Universidad Nacional de Loja

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TÍTULO:

"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis Familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN"

Tesis de grado previa a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista

Autora:

Mary Carmen Cañar Maza

Directora:

Dra. Laura Peña M

Loja - Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN

Dra. Laura Peña Merino
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN"** realizado por la señorita egresada **Mary Carmen Cañar Maza,** previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, ha sido dirigido y prolijamente revisado durante su ejecución, por lo tanto se autoriza su presentación para la calificación correspondiente.

Loja, Enero del 2015

Dra. Laura Peña Merino
DIRECTORA DE TESIS

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN

Tesis presentada al tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de:

Médico Veterinario Zootecnista

APROBADA:

DR. TITO MUÑOZ GUARNIZO MG.SC. .....
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

DRA. PATRICIA AYORA FERNÁNDEZ .....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DR. HERMÓGENES CHAMBA MG.SC. .....
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo, Mary Carmen Cañar Maza, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Mary Carmen Cañar Maza

Firma: .....

Cédula: 0704445055

Fecha: Loja, 20 de Enero del 2015

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, **Mary Carmen Cañar Maza,** declaro ser la autora de la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN",** como requisito para optar al grado de Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera para el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para la constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veinte días del mes de Enero del dos mil quince, firma la autora.

Firma: .....

Autora: **Mary Carmen Cañar Maza**
Número de Cédula: **0704445055**
Dirección: **Ciudad de Loja** Correo Electrónico: valeriacer_90@hotmail.com
Teléfono: 2563362 Celular: 0990243668
Directora de tesis: Dra. Laura Peña Merino
DATOS COMPLEMENTARIOS:
Tribunal de grado: Dr. Tito Muñoz Mg.Sc., Dra. Patricia Ayora, Dr. Hermógenes Chamba Mg.Sc.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Loja en especial a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a sus docentes por los conocimientos que me impartieron en los diferentes módulos.

Al Dr. Lenin Aguirre Riofrío por haberme ayudado con el tema y formulación del anteproyecto de la presente tesis.

A la Dra. Laura Peña Merino Directora de la Tesis por su ayuda, constante interés y supervisión a lo largo de toda la investigación.

A los Responsables del Laboratorio de Reproducción Animal Dr. Rómulo Chávez Valdivieso Ph D, Dr. Manuel Quezada y Dra. Melania Lourdes Uchuari.

Al Dr. Rosendo Ludeña Técnico del Hospital Docente Veterinario “César Augusto Guerrero”.

A mi familia porque ha sido mi motivación y soporte para la culminación de mí tesis y logro de todos mis objetivos trazados.

Mary Cañar

DEDICATORIA

A mi Dios por haberme dado la fuerza para poder cumplir con uno más de los objetivos que tengo en mi vida.

A mi familia en especial a mi madre quien con su amor, apoyo y entereza permitieron ver culminada mi carrera profesional.

Mary Cañar

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
PRESENTACIÓN		i
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS		ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO		iii
AUTORÍA		iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN		v
AGRADECIMIENTO		vi
DEDICATORIA		vii
ÍNDICE GENERAL		viii
ÍNDICE DE CUADROS		xii
ÍNDICE DE FIGURAS		xiii
RESUMEN		xiv
SUMMARY		xv
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA	3
2.1.1.	Pubertad	3
2.1.2.	Hormonas	3
2.1.3.	Espermatogénesis	5
2.1.4.	Espermatocitogénesis	5
2.1.5.	Espermiogénesis	6
2.1.6.	Espermiación	8
2.1.7.	Transporte del Semen	9
2.2.	CARACTERÍSTICAS SEMINALES	9
2.2.1.	Semen y Plasma Seminal	9
2.2.2.	Producción Espermática	9

2.2.3. Morfología del Espermatozoide Canino 10
2.2.4. Características Normales del Semen Canino 11
2.2.5. Eyaculación 14
2.3. COLECTA DE SEMEN 15
2.3.1. Técnica Manual 15
2.3.2. Condones de Plástico 18
2.3.3. Cono de Látex 19
2.3.4. Vagina Artificial 20
2.3.5. Electroeyaculación 22
2.3.6. Recogida Seminal Utilizando Fármacos 22
2.3.7. Obtención de Semen del Epidídimo 23
2.3.7.1. Métodos de recuperación de espermatozoides 23
2.3.7.2. Medios para la recuperación de espermatozoides 24
2.3.8. Motivos de Fracaso de una Muestra de Semen 24
2.3.9. Frecuencia de Recogida 25
2.3.10. Factores que Influyen sobre las Características Seminales 25
2.3.10.1. Individuo y raza 25
2.3.10.2. Ritmo de recogida 26
2.3.10.3. Estado de ánimo y ambiente 26
2.3.10.4. Edad 27
2.3.10.5. Neutrófilos y macrófagos 27
2.3.10.6. Eritrocitos 27
2.3.10.7. Temperatura 28
2.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL 28
2.4.1. Evaluación Macroscópica 28
2.4.1.1. Volumen 29
2.4.1.2. Color 29
2.4.1.3. Olor 30
2.4.1.4. pH 30
2.4.1.5. Aspecto 31
2.4.2. Evaluación Microscópica 32
2.4.2.1. Motilidad individual 32

2.4.2.2. Motilidad masal 34
2.4.2.3. Concentración 34
2.4.2.4. Morfología 35
2.4.2.5. Viabilidad 44
2.4.3. Evaluación Espermatozoides Epididimarios 46
2.4.4. Factores que Afectan las Características del Semen 48
2.4.4.1. Pubertad 48
2.4.4.2. Frecuencia de la eyaculación 48
2.4.4.3. Tamaño y patología de la próstata 48
2.4.4.4. Tamaño testicular 48
2.5. CONSERVACIÓN DEL SEMEN 49
2.5.1. Antecedentes 49
2.5.2. Situación actual del proceso de refrigeración y congelación 49
2.5.3. Métodos de conservación 51
2.5.3.1. Semen fresco 51
2.5.3.2. Semen refrigerado 51
2.5.3.3. Semen congelado 52
2.5.4. Diluyentes 53
2.5.4.1. Composición de los diluyentes 53
2.5.5. Dilutores de Semen Canino 54
2.5.5.1. Tris 54
2.5.5.2. Ácido cítrico 55
2.5.5.3. Yema de huevo 55
2.5.5.4. Adición de azucares 57
2.5.5.5. Adición de aminoácidos 57
2.5.5.6. Diluyente CaniPRO 58
2.5.5.7. Diluyente CaniPlus Chill 59
2.5.6. Impacto de la Refrigeración en la Estructura y Función Espermáticas 61
2.6. COLORANTES 63
2.6.1. Eosina G, Solución al 2% para Tinción Supravital, 50ml 63
2.6.2. Nigrosina, Solución al 4 % para Tinción Supravital, 50 ml 63

2.7. TRABAJOS RELACIONADOS 64
3. MATERIALES Y MÉTODOS 66
3.1. MATERIALES 66
3.1.1. De Campo 66
3.1.2. De Laboratorio 66
3.1.3. De Oficina 67
3.2. MÉTODOS 68
3.2.1. Delimitación del Área de Estudio 68
3.2.2. Descripción de las Unidades Experimentales 68
3.2.3. Descripción de los Grupos Experimentales 69
3.2.4. Descripción de los Tratamientos 70
3.2.5. Procedimiento de la Extracción del Semen 71
3.2.5.1. Colecta manual del semen 71
3.2.5.2. Recuperación del material seminal del epidídimo 72
3.2.6. Evaluación Seminal 73
3.2.6.1. Evaluación macroscópica 73
3.2.6.2. Evaluación microscópica 74
3.2.7. Procesamiento del Semen 76
3.2.7.1. Adición de diluyente CaniPlus Chill 76
3.2.7.2. Adición de diluyente CaniPRO 76
3.2.8. Evaluación Post Refrigeración 77
3.2.9. Análisis Estadístico 78
4. RESULTADOS 79
5. DISCUSIÓN 87
6. CONCLUSIONES 93
7. RECOMENDACIONES 94
8. BIBLIOGRAFÍA 95
9. ANEXOS 101

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Pág.
Cuadro 1.	Valores normales del eyaculado canino	13
Cuadro 2.	Características meteorológicas del lugar de estudio	68
Cuadro 3.	Identificación de perros para colecta manual	69
Cuadro 4.	Identificación de perros para castración	69
Cuadro 5.	Conformación de los grupos experimentales	70
Cuadro 6.	Distribución de los perros en grupos	70
Cuadro 7.	Volumen de diluyente CaniPlus Chill a añadir	76
Cuadro 8.	Volumen de diluyente CaniPRO a añadir	77
Cuadro 9.	Horas de evaluación post refrigerado	78
Cuadro 10.	Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante colecta manual	79
Cuadro 11.	Resultados de la evaluación microscópica del semen por colecta manual	80
Cuadro 12.	Resultados de la evaluación de semen obtenido mediante epidídimos post castración	80
Cuadro 13.	Resultados estadísticos de las características microscópicas en fresco	81
Cuadro 14.	Resultados de la evaluación del porcentaje de motilidad individual post refrigeración	82
Cuadro 15.	Promedios del % motilidad individual a distintos tiempos post refrigeración	83
Cuadro 16.	Resultados estadísticos de los porcentajes de motilidad individual en los tratamientos	84
Cuadro 17.	Porcentaje de motilidad individual por factor fuente de colecta	85
Cuadro 18.	Porcentaje de motilidad individual por factor diluyente	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA **Pág.**

Figura 1. Regulación hormonal de la función reproductora masculina 4
Figura 2. Espermatogonias en la membrana basal 6
Figura 3. Espermiogénesis 7
Figura 4. Proceso de espermatogénesis 8
Figura 5. Morfología del espermatozoide 11
Figura 6. Colecta manual usando recipiente plástico 15
Figura 7. Materiales para colecta de semen 17
Figura 8. Técnica extracción de semen 18
Figura 9. Colecta manual con embudo 18
Figura 10. Extracción de semen con condón de plástico 19
Figura 11. Materiales para la extracción con cono de látex 20
Figura 12. Cono de látex 20
Figura 13. Extracción 20
Figura 14. Electroeyaculador 24
Figura 15. Tiras reactivas de pH 31
Figura 16. Tinción 37
Figura 17. Espermatozoide con forma teratoide 40
Figura 18. Cola doble, múltiple, accesoria 41
Figura 19. Gota citoplasmática distal 42
Figura 20. Extensión de una gota de semen con colorante 45
Figura 21. Diluyente CaniPRO 59
Figura 22. Diluyente CaniPlus Chill 61
Figura 23. Alteraciones inducidas por el choque térmico 62
Figura 24. Colorante Eosina 63
Figura 25. Colorante Nigrosina 64
Figura 26. Porcentajes de motilidad individual cada 24 horas 83

“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN”

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar el semen canino refrigerado obtenido mediante colecta manual y epidídimos post castración determinando los efectos del tiempo de almacenamiento, fuente de colecta y diluyentes usados sobre él % de motilidad individual. Se utilizaron 16 perros en edad reproductiva de diferentes razas y se dividieron en cuatro grupos, el primer y segundo grupo estuvieron conformados por semen de epidídimos post castración con el diluyente CaniPRO más yema de huevo y CaniPlus Chill respectivamente; el tercer y cuarto grupo quedaron conformados por semen obtenido mediante colecta manual con el diluyente CaniPlus Chill y CaniPRO más yema de huevo respectivamente. La evaluación de la calidad seminal se realizó en fresco y cada 24 horas post refrigeración la información recopilada en las diferentes variables se analizó mediante estadística descriptiva, para el análisis de varianza se utilizó un diseño al azar y prueba de Duncan para establecer la diferencia estadística entre promedios. A las 24 horas post refrigeración existe diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos. A medida que transcurrió el tiempo la motilidad individual disminuyó gradualmente, observándose los valores mayores en el tratamiento cuatro. Por otro lado, los efectos de la fuente de colecta fueron significativos siendo mejor la colecta manual; los efectos del diluyente no fueron estadísticamente significativos ($p>0,05$) a las 24, 48 y 72 horas de refrigeración, a las 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 264 horas existe diferencia estadística significativa siendo mejor el CaniPRO más yema de huevo.

SUMMARY

The purpose of this researching was to evaluate the refrigerated manual collected canine semen and epididymis post castration determining the effects of the storage time, collection source, and diluents used over the percentage of individual motility. There were used 16 dogs in a reproductive age of different breeds and were divided in four groups, the first and second group were made up of semen of epididymis post castration with the diluent CaniPRO plus yolk and CaniPlus Chill respectively; the third and fourth group were made up of manual collected semen with the diluent CaniPlus Chill y CaniPRO plus yolk respectively. The seminal quality evaluation was made in fresh and every 24 hours post cooling the information collected in the different variables was analyzed through descriptive statistics, a random design was used for the variance analysis and also the Duncan test to establish the statistic difference between averages. At the 24 hours post cooling exist a significant statistic difference between the different treatments. As time passed the individual motility gradually declined, observing the highest values in the fourth treatment. On the other hand, the effects of the collection source were significant being the best the manual collect; the effects of the diluent were not statistically significant ($p>0,05$) at 24, 48, 72 cooling hours, at 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 and 264 hours exist significant statistic difference being the best CaniPRO plus yolk.

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de líquido seminal se realiza mediante el método manual y electroeyaculador. Otra forma de rescatar espermatozoides es del epidídimo constituyéndose en una técnica alternativa de rescatar el germoplasma de animales que les ha ocurrido accidentes, intoxicaciones o enfermedades que súbitamente pueden desencadenar en la orquiectomía. En estos casos, los propietarios no sólo deben afrontar la pérdida del animal, sino también la pérdida del material genético deseable. En ese sentido, es posible obtener espermatozoides hasta cierto tiempo después de la muerte del animal, los cuales son recuperados de la cola del epidídimo con una viabilidad y capacidad fecundante.

El análisis del semen es necesario para confirmar la espermatogénesis normal en un perro joven antes de comenzar a usarlo como semental, como parte de un programa de inseminación artificial, en casos de infertilidad, para comprobar la producción de semen tras una enfermedad o terapia con fármacos, y para investigar el efecto de la enfermedad prostática sobre la calidad del semen. El semen de baja calidad se relaciona no solo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de bajo número de cachorros (Keuerk, 2013).

Ha sido ampliamente demostrado que la composición de los diluyentes utilizados en los procesos de conservación de semen canino, puede afectar el tiempo de almacenamiento y la calidad de los espermatozoides (Sirivaidyapong et al., 2000).

Entre las ventajas del semen refrigerado tenemos que es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra, el semen no necesita un manejo complejo, la inseminación puede ser vaginal, al igual que se realiza con el semen fresco. El uso de este tipo de

semen, se está haciendo muy popular entre los criadores, debido a su fácil manejo, su bajo costo y su facilidad para el transporte, la limitante es el escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas (CRIOCEL, 2002).

En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Aplicar técnicas biotecnológicas reproductivas con la finalidad de obtener y conservar el material seminal de perros (*Canis familiaris*).
- Evaluar la calidad del semen proveniente de colecta in vivo y del epidídimo.
- Analizar la calidad del semen refrigerado a distintos tiempos.
- Evaluar la calidad del semen con dos medios de conservación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA

2.1.1. Pubertad

La pubertad se alcanza en aproximadamente 9 meses, aunque este valor varía de acuerdo al tamaño y raza del ejemplar. La pubertad se describe como el momento en el cual el macho tiene la capacidad de copular, presenta espermatozoides en el semen y son claras las características sexuales secundarias. Por otra parte la madurez sexual se alcanza 4 – 5 meses después de la pubertad (Arango y Rendón, 2009).

Según Ochoa y Torres (2012), la pubertad aparece comúnmente en el perro entre los 6 y 18 meses de edad y es más temprana en razas pequeñas que en grandes. La pubertad abarca los cambios morfológicos, fisiológicos y en el comportamiento que sufren los caninos, ya que se inicia la actividad gonadal.

2.1.2. Hormonas

El funcionamiento reproductivo del macho está regulado por el eje hipotálamo, hipófisis, gónadas. A nivel de estas últimas se produce la testosterona que es la hormona responsable de la espermatogénesis, el desarrollo del aparato reproductor y el comportamiento del macho. La FSH posee receptores a nivel de las células de Sertoli induciendo la expresión de la proteína ligadora de andrógenos, que aumenta la concentración de estos en los túbulos seminíferos y en el epidídimo. También, la FSH induce la producción de activina o inhibina, a nivel de las células ya mencionadas, las cuales como su nombre lo indica inhiben o activan la liberación de la misma.

La eyaculación es regida por el sistema simpático que envía impulsos nerviosos a través del nervio hipogástrico (Arango y Rendón, 2009).

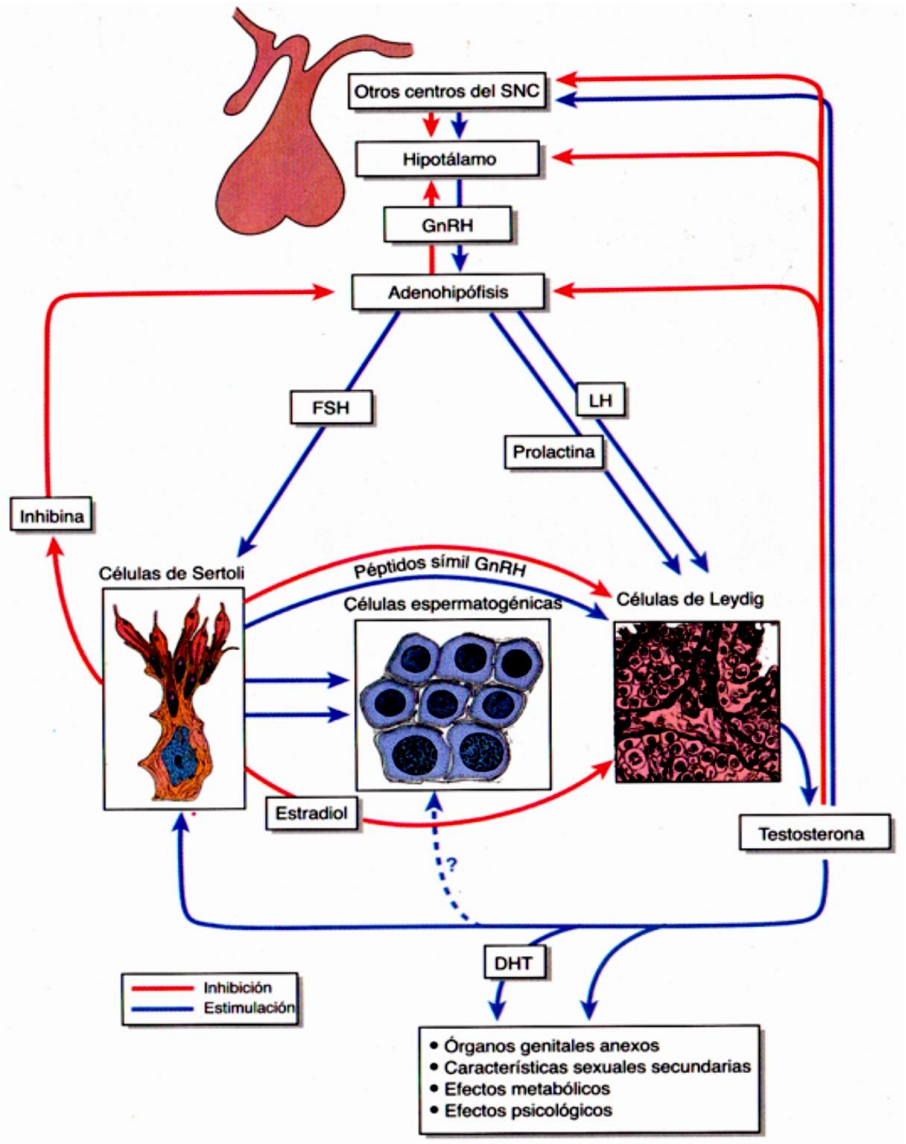

Figura 1. Regulación hormonal de la función reproductora masculina (Piñero, 2009)

Las hormonas hipofisarias que actúan sobre las células de Leydig y Sertoli, y el control mediante retroalimentación (feedback) de las hormonas gonadales desde la hipófisis y el hipotálamo. Si los niveles de testosterona en sangre periférica aumentan (bien como resultado del aumento en su producción por los testículos, bien por administración exógena) ejerce una retroalimentación negativa sobre hipotálamo e hipófisis suprimiendo la liberación de GnRH y

LH. Como consecuencia las células de Leydig producen menos testosterona y la concentración de esta hormona en los túbulos seminíferos cae. La FSH actúa directamente sobre las células de Sertoli; estas secretan 2 hormonas: inhibina, que actúa sobre la adenohipófisis suprimiendo selectivamente la liberación de FSH en respuesta a la GnRH, y activina que estimula la liberación de FSH. Las células de Sertoli también secretan una proteína ligadora de andrógenos (PLA) (Altamirano y Pereira, 2011).

