de solución de stock de DCFH-DA y se incubó con 100  $\mu\text{l}$  de muestra seminal hasta llegar a una concentración final de 2.5  $\mu\text{M}$  donde pasó a ser incubado a 25 $^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos en oscuridad. Después de incubar se agregó 1  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio y se homogenizó. Para visualizar en el microscopio se añadió 20  $\mu\text{l}$  de la solución final en una lámina portaobjeto, se extendió y paso a ser leída inmediatamente en un ambiente oscuro. Los espermatozoides que se veían de color verde eran los que estaban produciendo Peróxido de Hidrogeno, mientras lo de color rojo eran los espermatozoides muertos. En el microscopio en campo claro se veían los espermatozoides vivos que no producen peróxido de hidrogeno.



**Figura 3: Evaluación de la producción de peróxido de hidrogeno en muestras de semen canino; las flechas amarillas señalan espermatozoides produciendo peróxido de hidrogeno, mientras que la fecha roja indica espermatozoide muerto.**

### 3.5 Análisis estadístico:

Se empleo el programa estadístico PRISM® V.3. Los datos se analizaron empleando análisis de varianza ANOVA y pos-test de bonferroni.

#### IV. RESULTADOS

Se trabajaron con 15 muestras de semen canino, que se obtuvieron de caninos de la raza afgano.

**Tabla 1: Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la viabilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración de muestras de semen canino.**

Refrigeración	% de Viabilidad		
	Fructosa	Trehalosa	Sacarosa
<b>0 horas</b>	98.13 ±6.0 <sup>a</sup>	97.93 ±3.2 <sup>a</sup>	97.13 ±2.7 <sup>a</sup>
<b>24 horas</b>	64.26 ±22.8 <sup>b</sup>	64.20 ±19.0 <sup>b</sup>	54.66 ±21.3 <sup>b</sup>
<b>48 horas</b>	22.86 ±16.2 <sup>c</sup>	24.40 ±19.0 <sup>c</sup>	19.06 ±15.7 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes entre filas demuestran diferencia estadística significativa ( $p > 0.001$ )

En la viabilidad no se encontraron diferencias significativas entre los azúcares ( $p = 0.2592$ ) Sin embargo, si muestra diferencia significativa con respecto al tiempo ( $p < 0.0001$ ) a mayor tiempo, la viabilidad de los espermatozoides va disminuyendo significativamente.

**Tabla 2: Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la motilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración de muestras semen canino.**

Refrigeración	% de Motilidad		
	Fructosa	Trehalosa	Sacarosa
<b>0 horas</b>	97.20 ±1.4 <sup>a</sup>	96.80 ±1.5 <sup>a</sup>	96.80 ±1.5 <sup>a</sup>
<b>24 horas</b>	60.33 ±23.7 <sup>b</sup>	64.46 ±21.2 <sup>b</sup>	47.66 ±22.4 <sup>b</sup>
<b>48 horas</b>	13.46 ±14.1 <sup>c</sup>	19.00 ±19.6 <sup>c</sup>	13.20 ±18.3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes entre filas demuestran diferencia estadística significativa (p>0.001)

En la motilidad se puede observar que no hay diferencias significativas entre los azúcares empleados en el dilutor (0.0962), sin embargo, con respecto al tiempo si hay diferencia significativa (<0.0001) conforme va pasando las horas, la motilidad va disminuyendo considerablemente.

**Tabla 3: Valor promedio del efecto de los azúcares sobre la producción de peróxido de hidrogeno espermática a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración de muestras semen canino.**

Refrigeración	% de Producción de peróxido de hidrogeno		
	Fructosa	Trehalosa	Sacarosa
<b>0 horas</b>	32.53 ±15.3 <sup>a</sup>	39.73 ±20.8 <sup>a</sup>	34.53 ±14.4 <sup>a</sup>
<b>24 horas</b>	44.46 ±27.4 <sup>b</sup>	38.53 ±25.5 <sup>b</sup>	44.33 ±19.9 <sup>b</sup>
<b>48 horas</b>	74.46 ±13.3 <sup>c</sup>	77.73 ±22.9 <sup>c</sup>	81.46 ±23.3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes demuestran diferencia estadística significativa (p>0.001)

En la producción de peróxido de hidrogeno, no se encontraron diferencias significativas entre los azúcares, sin embargo, si hay diferencia significativa entre lo tiempos, conforme va aumentando el tiempo, la producción de peróxido de hidrogeno es mayor y hay un aumento apreciable con respecto a la hora 24 con la hora 48.

