

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE MEDIDAS TESTICULARES Y SEMEN DE PUDÚ (*Pudu pudu*) OBTENIDO CON UN PROTOCOLO COMBINADO DE MASAJE DIGITAL TRANSRECTAL Y ELECTROEYACULACIÓN DURANTE SU ÉPOCA REPRODUCTIVA.

Memoria de título presentada como parte de los requisitos para optar al TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

OSCAR ALEJANDRO ALEUY YOUNG

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE : _____
Dr. Jorge Correa Soto

PROFESOR COLABORADOR : _____
Dr. Guillermo Santibañez

PROFESORES CALIFICADORES : _____
Dr. Orlando Garrido Oñate

Dr. Roberto Schlatter Vollmann

FECHA DE APROBACIÓN: 7 de Abril 2008

**A mis padres, mi tía Vero,
mis hermanos, Diego,
Mariana y la Came.
...GRACIAS.**

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSIÓN	24
7. BIBLIOGRAFIA	28
8. ANEXOS	32
9. AGRADECIMIENTOS	35

El pudú (*Pudu pudu*) ha sido clasificado como vulnerable por el Libro Rojo de los Vertebrados de Chile y por la Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza (UICN).

El siguiente estudio fue realizado con cinco ejemplares mayores a dos años mantenidos en las dependencias del Centro de Rescate de Fauna Silvestre (CEREFAS) de la Universidad Austral de Chile. Se realizó un examen semanal a cada animal durante Marzo a Junio del 2007, este consistió en un procedimiento anestésico para la medición de testículos y obtención de semen por medio de un protocolo combinado entre masaje digital de las glándulas anexas del aparato reproductivo y electroeyaculación.

Las mediciones testiculares realizadas fueron perímetro escrotal y largo testicular obteniéndose un promedio \pm desviación estándar (DE) de $11,2 \pm 0,54$ y $2,84 \pm 0,83$ cm respectivamente. Los mayores valores se registraron en la última semana de Marzo y la primera de Abril, mientras que los menores en el último muestreo de Junio, en ambas mediciones testiculares.

El protocolo de estimulación utilizado logró inducir eyaculación con un 95,4 % de efectividad sin observarse ninguna reacción adversa al procedimiento. El promedio \pm DE de las variables estudiadas en el semen fueron: $0,073 \pm 0,009$ ml para volumen, $5,35 \times 10^9 \pm 642 \times 10^6$ espermatozoides/ml para concentración, $50 \pm 8,7$ % de motilidad progresiva, $61,7 \pm 7,59$ % de espermatozoides vivos, $81,3 \pm 4,5$ % de espermatozoides morfológicamente normales, $12,2 \pm 1,2$ % de anomalías primarias y $6,2 \pm 2,4$ % de anomalías secundarias.

Se observaron cambios importantes en longitud testicular, perímetro escrotal y calidad espermática durante los meses del estudio.

Palabras claves: Caracterización, pudú, electroeyaculación, semen, testículos.

TESTICULAR MEASUREMENTS AND SEMEN CHARACTERISTICS OBTAINED BY A COMBINATED PROTOCOL OF TRANSRECTAL DIGITAL MASSAGE AND ELECTROEJACULATION DURING THE REPRODUCTIVE SEASON OF PUDU (*Pudu pudu*)

The pudú (*Pudu pudu*) has been classified as a vulnerable animal by the Red Book of the Chilean vertebrates and by the International Union of the Nature Conservation.

This study was carried out using five adult pudu males aged 2 – 5 years, maintained at the Wild Animal Rescue Center of Universidad Austral de Chile (CEREFAS) during March to July 2007. A weekly exam was performed to each animal under anesthetic procedure to measure testicles and obtain semen samples by a mixture protocol using digital massage of the reproductive glands and electroejaculation.

The testicle measurements performed were scrotum perimeter and testicle length with an average \pm standard deviation of 11.2 ± 0.54 and 2.84 ± 0.83 cm respectively. The higher values registered were in the last week of March and the first week of April, whereas the minors were in the last sampling of June, in both testicle measurements.

The stimulation protocol allowed obtaining ejaculation in a 95.4 % of exams, without any adverse reaction observed. The average \pm standard deviation of the semen variable were: 0.073 ± 0.009 ml for the volume, $5.35 \times 10^9 \pm 642 \times 10^6$ spermatozoid/ml for the concentration, 50 ± 8.7 % of progressive motility, 61.7 ± 7.59 % of living spermatozoids, 81.3 ± 4.5 % of normal shape spermatozoids, 12.2 ± 1.2 % of primary abnormalities and 6.2 ± 2.4 % of secondary abnormalities.

Important changes in testicle length, scrotum perimeter and sperm quality associated with the day length were observed.

Key words: Description, pudu, electroejaculation, semen, testicles.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES

La única forma de evitar la extinción de un número considerable de especies animales es a través de su reproducción en cautiverio. La World Conservation Union (IUCN), ha reconocido el papel potencial de la reproducción en cautiverio y ha sugerido directrices para identificar y conservar especies amenazadas. El objetivo final de un programa de reproducción en cautiverio de especies en peligro de extinción deberá ser la instauración de políticas de manejo animal que mantengan el potencial de recrear una población silvestre sostenible (Garde y col 2003).

Para lograr estos objetivos, se dispone de herramientas tales como la conservación de semen (establecimiento de bancos de germoplasma), la inseminación artificial y otras técnicas de reproducción asistida. Estas técnicas, permiten almacenar semen de animales con un estado de conservación comprometido, eliminar limitaciones de manejo o sanitarias que impedirán la utilización de algunos individuos y facilitar la transferencia de material genético entre subpoblaciones que se encuentran geográficamente o biológicamente aisladas (Perez y col 2001).

Para abordar un tema de esta envergadura, es necesario comenzar por un estudio del semen de estas especies, y en el futuro, ampliar los estudios a aspectos de la fisiología de la hembra, con el propósito de instaurar técnicas de reproducción asistida como inseminación artificial, fecundación *in vitro* y transferencia de embriones (Garde 2001).

Las técnicas de Reproducción Asistida presentan numerosas posibilidades para ser empleadas para la propagación y conservación de las distintas especies de cérvidos (Garde y col 1998).

Estas tecnologías reproductivas, generalmente han sido adaptadas de aquellas utilizadas en vacunos y ovinos. Sin embargo, las diferencias en la fisiología reproductiva entre las referidas especies, han resultado a menudo un obstáculo importante para la aplicación exitosa de estas técnicas, habiendo sido necesarios profundos estudios para adecuarlas a los cérvidos. Así, dentro de los propios cérvidos existen grandes diferencias reproductivas entre especies y subespecies, habiéndose tenido que modificar, por tanto, los procedimientos empleados en los distintos genotipos (Garde, 2005).

3.2. EL PUDÚ (*Pudu pudu*)

4

El Orden *Artiodactyla* (o Arciodáctilos) agrupa un conjunto de especies herbívoras cuyas patas presentan un número par de dedos (dos o cuatro). Si tienen cuatro dedos, los externos son rudimentarios, de modo que solo dos son útiles. Por lo general, el pie está cubierto por una pezuña córnea, que corresponde a uñas modificadas. Muchos presentan astas o cuernos en la cabeza.

En Chile hay cinco Rumiantes silvestres de este grupo: dos de la familia de los Camélidos, que son el **Guanaco** (*Lama guanicoe*) y la **Vicuña** (*Vicugna vicugna*), y tres de la familia de los Cérvidos: el **Huemul** (*Hippocamelus bisulcus*), la **Taruca** (*Hippocamelus antisensis*), conocida también como **Ciervo andino** o **huemul peruano**, y el **Pudú** (*Pudu pudu*) (Reyes y col 1988).

Cuadro 1: Clasificación Taxonómica del pudú (*Pudu pudu*).

Orden:	<i>Artiodactyla</i>
Suborden:	<i>Ruminantia</i>
Familia:	<i>Cervidae</i>
Género:	<i>Pudú</i>
Especie:	<i>Pudu pudu</i>

Su nombre aceptado y en uso hoy es, por tanto, “Pudú pudu (Molina)”, conservando la denominación vernacular pudú (Figura 1). Sin embargo, como dato ilustrativo, además de “venado” y “venadito” se le suele designar con el nombre de “Ruco” y del mapudungun “Puyú” o “Püdu” (Neumann 1992).



Figura 1: Pudú (*Pudu pudu*) macho adulto mantenido en cautiverio.

Este pequeño habitante de nuestros bosques, que abundaba hace unas décadas atrás, en la actualidad va rápidamente hacia la extinción y cada vez se van observando menos ejemplares a medida que avanza la destrucción de la foresta para dedicarla a plantaciones o ser aniquilada por el fuego. Se encuentran amenazados en este momento por la gran explotación del bosque nativo, debido al excelente negocio que significa la venta del metro ruma y de maderas en general.

