

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

**CONGELACIÓN DE SEMEN DE PUDÚ (*Pudu pudu*): EFECTO DE LOS
DILUYENTES TRIS Y LECHE SB SOBRE SEMEN DILUIDO.**

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

SUSANA BEATRÍZ MUÑOZ TOLEDO

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Jorge Correa S.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Orlando Garrido O.

Nombre

Firma

Dr. Jorge Oltra C.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

14 de Enero de 2008.

*A todos los amantes
de la fauna silvestre y a
Elías, la luz de mi vida.*

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	22
7. BIBLIOGRAFÍA	26
8. ANEXOS	35
9. AGRADECIMIENTOS	42

1. RESUMEN

Con el objetivo de congelar semen de pudú, se logró obtener 16 muestras de semen mediante electroeyaculación a 6 machos adultos clínicamente sanos, mantenidos en dependencias del Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre (CEREFAS), de la UACH/SAG, desde marzo a junio del 2007.

La electroeyaculación se realizó bajo anestesia general con una combinación de Xilacina (0,5mg/kg i.m.) y Ketamina (10mg/kg i.m.) revertida con Yohimbina (2mg/kg e.v.).

Para la congelación del semen, se utilizaron dos diluyentes en base a Tris y Leche, el semen diluido fue evaluado en tres oportunidades: Fresco (dentro de 20 min. de recuperado), Refrigerado (después de curva de refrigeración y 2 hrs. almacenado a 4°C, en total 3 hrs y 21 min.), y Descongelado (después de estar en nitrógeno líquido a -196 °C como mínimo 30 min.). Esta evaluación incluyó motilidad, movimiento progresivo, intensidad de movimiento, vitalidad, prueba hiposmótica e integridad de acrosoma.

Los resultados obtenidos muestran que hubo supervivencia de los espermatozoides de pudú a -196°C con ambos diluyentes. En relación a los parámetros de calidad empleados puede destacarse que el semen congelado con Tris tuvo motilidad (%) $53,4 \pm 2,6$, movimiento progresivo (%) $38,4 \pm 3,1$, intensidad de movimiento (0-5) $3,2 \pm 0,2$, vitalidad (%) $47,1 \pm 2,6$, endosmosis positiva (%) $56,0 \pm 2,8$, integridad de acrosoma (%NAR) $48,6 \pm 3,3$ y con Leche motilidad (%) $49,4 \pm 3,7$, movimiento progresivo (%) $42,2 \pm 3,9$, intensidad de movimiento (0-5) $3,2 \pm 0,2$, vitalidad (%) $43,4 \pm 4,1$, endosmosis positiva (%) $47,2 \pm 4,0$, integridad de acrosoma (% NAR) $49,3 \pm 3,4$.

El análisis estadístico (*Statistica*) no arrojó diferencias significativas entre la calidad crioconservante de ambos diluyentes, pero sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre la calidad espermática del semen Fresco, Refrigerado y Congelado, evidenciándose que el punto crítico de congelación se encuentra en el paso de semen fresco a refrigerado.

Actualmente, se mantienen 100 pajuelas almacenadas en N2 líquido a -196°C constituyendo el inicio de un banco de semen de pudú (*Pudu pudu*), que pueda ser usado con posterioridad en múltiples técnicas de reproducción asistida en esta especie.

Palabras claves: pudú, semen, congelación.

2. SUMMARY

FREEZING OF PUDÚ (*Pudu pudu*) SEMEN: EFFECT OF TRIS OR MILK AS SEMEN DILUENTS.

The objective of this study was to evaluate the effect of two different extenders, Tris or Milk, on the viability of frozen spermatozoa from pudú. Semen was collected using electrical stimulation from six healthy mature males maintained at CEREFAS*, Universidad Austral de Chile, from March to June of the 2007.

Semen samples (n= 16) were taken, using electroejaculation under general anesthesia, induced with Xilacina ((0.5 mg/kg.) and Ketamina (10 mg/kg.) and reverted with Yohimbine (2 mg/kg.). Semen was diluted in Tris or Milk extenders and evaluated as: Fresh (20 min. within the collection), Cooled (after equilibration curve and 2 hr at 4°C), and Frozen at -196°C. Variables to evaluate were: motility, progressive motility, intensity of motility, vitality, hipo-osmotic-swelling test and acrosome integrity.

Post - thaw viability of pudu spermatozoa were: 53.4 ± 2.6 (%) motility, 38.4 ± 3.1 (%) progressive motility, 3.2 ± 0.2 (0-5) intensity of motility, $47.1 \pm 2,6$ (%) vitality, 56.0 ± 2.8 (%) hipo-osmotic-swelling test and 48.6 ± 3.3 (%) NAR) acrosome integrity for Tris while 49.4 ± 3.7 (%) motility, 42.2 ± 3.9 (%) progressive motility, 3.2 ± 0.2 , (0-5) intensity of motility, 43.4 ± 4.1 (%) vitality, 47.2 ± 4.0 (%) hipo-osmotic-swelling test and 49.3 ± 3.4 (%) NAR) acrosome integrity for Milk, respectively. Although, there was no effect of extenders on post thaw sperm viability, the studied variables were significantly affected by the freezing process (Fresh, Cooled and Frozen) being the critical step the transition from Fresh to Cooled stage.

Finally, 100 straws of pudú (*Pudu pudu*) frozen semen are kept at the Animal Reproduction Institute, Universidad Austral de Chile, that could be used as a first bank of gametes of this species.

*Wild life Rehabilitation Center

Keywords: pudu, sperm, freezing.

3. INTRODUCCIÓN

La importancia de la protección de la fauna silvestre va incorporándose cada vez más a la cultura de Chile. El interés por conservar el medio ambiente es un claro indicio de la evolución de la conciencia sobre este tema. Tanto el estudio de comportamiento sobre fauna silvestre como las biotecnologías que se puedan aplicar sobre ellos, ayudan a vislumbrar un futuro exitoso para la existencia y conservación de estas especies.

La limitación de visualizar y estudiar la actividad reproductiva, deriva de la dificultad del manejo y el estrés a los que pueden ser sometidos los animales silvestres, por lo que se requiere de la formación de un núcleo de animales completamente adaptado al cautiverio y a las diferentes rutinas de manejos que son necesarias.

A diferencia de las especies domésticas, el conocimiento actual de las características reproductivas de los ciervos silvestres se ha basado en observaciones de campo del comportamiento sexual y gregario, así como la distribución de los períodos de parto. En Chile existen muy pocos trabajos publicados sobre *Pudu pudu*, estando en su mayor parte enfocados a áreas de comportamiento, lo que obliga a entrar en terrenos desconocidos hasta hoy en temas de reproducción asistida en ciervos pequeños.

Actualmente en nuestro planeta existen cincuenta y tres especies de ciervos distribuidos a lo largo de todo el mundo. El pudú es una de las especies que habitan en Sudamérica y junto al huemul (*Hippocamelus bisulcus*) y la taruca (*Hippocamelus antisensis*) son los únicos representantes autóctonos de la familias Cervidae en nuestro país (Glade 1993).

En Chile el *Pudu pudu* se distribuye desde la región del Maule hasta cerca del Estrecho de Magallanes. Es la especie de ciervo más pequeña de Sudamérica, el adulto es un animal de color marrón que mide aproximadamente 90 cm. de largo, pesa de 8 a 10 Kg. y la altura de la cruz es de alrededor de 40 cm., siendo la hembra de tamaño menor (Reyes 1988). Esta descripción corresponde al pudú del sur (*Pudu pudu*) que habita principalmente el sur de Chile y las áreas adyacentes de Argentina, el pudú norteño (*Pudu mephistophiles*), vive esencialmente en Perú, Ecuador y Colombia (Bubenik y col 2000).

Debido a drásticos cambios provocados por el hombre, en la actualidad el pudú se encuentra amenazado y clasificado como Vulnerable por el Libro Rojo de los Vertebrados de Chile (Glade 1993), y por el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN 2007) y como especie del Apéndice I (CITES 2007). Además, la legislación chilena, desde el 16 de Junio de 1929 a través de la ley N° 4601, protege al pudú de la caza, comercio, transporte o posesión, salvo en casos calificados de interés científico (Chile 1998).

3.1. ANTECEDENTES GENERALES

La preservación de gametos en diversas especies, es un importante campo de investigación, tanto para facilitar las posibilidades de reproducción de ciertos individuos y así salvaguardar las características genéticas encaminadas a la mejora de las especies como para la conservación de especies y razas que están en peligro de extinción o cuentan con pocos ejemplares.

La aplicación de técnicas reproductivas en gametos, permite preservar el máximo de diversidad genética y evitar los efectos de la consanguinidad en las poblaciones (Gomendio y Roldan 2004, Roldan y Garde 2004).

3.1.1. Recogida de semen

Para la recolección de semen en ciervos silvestres, se describen diferentes métodos, cuya complejidad varía de acuerdo al tipo de manejo que las especies requieran.

3.1.1.1. Vagina artificial

Las primeras recolecciones de semen en cérvidos mediante vagina artificial fueron hechas en ciervo Rojo (Krzywinski 1976, Krzywinski y Jaczewski 1978, Krzywinski y Bobek 1984, Strzezek y col 1985), y en Alce europeo (Krzywinski 1985). Estos investigadores crearon un sistema de vagina artificial portátil que debía ser desechada luego de la recolección. Los resultados obtenidos fueron buenos en cuanto a número de muestras recogidas y calidad seminal, sin embargo esta técnica requiere de entrenamiento de los animales, lo que limita la aplicación en ciervos silvestres (Asher y col 2000); además del riesgo que significa para los operarios, que reduce tal manejo sólo a especies dóciles. Para solucionar este problema Jabbour y Asher (1991) desarrollaron un sistema de vagina artificial interna para recolección de semen en ciervo Gamo (*Dama dama*) puesta en la vagina de una cierva ovariectomizada tratada hormonalmente para que presentara celo. Luego de observada la cópula, la vagina artificial fue retirada obteniendo semen para ser evaluado. No obstante las ventajas que presenta esta técnica, necesita de un semi-cautiverio para su desarrollo.