2.1.3. Espermatogénesis

La gametogénesis comienza en el estadio fetal donde las células primordiales se diferencian en gonocitos que sufrirán procesos de mitosis tanto durante la vida fetal como en la prepuberal; a este nivel, es cuando se diferenciarán en espermatogonias, momento en el cual se detiene el desarrollo de las células germinales a nivel de los túbulos seminíferos, hasta que comience la pubertad.

El proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos comienza aproximadamente a los 4 meses de edad y dura unas 8 semanas, si bien, la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado no se define hasta los 10-12 meses de edad. No obstante, hay autores que definen que las células de Leydig no completan su maduración hasta los 5 meses, pudiendo encontrar espermatozoides en los túbulos seminíferos sobre los 6-7 meses de edad.

2.1.3.1. Espermatocitogénesis

Representa la primera fase de la espermatogénesis y consiste en la producción cíclica de espermatocitos primarios. Aparte de las células en división, hay presente una reserva de espermatogonias en estado de latencia. Está descrito que en la especie canina, cada espermatogonia es capaz de producir un total de 64-96 espermatozoides (Alamo, 2007).

Las células germinales espermatogonias se dividen en tres subtipos: la tipo A, intermedias y la tipo B (Arango y Rendón, 2009).

Estas espermatogonias, que son las células precursoras de los espermatozoides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y sufren procesos de mitosis para generar los espermatocitos primarios que, posteriormente, sufrirán procesos de meiosis para dar lugar a los espermatocitos secundarios.

Finalmente, los espermatocitos secundarios se convertirán en espermátidas esféricas que ya contienen la mitad de cromosomas.

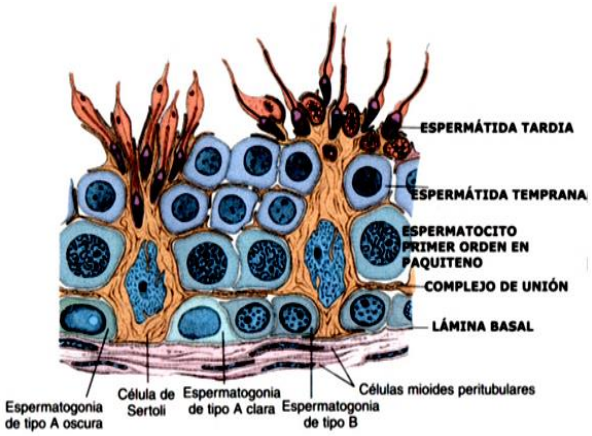

Figura 2. Espermatogonias en la membrana basal (Piñero, 2009)

2.1.3.2. Espermiogénesis

En esta fase, las espermátidas esféricas se transforman en espermátidas maduras que serán liberadas al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides. Para que ocurra la transformación es necesario que ocurra un complejo reagrupamiento de los orgánulos de la espermátidas maduras que darán lugar a los espermatozoides.

Básicamente, el núcleo pasa a ser la cabeza, el aparato de Golgi generaría

el acrosoma y por último, las mitocondrias y los centriolos darán lugar al desarrollo de la cola.

Fases:

a) Fase de Golgi, formación del gránulo acrosomico asociado a la membrana nuclear de la fusión de aparto de Golgi y retículo endoplasmatico.

b) Fase del Capuchón, crecimiento del capuchón acrosomico, el centríolo y el cuerpo de la cromatina migra hacia el polo posterior y se inicia la formación del flagelo.

c) Fase del acrosoma, transformaciones morfológicas drásticas, condensación, elongación y cambios de forma.

d) Fase de maduración, las espermátidas completan su diferenciación, formación del flagelo, cuello o pieza media (Mellisho, 2008).

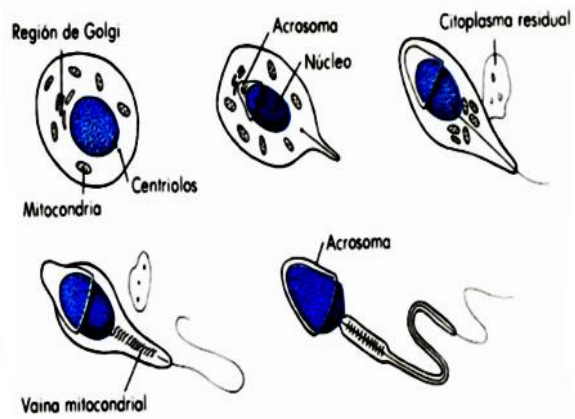

Figura 3. Espermiogénesis (Piñero, 2009)

2.1.3.3. Espermiación

Esta fase simplemente consiste en la liberación de los espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Alamo, 2007).

Según Armas (2009) en los caninos, la espermatogénesis tiene una duración de 8 a 9 semanas, La duración del ciclo del epitelio seminífero en los caninos es de 13,8 días en promedio, siendo dividido en 8 fases o estadios. El tránsito de los espermatozoides a lo largo del epidídimo es de 14 días en promedio (Taha et al., 1981; Martins, 2005). Olar et al. (1983), sostienen que la producción diaria de espermatozoides en el perro está entre los 11,7 y 16,7 millones de espermatozoides por gramo de parénquima testicular. Los mismos autores sugieren que la frecuencia de eyaculación no afecta la producción diaria de espermatozoides, pero puede reducir las reservas ubicadas en la cola del epidídimo y el conducto deferente en hasta 26% después de 6 a 8 colectas de semen a la semana. Mientras que Melgarejo (2013) comenta que la espermatogénesis tiene una duración de 54 días.

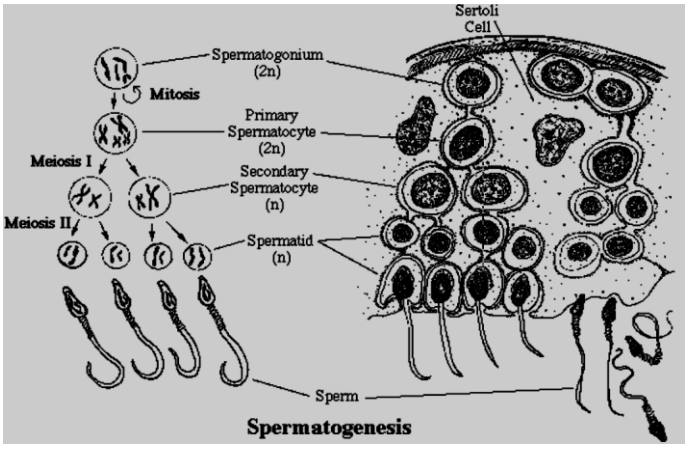

Figura 4. Proceso de espermatogénesis (Melgarejo, 2013)

2.1.4. Transporte del Semen

A su llegada a la cabeza del epidídimo los espermatozoides son inmaduros y símbolo de ello es la gota citoplasmática residual que presentan en el cuello. La maduración ocurre durante el avance a través del cuerpo y la cola del epidídimo. No está claro cómo se produce este avance, parece ser que está propiciado posiblemente por la constante producción de espermatozoides por parte del testículo, aunque otros autores sostienen que es resultado del peristaltismo existente a lo largo del epidídimo. La maduración es un proceso que dura unas 2 semanas, incluidas dentro de las 8 semanas que dura la espermatogénesis. En el momento en que el espermatozoide penetra en el conducto deferente, la gota citoplasmática se desplaza hacia el extremo distal de la pieza intermedia o bien es expulsada considerándose en este momento al espermatozoide como maduro (Alamo, 2007).

2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES

2.2.1. Semen y Plasma Seminal

Es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la formación de dicha suspensión que se forma durante la eyaculación se conoce como plasma seminal (Altamirano y Pereira, 2011).

2.2.2. Producción Espermática

La producción de espermatozoides está directamente correlacionada con la masa testicular, y esta a su vez con el tamaño del animal, por lo tanto la producción de espermatozoides es superior en perros de mayor tamaño. Además, el volumen total del eyaculado también se correlaciona positivamente con el tamaño del animal. El volumen testicular se puede determinar mediante ecografía utilizando la siguiente fórmula:

longitud x altura x ancho x 0,71.

2.2.3. Morfología del Espermatozoide Canino

Según Alamo (2007) se han realizado una serie de estudios para establecer las medidas de los espermatozoides caninos. Así, se obtuvieron como valores medios (± sem) los siguientes: longitud total, 68 ± 0.3 µm; longitud de la cabeza, 7 ± 0 µm; ancho de la cabeza, 5 ± 0.1 µm; longitud de la pieza intermedia, 11 ± 0.2 µm; y la longitud de la cola, 50 ± 0.3 µm. Mientras que Armas (2009) manifiesta que el espermatozoide canino maduro, tiene una longitud total de 61.4 ± 0.3 µm, la longitud de la cabeza es de 6.1 ± 0.04 µm y un ancho de 3.8 ± 0.2 µm, la pieza o segmento medio mide 10.1 ± 0.7 µm y la cola mide alrededor de las 50 µm.

Básicamente, es una célula alargada cubierta enteramente por la membrana plasmática y conformada por una cabeza y una cola que contiene el motor celular necesario para la motilidad espermática. La cabeza, como característica principal, posee un núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (DNA) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas y va a contener un número cromosómico haploide, esto es, la mitad de cromosomas que existe en el núcleo de las células somáticas de la misma especie.

Sobre la cabeza se encuentra el acrosoma, que es una estructura que se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide, tiene forma de casquete y contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas necesarias para el proceso de fecundación del ovocito (Armas, 2009).

Inmediatamente por detrás del acrosoma se encuentra la región post-acrosómica; la misma es fundamental para la fecundación porque es en esta

área donde el espermatozoide se une y se fusiona con el oocito. La cola espermática está formada por el cuello y las piezas media, principal y caudal.

El centro del segmento medio junto con toda la longitud de la cola, comprenden al axonema. El axonema, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales rodeados a su vez por nueve fibras gruesas o densas las cuales están cubiertas de manera periférica por numerosas mitocondrias.

La vaina mitocondrial es la fuente de energía necesaria que permite el desplazamiento hacia delante y atrás de los microtúbulos del interior de la cola, produciéndose de esta manera la motilidad espermática. La membrana plasmática, que cubre enteramente a la célula espermática, toma forma de una bicapa lipídica desplegada con fosfolípidos y proteínas asociadas (Armas, 2009).

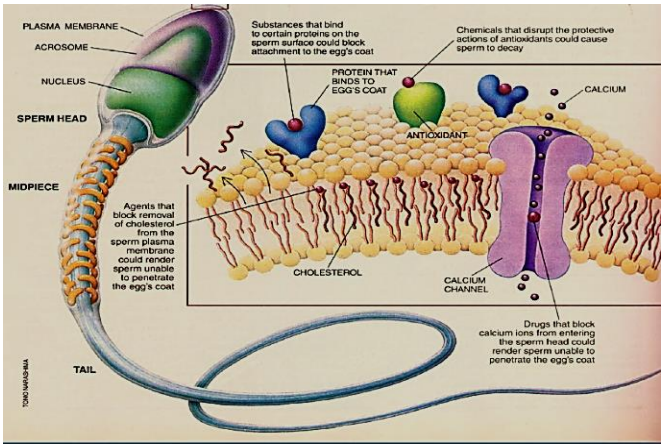

Figura 5. Morfología del espermatozoide (FAUBA, 2008)

2.2.4. Características Normales del Semen Canino

El semen canino está compuesto por dos partes: una parte celular conformada por los espermatozoides y una parte líquida llamado plasma seminal. La principal función del plasma seminal es servir como medio de

transporte y sustentación para los espermatozoides; y, es el producto de los tejidos accesorios sexuales, como el epidídimo, el conducto deferente y la próstata, en respuesta a la testosterona.

Muchos estudios han cuestionado su importancia en el proceso de fecundación, ya que, en algunas especies, los espermatozoides del epidídimo son capaces de fecundar el ovocito, sin ningún contacto con el producto de secreción de la próstata, pero las secreciones pueden proporcionar condiciones favorables a la motilidad espermática, sobrevivencia y transporte de los espermatozoides, tanto en el tracto reproductor del macho, como en el de la hembra.

El volumen del eyaculado puede variar de 1 a 40 ml. La concentración normal de espermatozoides en un canino adulto es de 200 millones/ml hasta 1000 millones/ml, siendo las razas de mayor tamaño las que alcanzan los mayores valores. Se debe de considerar que la concentración de espermatozoides en una colección depende de la cantidad de líquido prostático recogido.

Los valores normales de motilidad progresiva son de 75 a 80%, donde al menos un 75% de los espermatozoides deben ser normales en cuanto a su morfología. El pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende en gran parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido al colectar (Armas, 2009).

En 1933 empieza a estudiarse el pH del semen canino, llegándose a la conclusión que el valor dentro del cual se facilita la motilidad espermática es de 6.4 a 8.5. Los análisis bioquímicos del semen canino han revelado que contiene cantidades considerables de electrolitos como el cloro, potasio, magnesio y calcio, los cuales incrementan la motilidad espermática. Sin embargo, cuando estos electrolitos se utilizan juntos para la elaboración de diluyentes, el efecto no es tan bueno como cuando se usan por separado.

El semen también contiene sodio el cual se encuentra en mayor proporción con respecto al potasio en el plasma seminal. Debido a que el perro carece de vesículas seminales el eyaculado tiene bajas concentraciones de fructosa, por lo que la adición de glucosa puede ayudar a la supervivencia espermática. Contiene lípidos, carbohidratos y enzimas como la catalasa, peroxidasa, fenolasa, monobutirasa, tripsina, antitripsina, amilasa, fosfatasa alcalina y ácida, tromboplastina, fibrinogenasa y fibrinolisina.

Según Alamo (2007) en general, los valores totales de un eyaculado normal en perro (valores medios) serían de un volumen entre 4-25 ml, una osmolaridad de 320mOsm y un pH de 6.5-6.6.

Cuadro 1. Valores normales del eyaculado canino

	Fracción I	**Fracción II**	**Fracción III**	**Eyaculado completo**
Volumen (ml)	0.5-5	1-4	1-80	2.5->80
Color	Transparente, acuoso	Blanco, nacarado	Transparente, acuoso	Blanco
Concentración (10^6/ml)		4-400		4-400
Espermatozoides totales por eyaculado (10^6/ml)		300-2000		300-2000
Motilidad progresiva %		>70		>70
Formas normales %		>80		>80
pH			6,3 – 6,7	6,3 – 6,7

Fuente: Altamirano y Pereira, 2011

Se han llevado a cabo estudios en las diferentes razas y se determinó que en razas de talla pequeña como el Chihuahueño, el volumen es de 1.5 a 5.0 ml; en perros de talla mediana como el Pastor Alemán, el rango es de 4 a 10 ml; en animales de talla gigante como el Lobero Irlandés, es de 20 a 48 ml; lo importante del volumen es que éste se encuentre dentro de los rangos permitidos para la raza (Cuadra, 2012).

2.2.5. Eyaculación

El eyaculado del perro está constituido por 3 fracciones bien diferenciadas:

La primera fracción es transparente, de consistencia acuosa, proviene de la próstata, no contiene espermatozoides y su emisión dura de 30 a 50 segundos. Representa el 2-3% del volumen total, es llamada “fracción pre espermática”. Cumpliendo una función profiláctica al despejar la uretra de posibles elementos indeseables, su pH varía entre 6.2 a 6.5 y su volumen entre 2.4 ± 1.8 ml. Según Boucher y Cols, el volumen es de 0.8 ml con un rango de 0.25 a 2.80 ml para la primera, para Freiberg el volumen de la primera fracción es de 0.25 a 2.0 ml (Esquivel, 2013).

La segunda fracción tiene un color que varía entre gris y blanco lechoso y su consistencia es más viscosa que la primera; proviene del epidídimo y contiene a los espermatozoides; su emisión tiene una duración de 50 a 80 segundos. Constituye del 6-7% del volumen total, es la “fracción espermática”. Su volumen varía según el tamaño y la raza (Arango y Rendón, 2009).

Es de volumen variable de entre 1 a 4 ml (Altamirano y Pereira, 2011). Su pH varía entre 6.3 a 6.6 y su volumen medio entre 0.5 a 3.5 ml. Según Boucher y Cols, el volumen es de 0.6 ml con un rango de 0.40 a 2.0 ml, para Freiberg el volumen de 0.5 a 4.0 ml (Esquivel, 2013).

La tercera fracción proviene de la próstata y es de color transparente, de consistencia acuosa, luego de la fracción espermática comienzan movimientos pulsátiles de la uretra. Esta fracción no contiene espermatozoides, es la más abundante y su emisión tiene una duración promedio de 3 a 30 minutos. Del volumen total eyaculado, ocupa el 90%. Se llama “fracción prostática”. (Ochoa y Torres, 2012) es la de mayor volumen de 1 a 80 ml (Altamirano y Pereira, 2011).

Su liberación se produce una vez que está formado el “nudo” (Arango y Rendón, 2009).

Su pH 7 oscila entre 6.5 y 7.0, el volumen es directamente proporcional a la actividad secretora de la glándula prostática y su media es de 6.48 ± 4.32 ml. Se considera que facilita la ascensión de los espermatozoides en su camino al útero. Según Boucher y Cols, el volumen 4 ml con rango de 1.10 a 16.30 ml, para Freiberg el volumen de 3 a 25 ml para la tercera.

Muchos autores difieren en cuanto a los valores normales de concentración, volumen, características químicas etc., ya que estos pueden variar según la raza del perro, condición propia del animal, época del año en que se trabaja al animal, cuando el macho se trabaja en presencia de una hembra en celo (Ochoa y Torres, 2012).

2.3. COLECTA DE SEMEN

2.3.1. Técnica Manual

Figura 6. Colecta manual usando recipiente plástico (Angulo, 2011)

Se necesita de un lugar tranquilo y sin distracciones, evitando al máximo la presencia de personas que resulten extrañas para los perros y alteren su

actitud. Además, lo ideal es realizar la colección de la muestra seminal, en un lugar cercano a donde se llevará a cabo el procedimiento tanto de evaluación como de procesamiento (Ochoa y Torres, 2012).

La manipulación manual es el método más comúnmente empleado para recoger muestras de semen, porque en general es fácil, barata, no afecta la calidad y la cantidad del eyaculado, es indolora, inocua y no es estresante para el animal (Altamirano y Pereira, 2011).

Antes de la colección de semen se debe tener presente cuando se hizo la última colección o cuando se realizó la última monta, ya que esto puede alterar los resultados de la evaluación de semen (FCM, 2010).

Cuando se va a colectar semen, el material debe estar listo, estéril y a la mano. Como primer paso y antes de iniciar la colecta del semen, el animal debe ser higienizado en su región abdominal y prepucial con abundante agua. Posteriormente, se debe secar el área con el fin de evitar la contaminación y alteración de la muestra seminal a evaluar y/o preservar. Siendo adecuado en perros de pelo largo cortar el pelo de la región (Cuadra, 2012).