En nuestro país la distribución comprende principalmente las Novena, Décima y Undécima Regiones, situándose de preferencia en los bosques de la cordillera de la costa, donde encuentra mejor refugio de los depredadores, de los cuales el más importante es el hombre, que lo caza por diversión o para consumir su carne, y en segundo lugar los depredadores naturales como el puma (*Puma concolor*), la güiña (*Oncifelis guigna*), los zorros con sus representantes principales en estas regiones como es la Chilla (*Canis griseus*), el culpeo (*Canis Culpaeus*) y el zorro chilote (*Canis fulvipes*), también está expuesto a ataques de aves rapáceas (Neumann 1992).

3.2.1. Estacionalidad en el macho pudú

En la mayoría de las especies animales mantenidas en su hábitat natural, las variaciones horas luz/día a lo largo del año (fotoperiodo), la situación geográfica (latitud), temperatura, disponibilidad de alimento, interacciones sociales, densidad de población, etc., determinan los periodos de actividad reproductiva estacional (Moreno y col 2003).

El pudú sufre cambios de comportamiento muy evidentes en su época de apareamiento (Reyes 1997), En el periodo de celo se observa preferentemente la lucha por la supremacía, lo que trae consigo frecuentes peleas en las que los machos parados frente a frente, a cierta distancia, generalmente de 5 a 10 metros, se paran sobre los miembros posteriores y embisten con la cabeza baja chocando fuertemente, luego juntan las cabezas y se empujan tratando de hacer retroceder al contrincante, como sucede entre los caprinos, y en caso de notar debilidad, atacan por el flanco pudiendo herir gravemente al contrario en la región pectoral o abdominal con sus afilados cuernos (Neumann 1992).

Estos cambios no son solo conductuales, también hay grandes cambios estructurales, que se manifiestan en el tamaño testicular y del epidídimo (Figura 2).

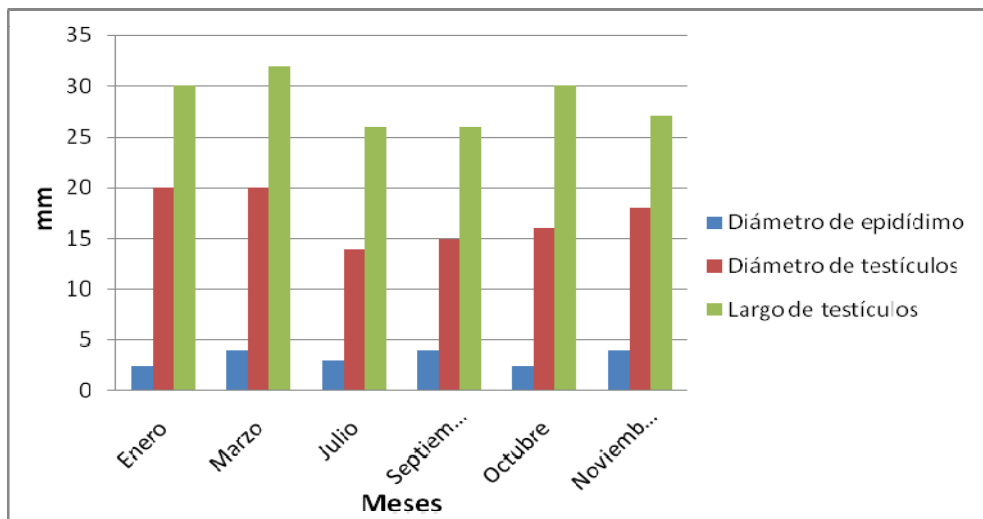


Figura 2: Variación estacional de largo y diámetro testicular y de diámetro de epidídimo de pudú (n=6) adultos (Reyes 1997).

De esta manera también ocurren cambios estacionales en los niveles de testosterona plasmática (Figura 3).

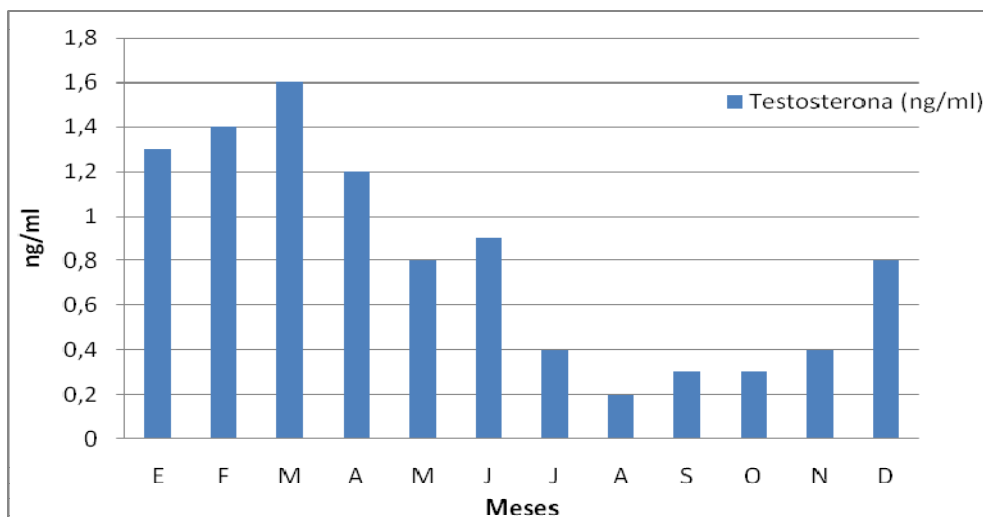


Figura 3: Niveles sanguíneos de testosterona (ng/ml) en pudú durante el año (Reyes 1993).

3.3. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

El principal objetivo de los bancos de recursos genéticos que se desarrollan dentro de un programa de conservación de especies amenazadas es el de mejorar el manejo genético de las mismas. Los bancos de recursos genéticos pueden contener material genético de diverso origen; en general y pensando en la reproducción se habla de bancos de semen, ovocitos y embriones; actualmente y debido a las técnicas de clonación, las células somáticas también pueden formar parte de estos bancos de recursos genéticos (Abáigar 2001).

Las mayores motivaciones al momento de evaluar la creación de un banco de recursos genéticos son (Garde 2001):

- Preservar material genético después de la muerte de los individuos.
- Conservación “*in situ*” y “*ex situ*”.
- Reducir el espacio y dinero para conservar una especie.
- Minimizar el riesgo que con lleva el transporte de animales.
- Reducir el riesgo de transmisión de enfermedades.
- Ayudar a mantener la variabilidad genética de una pequeña población:
 - Utilización de individuos genéticamente valiosos después de su muerte.
 - Reducción en el número de generaciones.
 - Intercambio genético entre subpoblaciones cautivas.

Luego, por otra parte es importante tener en consideración ciertos factores que pueden ayudar o entorpecer el desarrollo de un banco de recursos genéticos por lo cual hay que tenerlos en cuenta al momento de querer lograr un óptimo aprovechamiento y funcionamiento de éste. Los factores a considerar, entre otros, al desarrollar un banco de recursos genéticos son:

- Conocimiento del ciclo de vida y reproducción natural.
- Conocimiento de la reproducción asistida en la especie.
- Distribución geográfica de hembras y/o machos.
- Tipo y cantidad de biomaterial que será almacenado.

Esto llevará a una recolección, procesamiento y almacenaje de gametos, embriones y otros materiales genéticos en forma adecuada (Comizzoli y col 2000).

Respecto al principio fundamental de los bancos de semen, destaca la simpleza de éste; los gametos se mantienen en pausa metabólica, generalmente criopreservación en nitrógeno líquido (-196°C), y pueden ser utilizados para apoyar programas de reproducción cuando se considere apropiado (Garde y col 2006).

Respecto a la obtención y congelación de semen, todas las investigaciones realizadas en animales domésticos han constituido la base de las experiencias que posteriormente se han llevado a cabo en especies silvestres. A pesar del gran número de especies de mamíferos que se encuentran amenazados, se han realizado experiencias de obtención y congelación de semen seguidas de pruebas de fertilidad en muy pocos, la mayoría en ungulados; recolectándose el semen con técnicas como vagina artificial, electroeyaculación o recuperación de epidídimo. Al optimizar estos procedimientos se obtendrán resultados más alentadores al momento de aplicar técnicas reproductivas como inseminación artificial, transferencia de embriones y fecundación *in vitro* (Comizzoli y col 2000).