3.1.1.2. Electroeyaculación

La electroeyaculación es la técnica más usada en la recolección de semen de ciervos silvestres, tiene la ventaja de ser segura para el operador y además permite trabajar con variedad de animales en estado silvestre, sin la necesidad de tener un núcleo de animales adaptado al cautiverio. Ha sido descrita para varias especies de ciervos (Asher y col 1993, 2000, Wahid y col 2000, Garde y col 2003,), sin evidenciar una gran diferencia en cuanto a calidad con el semen obtenido mediante servicio natural (Asher y col 2000).

3.1.1.3. Recuperación post-mortem desde epidídimo

La recuperación de espermatozoides post-mortem (desde epidídimo) ha sido empleada para varias especies de ciervos, como por ejemplo Alce europeo (*Alces alces*) (Krzywinski 1981), ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Platz y col 1982, Jacobson y col 1989) y ciervo ibérico (*Cervus elaphus*) (Garde y col 1998), conservando la fertilidad de los espermatozoides recolectados en todos los casos.

3.2. ANÁLISIS SEMINAL

El análisis del semen es fundamental para estimar la fertilidad potencial de un macho (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Los resultados de estos análisis pueden ser la base para tomar decisiones importantes relacionadas con la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* o la crioconservación de espermatozoides.

3.2.1. Análisis Macroscópico

Aspecto físico: Es importante como primer análisis revisar el color y olor del semen, se evalúan en el mismo tubo de recogida, inmediatamente después de obtenido. Esto nos permite sospechar sobre la presencia de contenidos no deseados, como sangre, orina u otros elementos que pudieran estar contaminando la muestra (Evans y Maxwell 1987).

Volumen: El volumen del eyaculado se puede medir directamente en el tubo de recogida, si está calibrado, o, con más seguridad utilizando una pipeta graduada (Evans y Maxwell 1987). En pudú no está descrito el volumen promedio de semen por eyaculado.

3.2.2. Análisis Microscópico

Motilidad: La motilidad se valora mediante la onda de movimiento del semen o según la proporción de la motilidad progresiva de los espermatozoides en una muestra. La valoración de la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la movilidad del semen fresco. Cuando el semen ha sido diluido extensivamente o congelado y descongelado se debe usar la valoración mediante la proporción de espermatozoides móviles. En este caso se utiliza el aumento 400x. Esta prueba nos permite estimar la proporción de espermatozoides vivos en la muestra (Cortés 2003).

Movimiento progresivo: Se refiere al movimiento cefálico rectilíneo (hacia adelante) de los espermatozoides. Puede ser determinado en forma subjetiva, en microscopio de contraste de fases, observando una pequeña gota de semen colocada sobre una platina térmica o en un portaobjetos precalentado a 38 °C.

Otro método para evaluar el movimiento de los espermatozoides es utilizando el “CASA” (*Computer Assisted Semen Analysis*), con el cual es posible medir diferentes parámetros cinéticos como velocidad curvilínea, en línea recta, y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (Theau-Clement y col 1999). También puede ser

usado para identificar el estatus de hiperactividad de los espermatozoides, el cual puede ser indicador de capacitación (Stachecki y col 1993).

Intensidad de movimiento: Se refiere a la calidad del movimiento de los espermatozoides vistos en microscopio de contraste de fases y en platina temperada. Se mide en una escala que va de 0 a 5 (Howard 1993) según la cual:

- 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.

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de especie y del estado fisiológico en que se encuentre (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales y manejo del semen tras su obtención (Evans y Maxwell 1987).

Concentración: Se define concentración espermática a la relación entre el número de espermatozoides y el volumen de eyaculado (expresado en ml. o μ l.). Es muy importante, ya que la relación de dilución depende de ella.

La concentración de espermatozoides puede ser estimada por ensayos basados en la consistencia o apariencia del semen y puede ser valorada mediante el uso de hemocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas (*coulter*). Los diferentes métodos varían en función de su rapidez y seguridad. El método del hemocitómetro es más lento pero más exacto. El colorímetro es rápido y seguro, aunque no todas las veces esté disponible con facilidad.

Otra manera de medir concentración de espermatozoides es utilizando un espectrofotómetro (Axner y col 1997). Donde la concentración seminal es obtenida mediante una tabla de conversión, asignado a cada valor de transmitancia un valor de concentración previamente calculado mediante recuento directo o contador de partículas (Sorensen 1982). La medición por técnicas fluorométricas del número de células cuantificando la cantidad de ADN, es un método sencillo si se dispone del instrumental adecuado, ya que el ADN teñido específicamente con un fluorocromo (H33258) puede ser medido con gran precisión porque la cantidad de ADN presente en un espermatozoide es un valor constante (Woelders 1991; Evenson y col 1993).

Vitalidad: Es el número de espermatozoides vivos dentro de una muestra. Se describen variados métodos de medir el porcentaje de espermatozoides vivos en especies domésticas. Las tinciones se basan en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática del espermatozoide. Una de las más usadas es la tinción de Bloom que utiliza eosina como colorante principal y nigrosina como contraste (Hancock 1951, Rubilar 1999, Tizol y col 1991), otra tinción es Tripán azul. Además se han utilizado kits de viabilidad espermática

como el *propidium iode*, donde los espermatozoides muertos se ven de color rojo bajo la luz fluorescente (Garner y col 1986, Harrison y Vickers 1990, Spindler y Wildt 1999).

Normalidad: Las primeras evidencias de la relación entre la morfología del espermatozoide y la fertilidad en las especies domésticas fueron presentadas por Williams y Savage en 1927 en el ganado vacuno, citado por Soderquist y col (1991), quienes determinaron como causa de infertilidad la tasa elevada de formas anormales. Posteriormente, Langerlof (1934), citado por Soderquist y col (1991) demostró la relación existente entre la incidencia de malformaciones espermáticas y alteraciones histopatológicas encontradas en los testículos de toros con una baja fertilidad, asimismo Wahid y col (2000) considera que el porcentaje de anomalías es inversamente proporcional a la capacidad fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, no todas las alteraciones de la morfología del espermatozoide tienen un origen testicular, ya que ciertas alteraciones de la cola parecen estar relacionadas con disfunciones durante el tránsito por el epidídimo.

Cada eyaculado contiene una proporción de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta suele estar relacionada con inmadurez sexual y con procesos degenerativos y patológicos. En la mayoría de las especies se verifica que al aumentar la incidencia de teratospermia se reduce el potencial reproductivo (Howard y col 1991). Así, el examen morfológico del semen se realiza como una prueba de control de calidad

La morfología espermática puede evaluarse mediante microscopía de interferencia (Saacke y Marshall 1968) o contraste de fases utilizando una variedad de fijadores celulares (Pursel y Johnson 1974, Johnson y col 1975, Pintado y Perez Llano 1992), que pueden crearse en frotis de semen teñidos, preparados sobre un porta objetos. Tradicionalmente se han utilizado tinciones como Bloom (Evans y Maxwell 1987), Karras, Giemsa (Watson 1975), cristal violeta, nitratos de plata ó la fijación de los espermatozoides en glutaraldehído al 2% (Cortés 2003). Finalmente, existen métodos para distinguir en una misma preparación la viabilidad de las células y su integridad morfológica (Talbot y Chacon 1981, Tamuli y Watson, 1994). La introducción de los sistemas CASA, ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa en diversas especies (Malo y col 2006).

Prueba de endosmósis positiva o Hipo- osmotic-swelling test (HOS test): Utilizada para medir integridad de membrana. Consiste en someter a los espermatozoides en una solución hiposmótica y fijarlos con glutaraldehído 2%, se observa el porcentaje de flagelos enrollados (Cortés 2003).

Tiene su base en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hiposmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Cortés 2003, Akourki y col 2004), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola. Cuando la cola permanece sin alteración quiere decir que la membrana se encuentra dañada o se ha vuelto altamente permeable.

La habilidad de los espermatozoides de toro, conejo y humano, de hincharse al ser sometidos a un medio hipoosmótico, fue demostrada por Drevius y Eriksson en 1966, los cuales observaron una asociación entre el hinchado de éstos y la flexión o enrollamiento de las colas de los espermatozoides, así como el retorno a la forma original al someterlos nuevamente a un medio isoosmótico.

Se ha demostrado, además, que el porcentaje de espermatozoides hinchados se incrementa linealmente a medida que la osmolaridad del medio decrece (Drevius 1972).

La capacidad del espermatozoide para hincharse, cuando es sometido a condiciones hipoosmóticas, implica integridad y funcionalidad de su membrana, lo cual es importante no solo para el metabolismo espermático, sino también para procesos como capacitación, reacción acrosómica y fecundación, por lo que podría ser catalogado como un certero indicador de la fertilidad potencial de semen (Kell y Webster 1990). Estudios realizados tratando de probar la capacidad funcional de la membrana de los espermatozoides humanos, utilizando la prueba hipoosmótica, indican una elevada correlación entre esta prueba y la capacidad de los espermatozoides de penetrar la zona pelúcida de ovocitos de hámster (Jeyedran y col 1984).