Esta práctica se puede ser facilitada estimulando el macho con un hisopo vaginal impregnado de secreciones vulvares de hembras en celo o con la aplicación de feromonas sintéticas (metil-p-hidrobenzoato) que para mejorar el estímulo suele aplicarse en la región perineal de una hembra estimuladora (No en celo); e incluso de un macho castrado y, si fuese posible, se les impregna la cola con secreciones de una hembra en celo. Sin embargo, en algunos casos con el simple masaje prepucial puede ser suficiente para la eyaculación (Buriticá et al, 2009).

Figura 7. Materiales para colecta de semen (MINITUBE, 2013)

Para dicha técnica se requiere que el animal se encuentre lo más tranquilo posible y de preferencia en compañía de su propietario (Ojeda y Gutiérrez, 2007). Sobre un piso no resbaladizo (Cuadra, 2012).

El operario se debe ubicar a un lado del reproductor sujetando firmemente el pene con toda la palma de la mano, para facilitar un mejor manejo y masturbación del canino. Se debe iniciar con un masaje prepucial suave, con el fin de estimular el bulbo del pene. Antes de que ocurra la erección total, se debe retraer el pene hacia atrás, debido al dolor que ocasionaría la presión que ejerce el bulbo peneano contra el prepucio, lo que impediría la erección total y la posterior eyaculación. Después de retirar el prepucio, se realiza una presión sostenida en la parte caudal del bulbo, para posteriormente fijar el condón o el tetero y colectar la muestra seminal, la cual deberá ser preservada en oscuridad a una temperatura de 37 ºC (Buriticá et al, 2009).

Finalizada la recolección manual, se debe proteger el pene de lesiones hasta que pierda la erección (Bonilla y Ballesteros, 2007).

El eyaculado total compromete un volumen que puede oscilar entre los 20 y 50 cm^3 dependiendo de la actividad sexual del reproductor. El fluido prostático generalmente no se colecta cuando se va a conservar como

semen refrigerado o congelado, debido a que aporta poca concentración espermática, mientras que si puede ser utilizado cuando la inseminación es realizada con semen fresco, cumpliendo las características de ser claro, transparente y de no mostrar signos de patología. Esta última fracción es importante ya que sirve como medio protector de semen y aumenta su volumen. Al finalizar la toma de la muestra se debe tener especial cuidado en la reintroducción del pene en el prepucio (Buriticá et al, 2009).

Figura 8. Técnica extracción de semen (Páramo, 2009)

Figura 9. Colecta manual con embudo (FCM, 2010)

2.3.2. Condones de Plástico

No necesita un tubo colector graduado, a veces precisa de lubricante. El condón se ubica sobre el bulbo del pene para conseguir una tensión grande,

provoca así la eyaculación. Una vez recogida la muestra, se recorta el extremo inferior, se absorbe con jeringa (evitando rozar con el caucho) o pipeta y se la pasa a un tubo de ensayo temperado a 37°C (Ochoa y Torres, 2012).

Facilita la colección porque simula la penetración del pene en la vagina, además tiene fijo un tubo colector en su porción final, lo cual es una ventaja porque evita la pérdida del semen cuando el animal se mueve mucho, es decir, el cono y el tubo se mueven junto con el perro. Otra ventaja es que el pene se mantiene húmedo por no estar en contacto con el aire, lo que ocurre cuando se utiliza el embudo de vidrio, teniendo que lubricar el pene posteriormente a la eyaculación para evitar problemas como la parafimosis.

Algunos autores consideran que el empleo de lubricantes en el cono para colectar semen afecta la motilidad espermática y argumentan que el contacto del espermatozoide con la superficie del látex ocasiona su inmovilización, sin embargo, esto no ha sido totalmente comprobado.

Figura 10. Extracción de semen con condón de plástico (Buriticá et al, 2009)

2.3.3. Cono de látex

Es una variante de la técnica anterior, pero en la que solamente se utiliza un embudo o cono de látex al que se encuentra unido un tubo colector

graduado a 37 ºC cubierto de una envoltura protectora. El cono se sitúa justo encima del bulbo del pene para conseguir una compresión enérgica y provocar así la eyaculación. Este método dificulta la separación de las tres fracciones del eyaculado y, además, el látex puede ser tóxico para los espermatozoides. Se recomienda su uso para animales principiantes o inexpertos, donde las fracciones son difícilmente identificadas, porque es más relajante para el animal (Ochoa y Torres, 2012).

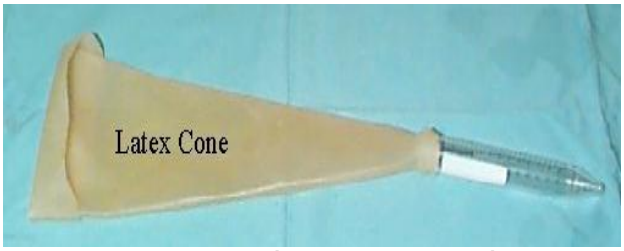

Figura 11. Materiales para la extracción con cono de látex (Ochoa y Torres, 2012)

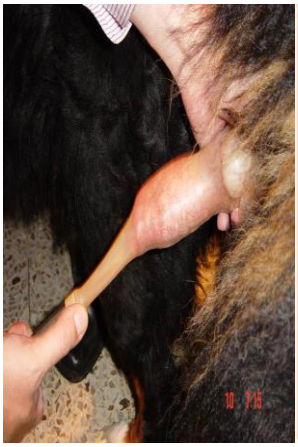

Figura 12. Cono de látex (Esquivel, 2013) **Figura 13**. Extracción (Páramo, 2009)

2.3.4. Vagina Artificial

En 1954 Harrop desarrolla la primera vagina artificial para perros (Ochoa y Torres, 2012).

Esta vagina tiene un espacio para ser llenado con agua y es operada mediante una bomba de mano que proporciona estímulos pulsátiles dando como resultado la eyaculación. (Altamirano y Pereira, 2011).

Está formada por un cilindro rígido de 15 cm de longitud, que está rodeado por una manga de caucho en donde se coloca agua a 40 º C a través de una válvula. En un extremo del cilindro se ubica un embudo también de caucho, el mismo que se encuentra unido a un tubo colector graduado a 37º C de temperatura (Ochoa y Torres, 2012).

El tubo colector graduado se va cambiando conforme se van recogiendo las diferentes fracciones del eyaculado. En la especie canina hay estudios que han demostrado que la cantidad y la calidad del semen recogido mediante estimulación manual es mucho mejor (Alamo, 2007).

La técnica consiste en introducir el pene en la vagina artificial cuando sobrepase el 50% de erección, cuando se haya exteriorizado el bulbo, situando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la misma hasta conseguir la eyaculación.

Ventajas

- ✓ No depende de la presencia de una hembra para estimular al macho.
- ✓ Logra una mejor excitación.

Desventajas

- ✓ No es recomendable económicamente.
- ✓ Se puede provocar laceraciones e infecciones al retirar el pene,
- ✓ Se pueden producir quemaduras en el pene por el agua caliente.
- ✓ Hay estudios que han demostrado que la cantidad y calidad del semen es menor a la que se obtiene a través de la estimulación manual y es más difícil aplicarla.
- ✓ El contacto prolongado del semen con el látex resulta tóxico y puede provocar su completa inmovilidad (Ochoa y torres, 2012).

2.3.5. Electroeyaculación

El electroeyaculador fue inventado por Tinte en 1938. Esta técnica solo se usa con fines de investigación, o para trabajar con canideos de zoológico, ya que es muy traumática, es necesario anestesiar al animal y la calidad del eyaculado es baja. La técnica consiste en la aplicación de estímulos eléctricos (corriente alterna de 30 volts) por medio de un dispositivo (electroeyaculador), en un polo del aparato se conecta a una pieza metálica aproximadamente del grosor de un lápiz y de 10 cm de longitud, esta porción se introduce en el recto del animal justo encima de las glándulas accesorias para estimular a los nervios que controlan el sistema reproductivo, el otro polo es una pinza que se fija a la pared de los sacos anales. La operación dura 1 minuto, durante el cual se aplican los estímulos eléctricos en forma intermitente durante 1 a 3 segundos con períodos de descanso de 7 a 9 segundos, el volumen del eyaculado varía entre 0.5 y 0.8 ml (Esquivel, 2013).

Figura 14. Electroeyaculador (MINITUBE, 2013)

2.3.6. Recogida Seminal Utilizando Fármacos

Si bien se ha comprobado que el uso combinado de xilacina e imipramina es capaz de generar una recogida seminal, presenta el inconveniente de ser

una eyaculación de tipo pasivo por lo que gran cantidad de espermatozoides pasan a la vejiga urinaria y cuando se eyaculan están muertos, probablemente porque las muestras se contaminan con la orina.

2.3.7. Obtención del Semen del Epidídimo

2.3.7.1. Métodos de recuperación de espermatozoides

La primera dificultad en la utilización de los espermatozoides epididimarios es la obtención de los mismos. Muchos métodos de recuperación son descritos los cuales varían dependiendo del tamaño del órgano. En el caso de pequeños animales, el método de preferencia (fluctuación) consiste en cortar la cola del epidídimo y dejar reposar en un medio de recolección, de esta manera, los espermatozoides migraran hacia el medio y serán recuperados; una técnica similar consiste en hacer numerosos cortes en la cola del epidídimo, presionando suavemente y coger los espermatozoides por extravasamiento.

Otros métodos son realizados utilizando una aguja para perforar los túbulos o promoviendo un flujo retrógrado en la cola del epidídimo aplicando presión en los vasos deferentes hasta que el contenido salga a través de un corte realizado en la unión con el cuerpo del epidídimo; la presión puede ser generada con una jeringa, que inyecta aire o algún líquido no perjudicial para los espermatozoides como algún tipo de dilutor. Martínez et al. (2006) demostraron que la colección de espermatozoides de la cola del epidídimo a través del flujo retrogrado es la técnica más indicada, pues las muestras obtenidas son menos contaminadas y de mejor calidad seminal en relación a los otros métodos; sin embargo, posee la limitación de ser generalmente usada para grandes animales debido al tamaño del epidídimo y ser más compleja que las otras técnicas.

2.3.7.2. Medios para la recuperación de espermatozoides

Existen diversos medios utilizados para la recuperación de espermatozoides epididimarios caninos y los cuales han demostrado ser eficientes. Entre los más importantes se encuentran: solución salina fisiológica, medio de capacitación canina, fluido prostático, el cual fue previamente recolectado de otros caninos, centrifugado y almacenando el sobrenadante a -40ºC, y solución Tris-fructosa citrato. Aunque poco utilizadas, también se han recuperado espermatozoides epididimarios utilizando solución de Ringer sin lactato y solución de Hartmann (Solución Ringer y lactato de sodio) (Armas, 2009).

2.3.8. Motivos de Fracaso de una Muestra de Semen

Los motivos más frecuentes incluyen una técnica deficiente de recolección, un macho con nerviosismo o agitación inusual interferencia por parte del propietario y anomalías en el macho. Los errores comunes en la técnica incluyen falta de exposición del grande, momento inadecuado de exposición del pene, fuerza o presión excesivo sobre el pene, uso de dispositivos de recolección fríos y contacto con el pene, con la práctica es posible resolver la mayor parte de estos problemas técnicos.

Otro problema técnico frecuente de fracaso es colocar al perro en un ambiente no familiar, como el hospital veterinario. No es raro que los machos no muestren interés sexual, incluso ante una perra en estro, cuando se acaba de colocar en un ambiente atemorizante. Dejar al perro en un ambiente nuevo durante unas cuantas horas a menudo alivia el temor.

Cuando se intenta colectar una muestra de semen, es necesario evitar todas las distracciones posibles. Solo deben encontrarse en el cuarto las personas absolutamente necesarias para la recolección. Hay que evitar aglomeraciones, la plática excesiva, las risas, las fotografías con flash.

Deben estar presentes los propietarios del macho. No es raro que este se rehusé a participar si no está presente una persona conocida. Algunos machos solo pueden ser objeto de recolección por sus propietarios, unos cuantos solo en casa y un pequeño número no pueden ser objeto de recolección hasta que su propietario sale del cuarto.

El libido escaso, dolor (orquitis o prostatitis aguda, artritis degenerativa) o anomalías conductuales adquiridas por una experiencia sexual negativa previa, puede afectar el proceso de recolección de la muestra de semen (Arango y Rendón, 2009).

2.3.9. Frecuencia de Recogida

No hay unanimidad a la hora de establecer unos patrones de recogida seminal en el perro. Hay autores que realizan recogidas de 3-4 eyaculados totales/ perro a la semana con una distribución de 2-3 recogidas semanales. Sin embargo, en otros trabajos se defiende que es posible mantener una frecuencia de recogida de 2 eyaculados/perro cada 2 días, sin que se observe un marcado descenso de la calidad seminal.

La mayoría de los autores recomiendan utilizar sólo el primer eyaculado, tanto para inseminar como para la refrigeración y/o la congelación seminal. Sin embargo, hay estudios en los que se trabaja con los dos eyaculados, con un intervalo de tiempo de 45-75 minutos entre el primer y el segundo eyaculado, sin observar un descenso evidente de la calidad seminal (Alamo, 2007).

2.3.10. Factores que Influyen sobre las Características Seminales

2.3.10.1. Individuo y raza

Hay autores que han conseguido demostrar una aparente relación entre la

raza y la calidad del segundo eyaculado. En el Pastor Alemán se obtiene un mayor volumen seminal y una mayor concentración total cuando se realiza una segunda recogida, en comparación con otras razas.

Sin embargo, el resto de los parámetros no se ven afectados y la motilidad y la concentración/ml presentan valores inferiores a otras razas. Asimismo, las reservas espermáticas del epidídimo están influidas por el tamaño del animal.

2.3.10.2. Ritmo de recogida

Está perfectamente demostrado que una recogida seminal diaria produce una reducción de las reservas espermáticas en pocos días. Este fenómeno se incrementa si se realizan dos recogidas diarias. En cambio, se ha comprobado que si se obtienen dos eyaculados con escaso margen de tiempo entre recogidas, la motilidad total de la muestra es mayor que la motilidad de cada uno de los eyaculados por separado.

Finalmente, otros estudios evidencian que si se realizan recogidas de semen cada 2 días, no ocurre una reducción significativa de las reservas espermáticas, en cuanto al periodo de abstinencia, si es muy largo, puede generarse un envejecimiento delas reservas espermáticas, que se terminan excretando con el semen o la orina.
Existen dos teorías sobre cuál es el destino de los espermatozoides no eyaculados; en una se defiende que sufren un proceso de destrucción por parte de los espermiófagos presentes en el propio testículo y en el epidídimo para luego ser reabsorbidos; en la segunda se afirma que los espermatozoides se depositan en la uretra y se eliminan por la orina.

2.3.10.3. Estado de ánimo y ambiente

En la especie canina, se ha demostrado que el miedo y el pánico a

determinadas situaciones y ambientes impiden que se produzca una erección completa y por consiguiente que se pueda producir la eyaculación. Asimismo, los ejemplares excesivamente juguetones, tanto con la hembra en celo como con todas las personas presentes en el momento de la recogida, suelen presentar una incapacidad para conseguir que se produzca la erección.

2.3.10.4. Edad

En algunos trabajos se ha comprobado que la calidad seminal en animales menores de 6 meses no es muy buena, describiendo que la motilidad, morfología y la concentración mejoran a partir de esa edad. Asimismo, otros autores afirman que la pubertad en la especie canina se alcanza a los 9 meses, siendo a partir de esta edad cuando la calidad seminales mejor.

Por otro lado, hay estudios donde se ha determinado que la concentración seminal es peor en animales mayores de 4 años, siendo este efecto más marcado a partir de los 5 años; sin embargo, no parece que el resto de parámetros seminales sufra alteración alguna.

2.3.10.5. Neutrófilos y macrófagos

Son originarios de la flora de la pared del pene y el prepucio, aunque en ocasiones pueden provenir de la próstata. Los macrófagos, pueden adherirse a los espermatozoides, mientras que los neutrófilos no afectan a la movilidad de la muestra.

2.3.10.6. Eritrocitos

Se presentan con frecuencia en el eyaculado de machos mayores a 5 años, proceden de la próstata e indican que hay enfermedad. Puede deberse a traumas accidentales que ocurren durante la monta natural o la recogida

manual y que se encuentren afectando al pene o al prepucio.

Se presentan generalmente en la primera recogida, cuando el animal es muy joven. La presencia de un 2% (v/v) de sangre en el semen que va a ser congelado, afecta negativamente a la motilidad y al estado del acrosoma.

2.3.10.7. Temperatura

El espermatozoide es una célula altamente sensible a cambios de temperatura y la exposición a la luz, se debe extremar sus precauciones para evitar la muerte espermática por un mal manejo de la muestra (Ochoa y Torres, 2012).

2.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

El análisis del líquido seminal se inicia evaluando sus características macroscópicas, tal como el color, olor, aspecto y volumen. Posteriormente, se evalúan las características microscópicas como, motilidad masal e individual, morfología, concentración espermática y conteo de espermatozoides vivos y muertos (Buriticá et al, 2009).

Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en inseminación artificial (Mellisho, 2010).

Una vez recolectado, el semen debe mantenerse a una temperatura constante. (Altamirano y Pereira, 2011).

2.4.1. Evaluación Macroscópica

Esta evaluación incluye todas las características que puedan ser observadas a simple vista, estas son:

2.4.1.1. Volumen

Para evaluar el volumen el semen debe ser colectado en un tubo graduado, este valor se necesita para calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado y varía dependiendo de factores como la edad, tamaño del perro, frecuencia de colección, cantidad colectada de líquido prostático, época del año, etc., obteniéndose un volumen de 1 hasta 40 ml por eyaculado y no está relacionado con la fertilidad del animal (Altamirano y Pereira, 2011). Aguilar et al. (1994), citaron un valor de 5.98 ± 2.3 ml para eyaculado total de caninos de hasta 20 Kg (Armas, 2009).

Los valores medios para un perro de raza mediana serían de 1-2 ml para la primera fracción, la segunda presentaría de 1-2 ml y finalmente unos 4-8 ml para la tercera (Alamo, 2007).

2.4.1.2. Color

El semen es de color blanco lechoso, tendiendo a la opacidad. La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un color anormal determina la no utilización del semen con fines reproductivos (Ochoa y Torres, 2012).

Según Buriticá et al, (2009) La muestra de semen idealmente debe ser clara; sin embargo, el color puede ser translúcido o blanco cremoso en el caso de existir una muy baja o muy alta concentración espermática respectivamente. Mientras que Armas, (2009) comenta que el color del eyaculado canino puede variar de blanco opalescente a opaco.

Las muestras de color rojo y con olor a hierro, indican una hemospermia (sangre en el semen), (Buriticá et al, 2009), mientras que Armas, (2009) comenta que este color se debe a heridas ocurridas en el pene erecto o de proceso patológicos de la glándula prostática o colores verdosos son

indicadores de presencia de pus. Buriticá et al, (2009) indica que el color amarillo indica la presencia de orina y partículas blancas pueden ser indicativas de la presencia de leucocitos (Altamirano y Pereira, 2011).

Según Armas, (2009) un semen claro e incoloro sugiere azoospermia. Mientras que Cuadra, (2012) el color normal es "blanco nacarado" la tonalidad varía de un semental a otro; esto depende del tipo de alimentación.

2.4.1.3. Olor

Para su evaluación, acercamos el tubo colector a la nariz (Ochoa y Torres, 2012).

Procede de las glándulas prepuciales, saco prepucial y sacos anales, en general podemos decir que en este punto se busca que no presente olor pútrido, ácido, urinoso (amoniacal), etc. teniendo un olor característico de la especie (Altamirano y Pereira, 2011).