3.4. ELECTROEYACULACIÓN

La estimulación eléctrica es el método preferido solo cuando los machos no pueden ser entrenados para la colecta de semen por vagina artificial, o se rehúsan a hacerlo (a menudo en crías semisilvestres), además, lesiones y salud precaria pueden hacer imposible la monta. Este método puede emplearse exitosamente en toro, carnero y macho cabrío, y es posible obtener muestras de semen de volumen reducido en el verraco, no es deseable colectar y usar semen de machos incapaces de montar debido a un probable defecto genético (Hafez, 2000).

Para la realización de esta técnica debe utilizarse un electroeyaculador, el cual consta de un vástago (provisto de electrodos) y una fuente de energía. Se ha demostrado que el voltaje de estimulación afecta la osmolaridad y pH del semen obtenido por este método. También se ha comprobado que la electroeyaculación permite obtener un eyaculado de mayor volumen pero menor concentración espermática que la vagina artificial (Roth y col 2005).

La electroeyaculación permite obtener semen de todos los animales que posean la vía neurológica implicada intacta. Sin embargo, en animales silvestres o pequeñas especies, una limitante es la necesidad de someter al animal a una anestesia general a fin de evitar las molestias que este método produce sobre el animal (Roth y col 2005).

La mayoría de extracciones de semen que se realizan en ciervos son hechas por electroeyaculación con el animal anestesiado o sedado. Esto representa un riesgo cuando se compara con métodos de colecta natural por la anestesia a la cual es sometido el animal. Sin embargo, a la fecha se ha realizado exitosamente este procedimiento en una gran variedad de ciervos, sin observarse una diferencia notoria de calidad ni cantidad seminal con respecto a eyaculados obtenidos con métodos más cercanos al natural. (Asher 1999). Existen variables entre macho y la cantidad de estimulación requerida para producir una eyaculación satisfactoria. Sin embargo, aparte del estrés y de las contracciones musculares

ocurridas durante el tratamiento no hay efectos secundarios permanentes (Evans y col 1987).

3.5. MASAJE DIGITAL TRANSRECTAL

Si no se dispone de un electroeyaculador, es posible inducir el flujo de semen mediante masaje por la vía rectal de las glándulas vesiculares y las ampollas del conducto deferente. También puede ser deseable el masaje de la flexura sigmoidea para causar la protrusión de manera que un asistente pueda coleccionar el semen con la menor contaminación bacteriana posible. El semen así obtenido suele tener menor volumen y concentración espermática que los eyaculados obtenidos con una vagina artificial (Palmer 2005).

En base a todos los antecedentes señalados se formuló la siguiente hipótesis:

El tamaño testicular y las características del semen de pudú varían durante la estación reproductiva.

Para resolver la problemática establecida y corroborar o rechazar la hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

- Determinar la efectividad del método de extracción de semen.
- Caracterizar la variación del tamaño de testículos durante la duración del estudio.
- Caracterizar el eyaculado.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Animales experimentales

Podúes mantenidos en el Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre de la Universidad Austral de Chile (CEREFAS), Valdivia. Centro autorizado por la entidad gubernamental fiscalizadora, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

4.1.2. Materiales para la recolección de semen por electroeyaculación:

- Estimulador eléctrico *GRASS S44 Stimulator*
- Sonda rectal.
- Ketamina (Ketostop)
- Xilacina (Rompún®)
- Yohimbina
- Guantes de latex
- Vaselina
- Tubo de ensayo graduado
- Vitamina E
- Selenio
- Compresas frías
- Cervatana
- Dardos

4.1.3. Material para evaluación espermática:

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Pipetas de 25 a 100 microlitros y de 5 a 50 microlitros con tips.
- Microscopio de contraste de fase.
- Platina temperada para microscopio.
- Platina temperada para material.
- Cámara de Neubauer.
- Contador manual de células.
- Solución de Eosina al 5%.
- Solución de Nigrosina al 10%.
- Tubos Ependorf de 1 ml.

4.2. MÉTODO

4.2.1. Animales experimentales

Se utilizaron 5 pudúes machos adultos, mayores a 2 años (Cuadro 2).

Cuadro 2: Nombre de los animales experimentales.

Animal experimental	Nombre
Pudu 1	Cachito
Pudu 2	Panchito
Pudu 3	Wilson
Pudu 4	Copuchento
Pudu 5	Centinela

Durante el estudio (1 Marzo al 30 de Junio) se realizó un examen semanal a cada individuo, exceptuando la segunda semana de Marzo. Antes de cada colección se evaluó la condición general del animal, para determinar si estaba en condiciones de ser sometido a un procedimiento anestésico. Producto de esta evaluación se obtuvo el patrón que se observa en el Cuadro 3. Las fechas exactas de cada examen pueden ser observadas en el Anexo 1.

Cuadro 3: Número de animales sometidos a examen entre Marzo y Junio.

	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO			
Examen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
N° Animales	2		5		4	5				4	5		3			

En cada examen se realizaron mediciones testiculares y recolección de semen, para ello los ejemplares fueron anestesiados, previo ayuno de 24 hrs, mediante inmovilización química a distancia con cerbatana y dardos de inyección intramuscular con una combinación de Xilazina al 2% (0,6 mg/kg) y Ketamina al 10% (8 mg/kg). Durante la anestesia se monitoreó cada 5 minutos la temperatura rectal con un termocuppler, la frecuencia cardíaca (pulsos/minuto) y frecuencia respiratoria (ciclos/minuto) por auscultación directa y saturación de oxígeno (mm/hg) por oxímetro de pulso en la lengua. Además se realizó un examen clínico general y un examen especial del aparato reproductor. Una vez finalizado el examen la anestesia se revirtió con Yohimbina 1% endovenosa.

4.2.2. Medición testicular

Se midió la longitud de cada testículo con un calibre tradicional, también se midió el perímetro escrotal con una cinta métrica o flexómetro (Figuras 4 y 5).



Figura 4: Medición testículo izquierdo de pudú.



Figura 5: Medición perímetro escrotal de pudú.

4.2.2. Obtención de semen

El semen se obtuvo mediante el siguiente procedimiento:

1.- Masaje digital inicial de las glándulas anexas del aparato reproductivo por un lapso de 3 minutos. El dedo fue lubricado con vaselina líquida para no dañar el recto del animal..

2.- Electroeyaculación. Se utilizó un estimulador eléctrico *GRASS S44 Stimulator* (Figura 6) con una sonda de 12 cm (Figura 7) de largo y 1 cm de diámetro con electrodos longitudinales. La sonda rectal fue lubricada con vaselina líquida y con cuidado se introdujo de 7 a 9 cm en el recto con los electrodos dirigidos centralmente. Se utilizó el siguiente protocolo de estimulación eléctrica.

1. 10 pulsos de 2 voltios, de 1 segundo cada uno
2. Reposo de 5 segundos
3. 10 pulsos de 3 voltios, de 1 segundo cada uno
4. Reposo de 5 segundos
5. 10 pulsos de 4 voltios, de 1 segundo cada uno

3.- Masaje digital de las glándulas anexas del aparato reproductivo durante un lapso de 3 minutos.

Durante todo el procedimiento se trató de exteriorizar el pene ejerciendo una pequeña presión en su base, la muestra de semen fue aspirada con una micro pipeta graduada de 100 μ l, desde el prepucio (Figura 8). Esta pipeta permitió medir el volumen y evaluar color del semen obtenido. La pipeta fue entibiada previamente a 37 °C. El semen fue depositado en un tubo ependorf que contenía 1ml de leche descremada, entibiada previamente a 37°C.



Figura 6: Estimulador eléctrico *GRASS S44 Stimulator*.

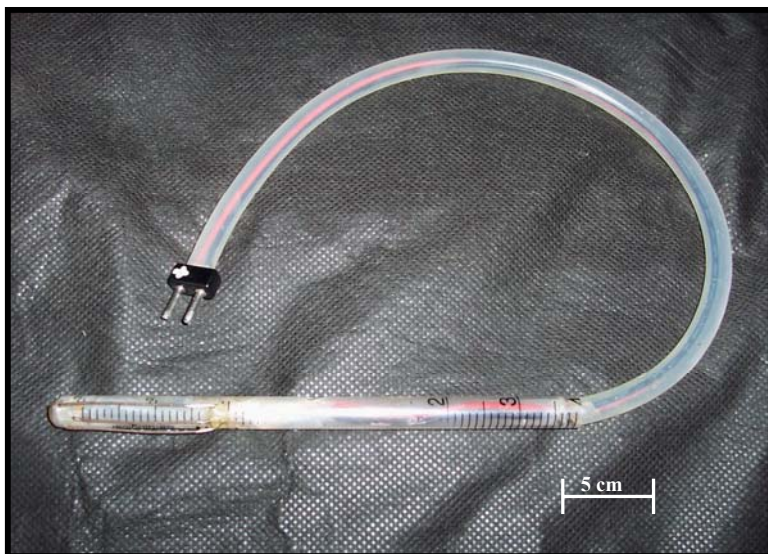


Figura 7: Sonda rectal.