Integridad de acrosoma: Las alteraciones de la morfología del acrosoma son debidas a procesos fisiológicos asociados por un lado al envejecimiento de la célula espermática y por otro al proceso de fecundación (Yanagimachi 1994). No obstante también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia de shock por frío, en los procesos de congelación descongelación, en los cambios de presión osmótica, por diluciones y por lavados y centrifugaciones repetidas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

Dichas alteraciones parecen estar relacionadas con una baja capacidad fecundante del semen, ya que en condiciones fisiológicas sólo los espermatozoides capaces de experimentar reacción acrosómica en las proximidades del ovocito serán capaces de atravesar la zona pelúcida y penetrar el gameto femenino (Pomerol y Arrond 1994).

La valoración del estado acrosomal se puede realizar mediante microscopía óptica de campo claro en muestras previamente teñidas con Giemsa (Cortés 2003), microscopía de contraste de fases (1000 x) por inclusión de las muestras en glutaraldehído 2 % (v:v) en BL-1 (Pursel y Johnson, 1974), o citrato de sodio al 2.9 % adicionada con 2 % de formalina comercial al 40 % (Hellemann y Jara 1997).

La valoración se efectúa clasificando a los espermatozoides en tres grupos diferentes según la categorización formalizada por Pursel y col (1972), con las modificaciones introducidas por Cassinello y col. (1998). Se reconocen tres categorías:

- a) espermatozoides con borde apical normal (NAR)
- b) espermatozoides con borde apical dañado o modificado (DAR)

c) espermatozoides sin borde apical o sin acrosoma (MAR)

Tras realizar el recuento, el resultado se expresa como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto respecto al total.

También se ha incorporado la utilización de lectinas asociadas a fluoresceínas como marcadores de acrosoma y de modificaciones plasmáticas en espermatozoides eyaculados ([Cummins 1995](#), [Medeiros y Parrish 1996](#)). Las lectinas son glicoproteínas que se unen específicamente a terminales azúcares ubicados en las estructuras celulares y, por lo mismo, se han utilizado como marcadores específicos de glicoconjugados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal ([Cross y col 1986](#), Cross y Meizel 1989, [Nolan y col 1992](#), [Way y col 1995](#)). El yoduro de propidio es una tinción nuclear y por lo mismo sirve como tinción espermática de contraste. En combinación, permiten una evaluación rápida, simple y sin ambigüedad de la presencia o ausencia del saco acrosomal.

3.3. ANTECEDENTES SOBRE CONGELACIÓN DE SEMEN

Los primeros intentos de congelación de semen de ciervo (Krzywinski 1976) utilizaron diluyentes probados para toro y macho cabrío. Krzywinski y Jaczewski en 1978 trabajaron en semen de ciervo con diluyente en base a citrato. También se ha usado leche descremada, Tris con fructosa, citrato, yema de huevo y glicerol (Evans y Maxwell 1987, Mulley y col 1988, Jacobson y col 1989). Hoy existen diferentes protocolos para congelar semen de ciervo (Asher y col 2000, Garde y col 2003, 1998, 1997, Haigh y col 1993, Haigh y Bowen 1991, Ortiz y col 1997).

Las ventajas del uso de semen congelado son ya conocidas, entre ellas encontramos: conservación prácticamente indefinida en el tiempo, recogida de semen sólo en épocas reproductivas, permite el comercio internacional de las dosis, racionalización económica del eyaculado, eliminación de riesgos sanitarios, entre otros.

El proceso de conservación de espermatozoides por congelación incluye las etapas de dilución, adición del crioprotector, refrigeración, congelación y descongelación, teniendo cada una de ellas factores críticos a considerar.

Múltiples factores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado además de la composición del diluyente empleado (Stornelli y col 2005). Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la crioconservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (Mazur 1970, Parks y Graham 1992, Watson 1995). Para lograr dicho proceso, es necesario diluir el semen en un medio adecuado, que según Berndtson y Pickertt (1978) debe cumplir las siguientes funciones:

- a) Abastecer de nutrientes como fuente de energía.
- b) Proteger contra el efecto mecánico que produce el enfriamiento rápido.
- c) Proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios en el pH al formarse ácido láctico.
- d) Mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico correcto.
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano.

La reducción de la temperatura por debajo de los 37 °C y, principalmente, de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60 °C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196 °C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130 °C no existe agua en el estado líquido (Mazur 1984).

Con el enfriamiento de la suspensión celular por debajo de los 0°C, se desencadena una serie de procesos nocivos para la célula, que comienzan con la formación de hielo en el compartimento extra-celular. La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intra-celular (Watson 1979, 1995). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intra-celular hacia el ambiente extra-celular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett 1987). Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intra-celular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham 1992).

Para obtener buenos resultados en la congelación de semen, Anchordoguy y col. (1987), determinaron que es necesario realizar el cambio de temperatura en 3 pasos, los cuales tendrán una duración distinta según la especie en que se trabaje:

- 1) Periodo de equilibrio: la muestra es enfriada lentamente desde la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima del punto de congelación (4°C).
- 2) La muestra es congelada rápidamente para minimizar el tamaño de los cristales de hielo, exponiéndola primero a los vapores de nitrógeno líquido por un período y luego sumergirla en nitrógeno líquido.
- 3) La muestra congelada alcanza la temperatura de almacenamiento (-196°C), lo suficientemente rápido para evitar la re-cristalización.

Existen sustancias denominadas crioprotectores, cuya función es mejorar la sobrevivencia celular durante el congelamiento. El más utilizado es el glicerol. Éste actúa intracelularmente reduciendo la deshidratación celular, disminuyendo el efecto de la concentración de solutos del medio extracelular, o bajando el punto de congelación del medio intracelular (Ortega 2004). Sin embargo, no es una sustancia inocua para la célula, por lo tanto su concentración debe ser la adecuada para no resultar tóxico. Esta

concentración varía según la especie e incluso existen algunas en las que no se puede utilizar (Nelson y col 1999).

La yema de huevo también es considerada un agente crioprotector. Su acción está dada por la unión que se produce entre las lipoproteínas presentes en la fracción de baja densidad y la membrana celular del espermatozoide (Watson 1976). El glicerol y la yema de huevo actúan sinérgicamente como agentes crioprotectores, proporcionando una mejor tasa de sobrevivencia espermática post-descongelado (Pace y Graham 1974). Se determinó que la yema de huevo en diluyentes seminales tiene mayor efectividad en la preservación de la integridad de la membrana espermática y protección contra las variaciones de temperatura gracias a lipoproteínas y lecitinas presentes en la yema de huevo (Cole y Cupps 1977), mientras que el glicerol tiene un rol importante en la preservación de la motilidad (Foulkes 1977).

El semen se ha preservado satisfactoriamente en diluyentes basados en el amortiguador orgánico Tris (Trihidroximetil-aminometano), cuya función es mantener el pH cercano al neutro y una presión osmótica de 300mOsm, equivalente a la del semen, plasma sanguíneo y leche (Hafez 2000).

Los espermatozoides se hacen susceptibles al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo, cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto, durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico (White 1993).

Otro de los factores importantes que afectan decisivamente a la viabilidad del espermatozoide es la velocidad de descongelación (Fiser y col 1993). Ésta deberá estar en concordancia con el protocolo de congelación (Mazur 1984) ya que los efectos de las velocidades de descongelación en la supervivencia del espermatozoide dependen del ritmo previo de congelación (Fiser y col 1993, Watson y col 1992). La existencia de la interacción entre las dos velocidades fue descrita en la congelación de espermatozoides de cerdo (Fiser y col 1993, 1996), toro (Robbins y col 1976) y hombre (Henry y col 1993).

Serían, por lo tanto, los espermatozoides anormales o dañados durante el enfriamiento, los que generan una gran cantidad de sustancias oxidantes (Ball y col 2001) conocidas como ROS (reactive oxygen species), por lo que actualmente se investigan sustancias antioxidantes que prevengan el daño durante el enfriamiento.

3.4. HIPÓTESIS

Es posible congelar semen de pudú utilizando dos diluyentes, Tris y Leche SB.

3.5. OBJETIVOS

3.5.1. Objetivo general

Congelar semen de pudú con dos diluyentes de congelación.

3.5.2. Objetivo específico

Evaluar semen fresco de pudú obtenido mediante electroeyaculación.

Evaluar el efecto de la refrigeración sobre los espermatozoides de pudú con diluyentes Tris y Leche SB.

Congelar espermatozoides en pajuela francesa de 0,25 ml.

Evaluar el efecto de la congelación sobre los espermatozoides de pudú con diluyentes Tris y Leche SB.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Animales o material biológico

Seis pudúes machos entre 1 y 5 años de edad, clínicamente sanos, mantenidos en cautiverio en CEREFAS (Centro de Rehabilitación de fauna Silvestre) desde marzo hasta junio. Se les realizó un examen clínico reproductivo a través de inspección y palpación de los genitales para constatar la presencia e integridad de los testículos, epidídimos, escroto, prepucio y pene.

4.1.2. Recolección y transporte de semen

Fármacos: Xilacina¹, Ketamina², Yohimbina.³

Electroeyaculador: Sonda rectal de 1 cm. de diámetro x 12 cm. de largo con 3 electrodos de alambre de plata de 1 mm. de diámetro orientados longitudinalmente (confeccionada artesanalmente en el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile), conectada a un estimulador eléctrico (*Grass S 44, Grass Medical, U.S.A.*).

Pipetas graduadas de 100µl.

Tubos ependorff.

Leche descremada UHT.

Tris (solución stock) (Anexo 1)

Baño maría 36 °C.

4.1.3. Material de laboratorio

Platina temperada

Microscópio óptico *Zeiss* con contraste de fase y platina temperada

Termo de nitrógeno líquido de 50 kg.