2.4.1.4. pH

Para su evaluación se utilizan tiras reactivas de pH, se colocan unas gotas de semen en ellas, se espera y se lee el resultado. El rango de pH va desde 6,3 a 8,4. Está determinado por el fluido prostático (Ochoa y Torres, 2012).

Según Altamirano y Pereira (2011) debe medirse inmediatamente y debe determinarse empleando un método muy preciso. El pH normal del semen canino se encuentra en un rango de 6.3 a 7.

El pH del líquido seminal, el cual usualmente varía de 6,0 a 7,4 en animales sanos, tiene una gran importancia para reconocer la necesidad de instaurar tratamientos antimicrobianos, ya que los valores que tienden a la alcalinidad mayor al límite superior, suelen asociarse a estados infecciosos. Los niveles

de fosfatasa alcalina seminal en un canino adulto normal oscilan entre las4000 – 5000 UI/L. El epidídimo canino es la principal fuente de la fosfatasa alcalina seminal. En consecuencia, la enzima puede emplearse como indicador de la presencia de líquido epididimario en el eyaculado. Si este se encuentra en bajas concentraciones o está ausente la eyaculación fue incompleta o evidencia la obstrucción bilateral del epidídimo o del conducto deferente (Buriticá et al, 2009).

Según Armas (2009) el pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido el cual tiene un pH promedio de 6.8. Se cree que la naturaleza alcalina del líquido prostático favorece el aumento de la motilidad espermática y la neutralización del ambiente ácido de la cúpula vaginal durante la cópula. Mientras que Cuadra (2012) comenta que el ph deberá estar dentro de los rangos de 6.5 a 7.

Figura 15. Tiras reactivas de pH (FMC, 2010)

2.4.1.5. Aspecto

Lechoso da una idea de la concentración de esperma (Cuadra, 2012).

2.4.2. Evaluación Microscópica

2.4.2.1. Motilidad individual

Es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizarlo y deberá evaluarse a 37°C. El portaobjetos y el cubreobjetos deben estar a temperatura corporal (37°C) para este procedimiento, ya que la exposición a temperaturas más frías que la corporal tiene un impacto en la motilidad observada, la motilidad en el portaobjetos se reduce significativamente tras 1-2 minutos en un microscopio de luz. Para valorar la motilidad, se coloca una gota de semen en un portaobjetos y la examina a 100 X – 200X aumentos. Hay que evaluar la velocidad y dirección del movimiento de los espermatozoides (Altamirano y Pereira, 2011).

Puede clasificarse de acuerdo al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva como: muy buena (80–100%), buena (60–79%), regular (40-59%) y pobre (<40%) (Buriticá et al, 2009).

Una disminución en la velocidad y en la proporción de células móviles progresivas refleja lesiones celulares que pueden reducir las posibilidades de fecundación (Andrade, 2005).

La motilidad del espermatozoide es incrementada por el potasio, magnesio y calcio. Las vitaminas presentes en el plasma seminal son ácido ascórbico, inositol que ayuda en la regulación de la presión osmótica y trazas de vitaminas del complejo B. Entre las bases nitrogenadas se encuentran la ergotionina, base reductora que contiene azufre y cuyo papel podría ser el proteger de los metales pesados a los grupos sulfhídricos de los espermatozoides, ya que estos metales producen una disminución de la motilidad.

Para evaluar la motilidad se debe observar inmediatamente después de la recolección, esto para observar los espermatozoides aun cuando la temperatura de su medio es aceptable para su sobrevivencia (ideal que su platina esté atemperada porque si no es así, se reduce el tiempo para valorar puesto que son muy sensibles al choque térmico).

Un descenso rápido de la temperatura puede originar una alteración mediante “choque por frío” de los espermatozoides; sin embargo, esto es poco frecuente en el semen del perro por ser relativamente resistente al choque. Los espermatozoides que se mueven describiendo círculos presentan anomalías en la cola. Los espermatozoides pueden verse agrupados unos a otros y con otras células (células epiteliales o macrófagos); se desconoce la importancia de este hecho en el perro aunque a no ser que afecte a la totalidad de la muestra no es probablemente un síntoma con pronóstico malo.

La motilidad descenderá según pase el tiempo de permanencia del portaobjetos en el microscopio (posiblemente debido al efecto de la luz y el enfriamiento). El semen canino normal es viable durante 20 a 30 minutos a temperatura. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva puede ser alterado por la exposición del semen a extremos térmicos, diluyentes ácidos, agua, orina, pus, sangre o exceso de lubricantes (Bonilla y Ballesteros, 2007).

En muestras muy concentradas es recomendable realizar una dilución del semen en suero salino o un tampón de TRIS-fructosa. Se considera que un valor por debajo del 80% de motilidad en semen fresco sería indicativo de una reducción de la fertilidad. No obstante, la mayoría de los autores considera que un semen presenta una buena motilidad cuando presenta valores entre 70-90%. Cuando el semen ha sido sometido a un procedimiento de refrigeración, se considera que la motilidad puede oscilar entre 20-80%, aunque en otros trabajos se obtienen valores del 79-93%.

Como norma general, se acepta que la motilidad seminal post-refrigeración es aceptable cuando alcanza valores del 60-70% (Alamo, 2007).

2.4.2.2. Motilidad masal

Es una prueba simple que se realiza al semen puro, resulta de importancia debido a que la motilidad espermática es indispensable para la fecundación natural.

La muestra para estimar la motilidad masal espermática debe ser preparada colocando una gota (15 µl) de semen en una lámina porta-objeto limpia a temperatura de 37^0C, usando una platina caliente puesta sobre el microscopio a un aumento de 40 a 100x. El análisis se realiza con un estimado subjetivo de motilidad basándose en el vigor de las “ondas” y su actividad se cuantifica en grados en una escala de 0 a 5. Hay que considerar que la evaluación de estos movimientos ondulantes en el conjunto de espermatozoides requiere de la experiencia del observador al no ser tan evidentes como los movimientos observados en la evaluación espermática bovina, debido a que la concentración espermática en esta segunda especie es mucho mayor (Buriticá et al, 2009).

Para considerase de buena calidad, el movimiento ondulatorio tiene 4 categorías; Muy bueno (Torbellino intenso con ondas oscuras y claras); Bueno (onda en torbellino más lentas, no tan intensas); Regular (movimiento lento con menos ondas); Malo (muy poca actividad en torbellino o ninguna). La motilidad circular o de reversa es con frecuencia signo de choque frío o de un medio que no es isotónico con el semen (Cuadra, 2012).

2.4.2.3. Concentración espermática

La concentración es el número de espermatozoides por ml de semen. El número de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la

concentración por el volumen total colectado. La concentración puede variar dependiendo de la edad, raza, estado fisiológico, sanitarios, tamaño testicular, actividad sexual, época del año y ritmo de recogida.

En una pipeta se hará la dilución de solución salina al 2.9 % 1:100, después se llenara la cámara Neubauer y se contabiliza los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. La cámara Neubauer tiene 2 cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se dividen entre dos para sacar el promedio y el resultado (número de espermatozoides) se multiplica por 5 x 10^6 según el factor de dilución (1:100 es por 5 x 10^6), obteniéndose así la concentración espermática por ml de eyaculado. Se multiplicara la concentración obtenida en cada ml, por el volumen colectado; dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado.

En un eyaculado normal existen en promedio de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro y por lo menos 100 millones son necesarios para gestar una perra, siempre y cuando se insemine con semen fresco. Cuando el semen es congelado la concentración espermática debe ser mayor debido a la muerte de espermatozoides ocasionada por los procesos de congelamiento y descongelamiento (Altamirano y Pereira, 2011).

Es una las pruebas de análisis seminal más importante. Existe variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar. La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen. Entre estos métodos destaca la espectrofotometría, colorimetría, citometría de flujo y uso de cámara de recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thoma (Mellisho, 2010).

Se ha estimado que la cantidad de espermatozoides esperada por milímetro

cubico de eyaculado para la especie canina está entre los 200 y 800 x 10^6 dependiendo el peso del animal (Buriticá et al, 2009).

Según Cuadra (2012) la concentración de espermatozoides es de 100 – 500 x 10^6/ml; en razas gigantes pudiendo llegar cerca de los dos billones, para una inseminación se necesita 200 millones de espermatozoides. El diluyente de la fracción seminal utilizada debe detener el movimiento y prevenir el agrupamiento de las células; se trabaja con una solución de suero fisiológico formulado con cloruro de sodio 9 gr; formaldehido al 40% (3ml); y agua destilada (1000ml).

En el perro hay descritos valores de concentración que oscilan entre 300-2000 x 10^6 espermatozoides/ml (esp/ml), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10^6 esp/ml. Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000 x 10^6 esp/ml. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco sería de 100 x 10^6 esp/ml.

La observación de una baja concentración espermática puede deberse a una eyaculación incompleta generada frecuentemente por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos. También se puede observar este descenso en la concentración espermática en aquellos individuos tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos; esta situación suele tener carácter transitorio, volviendo el eyaculado a la normalidad 2 meses tras la supresión del tratamiento. Asimismo, se debe tener en cuenta que valores bajos de concentración se deben en muchas ocasiones a que se recoge un excesivo volumen de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal. Además, también es posible observar una disminución de la concentración cuando la eyaculación es incompleta.

Es posible también que se presente una baja concentración espermática en aquellos individuos que hayan desarrollado una aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes o que algunas estructuras testiculares se hayan fibrosado como consecuencia de traumatismos o infecciones. Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal (dermatitis, heridas, infecciones) también genera un descenso de la concentración del eyaculado así como la presencia de inflamaciones como orquitis o epididimitis. Otras posibles causas son la presencia de anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc. (Alamo, 2007).

2.4.2.4. Morfología

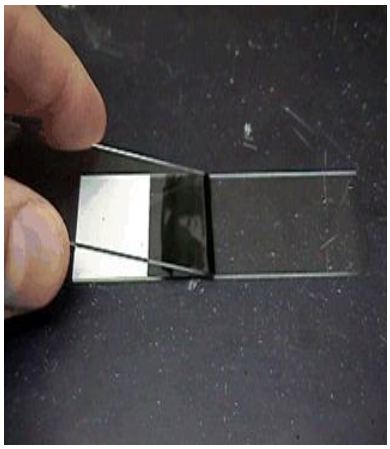

Figura 16. Tinción (Ochoa y Torres, 2012)

La forma de los espermatozoides es una característica importante porque afecta a la motilidad. Esto se hace tomando una gota de semen, a la que se le agrega una gota de eosina - nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4 campos distintos, las anormalidades del espermatozoide se clasifican en primarias y secundarias conforme al sitio donde se localiza el defecto. En tanto Wanke María manifiesta -“la proporción de espermatozoides con defectos primarios y secundarios no debe exceder el 30 – 40%”-; mientras Esquivel cita que “un perro normal

debe tener un 80% de espermatozoides normales y un máximo de 20% de espermatozoides anormales" (Altamirano y Pereira, 2011).

Puede darse el caso que un mismo espermatozoide presente varias anormalidades, caso en el cual se procederá contando cada una por separado y el espermatozoide como una sola célula (Buriticá et al, 2009).

La metodología generalmente utilizada para la evaluación de la morfología espermática es la coloración de frotis de semen. Los colorantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac®, Giemsa, Hematoxilina-eosina y eosina-nigrosina son comúnmente utilizados. Después de la coloración, los frotis deben ser evaluados en microscopio mediante inmersión en aceite.

Se deben contabilizar y clasificar un mínimo de 200 espermatozoides; los machos normales suelen tener más del 70% de espermatozoides con morfología normal, las anormalidades primarias deben constituir menos del 10% y las secundarias menos del 20% de los espermatozoides defectuosos en el perro normal. Oettlé (1993) relató que a medida que aumenta el porcentaje de espermatozoides anormales, la fertilidad es reducida, observando que cuando la proporción de espermatozoides morfológicamente normales se encontraba por debajo del 60%, la fertilidad se encontraba adversamente afectada (Armas, 2009).

Las causas que pueden provocar la aparición de morfoanomalías son el estrés asociado a inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de LH y testosterona o alteraciones iatrogénicas. Es frecuente el uso combinado de tinciones para valorar la vitalidad, con colorantes que permitan diferenciar el estado del acrosoma, como por ejemplo el uso combinado de Trypan blue y Giemsa o Trypan blue, Bismarck brown y Rosa de Bengala, consiguiendo así valorar tanto la vitalidad, como las morfoanomalías y las acrosomías. En el caso concreto de las acrosomías, es posible el uso del Spermac®, pero

no es posible establecer diferencias entre células vivas y muertas.

Por otro lado, mediante el uso de tinciones fluorescentes es posible realizar la valoración de la integridad de membrana. En el caso de la gota citoplasmática proximal se ha visto que en la especie canina afecta a la fertilidad; sin embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece tener efecto sobre la fertilidad en el perro (Alamo, 2007).

Las morfo anomalías se clasifican en:

- ✓ Primarias: aparecen como consecuencia de una alteración de la espermatogénesis (malformaciones de la cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo), porcentaje normal 10-15%.

- ✓ Secundarias: debidas a un fallo en la espermiogénesis o a una inadecuada manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). Porcentaje normal 10-20%.

- ✓ Por manejo: en este grupo se encuentran todas las alteraciones que se producen en el momento de recolección del semen, tinciones, manipulación de la muestra, etc.

a) Características anormales de los espermatozoides

- ✓ **Cabezas piriformes y angostas**

Presentan la zona post-acrosomal más estrecha, siendo evidentes anormales.

- ✓ **Micro y macrocefalia**

Están ocasionados por una distribución desigual de los cromosomas durante la meiosis y generalmente la mayoría de las células mueren o son fagocitadas por las células de Sertoli antes de llegar al estadio de espermátide.

- ✓ **Formas teratoides**

Los espermatozoides con estos defectos tienen una condensación de ADN anormal, un núcleo pequeño y deforme y la pieza principal está alrededor del núcleo.

Figura 17. Espermatozoide con forma teratoide (Domínguez, 2013)

- ✓ **Defectos del acrosoma**

El acrosoma se encuentra aumentado de tamaño generalmente conteniendo un quiste y un cuerpo de inclusión que se pliega en la región apical de la cabeza del espermatozoide.

- ✓ **Cabezas sueltas**

Se pueden hallar espermatozoides decapitados en un pequeño número en el semen normal. Cuando se encuentran en mayor cantidad, están asociados con defectos en la termorregulación del testículo y por un defecto en la espermiogénesis.

- ✓ **Pieza media distal plegada**

Suele combinarse con pieza principal doblada. Estos defectos se producen en la cola del epidídimo o en los últimos pasos de la espematogénesis.

- ✓ **Colas abaxiales, accesorias y múltiples**

Las colas accesorias están generalmente presentes junto con las abaxiales y las dobles. Estos defectos se producen cuando se forma más de un cilio a partir de una replicación de los centriolos.

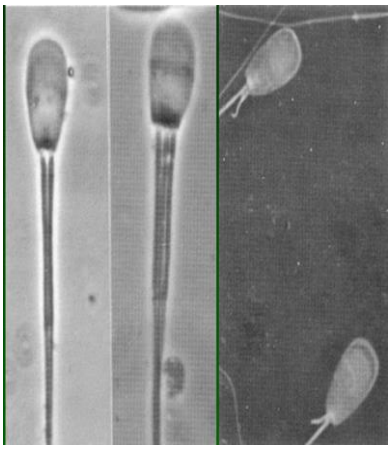

Figura 18. Cola doble, múltiple, accesoria (Domínguez, 2013)

- ✓ **Pieza principal doblada**

La pieza principal se encuentra doblada, en forma de rulo o espiral.

- ✓ **Pieza intermedia arqueada**

Tienen forma de arco iris o de “U”. Este defecto es generalmente producido por la tinción.

- ✓ **Gota citoplasmática proximal**

Casi todos los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una gota citoplasmática proximal. Luego, a medida que van descendiendo hacia la cola del mismo, la gota se va desplazando distalmente, al menos en el 90 % de los casos. Una alta incidencia de gotas proximales se puede ver en animales que aún no han atravesado en forma completa el período de la pubertad. En ejemplares adultos, las gotas proximales en el eyaculado son indicio de disturbios en la función epididimaria o testicular.

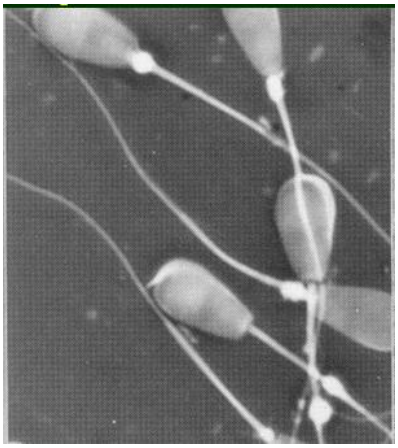

Figura 19. Gota citoplasmática distal (Domínguez, 2013)

b) Otras alteraciones

- ✓ **Aspermia**

Si no hay eyaculación, puede deberse a:

- ✓ Falta de eyaculación debido a un déficit neurológico o de libido.
- ✓ Falta u obstrucción de la secreción de líquido prostático de modo que la fracción espermática no es transportada al exterior.
- ✓ Falta de secreción de líquido prostático y una pequeña porción de fracción pre-espermática y espermática que no son detectadas ni recogidas. Debe realizarse un nuevo intento de recolección de semen 6 o más horas más tarde.

- ✓ **Azoospermia**

Es la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, debida a que:

- ✓ Los testículos no están produciendo espermatozoides.
- ✓ Los espermatozoides se producen pero hay una obstrucción en el epidídimo.
- ✓ Obtención de un eyaculado incompleto.

- ✓ **Leucospermia**

Leucocitos en el eyaculado. Requiere consideraciones acerca de infecciones bacterianas de la próstata, testículo o epidídimo.

- ✓ **Teratospermia**

Cuando hay demasiadas anormalidades morfológicas. Los perros normales deberían tener un 80% o más de espermatozoides morfológicamente normales. Puede ser causada por tumores testiculares, orquitis, fiebre, prostatitis, abstinencia o sobre-utilización, y obesidad.

- ✓ **Astenospermia**

Es la ausencia de motilidad espermática. Causada por un equipo de

recolección contaminado y el síndrome de cilio inmóvil. Los residuos de la fabricación del látex y una serie de lubricantes solubles en agua pueden disminuir la movilidad progresiva del semen.

- ✓ **Necrospermia**

Todos los espermatozoides del eyaculado están muertos.

- ✓ **Oligospermia**

Se presenta cuando hay muy pocos espermatozoides en el eyaculado. Un recuento espermático menor a 200 millones de espermatozoides/eyaculado en perros que pesan más de 4,5 kg se considera anormal.

- ✓ **Hematospermia**

La presencia de sangre en el eyaculado, por hipertrofia prostática benigna o debido a un traumatismo durante la recolección o la cópula.

- ✓ **Aglutinación espermática**

Infertilidad espontánea, los espermatozoides se ven alterados en su motilidad. En perros afectados crónicamente con B. canis y orquitis autoinmune (Ochoa y Torres, 2012).

2.4.2.5. Viabilidad

Con el propósito de evaluar la valoración vital espermática, de una muestra de semen se toma una gota, a la que se le agrega una gota de eosina - nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4 campos distintos los espermatozoides vivos no presentan coloración

mientras que los muertos se tiñen de rojo debido a la pasividad de sus membranas, al penetrar la eosina, la nigrosina tan solo sirve de contraste quedando depositado en el fondo del portaobjetos, la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% si rebaza este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado (Altamirano y Pereira, 2011).

Es necesario realizar dos conteos a lo largo de la placa preparada, cada uno de 100 células espermáticas, para estimar el número de células vivas y muertas pero la diferencia entre cada conteo no debe exceder un 5% (Buriticá et al, 2009).