Figura 8: Semen de pudú aspirado con una micropipeta desde el prepucio.

4.2.3. Evaluación de semen

4.2.3.1. Movimiento progresivo: Se depositaron 5 μ l del semen diluido en un portaobjetos que se encontraba sobre una platina temperada a 37°C; se colocó un cubreobjeto y se observó en un microscopio de contraste de fase a 400x. Se determinó en forma subjetiva el porcentaje de espermatozoides con movimiento cefálico, además se determinó la calidad del movimiento (estatus), utilizando una escala que va de 0 a 5, calificando como:

0: no hay movimiento.

1: hay leve movimiento de lado a lado sin progresión.

2: hay movimiento de lado a lado con ocasional y lenta progresión.

3: hay movimiento de lado a lado con lenta progresión.

4: hay movimientos de progresión continuos.

5: hay movimientos de progresión rápidos.

Utilizando estos dos parámetros, Howard (1993) obtuvo el índice de motilidad espermática: $(IME) = 0.5 [(estatus \times 20) + (\% \text{ de motilidad})]$.

4.2.3.2. Viabilidad de los espermatozoides: Se utilizó la tinción de Bloom, para la cual se colocó sobre un portaobjetos separadamente una gota de semen diluido (5 μ l), una gota de eosina al 5 % y dos gotas de nigrosina al 10 %. Primero se mezcló las gotas de colorantes (eosina-nigrosina) y luego éstas con la de semen. Utilizando una gota de la mezcla resultante se realizó un frotis sobre otro portaobjetos y se fijó en forma suave sobre una platina temperada a 37°C. Posteriormente se contó un total de 200 espermatozoides, los muertos se observaron teñidos de color rojizo (eosina), en contraste con los vivos, que se evidenciaban de color blanco (Figura 9).



Figura 9: Tinción de Bloom en semen diluido de pudú, (↔) espermatozoide vivo y (→) espermatozoide muerto al momento de la tinción.

4.2.3.3. Morfología espermática: Se determinó tomando una gota de semen diluido (5 μ l), con la que se realizó un frotis sobre un portaobjetos, el cual fue fijado y almacenado en un lugar fresco y seco para su posterior tinción utilizando la técnica de “Karras”. Los machos con un porcentaje de espermatozoides normales superior al 60 % se clasificaron como normozoospermicos, mientras que los con un porcentaje de espermatozoides normales inferior al 40 % se clasificaron como teratozoospermicos. Las anomalías fueron agrupadas según la clasificación Axner y col (1998) en primarias en el caso de haberse producido en la fase de espermatogénesis (anomalías de cabeza, acrosoma, pieza intermedia y cola enrollada), o secundarias si éstas se produjeron durante su paso por el epidídimo o en el momento de la eyaculación (anomalías de cola y persistencia de gotas citoplasmáticas).

4.2.3.4. Número total de espermatozoides: El cálculo fue realizado asumiendo como volumen total de eyaculado los 1000 μ l de semen diluido en leche descremada. Posteriormente se realizó una dilución de 1/100 y se contaron los espermatozoides en una cámara cuenta glóbulos llamada cámara de Neubauer (Figura 10).

El cálculo final se obtuvo de la siguiente forma:

$$\begin{array}{lll}
 1) \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides en cámara} & \times & 10 \\
 \text{ (0,1 mm}^3\text{)} & & = \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides en} \\
 & & \text{1 mm}^3 \text{ de semen diluido} \\
 \\
 2) \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides en} & \times & 100 \\
 \text{1 mm}^3 \text{ de semen diluido} & & \text{(Dilución)} \\
 & & = \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides en} \\
 & & \text{1 mm}^3 \text{ de semen} \\
 \\
 3) \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides} & \times & 100 \\
 \text{en 1 mm}^3 \text{ de semen} & & \text{(Vol. de muestra.)} \\
 & & = \text{ N}^\circ \text{ de espermatozoides} \\
 & & \text{totales / muestra}
 \end{array}$$

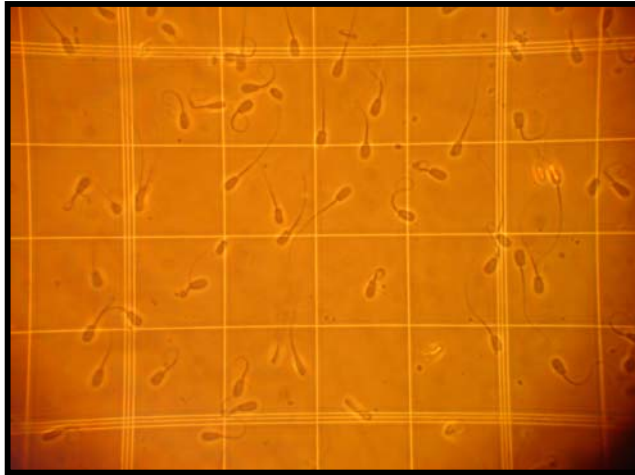
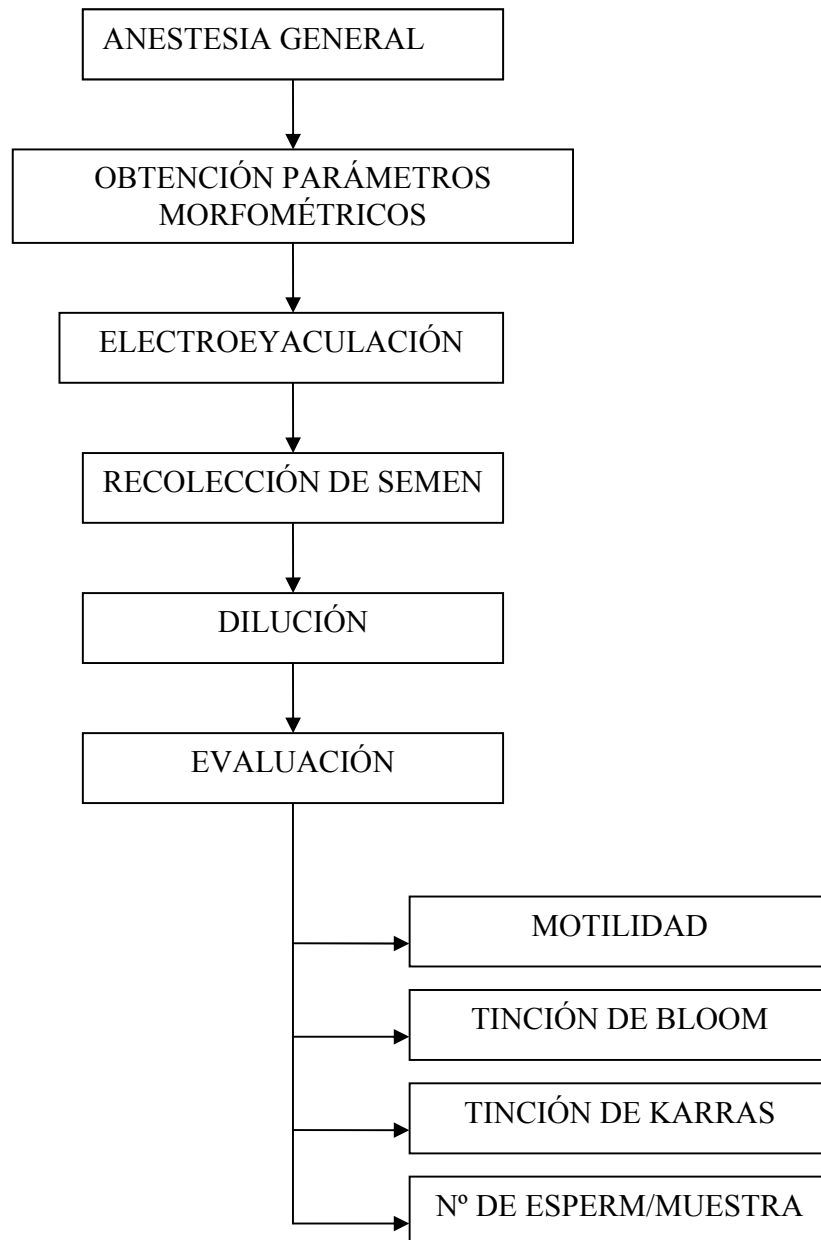


Figura 10: Cámara de Neubauer con espermatozoides de pudú.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente cada examen se desarrolló siguiendo el siguiente esquema de trabajo:

ESQUEMA DE TRABAJO DE CADA EXAMEM

5. RESULTADOS

5.1. MEDICIONES TESTICULARES

Se realizaron mediciones testiculares en 65 procedimientos (Anexos 2 y 3), obteniéndose un promedio \pm desviación estándar (DE) de perímetro escrotal de $11,2 \pm 0,54$ cm y $2,84 \pm 0,83$ cm de longitud testicular. El testículo izquierdo presento una longitud promedio \pm DE de $2,8 \pm 0,51$ cm y el testículo derecho $2,9 \pm 0,56$ cm.