Program Freezer ET-1N

Baño maría

Autoclave

Balanza *Sartorius*

Medidor de pH *Kent Eil 7020*

¹ Xilacina 2% ® Agroland, Chile.

² Ketostop®, Drag Pharma, Chile.

³ Yohimbina, Recetario Magistral, Farmacias Ahumada, Chile

Reactivos y Medio:

Tinción de Blom (Eosina 5%, Nigrosina 10%) (Anexo 2)

Tinción de Karras (Anexo 2)

Solución Hiposmótica (Anexo 3)

Glutaraldehído 2% en BL-1 (Anexo 3)

Alcohol Polivinílico

Aceite de inmersión

Material fungible:

Micropipetas 10, 20, 100 y 1000 μ l

Pipetas de Pasteur desechables

Papel pH

Cámara de Neubauer

Porta objetos

Cubre objetos

Termómetro

Nevera con canastillo para vapor de nitrógeno líquido.

4.1.4. Diluyentes de congelación

Leche SB (leche descremada UHT, fructosa, estreptomicina, penicilina, glicerol, yema de huevo) (Anexo 1)

Tris (Tris stock, glicerol, yema de huevo) (Anexo 1).

4.2. MÉTODO

4.2.1. Animales

Los animales utilizados en este estudio contaron con la autorización del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) del gobierno de Chile. Seis pudúes machos adultos entre 1 y 5 años de edad y de ocho a trece kg. de peso, fueron mantenidos en cautiverio durante el período de duración del estudio (cuatro meses), en recintos de CEREFAS, pertenecientes a la UACH (Universidad Austral de Chile), ubicado en Valdivia, Chile. Los machos fueron separados en corrales individuales (20 x 20 m.) para evitar enfrentamientos violentos entre sementales que expresan territorialidad. Los pudúes fueron alimentados con 400 g/día de concentrado para ternero, agua fresca y ramoneo de Chilco (*Fuchsia magallanica*), Maqui (*Aristotelia chilensis*) y Murra (*Rubus ulmifolius*).

4.2.2. Recolección de semen

Los trabajos de congelación fueron hechos con semen recolectado desde los meses de abril a mayo del 2007.

Para la recolección de semen los animales fueron anestesiados con una combinación anestésica de Xilacina (0,5 mg./kg. i.m.) y Ketamina (10 mg./kg i.m.). Después del procedimiento, la anestesia fue revertida con la administración del antídoto Yohimbina (2 mg./kg. e.v.).

La estimulación de las glándulas accesorias por vía rectal (lubricado con vaselina) combinó masaje digital (antero - posterior) y electroeyaculación, donde los electrodos fueron colocados ventralmente a 8 cm. de profundidad medidos desde el ano. El protocolo utilizado consistió en un total de ochenta estímulos divididos en tres series, con voltajes que variaron entre 2 y 5 volt. (Anexo 4), cada serie separada por 15 seg.. Mientras se aplicaban los estímulos, el semen se succionó desde el prepucio con una pipeta graduada de 100 µl y fué puesto en tubos ependorff que contenían los diluyentes Tris y Leche. Luego el material seminal se transportó desde CEREFAS al laboratorio, en baño maría a 36 °C, para posteriormente ser analizado.

4.2.3. Evaluación de semen

Motilidad: Sobre un portaobjetos puesto en una platina temperada a 37 °C, se depositó una gota de aproximadamente 5 µl de semen diluido. Se observó en microscopio de contraste de fases 40x el porcentaje de espermatozoides que presentaban movimiento.

Movimiento progresivo: Sobre la misma gota en que se evaluó motilidad, una vez transcurrido 5 min. y sobre platina temperada en 37 °C, se evaluó el porcentaje de espermatozoides con movimiento cefálico rectilíneo (hacia adelante), en microscopio de contraste de fases a 40x.

Intensidad de movimiento: Bajo las mismas condiciones de las dos pruebas anteriores se evaluó la calidad del movimiento de los espermatozoides en una escala del 0 al 5, donde 0 representa la ausencia de movimiento y 5 un movimiento de progresión rápido (Howard 1993).

Concentración: El semen fue recolectado en 500 µl de cada diluyente. Asumiendo este volumen como total de semen recolectado, se hizo una dilución de 1:100 y se contaron los espermatozoides en cámara cuenta glóbulos (Neubauer).

Vitalidad: Se utilizó la tinción de Blom, para la cual se colocó sobre un portaobjetos separadamente una gota de semen diluido (10 µl), 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 100 a 200 espermatozoides, diferenciando a los muertos teñidos de color rojizo (eosina), con los vivos, que se evidenciaban del mismo color del medio de contraste (nigrosina), como se muestra a continuación (Figura 1).

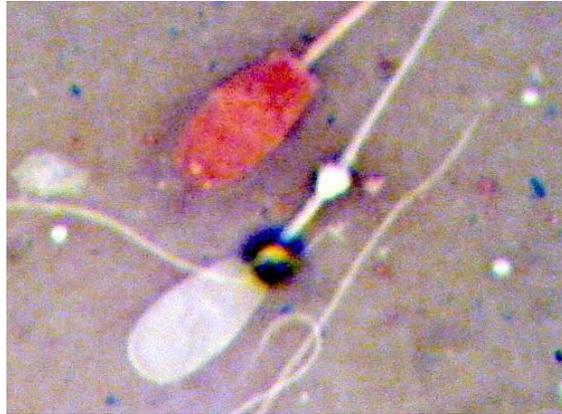


Figura 1. Espermatozoides de pudú teñidos mediante Tinción de Blom. Observe el espermatozoide superior teñido (muerto), mientras que el espermatozoide inferior está vivo por resistencia al colorante (100x).

Normalidad: Ésta se determinó tomando una gota de semen diluido (10 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” (Anexo 2).

Permeabilidad de membrana: Para medir este parámetro se usó la prueba Hiposmótica o de endosmosis positiva que consistió en someter a los espermatozoides en una solución hiposmótica (100 mOsm/Kg) (Anexo 3) a razón 1:10, durante 25 min. a temperatura ambiente y fijarlos con glutaraldehído 2% (1:1) por 5 min., se contó un total de 100 a 200 espermatozoides y se observó el porcentaje de flagelos enrollados en microscopio de contraste de fases a 100x, como se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Espermatozoide bajo la prueba Hiposmótica. Espermatozoide de pudú enrollando la cola (100x).

Integridad de acrosoma: En esta evaluación, los espermatozoides fueron fijados en glutaraldehído 2% (Anexo 3) en partes iguales durante 5 min., se contó entre 100 a 200 espermatozoides, observando el porcentaje con borde apical intacto (NAD), bajo microscopía de contraste de fases a 100x.

4.2.4. Diluyentes

Los diluyentes utilizados para la crioconservación del semen fueron Tris (Trihidroximetilaminometano, ácido cítrico, Fructosa, estreptomina, penicilina sódica, glicerol y yema de huevo) y Leche SB (Leche descremada, fructosa, estreptomina, penicilina sódica, glicerol y yema de huevo). Ambos diluyentes fueron preparados en el laboratorio de semen del Instituto de Reproducción Animal de la UACH.

Dado el escaso volumen de semen obtenido por procedimiento, cada eyaculado fue colectado con 500µl de diluyente respectivo sin glicerol ni yema de huevo.

Cuadro 1. Composición de los diluyentes de congelación.

Componente	Tris	Leche SB
Yema de huevo	20%	5%
Glicerol	7%	7%
Tris stock	73%	-
Leche UHT	-	88%

pH diluentes: Tris 6,8; Leche 6,5

4.2.5. Crioconservación de semen

Después de agregada la porción de diluyente que contenía yema de huevo y glicerol (crioconservantes), se ajustó a concentración de 10×10^6 espermatozoides por pajuela. Se envasó en pajuela francesa de 0,25 ml. a temperatura ambiente (17 °C). Se llevó a curva de refrigeración a -0,16 °C/min hasta llegar a 4 °C (1,21 h.), manteniendo esta temperatura por 2 horas con un total de 3,21 horas (Garde y col 2003) (Figura 3). Inmediatamente después de terminado el período de adaptación se realizó una segunda evaluación al semen refrigerado que contempla motilidad, movimiento progresivo, intensidad de movimiento, vitalidad, endosmosis positiva e integridad de acrosoma. Posteriormente las pajuelas fueron sometidas a vapor de nitrógeno líquido a 5 cm. del nitrógeno líquido durante 10 min., y sumergidas en él.

Después de un mínimo de 30 min. sumergidas en nitrógeno líquido una pajuela de cada diluyente fue descongelada en baño maría a 37 °C durante 11 seg. y se evaluó motilidad, movimiento progresivo, intensidad de movimiento, vitalidad, endosmosis positiva e integridad de acrosoma.



Figura 3. Pajuelas en periodo de adaptación de temperatura desde 17 °C a 4 °C.

Se contaron 100 a 200 espermatozoides para cada preparación. Las evaluaciones con espermatozoides motiles fueron hechas sobre platina temperada 5 min. posterior al montaje de las preparaciones, las pruebas realizadas con espermatozoides fijados y/o teñidos fueron evaluadas entre 2 a 4 horas después de la fijación, exceptuando prueba de normalidad (Karras), cuya evaluación se llevó a cabo pasadas las 24 horas que requiere la fijación.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico *Statistica* versión 6.0.

El análisis estadístico que permitió determinar la influencia de los diluyentes y el estado de conservación sobre el semen, fué *ANOVA* de dos vías y *test* de comparación *Post-hoc*, *Tukey HSD*, previa comprobación de normalidad de los datos a través del *test Kolmogorov-Smirnov*.