## V. DISCUSIÓN:

El objetivo del presente trabajo fue evaluar tres azúcares (Fructosa, trehalosa y sacarosa) empleados en un dilutor con el fin de determinar cuál de ellas conserva mejor la calidad del semen en tres tiempos (0 horas, 24 horas y 48 horas).

Se observó que, al analizar estadísticamente los tres azúcares, no se hallaron diferencias significativas entre ellas para la motilidad ( $p=0.0962$ ); viabilidad ( $p= 0.2592$ ) y peróxido de hidrogeno ( $p=0.7980$ ).

Con respecto a los azúcares, como se ha señalado anteriormente no hay diferencia significativa entre ellas, pero al compararlo con otro estudio se encontró que los mayores porcentajes de motilidad corresponden a los grupos de sacarosa ( $p<0.05$ ). En dicho estudio el dilutor se preparó en base a Tris, ácido cítrico, agua destilada y la adición de una azúcar (glucosa, sacarosa, fructosa y trehalosa) (Flores *et al* 2010). Los resultados de este estudio podrían explicarse que el dilutor que se empleó en el presente trabajo, es un dilutor básico, fácil de preparación, con solo tres componentes empleados en un dilutor (leche, yema de huevo y azúcar). Además, en el trabajo de Flores *et al.*, (2010). Queda demostrado que la adición de azúcar al dilutor, ayuda preservar la calidad espermática. En el caso de Dinatolo (2011) quien trabajo en ovinos, “señala que agregar de 100 mOsm de trehalosa al dilutor preserva la viabilidad espermática dentro del rango de aceptación para la inseminación artificial hasta las 48 horas de refrigeración”, mientras que en este trabajo no se consideró la osmolaridad de los azúcares ni del dilutor base, sino la concentración final de los azúcares, la cual fue de 50 mmol. (Flores *et al.*, 2011)

Sin embargo, cuando evaluamos los porcentajes de motilidad a lo largo del tiempo, se observa que existe diferencia significativa entre los tiempos evaluados ( $p < 0001$ ), demostrándose que la motilidad disminuye conforme van pasando las horas y obteniendo mejores resultados hasta las 24 horas de refrigeración. Vivianco (1998) acota que uno de los mayores problemas técnicos que presenta la inseminación artificial con semen refrigerado, es que la capacidad fecundante que presenta este semen, es limitada en el tiempo. Estos valores obtenidos, que van disminuyendo a lo largo del tiempo, está asociado al daño causado por los cambios de temperatura (Sánchez *et al.*, 2006). Cabe resaltar, que durante el proceso de refrigeración de semen canino, se ve un efecto negativo sobre los espermatozoides, “el cual se ve reflejado en la disminución de la motilidad, integridad de membrana, actividad mitocondrial y en el aumento de la reacción acrosomal” (Manosalva *et al.*, 2005). Ya que como ha descrito Hammerstedt *et al.*, (1990) que “el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática (plasmalema) al daño causado por los cambios de temperatura (shock térmico)”.

Por otro lado, mis resultados de motilidad difieren a los obtenidos por Flores *et al.* (2010), ya que la motilidad espermática, en todos los grupo de los azúcares empleados en un dilutor evaluados, se encontraron dentro de rangos aceptables durante las 96 horas de duración del experimento, al igual que el estudio de Sánchez *et al.* (2006) esta diferencia de resultados entre los dos estudios con respecto a este estudio, se debe a que los dilutores utilizados en los otros estudios, son dilutores más complejos, con más componentes, mientras que en el presente estudio se utilizó un dilutor de fácil preparación, con solo tres componentes.

En relación a la viabilidad como se indicó anteriormente no hay diferencia significativa entre las azúcares empleadas en el dilutor, manteniendo los espermatozoides vivos hasta las 48 horas, pero con niveles bastante inferiores con respecto a la hora 0. La hora 24 tiene valores superiores de viabilidad del 50 % por lo tanto solo se obtienen mejores resultados a las 24 horas de refrigeración de semen canino. Esta disminución de valores con respecto a la hora 0, es a causa del enfriamiento, en el cual los espermatozoides están expuestos a los efectos negativos del shock térmico. Dentro del shock térmico lo que experimentan los espermatozoides es estrés oxidativo, (Córdova *et al.*, 2009). Además, el enfriamiento genera cambios en la permeabilidad de la membrana, aumentando su permeabilidad para el paso de iones, alcanzado niveles tóxicos.