La mayor longitud testicular y diámetro escrotal se obtuvo durante el examen número 3 realizado entre el 26 y 30 de Marzo con valores promedio \pm DE de $3,6 \pm 0,13$ cm y $12,9 \pm 0,62$ cm respectivamente.

Las mediciones testiculares obtenidas variaron a lo largo de todo el estudio, esto se evidencia en las Figuras 11 y 12.

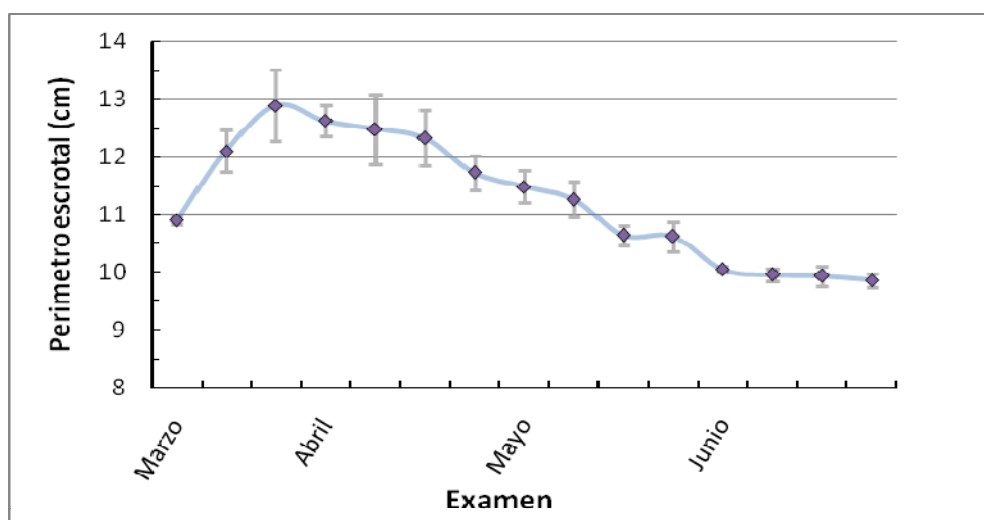


Figura 11: Promedio \pm DE de perímetro escrotal de pudú (*Pudu pudu*).

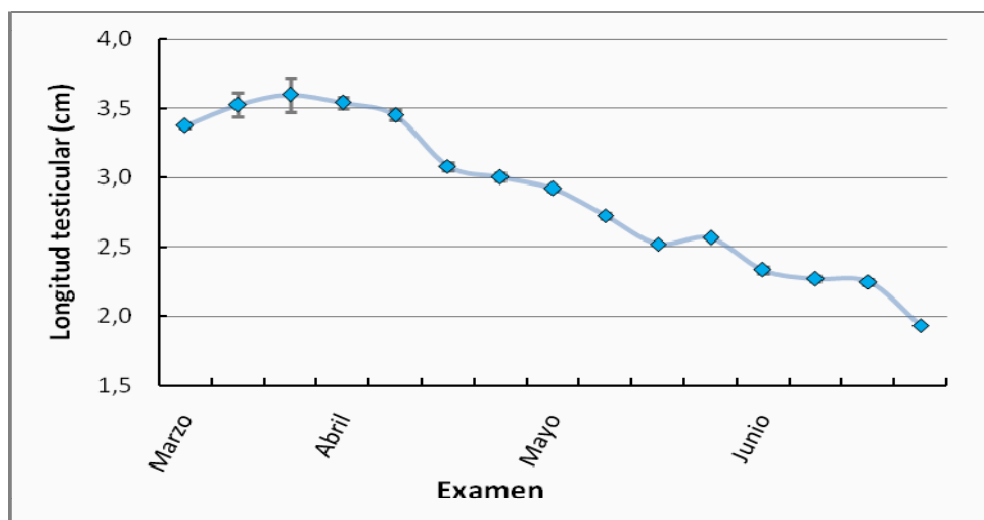


Figura 12: Promedio \pm DE de longitud testicular de pudú (*Pudu pudu*).

5.2. RECOLECCIÓN DE SEMEN

La respuesta a la recolección de semen fue positiva en 62 de los 65 exámenes realizados (95,4 %). Los 3 intentos fallidos se produjeron en el mismo animal (Copuchento) en los exámenes 9, 12 y 14 correspondientes al 11 de Mayo, 4 y 30 de Junio respectivamente.

5.3. ANÁLISIS DE SEMEN

5.3.1. Características macroscópicas

Las características macroscópicas evaluadas fueron; el color, blanco opaco en todos los casos, y el volumen que solo fue posible medir a partir del cuarto procedimiento, los promedios \pm DE del volumen se muestran a continuación (Figura 13).

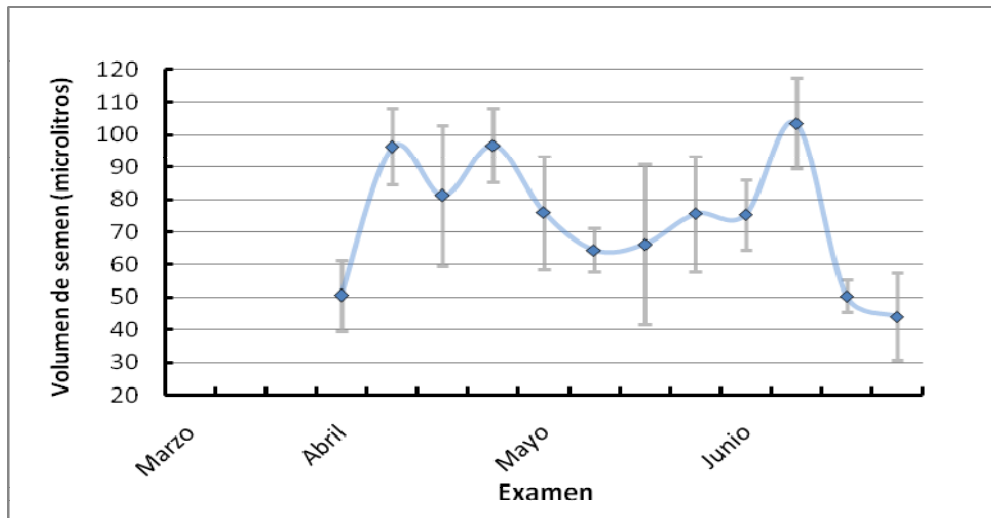


Figura 13: Promedio \pm DE volumen (microlitros) de semen de pudú (*Pudu pudu*).

5.3.2. Características microscópicas

Dentro de las características microscópicas evaluadas están el movimiento progresivo y la vitalidad seminal (Anexo 4), los promedios \pm DE se muestran a continuación (Figura 14):

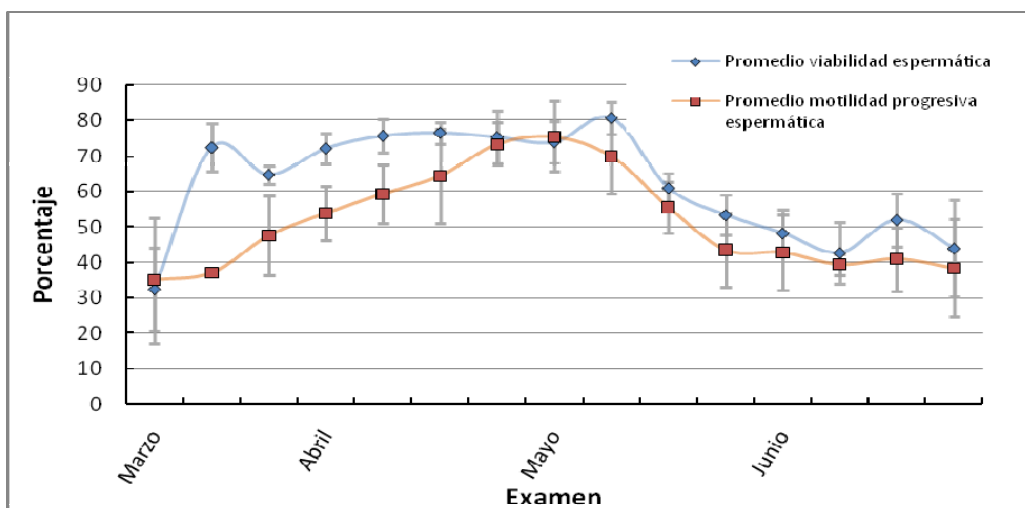


Figura 14: Promedios \pm DE viabilidad y motilidad progresiva espermática en semen de pudú (*Pudu pudu*).