Para saber que relación existió entre los parámetros de funcionalidad espermática, se realizó una prueba de correlación para semen Fresco, Refrigerado y Congelado a través de *Microsoft Excel*, previa comprobación de normalidad de los datos a través del *test Kolmogorov-Smirnov*. Para la prueba de hipótesis se realizó el *test de "t"- Student* con intervalo de confianza de 95%.

5. RESULTADOS.

5.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN RECOLECTADO.

Se utilizó dieciséis muestras de semen, las cuales cumplieron con las características exigidas: libres de orina y motilidad $\geq 50\%$. Estas muestras fueron analizadas y congeladas. El pH promedio y rango fue de 6,7 (6,4-7,0). El volumen seminal obtenido fue $76,8 \pm 32,3$ μl . de promedio, con una concentración alrededor de 405×10^6 espermatozoides por ml. de semen diluido. La normalidad promedio y rango fue de 83,5 % (59-95).

Las características microscópicas para semen fresco evaluado dentro de 20 minutos posterior a la recolección, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características microscópicas de semen fresco de pudú diluido en Tris y Leche SB.

	Tris (n = 16)	Leche SB (n = 16)
Motilidad (%)	$82,8 \pm 2,8$ (60-95)	$80,6 \pm 3,3$ (50-95)
Movimiento progresivo (%)	$75,0 \pm 3,6$ (45-90)	$75,6 \pm 3,6$ (50-90)
Intensidad de movimiento (0-5)	$4,4 \pm 0,2$ (3-5)	$4,8 \pm 0,1$ (4-5)
Vitalidad (%)	$75,1 \pm 2,8$ (51-90)	$74,6 \pm 3,8$ (35-93)
Endosmosis positiva (%)	$77,0 \pm 2,0$ (66-91)	$74,2 \pm 2,9$ (46-92)
Integridad de acrosoma (% NAR)	$63,6 \pm 4,2$ (14-85)	$67,9 \pm 3,9$ (34-89)

Valores expresados en promedio \pm error estandar del promedio con rangos entre paréntesis.

En el Cuadro 3 se muestran las características obtenidas en el semen refrigerado luego de un período de adaptación en curva de enfriamiento (3 horas y 21 minutos), en 20 pajuelas de 0,25 ml.

Cuadro 3. Características microscópicas de semen de pudú luego de un período de adaptación en curva de enfriamiento con diluyentes de congelación Tris y Leche SB.

	Tris (n=16)	Leche SB (n=16)
Motilidad (%)	69,7 ± 2,1 (50-85) ^a	62,2 ± 2,9 (40-80) ^a
Movimiento progresivo (%)	52,8 ± 3,7 (25-70) ^a	54,7 ± 3,0 (30-70) ^a
Intensidad de movimiento (0-5)	3,8 ± 0,2 (3-5) ^a	3,8 ± 0,2 (2-5) ^a
Vitalidad (%)	61,3 ± 3,4 (31-89) ^a	57,6 ± 3,6 (31-83) ^a
Endosmosis positiva (%)	67,5 ± 2,3 (53-82) ^a	56,1 ± 3,1 (36-76) ^b
Integridad de acrosoma (% NAR)	58,7 ± 3,3 (30,76) ^a	56,7 ± 3,3 (29-76) ^a

Valores expresados en promedio y error estandar del promedio con rangos entre paréntesis.

^{a-b} El exponente denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes.

En total se logró congelar 256 pajuelas, en el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos en las muestras descongeladas. Cien pajuelas de las mejores muestras descongeladas se mantienen almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C para usos futuros.

Cuadro 4. Características microscópicas de semen de pudú descongelado, con diluyentes de congelación Tris y Leche SB.

	Tris (n=16)	Leche (n=16)
Motilidad (%)	53,4 ± 2,6 (30-70) ^c	49,4 ± 3,7 (20-75) ^c
Movimiento progresivo (%)	38,4 ± 3,1 (15-60) ^c	42,2 ± 3,9 (10-60) ^c
Intensidad de movimiento (0-5)	3,2 ± 0,2 (2-4) ^c	3,2 ± 0,2 (2-5) ^c
Vitalidad (%)	47,1 ± 2,6 (27-62) ^c	43,4 ± 4,1 (14-67) ^c
Endosmosis positiva (%)	56,0 ± 2,8 (32-72) ^c	47,2 ± 4,0 (16-68) ^d
Integridad de acrosoma (% NAR)	48,6 ± 3,3 (26-66) ^c	49,3 ± 3,4 (18-74) ^c

Valores expresados en promedio y error estandar del promedio con rangos entre paréntesis.

^{c-d} El exponente denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre diluyentes

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis *ANOVA* muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambos diluyentes para los parámetros utilizados en las evaluaciones del semen, con excepción de endosmosis positiva, donde el uso de uno u otro diluyente influyó sobre la calidad espermática, siendo Tris el diluyente que conservó mejor las características de integridad de membrana durante el proceso de congelación. El estado de conservación presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas las variables analizadas, donde el cambio que más afectó a los espermatozoides en la mayoría de los parámetros analizados fue desde fresco a refrigerado.

Se observó correlación lineal significativa en semen congelado para Tris entre motilidad y movimiento progresivo ($r = 0,581$), movimiento progresivo e integridad de acrosoma ($r = 0,498$) y vitalidad y endosmósis positiva ($r = 0,591$), para Leche SB se observó correlación lineal significativa para todas las variables analizadas en semen congelado/descongelado excepto entre intensidad de movimiento e integridad de acrosoma, y entre vitalidad e intensidad de movimiento. Para Tris en semen refrigerado y congelado se observó correlación negativa entre endosmósis positiva e integridad de acrosoma ($-0,138$ y $-0,036$ respectivamente) (Anexo 5).

6. DISCUSIÓN.

La técnica usada permitió obtener muestras de semen que, no obstante su escaso volumen, fueron susceptibles de ser procesadas y conservadas en nitrógeno líquido. Las muestras obtenidas en las condiciones mínimas previamente establecidas como se observa en el Cuadro 2, demuestra que estos pudúes se encontraban en estación reproductiva, ya que se ha descrito que en estos meses los niveles de testosterona presentan un mayor incremento, especialmente en Marzo, decreciendo marcadamente estos niveles hacia fines de Mayo y comienzos de Junio (Bubenik y col 2000, 1996, Bartos y col 1998), época que coincide con la caída de las astas y reducción del tamaño testicular (Reyes y col 1997). La calidad espermática, descrita por primera vez de acuerdo a nuestros antecedentes, de estas muestras tiene una concentración de alrededor de 405×10^6 de espermatozoides por ml. de semen diluido, la normalidad espermática de los espermatozoides de pudú es alta respecto a la descrita por Asher y col (1996a, 2000) para ciervo *Dama dama* y para ciervo *Axis axis* por Umaphy y col (2007).

El procesamiento de las muestras aseguró al menos a través del pH, que éstas fueran libres de contaminación con orina y que tuviesen una motilidad espermática sobre el 50% parámetros utilizados en la selección de muestras de semen para otros ciervos (Garde y col 2003). La electroeyaculación ha sido usada con éxito en diversas especies, particularmente ciervos silvestres (Garde y col 2003, Asher y col 2000). Sin embargo, el pequeño tamaño del pudú suponía una dificultad mayor. El diseño del electroeyaculador usado previamente en gatos (Ortega 2004) se adaptó perfectamente al pudú.

El análisis del Cuadro 2 demuestra una alta calidad del semen usado con una motilidad sobre el 80 % y un movimiento progresivo de un 75 % en ambos diluyentes. La inclusión de un análisis de una muestra de semen con ambos diluyentes una vez finalizado el período de adaptación permite obtener información de que hubo un efecto, independiente del diluyente usado, de la refrigeración sobre la calidad espermática; la motilidad y particularmente el movimiento progresivo, disminuyó sobre un 20 %, por lo tanto esto supone que hay factores como temperatura y efecto de los crioprotectores que estarían afectando la calidad espermática. No se sabe cual de ellos está influenciando pero se abre una línea de estudio para el futuro. Conviene destacar, que la curva de refrigeración usada en este experimento fue controlada por una máquina de congelación programada (-0,16°C por min.) semejante a la utilizada en otros ciervos por Garde y col (2003), lo que permitió disminuir y mantener condiciones uniformes de temperatura en curva de refrigeración para todas las muestras de semen recolectadas.

Respecto al Cuadro 4 puede observarse que la motilidad y movimiento progresivo del semen congelado y descongelado bajó alrededor de un 16 a 13 % para Tris y Leche SB respectivamente desde la evaluación refrigerada. Esta disminución es menor a la provocada por la refrigeración, por lo tanto parece razonable estimar que los espermatozoides de pudú resistieron adecuadamente el proceso de congelación a -196 °C al cual fueron sometidos, con ambos diluyentes, (53,4% y 49,4 % de motilidad para Tris y

Leche SB respectivamente). Estos resultados son mas altos que los descritos en semen congelado, para ciervo *Dama dama*, en el cual el porcentaje de motilidad no superó los 43,5% (Garde y col 2003).

En relación a los diluyentes usados se demuestra que ambos conservaron el semen, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos; sin embargo, es necesario señalar que los espermatozoides recolectados con Leche SB mostraron un movimiento mas uniforme que aquellos conservados con Tris, pero durante menos tiempo. Tris permitió que los espermatozoides mostraran un vigoroso movimiento que se mantuvo durante más tiempo que en Leche SB. Palomino y col (2001) trabajando con semen caprino usando como diluyentes Citrato y Leche concluyeron que la viabilidad en Leche es muy baja (6 horas) con respecto al Citrato (48 horas). Asimismo se observó en semen de pudú que para la mayoría de los parámetros de la evaluación seminal, Tris aventaja levemente a Leche SB. Esto concuerda con trabajos realizados en ciervos (Garde y col 1998, 2003) y en congelación de semen en otras especies de mamíferos (Stornelli y col 2005), donde los diluyentes en base a Leche no son los mas efectivos.