Algunos autores describen el uso de otras tinciones como la eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test -HOST-. En el caso concreto del HOST, algunos autores han encontrado una correlación entre motilidad y vitalidad espermáticas, pero no existe correlación entre la motilidad, vitalidad y las morfoanomalías. No obstante, no se ha podido establecer fehacientemente una relación entre el HOST y la fertilidad en el perro.

Figura 20. Extensión de una gota de semen con colorante (Buriticá et al, 2009)

El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido

fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola.

En la mayoría de los trabajos, se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco. (Alamo, 2007).

2.4.3. Evaluación Espermatozoides Epididimarios

El método de evaluación de espermatozoides epididimarios es el mismo que se realiza para eyaculados de semen canino.

Los porcentajes de motilidad en espermatozoides epididimarios encontrados por Hernández et al. (2004) y que fueron recuperados con solución de Hartmann fueron de 53.97 ± 27.22%. Más adelante, Hori et al. (2005) compararon la calidad de espermatozoides epididimarios recuperados con fluido prostático y eyaculados antes de la orquiectomía; estos autores, encontraron una motilidad espermática promedio de 88.6% (n=9) frente al 92.1% encontrada en los eyaculados, no encontrando diferencia estadística significativa entre los grupos. Posteriormente, Ponglowhapan et al. (2006) encontraron que el porcentaje promedio de espermatozoides epididimarios mótiles de muestras frescas recolectados con dilutor Tris fue de 77.2 ± 6.8 (n=16).

Con respecto a la concentración de espermatozoides epididimarios, Antypas et al. (1994) reportaron una concentración promedio de 340.5 ± 38.5 x 106, más adelante, Hernández et al. (2004) encontraron una concentración de espermatozoides en la cola de los epidídimos de perros de 583.09 x 106, similar a los valores encontrados por Hewitt (2001). Posteriormente en un estudio más exhaustivo, Hori et al. (2005) estudiaron las concentraciones de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo y eyaculados del mismo

perro; encontrando cantidades de espermatozoides del epidídimo izquierdo y derecho de 1.8 a 9.0 x 108 y 1.6 a 9.4 x 108, respectivamente, con un promedio de 4.4 ± 0.6 x 108 y 5.2 ± 0.7 x 108, respectivamente; no habiendo diferencia entre los epidídimos izquierdo y derecho en los animales individuales; a su vez, encontraron una concentración de espermatozoides en el eyaculado de 2.7 hasta 11.1x108, con un promedio de 6.2 ± 0.7 x 108. La proporción de espermatozoides eyaculados del número total de espermatozoides epididimarios derecho e izquierdo fue desde 21.7% hasta 171.9%, con un promedio de 76.8 ± 12.3%.

Los valores de morfología normal encontrada en la cola del epidídimo por Hernández et al. (2004) fueron de 68.84 ± 13.07%, obteniendo espermatozoides con gotas citoplasmáticas en menor porcentaje en la cola del epidídimo (14.53%), que en el cuerpo y cabeza (20.25% y 31.15%, respectivamente), concluyendo, que hay un mayor número de espermatozoides maduros en la cola del epidídimo, lo que corrobora las funciones de la última porción del epidídimo: concentración, maduración y almacenamiento de los espermatozoides. En otro estudio, Hori et al. (2005) encontraron niveles promedio de anormalidades espermáticas de 5.6% y 4.9% en los grupos de espermatozoides epididimarios y de eyaculado, respectivamente, no habiendo diferencia estadística significativa entre los dos grupos; las incidencias promedio de espermatozoides inmaduros fueron de 4.7% y 3.4% en los grupos de espermatozoides epididimarios y de eyaculado, respectivamente, no habiendo diferencia estadística significativa entre los dos grupos.

La evaluación de la integridad funcional de membrana, al igual que para la evaluación de eyaculados de semen fresco es, generalmente, evaluada mediante el uso del test hiposmótico (HOST). Hishinuma y Sekine (2003), encontraron un porcentaje de 75.1±11.0% de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo reactivos al test hiposmótico (HOST) (Armas, 2009).

2.4.4. Factores que Afectan las Características del Semen

2.4.4.1. Pubertad

Los eyaculados iniciales de un perro después de la pubertad contienen espermatozoides anormales y muertos, con las eyaculaciones posteriores se incrementa la concentración espermática y disminuye el número de anormalidades; la testosterona también aumenta después de la pubertad.

2.4.4.2. Frecuencia de la eyaculación

La frecuencia eyaculatoria tiene un efecto contra producente sobre el volumen seminal y la concentración espermática. Un perro con actividad sexual frecuente u oligospermia puede retornar a la actividad cuando se emplea espaciadamente para permitir que los espermatozoides se acumulen en los epidídimos.

2.4.4.3. Tamaño y patología de la próstata

Wheaton y col en 1979 establecieron una correlación directa entre el volumen seminal total por eyaculado y el tamaño prostático en los perros con próstatas normales e hiperplasia prostática glandular. El volumen de eyaculación del semen colectado naturalmente incremento de un modo lineal con el tamaño y peso de la próstata; Blender y Col en 1983 realizaron un estudio donde indican que la próstata continua agrandándose durante los primeros 6 años de vida pero la función secretora y por ende el volumen seminal por eyaculado comienza a disminuir después delos 4 años de vida.

2.4.4.4. Tamaño testicular

A medida que el peso (tamaño) testicular incrementa la producción

espermática diaria y el número de espermatozoides por eyaculado (Arango y Rendón, 2009).

2.5. CONSERVACIÓN DEL SEMEN

2.5.1. Antecedentes

Los primeros trabajos publicados sobre conservación del eyaculado de perro mediante refrigeración son de 1952, mientras que el primer registro de inseminación artificial exitosa con semen diluido y refrigerado data de 1954. Los diluyentes utilizados en estos estudios contenían yema de huevo con solución de citrato de sodio o fructosa o bien la leche pasteurizada. Tras estos trabajos, otros autores aportaron más conocimientos sobre los efectos de distintos diluyentes en la refrigeración. En 1975, Andersen adaptó al semen canino el diluyente TRIS Fructosa- Ácido Cítrico con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%; sin embargo, hoy se considera que para la conservación en refrigeración del semen de perro está desaconsejado el uso de glicerol, ya que presenta un efecto depresivo en la motilidad.

En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche. Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas (Andrade, 2005).

2.5.2. Situación Actual del Proceso de Refrigeración y Congelación

En las distintas especies domésticas, incluida la especie canina, se han realizado una considerable cantidad de investigaciones con el objetivo de mejorar la viabilidad y la motilidad del semen preservado y, consecuentemente, la fertilidad. Para ello, los protocolos de refrigeración y

congelación han sido objeto de distintos estudios sobre el uso de distintos diluyentes, diferentes proporciones de crioprotectores, ritmos de refrigeración, equilibrio y protocolos de congelación y descongelación, llevados a cabo por diversos grupos de investigación en las dos últimas décadas. Los avances en los equipamientos y en las técnicas de evaluación del semen han posibilitado analizar y conocer más ampliamente el impacto de los diluyentes en la longevidad, motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la refrigeración.

En la actualidad, el diluyente de semen canino más utilizado en situaciones prácticas y experimentales sigue siendo el TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico, con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%, si se pretende la congelación, diluyente éste conocido por proporcionar índices de concepción razonables. Sin embargo, las investigaciones más recientes estudian las posibilidades de suplementación de este diluyente con diversos azúcares como la trehalosa, la xilosa y la maltosa, metilxantinas como la pentoxifilina y detergentes biológicos como la Pasta Equex; los únicos aminoácidos estudiados en esta especie han sido la prolina y la glicina-betaína, obteniéndose con la adición de prolina buenos resultados post-descongelación.

Los estudios más recientes siguen investigando y comparando los protocolos de congelación a fin de mejorar la supervivencia espermática post-descongelación. Pero no podemos olvidar, para obtener un elevado porcentaje de nacimientos, la necesidad de una rigurosa monitorización del ciclo estral de la perra y el uso de una apropiada técnica de deposición intra-uterina del semen descongelado; factores éstos tan importantes como el método utilizado en la criopreservación (Andrade, 2005).

El uso de semen congelado fue aprobado en 1981, y tras 6 años y medio se contabilizaron 101 registros de camadas. La dificultad en canalizar el cérvix canino para realizar la inseminación intrauterina puede ser el origen del poco interés suscitado hasta entonces por la congelación, pero los autores

coinciden en que este método proporciona resultados bastante más satisfactorios.

2.5.3. Métodos de Conservación

2.5.3.1. Semen fresco

El esperma mantenido a temperatura ambiente se conserva algunas horas (Cuadra, 2012).

En la especie canina, el semen obtenido tras estimulación manual se suele conservar en tubos calibrados de plástico o cristal hasta el momento de su utilización. Si la muestra se mantiene en un baño María a 37 ºC, el semen fresco puede mantener su viabilidad hasta 24 horas tras la recogida (Alamo, 2007).

2.5.3.2. Semen refrigerado

Refrigeración a + 4 ºC aumenta su fecundación durante varios días e incluso una semana, antes de refrigerar el eyaculado obtenido debemos mezclarlo con un diluyente isotónico para aumentar el tiempo de vida del semen y para protegerlo contra el choque térmico y la acción de contaminaciones bacterianas (Cuadra, 2012).

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío, observándose que los mejores resultados se obtienen con la yema de huevo. Generalmente, se almacena el semen en tubos calibrados de cristal o plástico, aunque en ocasiones se utilizan envases menos convencionales como frascos calibrados de cristal o plástico.

La reactivación y prolongación de los parámetros de motilidad parece ser

que se ve influenciada por la suplementación de glucosa, la adición de yema de huevo fresco y la eliminación de productos de degradación presentes en el medio.

En cuanto a la glucosa, se ha observado que el aumento de este componente en el medio se encuentra relacionado con el porcentaje de espermatozoides estáticos. Asimismo, se ha comprobado que la baja motilidad espermática puede ser reactivada mediante la suplementación in vitro o in vivo de secreciones vagino-útero-oviductales.

En diversos estudios realizados en la especie canina se ha demostrado que añadiendo a la muestra de semen un diluyente a base de yema de huevo es posible mantener la viabilidad hasta 10 días a 4 ºC, sin alterar su viabilidad. Aunque se desconoce exactamente cuál es el mecanismo de reactivación de la yema de huevo, se sabe que el sustrato energético de los espermatozoides lo aporta la adición de fosfolípidos y probablemente, la yema de huevo se encuentre involucrada en la producción de estos cambios. No obstante, también existen otros trabajos donde se afirma que la viabilidad del semen de perro refrigerado es de 4-5 días como máximo (Alamo, 2007).

2.5.3.3. Semen congelado

En 1803 Lázaro Spallanzani informo que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo se tornaban inmóviles y que al exponerlos a calor recuperaban la motilidad por varias horas.

Según Cuadra (2012) el esperma en nitrógeno líquido a – 196ºC, puede ser utilizado varios años después de su recolección y su congelación. El diluyente que se escoge para congelación es un medio, bien natural bien artificial, en el cual el espermatozoide está protegido de los cambios de temperatura y donde su fecundidad es preservada suficientemente a las bajas temperaturas de conservación.

En la especie canina se han constatado el nacimiento de camadas a partir de semen congelado Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg y cols., 1999, pero hasta el momento no hay estudios que determinen el tiempo máximo de almacenaje que garantice altos porcentajes de fertilidad. En algunos trabajos se ha demostrado que no existen diferencias significativas en los parámetros de motilidad, reacción acrosomal e integridad de membrana post-congelación, cuando el semen es sometido a un proceso de congelación inmediatamente tras la recogida o tras permanecer 2 días refrigerado con un diluyente a base de TRIS-glucosa con yema de huevo (Alamo, 2007).

2.5.4. Diluyentes

Los diluyentes son una mezcla de compuestos que permiten la supervivencia celular durante los procesos de congelación/descongelación debido a que ayudan a estabilizar la membrana celular e imitan las características fisiológicas de los fluidos orgánicos. Si se adiciona un crioprotector se modifica la osmolaridad lo que disminuye el riesgo de deshidratación celular.

Usualmente se usan como diluyentes, un buffer de pH como citrato de sodio, un buffer osmótico como Hepes, una fuente de energía como glucosa o fructosa, antibióticos como penicilina o estreptomicina, y un medio excipiente como Tris (Arango y Rendón, 2009).

2.5.4.1. Composición de los diluyentes

El semen de cada especie tiene unas características especiales que impide que se desarrolle un diluyente universal. A pesar de esto, el diluyente debe reunir una serie de componentes que impida el deterioro de la muestra de semen y que básicamente son los siguientes:

- ✓ Agua bidestilada o ultra pura, como disolvente para el resto de

componentes.

- ✓ Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio. En el semen canino, las más usadas son: citrato sódico, leche desnatada en polvo, leche desnatada uperizada, lactosa, ácido cítrico, TRIS.
- ✓ Sustancias orgánicas que prevengan o amortigüen el shock térmico, como la yema de huevo o leche.
- ✓ Azúcares simples como fuente de energía para los espermatozoides
- ✓ Aditivos como enzimas (α y β-amilasa, β-glucuronidasa, catalasa), detergentes (SDS-dodecilsulfato sódico, STLS-trietanolamina laurel sulfato sódico), aminoácidos (alanina, prolina, glicina-betaína, glicina-betaína+prolina) y otros compuestos (cafeína, prostaglandinas) que pueden mejorar la fertilidad.
- ✓ Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano (Alamo, 2007).

2.5.5. Dilutores del Semen Canino

Tanto para la refrigeración como para la congelación del semen, son utilizados dilutores con el propósito de proteger a los espermatozoides de todos los efectos críticos del proceso de congelación.

Actualmente, la mayoría de los investigadores que trabajan en criopreservación de semen canino emplean dilutores a base de Tris/ácido cítrico como agente tampón, glucosa o fructosa como fuentes de energía, yema de huevo como protector de enfriamiento y el glicerol como agente crioprotector.

2.5.5.1. Tris

El compuesto Tris es una sustancia soluble en agua, de aspecto cristalino, tal sustancia posee la cualidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno, y por su capacidad

amortiguadora, tiene la capacidad de neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides, y en particular al ácido láctico además, actúa en la reducción del metabolismo de la fructosa por la célula espermática, contribuyendo así en la preservación de su energía.

2.5.5.2. Ácido cítrico

El ácido cítrico es un ácido frágil inorgánico, fácilmente encontrado en los frutos cítricos, que también entra en la composición del dilutor Tris. En temperatura ambiente, se presenta como un polvo blanco, pudiendo existir en la forma anhidra o en la monohidratada; en el caso del dilutor Tris, la forma utilizada es la monohidratada. Por su conocida acción antioxidante, el ácido cítrico ha sido utilizado como un conservante natural. Así, es probable que el ácido cítrico contribuya para la preservación de la célula espermática auxiliando en la manutención del pH y actuando como antioxidante (Armas, 2009).

2.5.5.3. Yema de huevo

La yema de huevo de gallina ha sido adicionada a los dilutores del semen para proteger la membrana plasmática. Se considera que la protección conferida por la yema puede ser debido a la presencia de una lipoproteína llamada fosfatidilcolina, la cual interactúa con la estructura lipídica de la membrana plasmática de las células espermáticas y propician la protección. Según Foulkes (1977) la yema de huevo previene también la liberación de la enzima hialuronidasa por la célula espermática.

Además de proteger la membrana plasmática, la yema de huevo actúa como una fuente proteica para el dilutor. La mayoría de los autores utilizan concentraciones de yema en torno de 20% en el dilutor. A pesar de sus efectos benéficos, la yema presenta algunos inconvenientes, como la

posibilidad de transmisión de enfermedades. Además, puede facilitar el proceso de oxidación sobre los espermatozoides caninos, pudiendo promover la peroxidación de los lípidos insaturados, a la cual el espermatozoide canino es bastante sensible (Armas, 2009).

Kampschmidt y col. (1953) precisaron que la yema contribuía beneficiosamente de dos maneras distintas: por resistencia, protegiendo contra el choque térmico y por conservación, consiguiendo la supervivencia del espermatozoide. Así, la porción lipídica constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico; hecho confirmado por Blackshaw (1954), quien precisó que la lecitina era el principal fosfolípido protector, algunos trabajos atribuyen la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con la membrana (Watson, 1975), más concretamente, a la débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (Quinn y col., 1980).

Además de Graham y Foote (1987) han sustentado que las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana.

También se atribuyen a la yema propiedades protectoras contra los efectos tóxicos del plasma seminal que desestabilizan la membrana del espermatozoide. De modo que, la cantidad de yema contenida en el diluyente debería ser proporcional a la cantidad de plasma seminal en el semen diluido. Así, en casos en que el semen esté muy diluido existe, consecuentemente, una reducida concentración de plasma seminal y por ello, las concentraciones de yema pueden ser reducidas sin impacto negativo en la fertilidad.

La yema de huevo previene la aparición de colas dobladas y protege la

motilidad el compuesto activo en la yema de huevos la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de baja densidad con alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (Arango y Rendón, 2009).

2.5.5.4. Adición de azúcares

Los azúcares han sido añadidos a los medios diluyentes como sustancias capaces de aportar energía a los espermatozoides pero disacáridos como trehalosa y sucrosa pueden proporcionar estabilización de la membrana debido a su capacidad para asociarse a las membranas más fuertemente que el glicerol.

2.5.5.5. Adición de aminoácidos

La adición de aminoácidos en los diluyentes parece tener resultados positivos tanto en la refrigeración como en la congelación del semen de especies pecuarias.

La adición de prolina en los medios de congelación resultó en una mayor motilidad tras la descongelación en el perro (Peña y col., 1998). Distintos investigadores atribuyen estas mejoras a características metabólicas y crioprotectoras de los aminoácidos. Para Chen y col. (1993), los aminoácidos son capaces de aportar protección a la membrana del espermatozoide, lo que aumenta su supervivencia en el tracto genital de la hembra (Andrade, 2005).

Las elevadas concentraciones de hipotaurina en el tracto reproductor masculino pueden estar justificadas por su papel anti-oxidante en la protección de las membranas de los espermatozoides. En el perro, la presencia de hipotaurina en el espermatozoide y en el plasma seminal fue demostrada por Van der Horst y Grooten (1966).

La presencia de taurina y sobretodo de hipotaurina a elevadas concentraciones en el plasma seminal sugiere que el epidídimo o el testículo son sus lugares de origen.

2.5.5.6. Diluyente CaniPRO

Medio de cultivo para semen canino, presentación de 20ml.

a) Composición

- ✓ Agua
- ✓ Citrato de sodio
- ✓ TRIS
- ✓ Glucosa
- ✓ Fructuosa
- ✓ Componentes propios del fabricante
- ✓ Gentamicina.

Diluir una parte del semen en tres a cinco partes de diluyente es decir: 1 ml en 3-5 ml de CaniPRO Chill 10 según la concentración inicial del semen.

El semen se puede conservar durante un máximo de 10 días a 4 ° C (39 ° F) con preservación de un mínimo de 70% de motilidad inicial.

b) Inseminación

Inseminar lentamente, dando tiempo para la absorción.

- ✓ **Inseminación vaginal**

Con un catéter MAVIC ™ utilice el semen diluido para alcanzar idealmente los siguientes volúmenes totales:

- ✓ 2.5 ml para perros <10 kg (<22 libras)
- ✓ 5.10 ml para perros entre 10-20 kg (22 libras - 44 libras)
- ✓ Hasta 20 ml para perros> 20 kg (>44 libras)

Estos volúmenes deben simular los volúmenes de las fracciones segunda y tercera producidos durante el apareamiento natural y pueden variar según la raza.

En el momento de la inseminación primero inyectar el semen diluido, luego enjuague con el volumen adicional de diluyente.

- ✓ **TCI o la inseminación quirúrgica**

Utilizar 1-3 ml de semen diluido dependiendo del tamaño de la perra.