Se evaluó la morfología de los espermatozoides mediante la prueba de Karras, los promedios \pm DE de normalidad espermática se muestra a continuación (Figura 15):

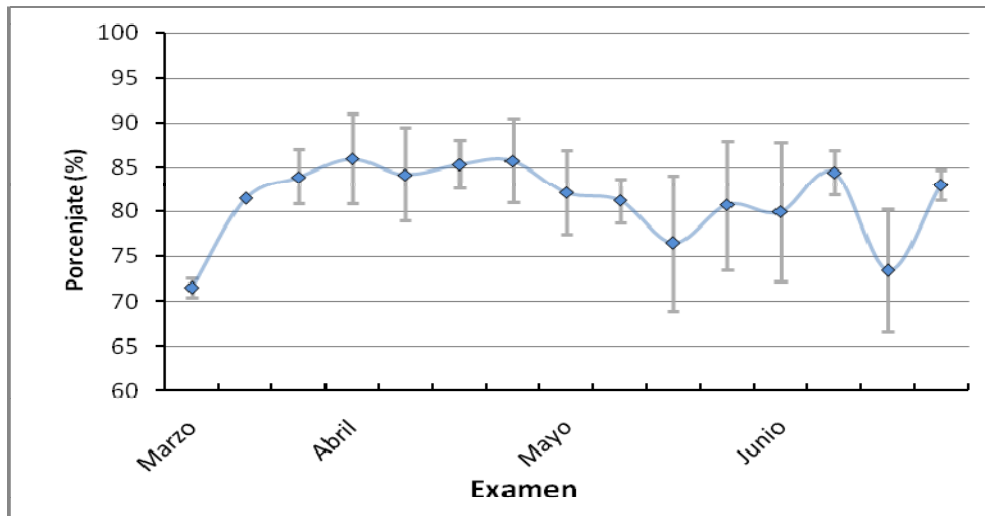


Figura 15: Promedios \pm DE de espermatozoides morfológicamente normales en eyaculado de pudú (*Pudu pudu*).

La concentración de espermatozoides (Anexo 5) fue calculada utilizando una cámara de Neubauer, los resultados se muestran a continuación (Figura 16).

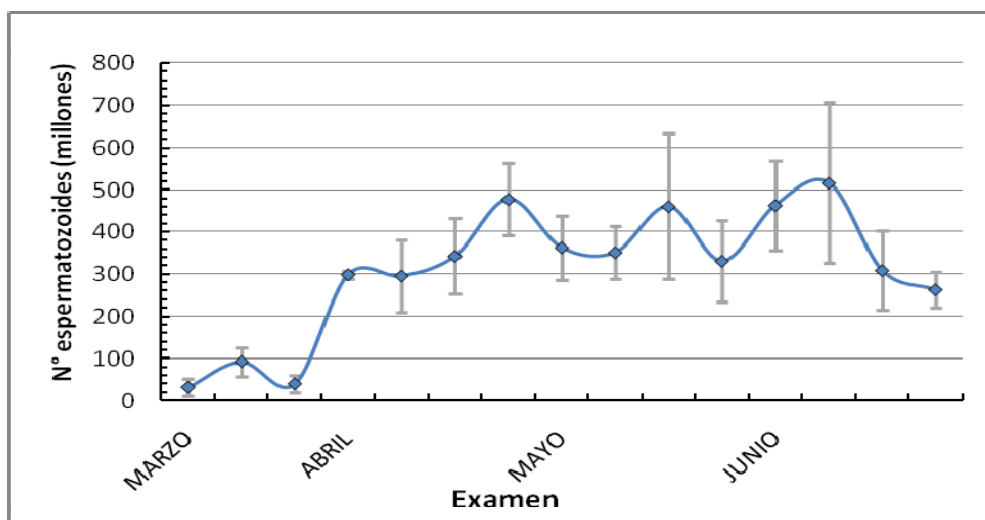


Figura 16: Concentración espermática en semen de pudú (*Pudu pudu*) obtenida desde Marzo a Junio.

Las anomalías morfológicas se clasificaron en primarias y secundarias (Cuadro 4).

Cuadro 4: Promedios \pm DE de características morfológicas espermáticas en semen de pudú (*Pudu pudu*).

Características morfológicas	Promedio \pm DE
% Espermatozoides normales	81,3 \pm 4,5
% Anormalidades primarias	12,2 \pm 2,3
% Anormalidades secundarias	6,2 \pm 2,5

6. DISCUSIÓN

Este estudio permitió obtener información de importancia referente a la morfometría testicular y características del semen de pudú. Esto fue difícil de lograr por el comportamiento elusivo de esta especie, siendo un desafío constante, lograr el equilibrio entre otorgar las mejores condiciones de vida para el animal y alcanzar los objetivos propuestos.

Las mediciones testiculares evidencian una clara estacionalidad que se manifiesta en el cambio constante de los valores obtenidos. Como se observan en las Figuras 4 y 5, las medidas testiculares se mantuvieron en una fluctuación semanal durante todo el estudio. Los mayores valores se registraron en los meses de Marzo y Abril, producto del aumento de tamaño de las células testiculares y de epidídimo que ocurre durante la época reproductiva (Reyes y col 1997). Estos valores son también coincidentes con las altas concentraciones de testosterona registradas por Reyes y col (1993) en estos meses. Las menores medidas testiculares se obtuvieron durante los últimos exámenes (segunda quincena de Junio), observándose una variación mayor al 45 % en longitud testicular y 20 % en perímetro escrotal entre los valores más altos y más bajos obtenidos.

El protocolo de obtención de semen se diseñó producto de ensayos pre-experimentales que demostraron su eficiencia frente al uso de estas técnicas en forma separada. No existen registros de haber sido utilizado anteriormente en otras especies. La respuesta a la obtención de semen mediante este procedimiento fue posible con un 95,4 % de efectividad. Los procedimientos donde ésta no se produjo fueron en un animal, que podría tener como explicación la disminución de más del 25 % del tamaño de sus testículos, lo cual provocaría una disminución en la espermatogénesis (Lincoln y col 1985). No se observaron reacciones adversas al procedimiento, la mayor complicación se produjo al momento de inmovilizar a los animales. Por la gran susceptibilidad de esta especie al estrés, es recomendable realizar un manejo cuidadoso para proteger tanto al animal como a la persona involucrada, la inmovilización química en animales silvestres es un proceso dinámico, con un gran número de variables, que es necesario conocer para obtener óptimos resultados.

No fue posible medir el volumen seminal desde el comienzo del estudio, los registros comenzaron durante la cuarta semana de muestreo. La menor cantidad registrada fue de 0,0018 ml mientras que la máxima fue de 0,141 ml. El reducido volumen seminal probablemente estuvo relacionado con el pequeño tamaño de esta especie (8-10 kg) y de sus glándulas anexas (Wahid y col 2000). Estudios realizados con electroeyaculación entregaron volúmenes de $0,076 \pm 0,018$ ml en gato doméstico, *Felis catus* (Ortega 2004) $0,02 \pm 0,01$ ml en hurón, *Mustela nigripes* (Howard y col 1993), $0,023 \pm 0,002$ ml en

malay chevrotain, *Tragulus javanicus* (Wahid Haron y col. 2000), entre 1,0 y 2,5 ml en ciervo dama, *Dama dama*, (Asher y col. 1999) y 4,1 ml en ciervo manchado *Axis axis* (Umapathy y col 2007).

La electroeyaculación resulta en grandes volúmenes y baja concentración espermática. Esta respuesta fisiológica se produce probablemente como consecuencia de la estimulación eléctrica de las glándulas anexas (Marco-Jiménez y col. 2005). Sin embargo en este estudio fue posible constatar las altas concentraciones que pueden ser obtenidas en esta especie ($5,35 \times 10^9 \pm 642 \times 10^6$ espermatozoides/ml) valor mas altos que en otros ciervos como el corzo, *Capreolus capreolus* (Goeritz y col. 2003) y el ciervo manchado, *Axis axis* (Umapathy y col. 2007). Esto probablemente se deba a que el estudio se realizó durante la época reproductiva y también por el tiempo transcurrido entre cada muestreo (una semana entre colección), Solder (2003). No obstante se observaron diferencias individuales importantes entre los animales en estudio probablemente sean producto de la salud, estrés o adaptabilidad individual a la electroeyaculación.