Conviene destacar que en las últimas muestras (Junio) se observó que, aunque las muestras inicialmente (fresco) presentaban una calidad aceptable, con un movimiento progresivo igual o superior a 50%, después de la congelación, éste bajaba drásticamente. Esta baja en la resistencia hizo abandonar el procedimiento de recolección y hace presumir que los machos comenzaban a salir de la estación reproductiva. Esto concuerda con estudios hechos sobre *Cervus elaphus* y *Dama dama*, donde se describen períodos marcados de fertilidad–infertilidad determinados por el fotoperíodo, relacionados con variaciones en el tamaño y función testicular que se refleja en drásticos cambios en las características seminales (Lincoln, 1971; Mirachi y col 1977, Haigh 1984, Asher y col, 1987, 1996b, Gosch y Fischer 1989), cuyos períodos infértiles son acompañado de la caída de astas, además de semen azoospermico.

Sin embargo en estas muestras fuera de temporada que podríamos llamar de “mala calidad”, Leche SB presentó una disminución considerablemente menor en puntos porcentuales para todas las características analizadas durante el proceso de congelación con respecto a los recolectados con Tris. Resultados opuestos a los obtenidos en ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) por Garde y col (1998) donde el semen de alta calidad inicial era mejor conservado con diluyentes en base a lactosa, pero reportaba los peores resultados en la conservación de semen de baja calidad.

Según Garde y col. (1998) la presencia de lactosa en el medio crioprotector provoca la aparición de un estado de hipertonicidad que puede provocar deshidratación celular, evitando así la formación de cristales y protegiendo de esta manera, mejor de los efectos nocivos que la congelación tiene sobre los espermatozoides. Por otro lado, Simon (1981), Salisbury y col (1982), Bonadona (1986) y Evans y Maxwell (1987), manifiestan que el empleo de leche de vaca descremada y esterilizada usada como diluyente de semen, no siempre da resultados uniformes, debido a que presenta variabilidad en su composición (Cole y Cupps 1977). Y, aunque es probado que la leche protege al espermatozoide contra el shock térmico debido a la caseína (Cole y Cupps 1977), en las muestras de baja calidad inicial (fuera de temporada), presenta un efecto perjudicial para los espermatozoides, los

cuales son más sensibles y no soportan el estrés osmótico debido a la presencia de lactosa en el medio crioprotector, provocando, por tanto, un mayor grado de lesión en las membranas plasmáticas de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación (Garde y col 1998).

El análisis estadístico permite inferir que los parámetros de evaluación del semen fueron medidos en forma correcta por la alta correlación que existe entre ellos. Aunque hubo correlaciones negativas entre integridad de acrosoma y endosmosis positiva en el semen refrigerado y congelado con Tris, éstas no son significativas y tienden a cero, es decir, que las variables son independientes.

La correlación significativa entre la mayoría de los parámetros de evaluación de semen de pudú en diluyente Leche SB nos indica que es posible estimar características de los espermatozoides, como por ejemplo vitalidad e integridad de acrosoma a partir del valor de otro análisis como la prueba de movimiento progresivo. No así para diluyente Tris donde la correlación entre la mayoría de los parámetros no fue significativa, es decir, éstos actúan en forma independiente.

Respecto a investigaciones hechas sobre la correlación que existe entre los análisis de semen y fertilidad, en especies domésticas, Elgueta (1992), observó correlaciones significativamente altas entre la prueba hipoosmótica, viabilidad espermática y movimiento progresivo. Jordan (1988), establece asociaciones positivas entre la prueba hipoosmótica y la fertilidad, así como Check y col. (1989), en la especie humana al correlacionarla con las tasas de concepción. La respuesta de los espermatozoides caninos al ser sometidos a la prueba hipoosmótica ha sido similar a aquellos reportados para espermatozoides humanos y bovinos, obteniéndose altas correlaciones entre las variables de motilidad progresiva, espermatozoides vivos y espermatozoides normales (Rubilar 1999). Consecuentemente el semen de pudú revelaría a través de los análisis realizados que posee valores de fertilidad potencial asociados a las características demostradas en los análisis de correlación.

Finalmente, estos resultados abren posibilidades para la creación de un Banco de Semen de esta especie, que pueda ser utilizado para el intercambio de material genético entre lugares distantes, evitando la endogamia y además, sin la necesidad de exponer estos animales silvestres a problemas de transporte, que podrían poner en riesgo su integridad. A futuro, también podría incluirse biotecnologías de reproducción asistida en manipulación de gametos y fecundación *in vitro* en pudú.

6.1. CONCLUSIONES.

Es posible obtener muestras de semen en pudú mediante electroeyaculación.

Es posible congelar semen de pudú en pajuelas francesas de 0,25 ml a -196 °C.

La evaluación de calidad espermática en semen fresco, refrigerado y congelado revela que la mayor disminución en esta calidad ocurre durante el proceso de refrigeración.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diluyentes Tris y Leche SB en la conservación del semen de pudú.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Anchordoguy T, A Rudolph, J Carpenter, J Crowe. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24, 324-331.
- Amann RP, BW Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7, 145-176.
- Akourki A, L Gil, M Gallegos de la Hoya, A Echeagaray, N Gonzalez, A Josa, E Espinosa, LC Meque. 2004. Resultados de fertilización *In vitro* utilizando semen congelado de los moruecos ASSAF. *Revista Científica FCV-LUZ* 5, 451-456.
- Asher GW, AM Day, GK Barrell. 1987. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer *Dama dama* and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil* 79, 353-362.
- Asher GW, MW Fisher, PF Fennessy, CG Mackintosh, HN Jabbour, CJ Morrow. 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer *Cervus elaphus* and fallow deer *Dama dama*. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 241-265.
- Asher GW, MW Fisher, PR Fennessy. 1996a. Environmental constraints on reproductive performance of farmed deer. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 35-44.
- Asher GW, DK Berg, S Beaumont, CJ Morrow, KT O'Neill, MW Fisher. 1996b. Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer *Dama dama* and hybrid Mesopotamian-European fallow deer *Dama mesopotamica* = *Dama dama*. *Anim. Reprod. Sci.* 45, 201-215.
- Asher GW, DK Berg, G Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 195-211.
- Axner E, B Strom, C Linde-Forsberg. 1997. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology* 47, 929-934.
- Ball BA, AT Vo, J Baumber. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Veto Res.* 62 (4), 508-15.
- Bartos L, E Reyes, D Schams, G Bubenik, A Lobos. 1998. Rank dependent seasonal levels of IGF-1, cortisol and reproductive hormones in male pudú (*Pudu puda*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 120, 373-378.

- Berndtson W, B Pickett. 1978. Techniques for the cryopreservation and field handling of bovine spermatozoa, In the integrity of frozen spermatozoa. Washington DC, Conaf. *Natl. Acad. Sci.* 53-57.
- Bonadona T. 1986. Reproducción Animal e Inseminación Animal. 1a Ed. Editorial Hemisférico Sur. Argentina. Pp. 121-145, 181-192
- Bubenik GA, E Reyes, D Schans, A Lobos, L Barto. 2000. Pudu, the smallest deer of the world: 10 years of endocrine studies of Southern pudu (*Pudu puda*) in Chile. *Z. Jagdwiss*, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin 46, 129-138.
- Bubenik GA, E Reyes, D Schans, A Lobos, L Barto. 1996. Seasonal levels of LH, FSH, Testosterona and Prolactin in adult male pudú (*Pudu puda*). *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, (4), 417-420.
- Cassinello J, T Abaigar, M Gomendio, ERS Roldan. 1998. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorrr*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). *J. Reprod. Fertil.* 113, (1), 35-45.
- Check JH, R Epstein, K Nowroozi, BS Shanis, CH Wu, A Ballendosf. 1989. The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil. Steril.* 52, 159-161.
- Chile Diario Oficial N° 36.233. 1998. Decreto Número 5. Aprueba Reglamento.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 2007. Appendices I, II and III. (13/09/2007). Official document.
- Cole HH, PTg Cupps. 1977. Reproduction in domestic animal. Academic Press. California-USA 3th Ed., Pp. 495-496.
- Cortés S. 2003. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. *Tesis doctoral* Universidad Complutense de Madrid, España.
- Cross NL, P Morales, JW Overstreet, FW Hanson. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm, *Gamete Res.* 15, 213-226.
- Cross NL, S Meizel. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 41, 635-641.
- Cummins JM. 1995. Tests of sperm function. En: Grudzinskas, JG, JL Yovich (eds.). Gametes. The Spermatozoon. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 70-103.
- Drevius LO. 1972. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. *J. Reprod. Fertil.* 28, 41-54.