Con respecto a la producción de peróxido de hidrógeno, hubo una tendencia al aumento considerable de la producción de este a la hora 48 con respecto a la hora 24, esto podría deberse a los espermatozoides que fueron muriendo al principio, donde hay ruptura de las mitocondrias por lo tanto hay liberación de las especies reactivas de oxígeno, generando oxidación, tal como indica Bansal *et al.* (2011) que los ROS son generados principalmente por espermatozoides muertos. Además, Se ha demostrado que es durante el descenso de la temperatura que los niveles de ROS se incrementan significativamente, siendo específicamente el peróxido de hidrógeno el que aumenta su nivel intracelular (Santiani. 2003). Por lo tanto, se observa que a las 48 horas la producción de peróxido de hidrogeno es elevada, en la cual la utilización del semen a las 48 horas no será viable ya que como indica Cassani *et al.* (2005) quien trabajo con caninos, que a mayor cantidad de ROS podrían estar asociadas mayores concentraciones de espermatozoides canino defectuosos.

## VI. CONCLUSIONES

- El estudio indica que, a las 24 horas de refrigeración, las muestras tienen parámetros aceptables para la inseminación, en comparación con las 48 horas.
- El empleo de cualquiera de los 3 azúcares durante la refrigeración no influirá en la conservación de las características espermáticas.
- Es posible emplear un dilutor de fabricación casera para el transporte de espermatozoides caninos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Álamo Santana D. Crioconservación y viabilidad espermática en la Especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152° C. tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria- España 2007:1,54-77
2. Aisen, E.G., Álvarez, H.L., Venturino, A. y Garde, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 2000: 53, 1053-1061.
3. Argawal A, Allamanemi S. Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal*. 2004:9-3
4. Argawal A, Sekhon L. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligasthenoteratospermia. *Indian Journal of Urology*. 2011:2:71 74-85
5. Baquero-Parrado J. Pardo Romero P. Cruz Casallas P. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. Trabajo de tesis. Universidad de los Llanos Meta, Colomobia. 2004: 8:26-33.
6. Bansal AK. Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International* 2011:686137, 7
7. Bielanski A, Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for shortterm storage and transportation of cryopreserved germplam and other biological specimens. *Theriogenology* 2005: 63, 1946-1957.
8. Bonilla C, Ballesteros R. Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el

- diluyente Tris-glucosa-yema de huevo. Tesis de grado. Universidad de la Salle – Bogotá- Colombia 2007:1,56-87
9. Cassani P, Beconi M, O'Flaherty C, Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science* 2005: 86,163–173
  10. Carlotto Rondona G, Fernandez A. Victor, Lira M. Boris, Santiani A. Alexei, Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2011: 22.3,183-189
  11. Chihuailaf,R.H.;Contreras,P.A.;Wittwer,F.G. Patogenesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal *Veterinaria México* 2002: 33;3
  12. Córdova Izquierdo A, Ruiz Lang C, Cordova Jiménez A, Córdova Jiménez M, Guerra Liera J, Rodríguez Deniz B, Arancibia Salinas K. Estrés Oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2009: 3.1,1-38
  13. Cortés S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid- España .1997:1,23-45
  14. Díaz D. Desarrollo de diluyentes de baja complejidad y costo para la preservación a corto y mediano plazo de semen canino. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata- Argentina 2015:1,78-99
  15. Dinatolo, E.F. Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado. Tesis de grado. Universidad Católica- Argentina 2011: 1,34-35.
  16. Flores J. Fernández V. Huamán H. Ruiz L. Santiani A. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa y trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2010: 21,26-34.
  17. Foote, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*. 2002:75, 119- 139.
  18. Goodman, M.; J. Cain. Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *Journal Reproduction. Fertility* 1993:47,554
  19. Hammerstedt, R.; J. Graham; J. Nolan.. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 1990 :11, 73-88