El promedio \pm DE de motilidad progresiva fue de $50 \pm 8,7$ % con un rango individual entre 10 y 90 %. Es mas bajo que el $87,5 \pm 11,4$ % descrito en gato doméstico, *Felis catus* (Ortega 2004), $81,4 \pm 1,2$ % en ocelote, *Leopardus pardalis* $73,5 \pm 1,3$ % en magray, *Leopardos wiedii* (Moranis y col. 2001), $66,5 \pm 1,5$ % ciervo manchado *Axis axis* (Umapathy y col 2007) $59,2 \pm 2,9$ % en ciervo dama, *Dama dama*, (Asher y col. 1999). El promedio \pm DE de índice de motilidad espermática (IME) fue de $62,7 \pm 8,69$ con un rango de 88 y 20. Puede haberse visto influenciado por orina que no fue detectada al momento de la extracción, situación común durante la electroeyaculación, y solo puede evitarse mediante la cuidadosa observación de las características macroscópicas del semen.

El porcentaje de espermatozoides vivos (viabilidad de espermatozoides) fue $61,7 \pm 7,59$ % similar al encontrado en malay chevrotain (*Tragulus javanicus*) con $59,6 \pm 2,1$ % (Wahid y col. 2000), $58,68 \pm 15,03$ % en ciervo rojo, *Cervus elaphus* (Gizejewski 2004), $65,9 \pm 1,5$ % en chamois, *Rupicapra pyrenaica ornata* (Carluccio y col 2006), $62,1 \pm 1,9$ % ciervo corzo, *Capreolus capreolus* (Goeritz y col. 2003). El periodo donde se encontró un mayor porcentaje de espermatozoides vivos fue durante el mes Abril y los primeros quince días de Mayo. Los cambios de temperatura del semen, después de la colecta, disminuyen en forma importante la viabilidad de los espermatozoides (Giuliano y col. 2007), durante los ensayos pre-experimentales se pudo constatar que el pudú es muy susceptible a este factor.

El alto porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, $81,3 \pm 4,5$ % con un rango de 71,5 % y 86 %, es similar a los valores en Ciervo Manchado (*Axis axis*) durante su época reproductiva (80,1 % de normalidad) pero superior a sus valores durante el resto del año (56,2% de normalidad) descritos por Umapathy y col (2007). Estos resultados reflejan la funcionalidad de testículos y de el sistema de conductos eferentes en pudú, existiendo evidencia suficiente que indica que el incremento de células anormales esta relacionado con pobre capacidad de preñez (Wahid Haron y col. 2000).

El promedio \pm DE de células espermáticas anormales es de $18,7 \pm 2,3$ % (con un rango de 14 – 29,5 %). La mayor parte de ellas fueron anomalías primarias ($12,2 \pm 1,2$ %), siendo las más frecuentes: acrosoma desprendido, cabeza suelta y microcefalia con un 8,7, 1,0 y 0,6 % respectivamente. El promedio \pm DE de las anomalías secundarias observadas fue de $6,2 \pm 2,4$ %, las más frecuentes fueron cola en “llave de sol”, 2,4 %, cola enrollada en cabeza 1,6 % y cola rota con 1 %. Las anomalías secundarias podrían disminuir colectando el semen con vagina artificial, eliminando el estímulo eléctrico producido por la electroeyaculación, que puede haber conducido al aumento de estas anomalías (Axnér y col 1998).

La calidad de semen obtenida fue buena, puesto que algunas muestras fueron criopreservadas, con una alta supervivencia posterior a la descongelación (Muñoz 2008).

Se observaron cambios importantes en todos los parámetros evaluados durante el estudio; este tipo de variaciones han sido descritos con anterioridad en otras especies de cervidos como el ciervo cola blanca, *Odocoileus virginianus* (Mirachi y col 1975), ciervo dama, *Dama dama* (Gosch y col 1989), muntjac, *Muntiacus reevesi* (Chapman y col 1991), ciervo rojo, *Cervus elaphus* (Gizejewski 2004) y ciervo de las pampas, *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus* (García-Pereira y col 2005). Las variaciones observadas se vieron relacionadas con el fotoperiodo, esto ha sido explicado por Bronson (1989) para ciervos de zonas templadas, por Umapathyal (2007) en ciervo manchado, *Axis axis* y Goeritz (2003) en ciervo corzo, *Capreolus capreolus*. Esta estacionalidad es distinta en ciervos de zonas tropicales, la cual está relacionada con el patrón anual de lluvias (Bronson 1989).

Por lo tanto, sería interesante continuar con esta línea de investigación, incorporando estudios que incluyan la influencia del fotoperiodo y actividad de melatonina, que podrían influir en la calidad espermática del semen de pudú.

CONCLUSIONES

El protocolo de obtención de semen establecido, resultó ser un método simple y de fácil aplicación para recolectar semen de pudú, sin generar ninguna reacción adversa en el animal.

Fue posible caracterizar las medidas testiculares de pudú durante su época reproductiva.

Fue posible caracterizar el semen obtenido, junto con los cambios que se produjeron en éste, durante la duración del estudio.

La investigación presentada puede ser utilizada en futuros estudios reproductivos de ésta y otras especies de ciervos, entregando la información necesaria para el desarrollo de diversas técnicas de biotecnologías reproductivas como la congelación de semen, inseminación artificial y fecundación in vitro, las cuales han sido utilizadas exitosamente en la conservación de otros *artiodáctilos* en el mundo.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abágair T, 2001, XXIV Curso internacional de reproducción animal, Tecnología reproductivas en la conservación de las especies amenazadas; el caso de Gacela Mohor, (*Gazella dama mhor*). Libro del XXIV Curso Internacional de Reproducción Animal, Madrid, España, Pp 90-105.
- Asher G, S Monfort, C Wemmer. 1999. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 143-156.
- Axnér E, B Ström Holst, C Linde-Forsberg. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50, 973-979.
- Bronson F H. 1989. *Mammalian Reproduction Biology*. University of Chicago Press, Chicago, USA. Pp 215-220.
- Carluccio A, P Ponzio, U Tosi, I Amicis, D Robbe, M Pennelli, A Contri. 2006. Semen evaluation in the chamois of Abruzzi (*Rupicapra pyrenaica ornata*). *Animal Reproduction Science* 97, 186-190.
- Chapman N, S Harris. 1991. Evidence that the seasonal antler cycle of adult Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*) is not associated with reproductive quiescence. *Journal of Reproduction and Fertility* 92, 361-369.
- Comizzoli P, P Mermillod, R Maguet, 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development* 40, 493-504.
- Evans G., WMC Maxwell, 1987, Salamon's artificial semination of sheep and goats. Butter worth Scientific (ed), Sydney, Australia, Pp 90-95.
- Garcia-Pereira R, J Barbanti, J Negrão. 2005. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*), *Theriogenology* 63, 2113-2125.
- Garde J. 2001. XXIV Curso internacional de reproducción animal, Aplicación de las técnicas reproductivas a poblaciones cinegéticas de cérvidos. Libro del XXIV Curso Internacional de Reproducción Animal. Madrid, España, Pp 40-45.

- Garde J, N Ortiz, A García, A López, L Gallego. 1998. Criopreservación postmortem de material espermático e inseminación artificial en el Ciervo Ibérico. *Arch. Zootec.* 47, 351-356.
- Garde J, A Soler, J Casinello, C Crespo, A Malo, G Espeso, M Gomendio. 2003. Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction* 69, 602-611.
- Garde J, M Estes, M Fernandez-Santos, A Soler, V Montoso. 2005. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la conservación y gestión de especies silvestres. Libro Conferencia pronunciada por Prof Dr Julián Garde López-Brea, 30-03-2005, Madrid, España.
- Garde J, F Martínez-Pastor, M Gomendio, A Malo, A Soler, M Fernández-Santos, M Estes, A García, L Anel, E Roldán. 2006. The Application of Reproductive Technologies to Natural Populations of Red Deer. *Reprod Dom Anim* 41, 93-102.
- Gizejewski Z. 2004. Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus*) semen collected using modified artificial vagina. *Reproductive Biology* 4, 51-66.
- Giuliano S, A Director, M Gambarotta, V Trasorras, M Miragaya, 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science* 104, 359-369.
- Goeritz F, M Quest, A Wagener, M Fassbender, A Broich, T Hildebrandt, R.Hofmann, S Blottner. 2003. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 59, 1487-1494.
- Gosch B, K Fischer. 1989. Seasonal changes of testes volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 85, 7-17.
- Hafez E. 2000, Técnicas para mejorar la eficiencia reproductiva. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en ANIMALES*. 6ta ed. Hafez E (ed). Philadelphia, USA, Pp. 400-439.
- Howard J. 1993. Semen collection and analysis in carnivores. En: *Zoo & Wild Animal Medicine. Current Therapy*. 3era ed. Fowler, M.E. (ed). Saunders, USA, Pp 390-399.
- Lincoln G. 1985. Seasonal breeding in deer. In: Drew and P.F. Fennessy (ed), *Biology of deer reproduction*. Royal Society of New Zealand, Wellington, Bull, Vol 22, Pp 165.