- Dreius LO, H Eriksson. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Cell. Res.* 42, 136-156.
- Elgueta MM. 1992. Evaluación y adaptación de la prueba hipoosmótica del semen de potro. *Memoria de Título* Universidad de Chile, Escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile.
- Evans G, WMC Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. *Butterworth*, Sydney, Pp. 107-117, 122-141.
- Evenson DP, JE Parks, MT Kaproth, L Jost. 1993 Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J. Dairy Sci.* 76, 86-94.
- Fiser PS, RW Fairfull, C Hansen, PL Panich, JNB Shrestha, L Underhill. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* 34; 190-195.
- Fiser PS, RW Fairfull, PL Panich. 1996. Glycerol equilibration time revisited. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 141-146.
- Foulkes JA. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect of the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Repr. Fert.* 34, 373-388.
- Garde JJ, N Ortiz, A García, A López, L Gallego. 1997. Criopreservación del material espermático postmortem e inseminación artificial en el ciervo ibérico. *I Congreso Nacional de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales*. 14-17 de diciembre, Córdoba, Argentina.
- Garde JJ, N Ortiz, AJ García, A López, L Gallego. 1998. Criopreservation of sperm samples collected postmortem and artificial insemination in Iberian deer. *Arch. Zootec.* 47, 351-356. Comunicación.
- Garde JJ, AJ Soler, J Cassinello, C Crespo, AF Malo, G Espeso, M Gomendio, ERS Roldan. 2003. Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. of reprod.* 69, 602-611.
- Garner DL, D Pinkel, LA Johnson, MM Pace. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. of Reprod.* 34, 127-138.
- Glade A. 1993. Libro Rojo de los Vertebrados Terrestres de Chile. 2a Ed. CONAF, Chile.
- Gomendio M, ERS Roldan. 2004. La conservación de la biodiversidad: un reto científico. En: *El conocimiento científico como referente político en el Siglo XXI*. Nombela C, Ed. Fundación BBVA, Madrid, España Pp. 117-158.

- Gosch B, K Fischer. 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer *Dama dama* and their relationship to the antler cycle. *J. Reprod. Fertil.* 85, 7–17.
- Hafez ESE, B Hafez. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7a Ed. McGraw Hill Interamericana. México. Pp 375-387.
- Haigh JC. 1984. Artificial insemination of two white-tailed deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 1446–1447.
- Haigh J, G Bowen. 1991. Artificial insemination of red deer (*Cervus elaphus*) with frozen-thawed wapiti semen. *J. Reprod. Fert.* 93, 119-123.
- Haigh J, A Dradjat, A English. 1993. Comparison of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. *J. Zoo. Wildl. Med.* 24, (4), 454-458.
- Hancock JL. 1951. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 167-323.
- Harrison RAP, SE Vickers. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343-352.
- Henry MA, EE Noiles, D Gao, P Mazur, JK Critser. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil. and Steril.* 60, 911-918.
- Helleman C, C Jara. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Arch. med. vet.* vol 29, Pp 3-6.
- Howard J, M Bush, DE Wildt. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J. Androl.* 12, 36-45.
- Howard JG. 1993. Semen collection and analysis in carnivores. En: Folwer ME Zoo & wild animal medicine current therapy. 3a Ed. Saunders, Philadelphia. U.S.A. Pp 390-399.
- Jabbour HN, GW Asher. 1991. Artificial breeding of farmed fallow deer *Dama dama*. En: Renecker LA, RJ Hudson Ed. *Wildlife Production: Conservation and Sustainable Development*. University of Alaska, Fairbanks, AK, Pp 485–491.
- Jacobson HA, HJ Bearden, DB Whitehouse. 1989. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 53, 224-227.

- Jeyedran RS, HH Van Der Ven, M Pérez Pelaes, BG Crabo, LJD Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219-228.
- Johnson L, WE Berndson, BW Pickett. 1975. An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 42, 951-954.
- Jordan A. 1988. Estimación de la fertilidad potencial en potros fina sangre de carrera mediante pruebas espermáticas de laboratorio. *Memoria de Título*. Universidad de Chile, Escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago. Chile.
- Kell BK, BW Webster. 1990. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. *C.R.C. Press*, Boston M. A. Pp. 80-96.
- Krzywinski A. 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. Proc. 8th Int. Congr. *Anim. Reprod.* AI, Cracow 1, 1002-1005.
- Krzywinski A, Z Jaczewski. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp. Zool. Soc. London* 43, 271-287.
- Krzywinski A. 1981. Freezing of post-mortem collected semen from moose and red deer. *Acta Theriol.* 26, 424-426.
- Krzywinski A. 1985. A study in artificial breeding in deer for practical application. *Deer* 6, 211-213.
- Krzywinski A, B Bobek. 1984. Semen collection from red deer males with a dummy. *Acta Zool. Fenn.* 171, 175-178.
- Lincoln GA. 1971. The seasonal reproductive changes in the red deer stag *Cervus elaphus*. *J. Zool.* London. 163, 105-123.
- Malo AF, M Gomendio, JJ Garde, B Lang-Lenton, AJ Soler, E Roldan. 2006. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246-249.
- Mann T, C Lutkwak-Mann. 1981. Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, New York. Pp 442-468.
- Mazur P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science* 168, 939-949.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, 125-142.
- Medeiros CM, JJ Parrish. 1996. Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation, *Mol. Reprod. Dev.* 44, 525-532.

- Mirachi RE, PF Scanlon PF, RL Kirkpatrick. 1977. Annual changes in spermatozoa production and associated organs of white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 41, 92-99.
- Mulley RC, NW Moore, AW English. 1988. Successful uterine insemination of fallow deer with fresh and frozen semen. *Theriogenology.* 29, 1149-1153.
- Nelson K, E Crichton, E Doty, D Volenec, R Morato, C Pope, B Dresser, C Brown, D Armstrong, N Loskutoff. 1999. Heterologous end homoplogous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology.* 45, 1038-1041.
- Nolan JP, JK Graham, RH Hammer-Stest. 1992. Artificial induction of exocytosis in bull sperm, *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 311-322.
- Ortega L. 2004. Recolección y congelación de semen en gato doméstico (*Felis catus*). *Memoria de título*, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Ortiz N, A García, L Gallego, J Garde. 1997. Comparison of three extenders for cryopreservation of different quality deer sperm (*Cervus elaphus hispanicus*) obtained postmortem from epididymis. 34th *Annual Meeting of the Society for Cryobiology.* 8-12 de Junio Barcelona, España. Pp 37-42.
- Palomino L, J Camacho, W Huanca, N Falcón. 2001. Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-yema. *Rev Inv Vet Perú.* vol. 12 - n° 1.
- Pace M, E Graham. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39, 1144-1149.
- Parks JE, JK Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222.
- Pintado B, B Perez Llano. 1992. Effect of glutaraldehyde concentration and fixative temperature on the number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen *Theriogenology* 38, 527-533.
- Platz CC, S Magyar, N Crider, M Densmore, G Wiley, MJ Bowen, JW Templeton, DC Kraemer. 1982. Cryopreservation of electroejaculated and epididymal spermatozoa in white tail deer (*Odocoileus virginianus*). *Annu. Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* 127-129.
- Pomerol JM, JL Arrondo. 1994. *Práctica Andrológica.* Barcelona Masson-Salvat, España Pp. 299-318.
- Pursel VG, LA Johnson. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1, 63-68.
- Pursel VG, LA Johnson, GB Ranpacek. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34, 278-283.

- Reyes E, GA 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 (1) 25, 35.
- Reyes E, R Guzman, A Angulo, I Hermosilla, YS Conejeros. 1988. Ciclo de vida y maduréz sexual de *Pudu puda* (Molina) (*Mammalia, Cervidae*). Boletín de Soc. de Biol. De Concepción, Chile 59, 143-150.
- Robbins RK, RG Saacke, PT Chandler. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *J. Anim Sci.* 42, 145-155.
- Roldan ERS, JJ Garde. 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En: Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La conservación de la Biodiversidad en España. M. Gomendio, ed. Fundación BBVA, Madrid, Pp.283-307.
- Rubilar JL. 1999. Evaluación de la fertilidad potencial de semen canino congelado. *Tesi de grado para optar a Licenciado en Medicina Veterinaria*, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Saacke RG, CE Marshall. 1968. Observation on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J. Repr. Fert.* 16, 511-514.
- Salisbury GW, NL Van Demarck, JR Lodge. 1982. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovinos. la. Ed Acribia. España Pp.463-504.
- Simon, Y. 1981. Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial. Perú 1ª Ed., Pp. 139-170.
- Sorensen AM. 1982. Reproducción animal: principios y prácticas. McGraw-Hill. México Pp 288-321.
- Söderquist L, L Janson, K Larsson, S Einarsson. 1991. Sperm morphology and fertility in A.I. Bulls. *J. Vet. Med.* 38, 534-543.
- Spindler RE, DE Wildt. 1999. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cats. *Biol. of Repr.* 61, 188-194.
- Stachecki JJ, KA Ginsburg, RE Leach, DR Armandt. 1993. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J. Androl.* 14, 60-65.
- Stornelli MC, CM Tittarelli, CA Savignone, MA Stornelli. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Universidad Nacional de la Plata, *Analecta Veterinaria* 25, (2), 28-35.

- Strzezek J, A Krzywinski, K Swidowicz. 1985. Seasonal changes in the chemical composition of red deer *Cervus elaphus* semen. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 195–204.
- Talbot P, R Chacon. 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201-208.
- Tamuli MK, PF Watson. 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 247-254.
- Theau-Clément M, N Bencheick, P Mercier, J Bellereaud. 1999. Reproductive Performance of Dose Under Artificial Insemination. Use of Deep Frozen Rabbit Semen. In: Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Association Française de Cuniculture (AFC), Lempdes-France 2, 127–132.
- Tizol G, D Laque, A Cárdenas. 1991. Técnica de eosina-nigrosina para la determinación de reacciones acrosomáticas en espermatozoides vivos. *Rev. Cub. Cient. Vet.*, 22, (2), 73-83.
- 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 (8), 1371-1378.
- UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales) IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species.
- Wahid H, M Yong, Zainal Zahari Zainuddin. 2000. Evaluation of semen collected by electroejaculation from captive lesser malay chevrotain (*Tragulus javanicus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31(2), 164–167.
- Way AL, MA Henault, GJ Killian. 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa, *Theriogenology* 43, 1301-1316.
- Watson PF. 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record* 97, 12-15.
- Watson PF. 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *Journal of thermal biology* 1, 137-141.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. (ed), Oxford University Press, Oxford, Pp 283-350.
- Watson PF, JK Critser, P Mazur. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. In: *Infertility*. A.A.Templeton & J.O. Drife, eds. Springer-Verlag, London, Pp.101-114.

- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Repr. Fert. and dev.* 7, 781-791, 871-891.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 639-658.
- Woelders H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: Boar semen preservation II. Eds.: Johnson, L.A. y Rath, D. Paul Parey *Scientific Publishers*, Berlin and Hamburg. Pp 145-164.
- Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.

8. ANEXOS.

Anexo 1

DILUYENTES

Tris Stock.

Trihidroximetilaminometano	3,2 gr.
Ácido cítrico	1,8 gr.
Fructosa	1,3 gr.
Estreptomicina	0,1 gr.
Penicilina sódica	100.000 UI
Agua purificada	100 ml.

Diluyente de congelación en base a Tris.

Tris stock	4,6 ml
Glicerol	1,4 ml (7%)
Yema de huevo	4 ml (20%)
pH	6,8

Diluyente de congelación Leche SB.

Leche descremada UHT	7,6 ml
Glicerol	1,4ml (7%)
Yema de huevo	1 ml (5%)
Fructosa	0,485 g
Estreptomicina	0,04 g
Penicilina G Sódica	0,03 g
pH	6,5

Las concentraciones usadas corresponden a la mitad de las fabricadas para cada diluyente, ya que se diluirá en partes iguales con semen+diluyente de recolección.

Anexo 2

TINCIONES.

Tinción de Blom:

Eosina (soluble en agua)	1,67 g
Nigrosina (soluble en agua)	10 g
Citrato sódico, 2H ₂ O	2,9 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml.

Se deposita en un porta objetos limpio y desengrasado una parte de la tinción y una parte de semen con las cuales se realiza el frotis. Se deja secar y se observa. Todo el procedimiento debe hacerse sobre platina temperada.

Tinción de Karras.

Técnica de tinción de *galea capitis* con amarillo metacromo y azul de victoria, según Karras (1950) y las indicaciones de Kördel (1959):

a) Preparación del frotis:

Se deposita una gota de semen sobre un portaobjetos (previamente limpiado y desengrasado), en seguida se realiza un frotis con un cubreobjeto de modo que este se mantenga en un ángulo de 45° en relación al portaobjetos. Inmediatamente después de secado a temperatura ambiente, se observa bajo el microscopio de contraste de fases para ver su calidad. Antes de proseguir el trabajo, los frotis deben permanecer a temperatura ambiente por 24 horas protegiéndolos del polvo.

b) Preparación de soluciones madre:

1.- Solución sobresaturada de amarillo metacromo.

Metanol	15 ml.
Solución madre de amarillo metacromo	85 ml .

2.- Solución de azul de victoria al 3% en alcohol metílico.

Agua destilada	80 ml .
Solución madre de azul de victoria	20 ml

Para el mejor éxito de la técnica de tinción es necesario que estas soluciones maduren durante 3 a 4 semanas en una estufa a 37°C. Al momento de usar deben ser filtradas.

3.- Solución de tanino.

Tanino	1 parte.
Agua destilada c.s.p.	19 parte.

c) Tinción del frotis:

- 1.- Fijar sumergiéndolo 2 veces en alcohol metílico. Dejar secar durante 30 min. en forma oblicua.
- 2.- Colocar el frotis horizontalmente y cubrirlo con la solución de amarillo metacromo durante 90 seg.
- 3.- Lavar cuidadosamente con agua hasta que no aparezca amarillo de metacromo en un papel de filtro.
- 4.- Cubrir el frotis con solución de tanino por 60 seg.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Cubrir con azul de victoria por 15 seg.
- 7.- Lavar y dejar escurrir el agua.
- 8.- Poner en forma oblicua y dejar secar al aire. No usar papel de filtro.

Anexo 3

SOLUCIONES PARA PRUEBAS DE EVALUACIÓN.

Solución Hiposmótica.

Citrato Trisódico	1 gr.
Agua purificada	100 ml.
pH	7,6
Osmolaridad	100 mOsm/kg.

Solución Glutaraldehido al 2% en BL-1.

BL-1:

Glucosa monohidratada	2,9 gr.
Citrato Trisódico	1 gr.
Bicarbonato sódico	0,2 gr.
Agua purificada	100 ml.

Glutaraldehido al 2%:

BL-1	92 ml.
Glutaraldehido	8 ml.
pH	7,8

Anexo 4

PROTOCOLO DE ELECTROEYACULAIÓN.

Pulsos de 1segundo					
	1 volt	2 volt	3 volt	4 volt	5 volt
Serie A	10 pulsos	10 pulsos	10 pulsos		
Serie B		10 pulsos	10 pulsos	10 pulsos	
Serie C			10 pulsos	10 pulsos	10 pulsos

Con reposo de 5 segundos cada diez pulsos y 15 seg. entre cada serie.

Anexo 5.

TABLAS DE CORRELACIÓN.

Correlación entre los parámetros de evaluación de semen de pudú en diluyente Tris.

SEMEN FRESCO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1					
mov progres (MP)	0,916	1				
intens mov (IM)	0,564	0,713	1			
vitalidad (V)	0,430	0,444	0,400	1		
endos posit (EP)	0,346	0,417	0,562	0,181	1	
integri acrosoma (IA)	0,618	0,713	0,633	0,649	0,329	1

SEMEN REFRIGERADO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1					
mov progres (MP)	0,574	1				
intens mov (IM)	0,463	0,556	1			
vitalidad (V)	0,379	0,178	0,360	1		
endos posit (EP)	0,015	0,225	0,168	0,360	1	
integri acrosoma (IA)	0,287	0,487	0,512	0,258	-0,138	1

SEMEN CONGELADO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1					
mov progres (MP)	0,581	1				
intens mov (IM)	0,484	0,498	1			
vitalidad (V)	0,432	0,184	0,154	1		
endos posit (EP)	0,471	0,201	0,215	0,591	1	
integri acrosoma (IA)	0,250	0,461	0,509	0,263	-0,036	1

Valores en color azul muestran correlación estadísticamente significativa.

Valores con fondo de color amarillo muestran correlación negativa.

Correlación entre los parámetros de evaluación de semen de pudú en diluyente Leche

SEMEN FRESCO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1	0,932	0,338	0,739	0,558	0,745
mov progres (MP)		1	0,428	0,601	0,555	0,735
intens mov (IM)			1	0,096	0,625	0,556
vitalidad (V)				1	0,570	0,681
endos posit (EP)					1	0,567
integri acrosoma (IA)						1

SEMEN REFRIGERADO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1	0,832	0,558	0,739	0,514	0,818
mov progres (MP)		1	0,565	0,545	0,317	0,786
intens mov (IM)			1	0,318	0,245	0,540
vitalidad (V)				1	0,554	0,623
endos posit (EP)					1	0,303
integri acrosoma (IA)						1

SEMEN CONGELADO	M	MP	IM	V	EP	IA
motilidad (M)	1	0,936	0,586	0,834	0,601	0,679
mov progres (MP)		1	0,626	0,761	0,523	0,757
intens mov (IM)			1	0,361	0,481	0,533
vitalidad (V)				1	0,572	0,621
endos posit (EP)					1	0,432
integri acrosoma (IA)						1

Valores en color azul muestran correlación estadísticamente significativa.

9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas las personas que colaboraron en este trabajo, especialmente a los compañeros que realizaron junto a mí sus Memorias de Título sobre pudú: Oscar Alejandro Aleuy, Angélica Romero, Susan Villa y a todos los voluntarios de CEREFAS. A Guillermo Santibáñez por la ayuda imprescindible y valiosa instrucción que brindó a mi trabajo y sobre todo por la amistad, ¡GRACIAS Tuli!. Al Doctor. Jorge Correa que guió mi aprendizaje con paciencia y sabiduría, virtudes de inestimable valor que me incentivaron constantemente para mejorar mi trabajo. Al Doctor. Renato Gatica por sus incansables deseos de enseñar, a Carmen Schüller y a Jimmy Boggio por las valiosas enseñanzas y por llenar de alegría los momentos de trabajo. A los alumnos de post-grado del Instituto de Reproducción Animal por la paciencia y disposición a compartir conocimientos y experiencias. A Carola y Don Sergio por su eficiencia y buena voluntad. A Silvio Rossi (Senda Romahue, Puerto. Varas) que proporcionó los animales por el período de duración del experimento.

Agradezco a quienes hicieron posibles mis estudios en Valdivia, mis padres Lavinia y Gonzalo por el apoyo incondicional, por darme las directrices que han guiado mi camino, por escuchar mis opiniones y respetar mis decisiones. A mis hermanos Marcos, Ismael y Elías, por llenar de amor mi vida. A Lucía Díaz (alias “Pia, Pato”), por el apoyo, confianza y alegría.

También quiero expresar mis agradecimientos a todos mis muy queridos amigos, que nunca han dejado de estar presentes aún cuando la distancia nos separe, y a aquellos que formaron una verdadera familia junto a mí en Valdivia y que me acompañaran siempre, gracias de todo corazón por compartir sus vidas conmigo.

Este trabajo se realizó gracias al subsidio del Proyecto DID/UACH S-200732. Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies amenazadas: Estudio preliminar de manipulación de semen y COCs de pudú (*Pudu pudu*). Y al Proyecto FIA/UACH PI-C-2004-1-P-047. Convenios Desarrollo Tecnológico. Centro tecnológico de reproducción de ovinos de alta calidad.