20. Hammoud A. O., M.G. Gibson, C.M. Peterson, B.D. Hammilton. D.T. Correl. Obesity and male reproductive potential, *Journal of Andrology*.2008: 27.5. 27 2365- 2372
21. Hendricks K, Penfold L, Evenson D, Kaproth M, Hansen P Effects of airport screening X-irradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development *Theriogenology* 2010:1, 267–272
22. Hermansson U, Linde Forsberg. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2006 :1,45-67
23. Hu, J.H.; Zan, L.S.; Zhao, X.L.; Li, Q.W.; Jiang, Z.L.; Li, Y.K.; Li, X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bobine semen. *Journal of animal Science* 2010.
24. Iturriaga, G.; Suárez, R.; Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. Centro de Investigación en BiotecnologíaUAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10, 3793-3810.
25. Leslie, S.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J. y Crowe, L. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*.1995: 61, 3592–3597.
26. López J. Criopreservación del semen. *Revista veterinaria* 2015:1,6-7
27. Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, Rocha A,. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Animal Reproduction Science* 2009: 112, 158-163.
28. Madrid Bury D, Reproducción asistida en los animales domésticos. *Revista Científica Universidad del Zulia Venezuela*. 2014:24:1,7-9
29. Mascorro J, Avonce N, Iturriaga G. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo*. 2005:11,2
30. Matas Parra C, análisis mediante citometria de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación. Trabajo de tesis, Universidad de Murcia – España. 1997:1,54-77
31. Manosalva I, Cortes C, Leyva V, Valdivia M, De los Reyes M, Barros C, Moreno R. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozodes caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2005: 16.2:114-128
32. Mattos, R.; Castilho, L.; Keller, A.; Malschitzky, E.; Neves, A.; Hött, A.; Silva, J.; Garbade, P.; Gregory, R.; Mattos, R. Influência da agitação e do vácuo na

- motilidad e fertilidade de sêmen equino diluído e preservado a + 4° C. Arquivos Faculdade de Veterinaria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1997 25: 44-53.
33. Mayes, P. 1997b. Carbohidratos de importancia fisiológica. En: Murray R, Granner, D., Mayes, P. y Rodwell. Bioquímica de Harper, 24ª edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. 1997:165- 176.
  34. Meyers S. Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals. Csiro. 2006:1,4
  35. Molinia F.; Evans, G. Y Maxwell, W . In vitro evaluation of switterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. Reproduction, Nutrition, Development. 1994:34, 491-500.
  36. Muiño R, River NM, Rigau T, Rodriguez-Gil Je, Peña AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Animal Reproduction Science. 2008:109,50-64
  37. Nizánski W, Klimowicz M, Partyka A, Savic M, Dubiel A. Effects of the inclusion of Equex STM into tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5°C. Reproduction Domestic Animal 2009:44, 363-365
  38. Paramo Ramirez R y Balcázar Sánchez J. Manual de manejo reproductivo en caninos. Trabajo de tesis. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. 2005
  39. Peña A. Canine fresh and cryopreserved semen. Reproduction Domestic Animal 2006:1
  40. Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE; Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. Theriogenology 1999:52, 609-616.
  41. Ponglowhapan S, Essen-Gustavsson B, Linde-Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long term storage of chilled canine semen. Theriogenology. 2004:1,4
  42. Rossi A. Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino. Tesis de grado. Universidad Católica 2012:1,56-84
  43. Salamon S, Maxwell W, Storage Ram semen. Animal Reproduction Science 2000: 77–111
  44. Sánchez A. Cartagena A. Berland M. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. Scielo. 2006:17,65-68.

45. Sánchez M, Santiago E, Vargas L, Mendoza N, Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. Ensayo Universidad Nacional Autónoma de México. 2004:29.3,81-90
46. Sánchez, A.; J. Rubilar.; R. Gatica. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. Archivos de Medicina Veterinaria. 2002:34.1,123-130
47. Santiani A. Uso de antioxidantes para mejorar la calidad de semen criopreservado. Spermova.2013:3,154-157.
48. Santa Cruz M. Efecto de variantes aplicadas a los procedimientos tecnológicos en la conservación seminal de la especie canina. Trabajo de tesis. Universidad de las Palmas de Gran Canaria- España 2011:1
49. Santiani A. Criopreservación de semen de ovino: efecto de adición de antioxidantes al diluyente. Tesis de Maestría. Universidad de la Frontera. Temuco-Chile.2003:1
50. Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. Theriogenology 2000:53,789-802.
51. Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Alfonso Osuna J, Gómez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. 2005:3.3,12-19.
52. Vargas Cahuana P. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carnero. Trabajo de tesis. Universidad Nacional del Altiplano .2015:1
53. Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M; Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. Theriogenology 2005:64, 720-733
54. Vivianco, M. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. 1998.
55. Yildiz C. Kaya A. Aksoy M. Tekeli T. influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology. 2000:23,886-888.