- Marco-Jiménez F, S Puchades, J Gadea, J Vicente, M Viudes-de-Castro. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa, *Theriogenology* 64, 1756–1765.
- Mirarchi R, P Scanlon, R Kirkpatrick, C Schreck. 1975. Variation in androgen levels in white-tailed deer in relation to the antler cycle and breeding season. *Journal of Animal Science* 40, 185-192.
- Moranis R, R Mucciolo, M Gomes, O Lacerda, W Moraes, N Moreira, L Gram., W Swanson, J Brown. 2002. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*L. pardalis*), magray (*L. Wiedii*) and tigrina (*L. Tigrinus*). *Theriogenology* 57, 2027-2041.
- Moreno S, A González, A Gómez, A López. 2003. El Muflón (*Ovis gmelini musimos*): Caracterización funcional y recurso cinegéticos. Monografía INIA: Ganadera N. 2. Madrid. España. Pp 150-152.
- Muñoz S. 2008. Congelación de semen de pudú (*Pudu pudu*): Efecto de los diluyentes Tris y Leche SB sobre semen diluido. Memoria de título, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- Neumann K. 1992. El Pudú (*Pudú Pudú Molina*) contribución a su estudio etológico. Impresur (ed), Chile, Osorno, Pp 10-60.
- Ortega L. 2004. Congelación de semen en gato doméstico (*Felis catus*). . Memoria de título, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- Palmer C, L Brito, A Arteaga, L Soderquist, Y Persson, A Barth. 2005. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science* 87, 25-31.
- Perez, S. 2001. XXIV Curso internacional de reproducción animal, Estudio de parámetros seminales y conservación de esperma en animales salvajes. Libro del *XXIV Curso Internacional de Reproducción Animal*. Madrid, España, Pp 120-132.
- Reyes E, R Guzmán, A Angulo, I Hermosilla. 1988. Ciclo de vida y madurez sexual de *PUDU PUDA* (*Mammalia, Cervidae*). *Theriogenology* 59, 143-150.
- Reyes E, P Muñoz, S Recabarren, P Torres, A Bubenik. 1993. Seasonal variation of LH and Testosterona in the smallest deer, the Pudu (*Pudu Pudu Molina*) and its relationship to the antler cycle. *Comparative Biochemistry Physiology* 106, 683-685.

- Reyes E, G Bubenik, D Schams, A Lobos, R Enriquez. 1997. Seasonal changes of testicular parameters in southern Pudú (*Pudu puda*) in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. *Acta Theriologica* 42, 25-35.
- Roth T, M Stoops, M Atkinson, E Blumer, M Campbell, K Cameron, S Citino, A Maas. 2005. Semen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe. *Journal and Zoo and Wildlife Medicine* 36, 617-27.
- Solder A, A Garcia, M Fernandez-Santos, M Estes, J Garde. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Journal of Andrology* 24, 746-756.
- Umapathy G, S Sontakke, A Reddy, S. Shivaji. 2007. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology* 67, 1371-1378.
- Wahid Haron A, Y Ming, Z Zahari-Zainuddin. 1999. Evaluation of semen collected by electroejaculation from captive lesser malay chevrotain (*Tragulus javanicus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31, 164-167.

ANEXO 1:

Cuadro 5: Fechas de exámenes correspondientes a cada animal.

Examen	1	2	3	4	5	6	7	8
Cachito	01-Mar		28-Mar	02-Abr	09-Abr	16-Abr	23-Abr	30-Abr
Panchito	02-Mar		28-Mar	03-Abr	10-Abr	17-Abr	24-Abr	30-Abr
Wilson		19-Mar	29-Mar	04-Abr		18-Abr	25-Abr	02-May
Copuchento		21-Mar	30-Mar	05-Abr	11-Abr	20-Abr	26-Abr	03-May
Centinela			26-Mar	05-Abr	12-Abr	19-Abr	27-Abr	04-May

Examen	9	10	11	12	13	14	15
Cachito	08-May	15-May	24-May	28-May	05-Jun	13-Jun	28-Jun
Panchito	08-May	14-May	24-May	29-May	05-Jun	13-Jun	
Wilson	09-May	16-May	25-May	30-May	06-Jun	14-Jun	29-Jun
Copuchento	11-May	18-May	24-May		04-Jun	20-Jun	
Centinela	10-May	17-May	25-May	01-Jun	08-Jun	14-Jun	28-Jun

ANEXO 2:

Cuadro 6: Promedio del diámetro escrotal individual y grupal en cada examen, expresado en centímetros.

Examen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cachito	10,8		12	12,2	11,8	11,2	11	10,8	10,8	10,2	10	10	9,6	10	9,6
Panchito	11		12,8	13,1	13,9	13	12	11,6	11,7	10,8	11	10	10	9,4	
Wilson		11,6	12	12,6		13,2	12,4	12	11,8	11	11	10	10	10	10
Copuchento		12,6	12,6	12	11,2	11,4	11,2	11	10,4	10,4	10,1		10	10	
Centinela			15	13,2	13	12,8	12	12	11,6	10,8	11	10,2	10,2	10	10
PROMEDIO	10,9	12,1	12,9	12,6	12,5	12,3	11,7	11,5	11,3	10,6	10,6	10,1	10	9,9	9,9

Cuadro 7: Promedio longitud testicular individual y grupal en cada examen, expresada en centímetros.

Examen	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15
Cachito	3,3		3,5	3,4	3,3	2,9	2,7	2,7	2,4	2,5	2,2	2,1	2,2	1,8
Panchito	3,5		3,9	3,9	3,7	3,3	3,1	3,0	2,7	2,7	2,5	2,4	2,3	
Wilson		3,2	3,3	3,4		3,0	2,9	2,7	2,5	2,5	2,4	2,3	2,2	2,0
Copuchento		3,9	3,9	3,6	3,6	3,2	3,1	2,6	2,6	2,6		2,3	2,4	
Centinela			3,1	3,3	3,1	3,1	2,9	2,6	2,5	2,5	2,4	2,2	2,2	2,0
PROMEDIO	3,4	3,5	3,6	3,5	3,5	3,1	2,9	2,7	2,5	2,6	2,3	2,3	2,2	1,9

ANEXO 4:

Cuadro 8: Características microscópicas del eyaculado de Cachito.

Examen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
VE (%)	16		69		76	83	89	91	80	73	35	30	27	40	26
MP (%)	10		65		50	85	80	90	75	30	30	15	30	30	20
IM	1		2		3	5	5	5	5	4	5	3	4	5	4
IME	20		85		80	135	130	140	125	70	80	45	70	80	60

VE: Vitalidad espermática; MP: Movimiento progresivo; IM: Intensidad de movimiento;
IME: Índice de motilidad espermática.

Cuadro 9: Espermatozoides totales por examen (ETE) y normalidad e integridad de membrana (NIM) en el semen de Cachito.

Examen	ETE	NIM (%)
1	3.000.000	73
2		
3	46.950.000	88
4	94.000.000	85
5	125.000.000	83
6	193.750.000	89
7	312.500.000	87
8	358.750.000	92
9	302.500.000	86
10	50.000.000	
11	370.000.000	84
12	352.000.000	86
13	315.000.000	84
14	262.500.000	72
15	167.500.000	85

ETE: Espermatozoides totales por examen

NIM: Normalidad e integridad de membrana

9. AGRADECIMIENTOS

En especial a mi tía Vero, sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

A mis padres.

A Daniela, Fernanda, Francisco y Rodrigo.

A la Came, fuiste el pilar de todo el tiempo que esto me tomó.

A Diego y a Mariana, son mi norte y alimento.

Al Dr Guillermo Santibáñez, el “pequeño saltamontes” terminó al fin.

Al equipo Pudú: Susana Muñoz, Angélica Romero, Susan Villa.

Al Dr Claudio Verdugo.

Al Instituto de Reproducción Animal, en especial al Dr Jorge Correa, la Dra Carmen Schüler y al Dr Juan Carlos Boggio.

A mis amigos, que el tiempo convirtió en familia: Ricardo, Oscar, Angelo, Rudy, Fresia, Andrea, Pablo, Cinthia, Natalia, Juan y Paloma.

Al proyecto interno DID – UACH, 2007-2008 “Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies amenazadas: estudio preliminar de manipulación de semen y COC’s de pudú (*Pudu pudu*)”.