Figura 21. Diluyente CaniPRO (MINITUBE, 2013)

2.5.5.7. Diluyente CaniPlus Chill

Su fórmula mejora la motilidad, permite una conservación más larga y aumenta la fertilidad. Es un medio de conservación para semen refrigerado de 5 días a 11 días. Presentación 30 ml (MINITUBE, 2013).

a) Composición

- ✓ Agua purificada
- ✓ Ácido cítrico
- ✓ TRIS
- ✓ Fructuosa
- ✓ Antioxidantes
- ✓ Componentes propios del fabricante
- ✓ Gentamicina

b) Dilución del semen nativo

Utilice para la inseminación con semen fresco solo la fracción del eyaculado rica en espermios (2ª fracción). No incluya la 1 ª fracción del eyaculado (la porción transparente, ni la 3ª fracción del eyaculado (fracción prostática), ya que la calidad del semen descendería. Las temperaturas del diluyente y semen deben ser iguales (+/- 1 ºC) al momento de la primera dilución. Diluya el semen de acuerdo a la concentración inicial del semen.

250 a 750 $x10^6$ agregar 2 ml de diluyente en 1 ml de semen
750 a 1250 x 10^6 agregar 3 ml de diluyente en 1 ml de semen
>1250 x 10^6 agregar 4 ml de diluyente en 1 ml de semen

c) Inseminación

- ✓ **Vaginal con catéter de balón**

El semen refrigerado es adicionado a temperatura ambiente con diluyente, hasta alcanzar los siguientes volúmenes totales.

2 a 5 ml para perras <10 Kg (<22lbs)
5 a 10 ml para perras entre 11 y 19 Kg (22 a 44 lbs)

Sobre 20 ml para perras ≥ 20 Kg (>44 lbs)

- ✓ **Inseminación trans- cervical (ITC) o inseminación quirúrgica:**

1 a 3 ml de semen diluido dependiendo del tamaño de la perra a inseminar.

Figura 22. Diluyente CaniPlus Chill (MINITUBE, 2013)

2.5.6. Impacto de la Refrigeración en la Estructura y Función Espermáticas

La reducida fertilidad del semen descongelado se atribuye principalmente a las alteraciones en la estructura y función de la membrana durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación.

El espermatozoide se hace susceptible 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.

Existen evidencias de que el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la

membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica. A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles.

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles donde se manifiesta por marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de Ca2+ y pérdidas de K+ y Mg2+. Por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidencian alteraciones tan marcadas (Andrade, 2005).

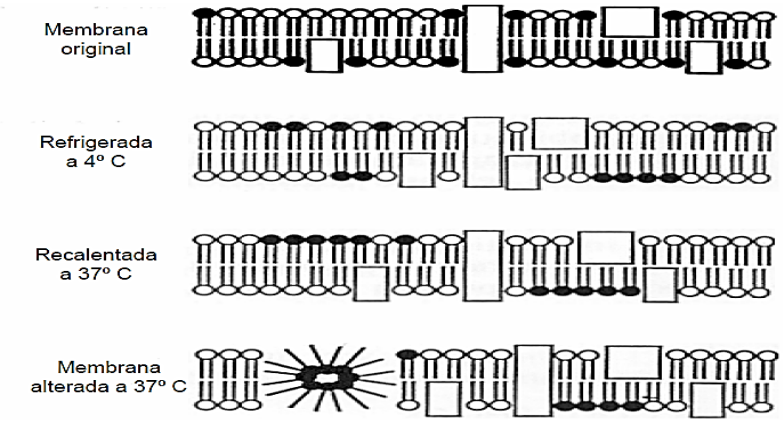

Figura 23. Alteraciones inducidas por el choque térmico (Andrade, 2005)

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática, degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso y que como hemos visto está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico. Esta pérdida de selectividad puede observarse mediante tinción intra-celular con colorantes incapaces de atravesar la membrana cuando ésta permanece intacta.

La refrigeración anticipa las modificaciones de la membrana plasmática que normalmente se producen durante la capacitación; observándose un incremento en la tendencia de las células a mostrar patrones típicos de los estadios de capacitación, cuando son teñidas con colorantes específicos. Además, el aumento de Ca2+ intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre la membrana plasmática y acrosomal externa.

2.6. COLORANTES

2.6.1. Eosina G, Solución al 2% para Tinción Supravital 50ml

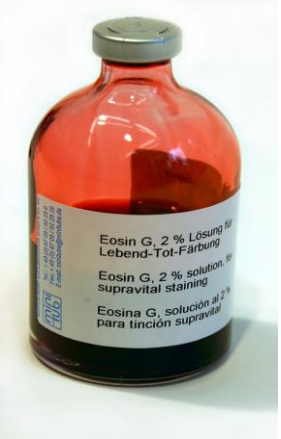

Figura 24. Colorante Eosina (MINITUBE, 2013)

Tinción en rojo de las células espermáticas dañadas o muertas.

2.6.2. Nigrosina, Solución al 4 % para Tinción Supravital, 50 ml

Permite diferenciar espermatozoides vivos de los muertos en base a la permeabilidad de membrana a los colorantes vitales. Las células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la

permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Ochoa y Torres, 2012).

Figura 25. Colorante Nigrosina (MINITUBE, 2013)

2.7. TRABAJOS RELACIONADOS

Baquero et al. 2004, evaluó de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración emplearon dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración, estudiando los efectos del tiempo de almacenamiento, el grado de dilución y los niveles de fructosa, sobre la movilidad, morfología e integridad acrosomal empleando como diluyentes TRIS-ácido cítricoyema de huevo o TRIS - Citrato de Sodio - Yema de huevo, con 1,3 o 1,6 g de fructosa. La evaluación del semen fue realizada antes de la dilución y a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento. A las seis horas de almacenamiento no se observó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los diferentes tratamientos.

Sánchez et al 2006, comparó del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado, se evaluó el efecto de dos diluyentes seminales yema de huevo + TRIS (EYT) (365 mOsm/kg, pH 6.8) y leche descremada fluida UHT (LD) (272 mOsm/kg, pH 6.8). En el semen fresco, la motilidad progresiva (MP) fue 95.7 ± 3.6% y la respuesta a HOST de 79.8 ± 6.6%. Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la

fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de MP e integridad de membrana con HOST a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen, observándose mayores valores de MP y de espermatozoides dilatados en el diluyente EYT en todos los tiempos ($p<0.05$). No obstante, los valores de MP (>70%) y HOST (>60%) observados en cada uno de los tiempos de evaluación, independiente del tipo de diluyente, superaron los valores mínimos establecidos como adecuados para uso del semen canino refrigerado en inseminación artificial.

Hernández et al. 2004, encontró una mayor concentración de espermatozoides totales en la cola del epidídimo (583.09x106), en comparación con cuerpo (136.27 x106) y cabeza (46.23 106), con una diferencia estadística ($p<0.05$) entre ellas. La motilidad espermática mostró diferencia estadísticamente significativa entre las regiones ($p<0.05$), siendo mejor en la cola del epidídimo con un 53.97% en promedio. La morfología espermática normal se observa mejor en la cola del epidídimo (68.85%).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. De Campo

- ✓ Agua destilada
- ✓ Bozal
- ✓ Frascos para muestras de orina
- ✓ Glicerina
- ✓ Guantes
- ✓ Lactato de Ringer
- ✓ Ligas
- ✓ Mesa
- ✓ Perros
- ✓ Semen canino
- ✓ Toallas desechables
- ✓ Termo
- ✓ Termómetro para tomar la temperatura del agua
- ✓ Testículos con epidídimos

3.1.2. De Laboratorio

- ✓ Agitador
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alcohol
- ✓ Algodón
- ✓ Baño María
- ✓ Bisturí
- ✓ Cajas Petri
- ✓ Cámara de Neubauer

- ✓ Centrífuga
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Colorantes eosina nigrosina
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Diluyente CaniPlus Chill
- ✓ Diluyente CaniPRO
- ✓ Equipo de disección
- ✓ Filtro
- ✓ Gradilla
- ✓ Jeringa de insulina
- ✓ Jeringas de 10ml
- ✓ Mandil
- ✓ Micropipeta
- ✓ Microscopio
- ✓ Plantilla térmica
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Puntas para pipeta de 0,5ul
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Toallas desechables
- ✓ Tubos de centrífuga 2 ml
- ✓ Tubos de ensayo 13ml
- ✓ Tubos de ensayo 45ml
- ✓ Yema de huevo

3.1.3. De Oficina

- ✓ Cámara
- ✓ Computadora
- ✓ Esferográfico
- ✓ Hojas de papel bon
- ✓ Impresora
- ✓ Libreta

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio

La recolección del material seminal mediante la técnica manual y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal ubicado en la Quinta Experimental Punzara de la Universidad Nacional de Loja y la recolección de los testículos post castración se llevó a cabo en el Hospital Docente Veterinario "César Augusto Guerrero" de la Universidad Nacional de Loja, luego se los transportó en un termo al laboratorio para su procesamiento.

Cuadro 2. Características meteorológicas del lugar de estudio

Característica	Hoya de Loja
Altitud	2 100 msnm
Extensión	1883 Km^2
Clima	Templado - ecuatorial, Sub húmedo
Temperatura	16 °C

3.2.2. Descripción de Unidades Experimentales

Se trabajó con un total de 16 UE; ocho UE para la técnica manual y ocho UE para epidídimos post castración, se consideró como una unidad experimental al material seminal de un macho adulto mediante colecta manual y de epidídimos obtenidos post castración de un macho en edad reproductiva. La identificación individual de las unidades experimentales se realizó escribiendo en el tubo de ensayo, la técnica diluyente y el nombre del canino, los datos se recogieron en una hoja de registro.

Cuadro 3. Identificación de perros para colecta manual

Perro	Raza	Edad	Nombre
1	Cocker	6 años	Lucas
2	Bull dog	14 meses	Charlie
3	Golden	3 años	Guapo
4	Mestizo	4 años	Rubén
5	Pekinés	5 años	Coquí
6	Yorkshire	3 años	Oso
7	Beagle	3 años	Moca
8	Pinscher	2 años	Pancho

Cuadro 4. Identificación de perros para castración

Perro	Raza	Edad	Nombre	Peso Kg
1	Mestizo	3 años	Paco	22
2	Bóxer	1 año	Maison	8
3	Mestizo	2 años	Caramelo	9.3
4	Mestizo	6 años	Lobo	19.2
5	Mestizo	17 meses	Valentín	10.5
6	Mestizo	5 años	Oso	19.5
7	Pekinés	2 años	Homero	5.1
8	Frensch	18 meses	Gasparin	7.5

3.2.3. Descripción de los Grupos Experimentales

Para la colecta manual y la técnica de epidídimos post castración se formaron grupos con cuatro UE cada uno, al primer grupo se le agregó el diluyente CaniPRO más yema de huevo y segundo grupo el diluyente CaniPlus Chill, al tercer grupo se le colocó CaniPlus Chill y al cuarto grupo se le agrego el diluyente CaniPRO más yema de huevo en total se formaron cuatro grupos en la investigación.

Cuadro 5. Conformación de los grupos experimentales

Fuente de colecta	**Diluyentes**	**Tratamientos**	**# UE**	**Identificación del grupo experimental**	**Tamaño de la muestra**
Epidídimo (E)	Tris (T) CaniPRO	ET	4	Gr1	8 UE
		ECh	4	Gr2	
Manual (Ey)	CaniPlus Chill (Ch)	EyCh	4	Gr3	8 UE
		EyT	4	Gr4	
Total: 2	**2**	**4**	**16 UE**	**4**	**16 UE**

Cuadro 6. Distribución de los perros en grupos

Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**
Mestizo	Mestizo	Cocker	Pekinés
Mestizo	Bóxer	Bull dog	Yorkshire
Pekinés	Mestizo	Golden	Beagle
Frensch	Mestizo	Mestizo	Pinscher

3.2.4. Descripción de los Tratamientos

El tratamiento uno estuvo conformado por semen obtenido mediante epidídimos post castración y el diluyente CaniPRO más yema de huevo, el tratamiento dos se formó con semen obtenido por epidídimos post castración

y el diluyente CaniPlus Chill, el tratamiento tres lo formaron el semen conseguido mediante colecta manual diluyente CaniPlus Chill, el tratamiento cuatro se formó por semen obtenido mediante colecta manual y el diluyente CaniPRO más yema de huevo.

CaniPlus Chill: Composición

- ✓ Agua purificada
- ✓ Ácido cítrico
- ✓ TRIS
- ✓ Fructosa
- ✓ Antioxidantes
- ✓ Componentes propios del fabricante
- ✓ Gentamicina

CaniPRO™ Chill10 + yema de huevo: Composición

- ✓ Agua
- ✓ Citrato de sodio
- ✓ TRIS
- ✓ Glucosa
- ✓ Fructuosa
- ✓ Componentes propios del fabricante
- ✓ Gentamicina

3.2.5. Procedimiento de Extracción del Semen

3.2.5.1. Colecta manual del semen

La recolección se realizó en horas de la mañana (9:00-10:00) se subió a los animales a la mesa para poder realizar la extracción.

Luego se procedió a limpiar el área genital con agua destilada, se secó con toallas desechables.

Se realizó un masaje suave del prepucio con las manos enguantadas y lubricadas con glicerina, antes de que ocurra la erección total del pene se retrajo el prepucio hacia atrás, realizando una presión en la parte caudal del bulbo peneano; a continuación se giró el pene en 180º hacia atrás haciendo estimulaciones pulsátiles alrededor y por detrás del bulbo peneano, se colecto el semen en un recipiente de plástico de 100ml.

3.2.5.2. Recuperación del material seminal del epidídimo

Los testículos recolectados después de la orquiectomía o muerte del animal se ligaron por el cordón espermático e inmediatamente se colocaron en un termo de transporte con Lactato de Ringer a una temperatura de 37ºC para evitar la desecación y el shock térmico.

Una vez en el laboratorio se separó el epidídimo del testículo con una hoja de bisturí. A los epidídimos se los evaluó inmediatamente como máximo de tiempo una hora, se procedió a eliminar los vasos sanguíneos, para evitar la contaminación con sangre (espermática).

Al mismo tiempo se calentó una caja Petri en la plantilla térmica a 37ºC con 20ml de cloruro de sodio, luego se cortó los epidídimos y macero dejándolos reposar por 30 minutos, para reactivar la motilidad de los espermatozoides y permitir la migración de los mismos desde los tejidos epididimales hasta el medio acuoso.

Pasado este tiempo procedimos a filtrar el contenido con un filtro de papel, luego colocamos en tubos Falcón a temperatura ambiente 25- 26ºC y de este contenido sacamos una muestra de 20 ul para realizar la evaluación. El resto de contenido se centrifugo por 10 minutos dejando sobrenadante para

luego centrifugar por otros 10 minutos finalmente se realizó una evaluación microscópica con el sedimento restante.

3.2.6. Evaluación Seminal

3.2.6.1. Evaluación macroscópica

Se evaluó las características macroscópicas del semen obtenido mediante colecta manual.

Las variables que se determinaron fueron las siguientes: Volumen, Color, Olor y Densidad.

a) Volumen

Para conocer el volumen se observó directamente en un tubo de ensayo graduado.

b) Color

Se determinó por observación directa. Se calificó como gris transparente y blanco opaco

c) Olor

Se obtuvo mediante el olfato, para lo cual se acercó el tubo colector a la nariz y se consideró normal un olor sui generis.

d) Densidad

Se la estableció mediante observación del semen. Se calificó como acuosa y cremosa o lechosa considerándose bueno un semen con una densidad

lechoso- cremoso lo que nos da una idea de la concentración de esperma. Se calificara como muy buena, buena y suficiente.

3.2.6.2. Evaluación microscópica

Se realizó la evaluación microscópica con lente de 40 X y 100 X del semen colectado manualmente y el obtenido mediante epidídimos post castración.

a) Motilidad masal

Para determinar este parámetro se colocó con una micropipeta 10 ul de semen en un portaobjetos previamente calentado a 37ºC y se observó al microscopio con lente de 40X.

Se calificó de la siguiente manera Según Tabla de referencia encontrada en Buriticá y col, 2009:

5 muy buena, 4 bueno, 3 regular, 2 pobre, 1 muy pobre 0 muertos.

b) Motilidad individual

Se colocó 10 ul de semen en un portaobjetos precalentado en la plantilla térmica a 37ºC se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio con lente de 40X.

Al microscopio se le colocó la plantilla térmica para mantener la temperatura.

Se calificó como según Corrada y col, 2006: 100-80% muy buena, 60-79% buena, 40-59% regular y menor a 40% pobre.

c) Concentración espermática

En la fase de entrenamiento en el laboratorio se hizo una dilución 1:100 para determinar la concentración, teniendo la dificultad que las muestras estaban muy diluidas, por lo tanto se trabajó con la dilución 1:10 de semen y agua, colocando 10ul de semen y 90ul de agua luego se agitó y se colocó dos gotas de 10 ul de la dilución en la cámara superior e inferior para llenar la cámara de Neubauer se ubicó la cámara en el microscopio y se observó con lente de 40x y se contabilizaron los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de la cámara lado superior e izquierdo.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Espermatozoides contados}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{) x Profundidad de la cámara (mm) x dilución}}$$

Superficie contada 5 cuadrados (5 x 0,04 mm2) = 0,2 mm2
Profundidad de la cámara = 0,1 mm
Dilución = 10

El resultado obtenido fue la concentración espermática en millones/ml.

d) Morfología

Para llevar a cabo la evaluación de la morfología se evaluó 200 espermatozoides por muestra y se obtuvo el porcentaje de anormalidades.

La técnica se llevó a cabo con la tinción eosina nigrosina se colocó en un extremo del portaobjetos una gota de 10ul de semen y se agregó dos gotas de eosina y una gota de nigrosina se mezcló y se hizo un extendido con otro portaobjetos se dejó secar, posteriormente se observó al microscopio con

lente de 100X.

e) Viabilidad

Para conocer la viabilidad se evaluó 200 espermatozoides por muestra y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Se realizó un extendido de semen y dos gotas de eosina y una gota de nigrosina y se observó con lente de 100X, los espermatozoides vivos no se tiñeron y los muertos tomaron una coloración rosada.

3.2.7. Procesamiento del Semen

3.2.7.1. Adición del diluyente CaniPlus Chill

En un tubo de ensayo con identificación se colocó 1ml de semen y se agregó el diluyente CaniPlus Chill de acuerdo a la concentración.

Cuadro 7. Volumen de diluyente CaniPlus Chill a añadir.

Concentración inicial del semen (10^6/ml)	**Proporción de semen - diluyente**
250-750	1+2
750-1250	1+3
>1250	1+4

Fuente: www.minitube.de

3.2.7.2. Adición del diluyente CaniPRO

Al diluyente CaniPRO™ Chill se le agregó 20% de yema de huevo (4 ml)

- ✓ Se obtuvo huevos frescos

- ✓ Se lavó enjuagó y secó los huevos y se los mantuvo en el refrigerador hasta su utilización
- ✓ Antes de utilizarlos se los limpió con una solución al 70% de Alcohol y se dejó secar al aire
- ✓ Se partió los huevos y se separó la yema con la membrana intacta luego se colocó en un trozo de papel plegado
- ✓ Se dejó rodar cuidadosamente la yema sobre el papel para retirar los restos de la clara de huevo.
- ✓ Se perforó la membrana de la yema y se recogió la yema en un vaso.
- ✓ Se agregó el volumen exacto de yema de huevo al diluyente con la ayuda de una pipeta.

Se colocó 1 ml de semen en un tubo de ensayo con identificación y se agregó diluyente CaniPRO de acuerdo a la concentración.

Cuadro 8. Volumen de diluyente CaniPRO a añadir

Concentración inicial del semen (10^6/ml)	**Proporción de semen - diluyente**
250-750	1+3
750-1250	1+4
>1250	1+5

Fuente: www.minitube.de

Luego de colocar el diluyente se dejó a temperatura ambiente por unos segundos y luego se colocó el tubo en un vaso de agua para que la temperatura descienda lentamente y a continuación se coloca en el refrigerador a 5ºC.