## VIII. ANEXOS

### 1.- Prueba del rango estudentizado de tukey para porcentaje de viabilidad

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Grados de error de libertad</b>	126
<b>Error de cuadrado medio</b>	251.3058
<b>Valor crítico del rango estudentizado</b>	3.35414
<b>Diferencia significativa mínima</b>	7.9264

<b>Las medias con la misma letra no tienen diferencias significativas.</b>			
<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Azúcar</b>
A	61.178	45	TREHALOSA
A			
A	60.956	45	FRUCTOSA
A			
A	56.289	45	SACAROSA

2.- Valores promedio de viabilidad de las tres azúcares en los tres tiempos

Nivel de azúcar	Nivel de tiempo	N	Porcentaje	
			Media	Std Dev
FRUCTOSA	0	15	95.7333333	6.0411289
FRUCTOSA	24	15	64.2666667	22.8049702
FRUCTOSA	48	15	22.8666667	16.2342964
SACAROSA	0	15	95.1333333	2.6690466
SACAROSA	24	15	54.6666667	21.3128622
SACAROSA	48	15	19.0666667	15.7228981
TREHALOSA	0	15	94.9333333	3.1502079
TREHALOSA	24	15	64.2000000	19.0270484
TREHALOSA	48	15	24.4000000	19.0030073

3.- Prueba del rango estudentizado de tukey para porcentaje de motilidad.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	126
Error de cuadrado medio	270.5058
Valor crítico del rango estudentizado	3.35414
Diferencia significativa mínima	8.2236

Las medias con la misma letra no tienen diferencias significativas.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	Azúcar
A	60.089	45	TREHALOSA
A			
A	57.000	45	FRUCTOSA
A			
A	52.556	45	SACAROSA

4.- Valores promedio de motilidad de las tres azúcares en los tres tiempos

Nivel de azúcar	Nivel de tiempo	N	Porcentaje	
			Media	Std Dev
FRUCTOSA	0	15	97.2000000	1.3732131
FRUCTOSA	24	15	60.3333333	23.7145726
FRUCTOSA	48	15	13.4666667	14.0959298
SACAROSA	0	15	96.8000000	1.5212777
SACAROSA	24	15	47.6666667	22.4297846
SACAROSA	48	15	13.2000000	18.2529841
TREHALOSA	0	15	96.8000000	1.5212777
TREHALOSA	24	15	64.4666667	21.1621855
TREHALOSA	48	15	19.0000000	19.5667356

5.- Prueba del rango estudentizado de tukey para porcentaje de producción de peróxido de hidrogeno.

<b>Alpha</b>	0.05
<b>Grados de error de libertad</b>	126
<b>Error de cuadrado medio</b>	434.6952
<b>Valor crítico del rango estudentizado</b>	3.35414
<b>Diferencia significativa mínima</b>	10.425

<b>Las medias con la misma letra no tienen diferencias significativas.</b>			
<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>Azúcar</b>
A	53.444	45	SACAROSA
A			
A	52.000	45	TREHALOSA
A			
A	50.489	45	FRUCTOSA

6.- Valores promedio de motilidad de las tres azúcares en los tres tiempos

<b>Nivel de azúcar</b>	<b>Nivel de time</b>	<b>N</b>	<b>Porcentaje</b>	
			<b>Media</b>	<b>Std Dev</b>
<b>FRUCTOSA</b>	<b>0</b>	15	32.5333333	15.3290884
<b>FRUCTOSA</b>	<b>24</b>	15	44.4666667	27.3753452
<b>FRUCTOSA</b>	<b>48</b>	15	74.4666667	13.2873015
<b>SACAROSA</b>	<b>0</b>	15	34.5333333	14.3570126
<b>SACAROSA</b>	<b>24</b>	15	44.3333333	19.9379991
<b>SACAROSA</b>	<b>48</b>	15	81.4666667	23.3203365
<b>TREHALOSA</b>	<b>0</b>	15	39.7333333	20.7690246
<b>TREHALOSA</b>	<b>24</b>	15	38.5333333	25.4919222
<b>TREHALOSA</b>	<b>48</b>	15	77.7333333	22.8612794