3.2.8. Evaluación Post Refrigeración

Se realizó la evaluación de la motilidad individual cada 24 horas post refrigeración en los dos diluyentes utilizados: CaniPRO más yema de huevo

y CaniPlus Chill.

Se sacó de la refrigeradora una muestra de 10ul se colocó en un portaobjetos previamente calentado se llevó a la plantilla térmica y se cubrió con un cubreobjetos, luego se observó al microscopio al cual se le colocó una placa térmica. Se analizaron los siguientes parámetros:

Cuadro 9. Horas de evaluación post refrigerado

MI	**%**										
Horas	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264

MI: Motilidad individual

3.2.9. Análisis Estadístico

Se realizó un arreglo factorial 2x2 dispuesto en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y 4 repeticiones.

La información recopilada en las diferentes variables se analizó en cada uno de los grupos experimentales, se aplicó un análisis de varianza ADEVA, para determinar si hay diferencia estadística entre los tratamientos.

4. RESULTADOS

Al concluir con la investigación, cuya finalidad fue evaluar el comportamiento de los diluyentes CaniPRO y CaniPlus Chill y las fuentes de colecta en distintos tiempos de refrigeración se llegó a los siguientes resultados.

4.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y DEL EPIDÍDIMO.

4.1.1. Calidad del Semen Proveniente de Colecta in vivo

Cuadro 10. Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante colecta manual.

Perros	Volumen ml	Color	Olor	Densidad
1 Lucas	1,00	Gr T	S G	Acuosa
2 Charlie	10,00	Bl Op	S G	Cremosa
3 Guapo	7,00	Gr T	S G	Acuosa
4 Rubén	4,00	Gr T	S G	Acuosa
5 Coquí	12,00	Gr T	S G	Acuosa
6 Oso	5,00	Bl Op	S G	Cremosa
7 Moca	3,00	Bl Op	S G	Cremosa
8 Pancho	1,00	Gr T	S G	Acuosa
PROMEDIO	5,38			

Bl. Op: Blanco opaco, **Gr T:** Gris Transparente, **SG:** Sui generis

Como apreciamos en el cuadro 10, del semen obtenido mediante colecta manual en ocho canes y al realizar el análisis macroscópico se obtuvo un volumen promedio de 5.38 ml; color gris transparente cinco canes que nos da el 62,5% y blanco opaco tres canes que nos da 37,5%; olor sui generis y una densidad acuosa en cinco canes que nos da el 62,5% y cremosa tres canes que nos da 37,5%.

Cuadro 11. Resultados de la evaluación del semen por colecta manual.

Perros	C. E. X 10^6 (millones spz/ml)	M. M.	% M. I.	% V	% Morfología	
					Normal	Anormal
1 Lucas	630	5	90	99,5	97	3
2 Charlie	830	4	80	92,5	68,5	31,5
3 Guapo	695	5	95	99	97,5	2,5
4 Rubén	600	5	98	95	87,5	12,5
5 Coquí	440	5	90	97	89,5	10,5
6 Oso	1280	5	95	99	92,5	7,5
7 Moca	1610	5	90	98,5	91,5	8,5
8 Pancho	475	5	85	99	84,5	15,5
PROMEDIO	820	5	90,38	97,44	88,56	11,44

C. E: Concentración espermática, **M. M:** Motilidad masal, **M.I:** Motilidad Individual, **V:** Viabilidad.

En el cuadro 11 podemos ver que al realizar el análisis microscópico obtuvimos un promedio de concentración espermática de 820x10^6; motilidad masal 4,88; motilidad individual de 90,38%; viabilidad de 97,44%; una normalidad de 88,56 y una anormalidad de 11,44.

4.1.2. Calidad Seminal Proveniente de Epidídimos Post Castración

Cuadro 12. Resultados de la evaluación del semen obtenido mediante epidídimos post castración

Perros	C. E. X 10^6 (millones spz/ml)	M. M.	% M. I.	% V	% Morfología	
					Normal	Anormal
1 Paco	1295	3	80	96	86	14
2 Maison	1285	4	60	99	93,5	6,5
3 Caramelo	450	4	60	99,5	87,5	12,5
4 Lobo	1280	4	90	98,5	85	15
5 Valentín	1190	5	70	99,5	90,5	9,5
6 Oso	380	4	85	99	80	20
7 Homero	610	4	90	98,5	89	11
8 Gasparin	700	4	70	98	85	15
PROMEDIO	898,75	4	75,63	98,50	87,06	12,94

C. E: Concentración espermática, **M. M:** Motilidad masal, **M.I:** Motilidad Individual, **V:** Viabilidad.

En el cuadro 12 del semen obtenido mediante epidídimos post castración en ocho caninos en el análisis microscópico se obtuvo un promedio de concentración espermática de 898,75x10^6; motilidad masal de 4; motilidad individual de 75,63%; viabilidad de 98,50%; una normalidad de 87,06%; una anormalidad de 12,94%.

Cuadro 13. Resultados estadísticos de las características microscópicas.

Parámetros evaluados	G1	G2	G3	G4
Motilidad individual	78,75^{ab}	72,50^{b}	90,75^{a}	90,00^{a}
Motilidad masal	4,25^{bc}	3,75^{c}	4,75^{ab}	5,00^{a}
Concentración	720,00^{a}	1077,50^{a}	688,75^{a}	951,00^{a}
% Normales	86,13^{a}	88,00^{a}	87,63^{a}	89,50^{a}
% Anormales	13,88^{a}	12,00^{a}	12,38^{a}	10,50^{a}
Viabilidad	98,75^{a}	98,25^{a}	96,50^{a}	98,38^{a}

(a, ab, b, bc, c) Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

El cuadro 13 nos indica que el porcentaje de motilidad individual en el grupo tres y cuatro no son significativamente diferentes (p> 0,05), a continuación se encuentra el uno y en último lugar el dos; la motilidad masal es estadísticamente superior en el grupo cuatro luego el tres, uno y en cuarto lugar el dos; en cuanto a la concentración espermática, porcentaje de normales, anormales y viabilidad los grupos no son significativamente diferentes (p> 0,05).

4.2. CALIDAD DEL SEMEN REFRIGERADO A DISTINTOS TIEMPOS

Se evaluó el porcentaje de motilidad individual cada 24 horas del semen obtenido mediante colecta manual y epidídimos post castración.

El cuadro 14 nos indica el porcentaje de motilidad individual encontrada al realizar la evaluación cada 24 horas post refrigeración.

Cuadro 14. Resultados de la evaluación del porcentaje de motilidad individual post refrigeración

Tratamientos	Perros	Tiempos de refrigeración en horas										
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h	264h
T1	Valentín	60	50	40	30	20	15	5	1	0	0	0
	Oso	75	60	45	40	25	15	8	2	0	0	0
	Homero	80	70	60	40	30	15	5	2	0	0	0
	Gasparin	60	45	30	20	10	3	0	0	0	0	0
T2	Paco	75	60	45	35	20	10	2	0	0	0	0
	Maison	50	45	35	20	5	1	0	0	0	0	0
	Caramelo	50	40	25	15	5	7	3	0	0	0	0
	Lobo	80	75	60	50	30	15	8	0	0	0	0
T3	Lucas	80	70	60	50	40	15	5	0	0	0	0
	Charlie	90	85	80	70	30	5	0	0	0	0	0
	Guapo	95	80	70	50	35	5	0	0	0	0	0
	Rubén	70	65	50	40	30	15	10	5	0	0	0
T4	Coquí	85	80	70	68	60	50	45	40	36	20	3
	Oso	87	85	80	75	70	68	65	50	40	35	20
	Moca	85	80	78	75	70	67	60	50	45	30	15
	Pancho	95	90	88	85	82	78	70	60	50	40	25

Cuadro 15. Promedios del % motilidad individual a distintos tiempos post refrigeración

Tratamiento	Tiempos de refrigeración en horas										
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h	264h
T1	68,75	56,25	43,75	32,5	21,25	12	4,5	1,25	0,0	0,0	0,0
T2	63,75	55	41, 25	30	15	8,25	3,25	0,0	0,0	0,0	0,0
T3	83,75	75	65	52,5	33,75	10	3,75	1,25	0,0	0,0	0,0
T4	88	83,75	79	75,75	70,5	65,75	60	50	42,75	31,25	15,75

T1 (ET): Epidídimos post castración y diluyente CaniPRO más yema de huevo
T2 (E Ch): Epidídimos post castración y diluyente CaniPlus Chill
T3 (Ey Ch): Colecta manual y diluyente CaniPlus Chill
T4 (Ey T): Colecta manual y diluyente CaniPRO más yema de huevo

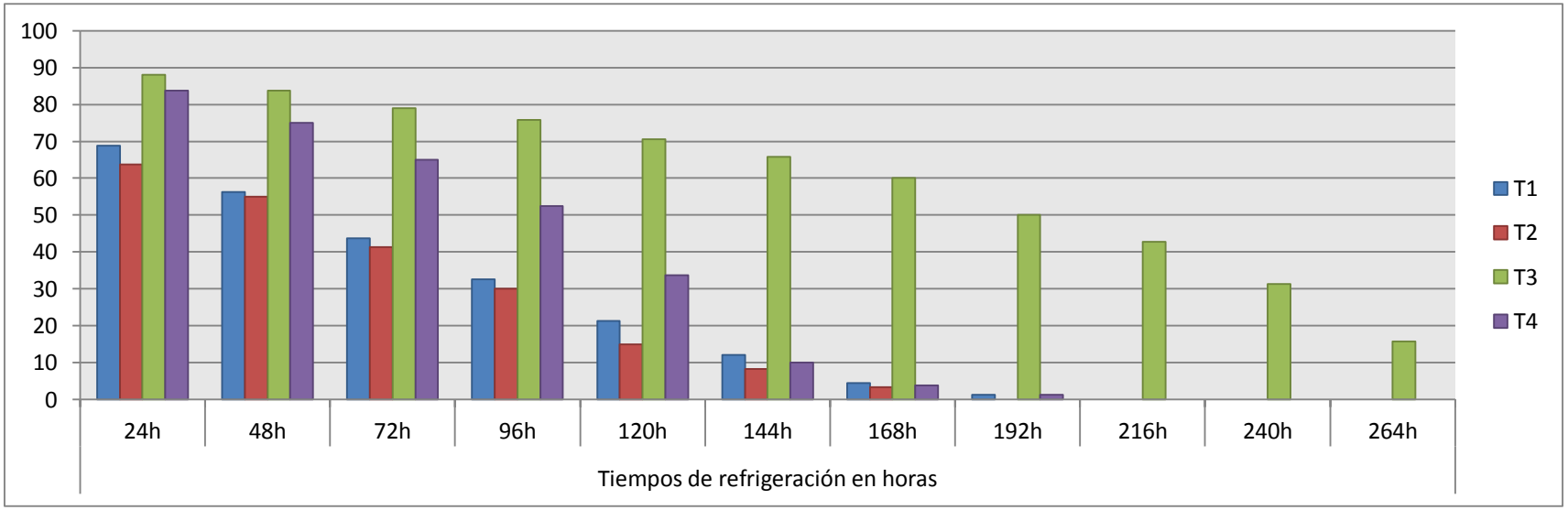

Figura 26. Porcentajes de motilidad individual evaluación cada 24 horas.

La figura 31 a simple vista podemos observar que el tratamiento cuatro es el mejor.

Cuadro 16. Resultados estadísticos de los promedios de motilidad individual en los tratamientos

Parámetro evaluado	**Tratamientos**			
Motilidad individual en horas	**T1 (ET)**	**T2 (E Ch)**	**T3 (Ey Ch)**	**T4 (Ey T)**
24h (1 día)	68,75 ^{bc}	63,75 ^{c}	83,75 ^{ab}	88,00 ^{a}
48h (2 días)	56,25 ^{b}	55,00 ^{b}	75,00 ^{a}	83,75 ^{a}
72h (3 días)	43,75 ^{b}	41, 25 ^{b}	65,00 ^{a}	79,00 ^{a}
96h (4 días)	32,50 ^{c}	30,00 ^{c}	52,50 ^{b}	75,75 ^{a}
120h (5 días)	21,25 ^{bc}	15,00 ^{c}	33,75 ^{b}	70,50 ^{a}
144h (6 días	12,00 ^{b}	8,25 ^{b}	10,00 ^{b}	65,75 ^{a}
168h (7 días)	4,50 ^{b}	3,25 ^{b}	3,75 ^{b}	60,00 ^{a}
192h (8 días)	1,25 ^{b}	0,00 ^{b}	1,25 ^{b}	50,00 ^{a}
216h (9 días)	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	42,75 ^{a}
240h (10 días)	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	31,25 ^{a}
264h (11dias)	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	0,00 ^{b}	15,75 ^{a}
PROMEDIO	21,84	19,68	29,55	60,23

($^{a, ab, b, bc, c}$) Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05) en la misma fila.
T1 (ET): Epidídimos post castración y diluyente CaniPRO más yema de huevo
T2 (E Ch): Epidídimos post castración y diluyente CaniPlus Chill
T3 (Ey Ch): Colecta manual y diluyente CaniPlus Chill
T4 (Ey T): Colecta manual y diluyente CaniPRO más yema de huevo

El cuadro 16 nos indica que el porcentaje de motilidad individual fue estadísticamente superior a las 24 horas post refrigeración en el tratamiento cuatro seguido por el tratamiento tres, uno y en último lugar el tratamiento dos; a las 48 y 72 horas post refrigerado los tratamientos cuatro y tres no son significativamente diferentes (p>0,05); sin embargo estos son estadísticamente superiores a los tratamientos uno y dos.

Mientras que a las 96 horas el porcentaje de motilidad individual estadísticamente superior está en el tratamiento cuatro, en segundo lugar se ubica el tratamiento tres y en tercer lugar los tratamientos uno y dos los

cuales no son significativamente diferentes (p>0,05).

A las 120 horas el porcentaje de motilidad individual estadísticamente superior está en el tratamiento cuatro, luego el tres, dos y en cuarto lugar el tratamiento uno, a las 144, 168, 192, 216,240 y 264 horas post refrigerado el mejor tratamiento es el cuatro seguido del tres, dos y uno los cuales no son significativamente diferentes (p>0,05). Esto nos permite determinar que el tratamiento en el cual se observó el mejor porcentaje de motilidad individual a lo largo del tiempo es el tratamiento cuatro (Ey T) conformado por semen obtenido mediante colecta manual y el diluyente CaniPRO.

4.3. CALIDAD DEL SEMEN CON DOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN

Cuadro 17. Porcentaje promedio de motilidad individual por factor fuente de colecta

Horas evaluación	E	Ey
fresco	75,63[b]	90,38[a]
24h	66,25 [b]	85,88 [a]
48h	55,63 [b]	79,38 [a]
72h	42,50 [b]	72,00 [a]
96h	31,25 [b]	64,13 [a]
120h	18,13 [b]	52,13 [a]
144h	9,63 [b]	37,88 [a]
168h	3,50 [b]	31,88 [a]
192h	0,63 [b]	25,63 [a]
216h	0,00 [b]	21,38 [a]
240h	0,00 [b]	15,63 [a]
264h	0,00 [b]	7,88 [a]

([a, b]) Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05) en la misma fila.
E: Epidídimos, **Ey:** Manual

El Cuadro 17 nos indica que existe diferencia estadística significativa en las fuentes de colecta es decir que la mejor fuente de colecta es la manual.

Cuadro 18. Porcentaje de motilidad individual por factor diluyente

horas evaluación	T	Ch
fresco	84,38[a]	81,63[a]
24h	78,38 [a]	73,75 [a]
48h	70,00 [a]	65,00 [a]
72h	61,38 [a]	53,13 [a]
96h	54,13 [a]	41,25 [b]
120h	45,88 [a]	24,38 [b]
144h	38,88 [a]	8,63 [b]
168h	32,25 [a]	3,13 [b]
192h	25,63 [a]	0,63 [b]
216h	21,38 [a]	0,00 [b]
240h	15,63 [a]	0,00 [b]
264h	7,88 [a]	0,00 [b]

([a, b]) Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05) en la misma fila.
T: CaniPRO más yema de huevo, **Ch:** CaniPlus Chill

El Cuadro 18 nos indica que no existe diferencia estadística (p>0,05) en los diluyentes a las 24, 48 y 72 horas; a las 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 264 horas existe diferencia estadística significativa en los diluyentes siendo mejor el CaniPRO más yema de huevo.

5. DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y DEL EPIDÍDIMO.

5.1.1. Calidad del Semen Proveniente de Colecta in vivo

Las características macroscópicas encontradas, en cuanto al volumen medio fue de 5,38; lo cual es confirmado por (Root Margareth, 2005) quien comenta que el volumen normal de semen varía desde 1 a 40 ml; por su parte Corti (2003) evaluó 10 eyaculados encontrando un volumen de 1 a 4,5ml con un promedio de 2,4 ml inferior al encontrado.

El color de los 8 eyaculados fue gris transparente en 5 eyaculados y blanco opaco en tres. Según Buriticá et al, (2009) la muestra de semen idealmente debe ser clara; sin embargo, el color puede ser translúcido o blanco cremoso en el caso de existir una muy baja o muy alta concentración espermática respectivamente. Por su parte Corti (2003) encontró que el color de 10 eyaculados fue: blanco, en 8 eyaculados, blanco-opalescente en 1 y a blanco-amarillento en otro.

El olor de todas las muestras fue calificado como sui generis similar al encontrado por Altamirano y Pereira (2011).

La densidad encontrada fue acuosa en 5 eyaculados y cremosa en tres. Según Cuadra (2012) nos da una idea de la concentración de esperma.

En cuanto a las características microscópicas el porcentaje de vitalidad espermática obtenido en promedio fue de 97,44; este valor está de acuerdo con los valores de referencia encontrados en Corrada y col (2006) quien

comenta que el porcentaje de viabilidad debe alcanzar el 70%. Por su parte Altamirano y Pereira (2011) obtuvo un promedio de 95; Corti (2003) obtuvo valores de 82,2 y Alamo y col (2007) 94,2.

Según Esquivel (2006) la concentración espermática es de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro, considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10^6 esp/ml. Otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000 x 10^6 esp/ml. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco es de 100 x 10^6 esp/ml estos valores coinciden con los encontrados en el estudio que fue de 820 x 10^6 superior al encontrado por Alamo (2007) de 711.22 x 106 esp/ml e inferior al encontrado por Altamirano y Pereira (2011) de 932 x 10^6.

En cuanto a la morfología el porcentaje de espermatozoides normales fue de 88,56 y el porcentaje de espermatozoides anormales de 11,44; estos valores están de acuerdo con los valores de referencia encontrados en Corrada y col (2006) quien comenta que un semen de buena calidad debe contener más de 70% de espermatozoides con morfología normal y las anormalidades no deben superar el 30%. Por su parte Alamo (2007) observó valores medios de anormalidades comprendidos entre 6.7 y 12.0%. Estos valores son inferiores a los encontrados por Altamirano y Pereira (2011) donde obtuvieron un promedio de normalidad de 98,5 y de anormalidad de 1,5. Corti (2003) obtuvo un promedio de normalidad de 81,4% mientras que Sánchez et al (2006) encontraron valores de 87,7.

En cuanto a la motilidad masal se encontró valores promedio de 5, superior al encontrado en Martínez y col (2009) de 4, tomando en cuenta los valores de referencia encontrados en Buriticá y col (2009) de 5 muy buena, 4 bueno, 3 regular, 2 pobre, 1 muy pobre 0 muertos**;** se tuvo una calificación muy buena.

En cuanto a la motilidad individual se encontró valores promedio de 90,38 que según los valores de referencia Corrada y col, 2006 de 100-80% muy buena, 60-79% buena, 40-59% regular y menor a 40% pobre, se tuvo un porcentaje muy bueno; este valor es superior al encontrado por Bonilla y Ballesteros (2007) de 88,33 y Andrade (2005) de 86,00; e inferiores a los encontrados por Carlotto (2009) que encontró valores de 94,8 y similar al encontrado por Cuadra (2012) de 90-98%.

5.1.2. Calidad de Semen Fresco Obtenido de Epidídimos Post Castración.

Se encontró un porcentaje promedio de motilidad individual de 74,38 que según los valores de referencia Corrada y col, 2006 de 100-80% muy buena, 60-79% buena, 40-59% regular y menor a 40% pobre, se tuvo un porcentaje bueno; estos valores son superiores a los encontrados por Hernández et al. (2004) y recuperados con solución de Hartmann que fueron de 53,97 Armas (2009) encontró valores de 79,5 y motilidad progresiva de 55,5.

La concentración espermática encontrada fue de 898,75 x 10^6 ese valor es apto para ser usado en biotecnologías reproductivas, como es el caso de la inseminación artificial en perras donde utilizan 50 a 100 millones de espermatozoides; Hernández y et al. (2004) obtuvo un promedio de 583.09 x 10^6 y Antypas et al. (1994) que reportaron una concentración promedio de 340.5 x 10^6.

En cuanto a la motilidad masal se encontró un promedio de 4 considerado como bueno según los valores de referencia Buriticá y col, 2009 de 5 muy buena, 4 bueno, 3 regular, 2 pobre, 1 muy pobre 0 muertos.

La viabilidad encontrada fue de 98,50% considerado como de muy buena calidad según los valores de referencia encontrados en Corrada y col, 2006 quien comenta que el porcentaje de viabilidad debe alcanzar el 70%.

La morfología normal encontrada fue de 87,06 y anormal de 12,94 estos valores están de acuerdo con los valores de referencia encontrados en Corrada y col, 2006 quien comenta que un semen de buena calidad debe contener más de 70% de espermatozoides con morfología normal y las anormalidades totales no deben superar el 30%. valores son superiores a los encontrados por Hernández et al. (2004) quien tuvo una morfología normal de 68,84%; e inferiores a los encontrados por Armas (2009) de 89,38%. Hori et al. (2005) encontraron niveles promedio de anormalidades espermáticas de 5.6%.

5.2. CALIDAD DEL SEMEN REFRIGERADO A DISTINTOS TIEMPOS

Según (Alamo, 2007) la motilidad seminal post-refrigeración es aceptable cuando alcanza valores del 60-70% tomando esto en cuenta, en nuestro estudio el tratamiento uno (E T) y dos (E Ch) el porcentaje de motilidad individual se consideró como aceptable hasta las 24 horas con un promedio de 68,75 y 63,75 respectivamente esto podría deberse a que el porcentaje de motilidad individual en fresco que tuvieron las muestras que se incluyeron en los tratamientos fue de 78,75 y 72,50.

El tratamiento tres (Ey Ch) tuvo un porcentaje de motilidad individual aceptable hasta las 72 horas con un promedio de 65,00 y el tratamiento cuatro (Ey T) se consideró aceptable el porcentaje de motilidad individual hasta las 168 horas con un promedio de 60,00 esto pudo deberse a que el porcentaje de motilidad en fresco fue de 90,75 en el tratamiento tres y 90,00 para el cuatro.

En este estudio el tratamiento uno epidídimos más CaniPRO a los 96 horas el porcentaje de motilidad bajo a 32,5% y en el tratamiento dos epidídimos CaniPlus Chill disminuyó a 30,0%; el tratamiento tres manual y CaniPlus Chill 120 horas el porcentaje de motilidad individual descendió a 33,8%, el tratamiento cuatro manual y CaniPRO a las 240 horas bajó a 31,3%;

a las 216 horas el tratamiento uno y tres todos los espermatozoides murieron; en el tratamiento dos a las 192 horas y en el tratamiento cuatro a las 264 horas el porcentaje de motilidad individual llegó a 15,8.

Los primeros trabajos publicados sobre conservación del eyaculado de perro mediante refrigeración son de 1952 Brochart y Coulomb, mientras que el primer registro de inseminación artificial exitosa con semen diluido y refrigerado data de 1954 Harrop. Con los valores encontrados podemos decir que se pueden utilizar espermatozoides epididimarios y obtenidos por la técnica manual en inseminación artificial en caninos de gran valor genético.

5.3. CALIDAD DEL SEMEN CON DOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN

En la presente investigación a las 24, 48, 72 y 96 horas no se encontró diferencia estadística significativa (>0,005) entre los dos diluyentes utilizados CaniPRO más yema de huevo y CaniPlus Chill, de las 120 a 264 horas post refrigerado existe diferencia estadística significativa (<0,005) entre los diluyentes usados observándose a las 120 horas (5 días) que el diluyente CaniPlus Chill comenzó a descender más rápidamente el porcentaje de motilidad individual esto podría deberse a que la motilidad individual en fresco y a las 24 horas de refrigeración fue de 81, 63; 84,38 y 73,75; 78,38 respectivamente en el diluyente CaniPlus Chill y CaniPRO además que a este último diluyente se le adicionó la yema de huevo lo que ayudo a conservar la motilidad por mayor tiempo.

Kampschmidt y col. (1953) precisaron que la yema de huevo contribuía beneficiosamente de dos maneras distintas: por resistencia, protegiendo contra el choque térmico y por conservación, consiguiendo la supervivencia del espermatozoide.

En cuanto a la fuente de colecta se consideró como apto el semen obtenido por colecta de epidídimos hasta las 24 horas con un promedio de 66,25 y manual hasta las 96 horas con un promedio de 64,13 existiendo diferencia estadística significativa (<0,005) en la colecta manual y de epidídimos por lo cual se pudo determinar que la mejor fuente de colecta fue la manual esto podría deberse al tiempo que transcurrió entre la castración y la evaluación seminal y el bajo porcentaje de motilidad en fresco de 75,63 en comparación con el obtenido en la colecta manual de 90,38.

Andrade (2005) evaluó la motilidad total (MT) y progresiva (MP) post refrigeración usando el diluyente tris, fructuosa y ácido cítrico obteniendo los siguientes resultados a las 24 horas MT 92, 07 y MP 59,97; a las 48 horas MT 84, 93 MP 49,92 a las 72 horas MT 80,68 y MP 35,76 a las 96 horas MT 67,51 MP 27,89 y a las 168 horas MT 51,33 MP 32,00 estos valores no coinciden con los encontrados en nuestro estudio el tratamiento tres a las 24 horas 83,75; a las 48 horas 75; a las 72 horas 65; a las 96 horas 52,5; a las 168 horas 3,75.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de la investigación se puede realizar las siguientes conclusiones:

- ✓ Las muestras obtenidas de los epidídimos y diluidas con CaniPRO más yema de huevo y CaniPlus Chill fueron óptimas para inseminación hasta las 24 horas post refrigeración.

- ✓ Las muestras de semen obtenidas mediante colecta manual y diluidas con CaniPRO más yema de huevo fueron recomendables para la inseminación hasta las 168 horas.

- ✓ Las muestras de semen obtenido mediante colecta manual y diluidas con CaniPlus Chill estuvieron óptimas hasta las 96 horas.

- ✓ La mejor fuente de colecta fue la manual ya que se obtuvieron mayores porcentajes de motilidad individual.

- ✓ El mejor diluyente fue el CaniPRO más yema de huevo ya que pudo conservar el semen por mayor tiempo.

7. RECOMENDACIONES

Los resultados de la investigación permiten realizar las siguientes recomendaciones:

- ✓ Si se requiere almacenar el semen por mayor tiempo se recomienda utilizar el diluyente CaniPRO más yema de huevo.

- ✓ Se recomienda utilizar muestras de semen con una buena calidad espermática para refrigerar ya que podrán ser almacenadas por más tiempo.

- ✓ Evitar cambios de temperatura.

- ✓ Si se va a refrigerar semen proveniente de los epidídimos se recomienda que el tiempo entre la castración y la refrigeración sea lo más corto posible.

- ✓ Se recomienda lavar el prepucio antes de la colecta para evitar la contaminación del semen.

- ✓ Se recomienda realizar la colecta de semen manual en un lugar tranquilo sin ruido para evitar que el can se ponga nervioso.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Aguilar H., Costa M., Abreu J. y Abreu P. 1994. Coleta e avaliação de sêmen canino. Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia. 46: 537-544.
- ✓ Alamo D. 2007. Crioconservación y Viabilidad espermática en la especie canina: utilización de Nitrógeno líquido vs Ultracongelador de – 152 ºC. Trabajo para optar al grado de Doctor en Veterinaria. Departamento de patología animal, producción animal, Bromatología y tecnología de los alimentos. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 234p.
- ✓ Altamirano L. y Pereira P. 2011. Evaluación de la fertilidad del semen canino fresco y congelado, en un perro de raza pitbull terrier, utilizando 3 diluyentes en la Clínica Veterinaria los Andes en Quito. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 145p.
- ✓ Andrade A. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Memoria para optar al grado de Doctor en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad Complutense de Madrid.287p.
- ✓ Angulo S. 2011. Reproducción y Neonatología canina y felina. Editorial Servet. Navarra España. 238p.
- ✓ Antypas S., Sofikitis N., Rodríguez F., Zavos M. y Miyagawa I. 1994. Bilateral effect of unilateral vasectomy on testicular testosterone biosynthesis. J Pediatric surgery 29: 828-831.
- ✓ Arango M. y Rendón L. 2009. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. Trabajo de grado para optar al título de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Biotecnología Reproductiva. Universidad CES. Medellín.

- ✓ Armas S. 2009. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 80 p
- ✓ Baquero J., Pardo E. y Cruz P. 2004. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. Revista Orinoquia, vol. 8, núm. 1, 2004, pp. 26 – 33. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89680106. (Consultado: Octubre 23, 2013).
- ✓ Blackshaw A. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. Australian journal of biological sciences. 7: 573-582.
- ✓ Bonilla C. y Ballesteros R. 2007. Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando Glicerol, Etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el Diluyente Tris-Glucosa-Yema de Huevo. Trabajo de Grado Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de La Salle. 84p.
- ✓ Buriticá E., Villanueva L. y Hernández L. 2009. ¿Cómo hacer una evaluación espermática en caninos? Revista Colombiana de Ciencia Animal. Vol. 2, No. 2.Disponible en: revistas.ut.edu.co. (Consultado Octubre 23, 2013).
- ✓ Carlotto G. 2009. Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Peru. 54p.
- ✓ Chen Y., Foote H. y Brockett C. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology 30: 423-431.

- ✓ Corti L. 2003. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*Canis familiaris*), en ova recuperadas de perras en celo inducido. Tesis Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. 71p.
- ✓ Corrada Y., De la Sota E., Giménez A., Fernández L. y Gobello C. 2006. El espermograma en la reproducción canina. Departamento Técnico Vital Can. Investigación y Desarrollo. Ciudad de Buenos Aires. Facultad de Veterinaria. UNLP. Obtenido de: (Consultado: Octubre 20, 2013).
- ✓ CRIOCEL. 2002. Semen Congelado. Obtenido de: http://www.cryocel.com. Consultado (Octubre 16, 2013).
- ✓ Cuadra M. 2012. Evaluación de semen congelado de caninos de dos a cinco años de edad con triladyl canine con yema de huevo al 10%, 20%, y 30% en el consultorio Veterinario la Quinta Pata del Gato. Tesis Medicina Veterinaria. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. UTC. Latacunga. 78p.
- ✓ Domínguez M. 2013. Alteraciones de la morfología espermática. Obtenido de: ftp://fmvz.uat.edu.mx. (Consultado, Septiembre 12, 2013).
- ✓ Esquivel C. 2013. Sistema Reproductor. Medicina veterinaria y zootecnia. MPA. Obtenido de: http://www.uv.mx. (Consultado Septiembre 9, 2013). 59p
- ✓ FAUBA. 2008. Anatomía y fisiología de la reproducción en machos. Obtenido de: www.agro.uba.ar. (Consultado Septiembre 20, 2013).
- ✓ Federación Canófila Mexicana. 2010. Manual de Reproducción Canina. Obtenido de: http://www.fcm.mx. (Consultado Septiembre 12, 2013). 48p.
- ✓ Foulkes J. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 49: 277-284.
- ✓ Graham J. y Foote R. 1987. Effects of several lipids, fatty acil chain

length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology 24: 42-52.

- ✓ Hernández P., Gutiérrez R., Fernández R. y Gómez N. 2004. Obtención y caracterización de espermatozoides procedentes de tres zonas del epidídimo de caninos. Revista de Salud Animal. Vol. 26 No. 1: 53-57.
- ✓ Hewitt A., Leahy R., Sheldon M. y England C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. Animal Reproduction. Sc. 67: 101-111.
- ✓ Hishinuma M. y Sekine J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. Journal of Veterinary Medical Science 65: 817-820.
- ✓ Hori T., Hagiuda K., Endo S., Hayama A., Kawakami E. y Tsutsui T. 2005. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymides. Journal of Veterinary Medical Science 67: 1141-1147.
- ✓ Islas E y Gutiérrez J.2007. Manual de Prácticas de Reproducción Animal Asistida. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Clínica Veterinaria. 51p.
- ✓ Kampschmidt R., Mayer D. y Herman H. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. Journal of Dairy Science 36: 733-742.
- ✓ Keuerk M. 2013.Utilización de mediciones testiculares y evaluación seminal estacional en perros ovejero alemán. Tesis de grado para obtener el título en Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo Uruguay.42p.
- ✓ Martins M. 2005. Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães. Tesis de doctorado em Reprodución Animal. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 123 p.
- ✓ Martínez A., Romero C., García A., Carrillo M. y Santiago J. 2009. Evaluación de semen en Pastor Alemán. Policlínica Veterinaria y de Asesoría Zootécnica de la UAM-X (POLIVET-AZ).

- ✓ Martínez F., Macías G., Álvarez M., Chamorro C., Herráez P., Paz P. y Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epidydimis of Iberian red deer. Theriogenology.65: 471
- ✓ Melgarejo C. 2013. Espermatogénesis. Obtenido de: www.vetrepro.cl. (Consultado, Septiembre 6, 2013).
- ✓ Mellisho E. 2008. Espermatogénesis. Disponible en: www.tarwi.lamolina.edu.p e. (Consultado Septiembre 4, 2013).
- ✓ Mellisho E. 2010. Evaluación de calidad seminal. Manual de laboratorio de reproducción animal. Obtenido de: www.tarwi.lamolina.edu.pe. (Consultado Septiembre 20, 2013).
- ✓ MINITUBE. 2013. Catalogo tecnología reproducción animal canina. Obtenido de: www.minitube.de. (Consultado Octubre 20. 2013).
- ✓ Ochoa A y Torres L. 2012. Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial. Título de Médico veterinario zootecnista. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Cuenca. 114p.
- ✓ Oettlé EE. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. Journal Reproduction Fertility 47: 257-260.
- ✓ Olar T., Amann P. y Pickett W. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. Biology of Reproduction 29: 1114-1120.
- ✓ Páramo R. 2009. Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de México. 235p. Obtenido de: www.fmvz.unam.mx. (Consultado Noviembre 20, 2013).
- ✓ Peña I., Quintela A. y Herradón G. 1998Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. Theriogenology 50: 1211-1220.
- ✓ Piñero J. 2009. Espermatogénesis. Obtenido de: http://personal.us.es. (Consultado Septiembre 18, 2013).

- ✓ Ponglowhapan S., Chatdarong K., Sirivaidyapong S. y Lohachit C. 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. Theriogenology 66: 1633-1636.
- ✓ Quinn P., Chow P. y White I. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. Journal of Reproduction and Fertility 60: 403-407
- ✓ Root. M. 2005. Manual de Reproducción del perro y el gato. 1° edición. Editorial Multimedica Ediciones Veterinarias. Barcelona España.
- ✓ Sánchez A., Cartagena A. y Berland M. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. Revista investigaciones Veterinarias. Perú. v.17 n.1 Lima pp 1-7. Disponible en: www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n1/a01v17n1 (Consultado Julio 12, 2014).
- ✓ Sirivaidyapong S., Cheng P., Marks A., Voorhout F., Bevers M. y Colenbrander B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. Theriogenology. Vol. 53, No. 3, pp. 789 – 802.
- ✓ Taha B., Noakes E. y Allen E. 1981. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. Journal of Small Animal Practice - 22: 177-184.
- ✓ Van der horst J. y Grooten J.1966. The occurrence of hypotaurine and other sulgur-containnig aminoacids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. Biochimica et Biophysica Acta 117: 495-497.
- ✓ Watson P. y Martin I. 1975. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen spermatozoa. Australian Journal of Biological Sciences 28: 153-9.

9. ANEXOS

9.1. FOTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"Evaluación de la calidad seminal en fresco y refrigerado del semen de perro (*Canis familiaris*) proveniente de colecta in vivo y en epidídimos post castración"

9.1.1. Colecta Manual

Figura 27. Golden Retriever

Figura 28. Yorkshire

Figura 29. Cocker

Figura 30. Beagle

Figura 31. Bulldog

Figura 32. Pekinés

Figura 33. Evaluación del volumen y color

Figura 34. Evaluacion microscópica

Figura 35. Morfología

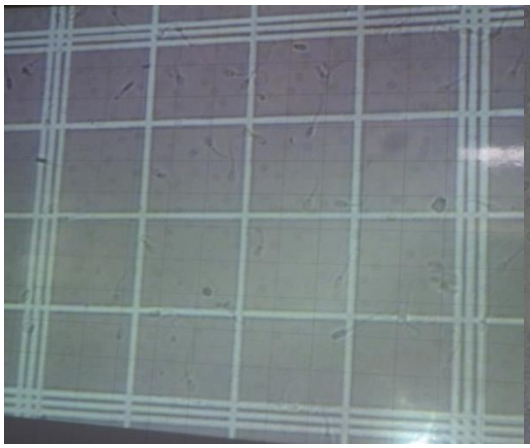

Figura 36. Concentración

Figura 37. Viabilidad

9.1.2. Epidídimos Castración

Figura 38. Castración

Figura 39. Termo

Figura 40. Epidídimos en maceración

Figura 41. Centrifugación del semen

Figura 42. Baño María

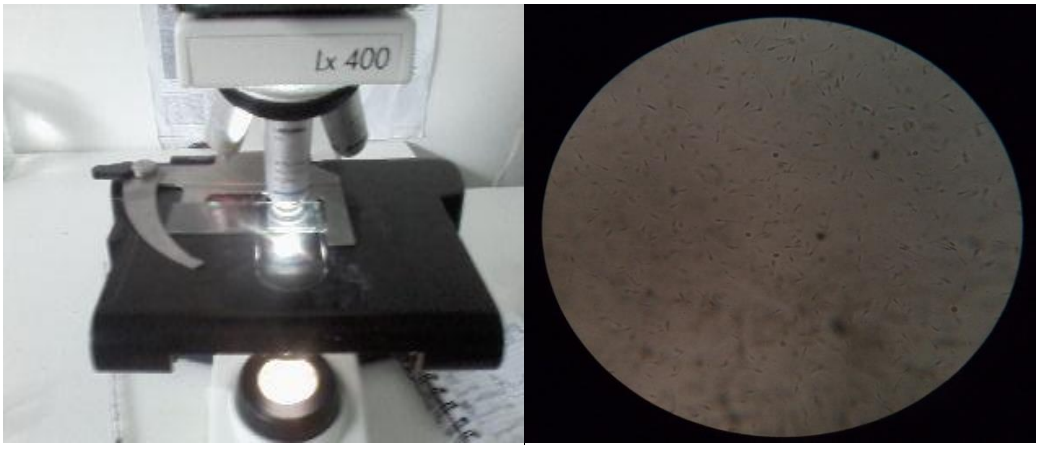

Figura 43. Evaluación Motilidad individual

9.1.3. Preparación del Diluyente CaniPRO

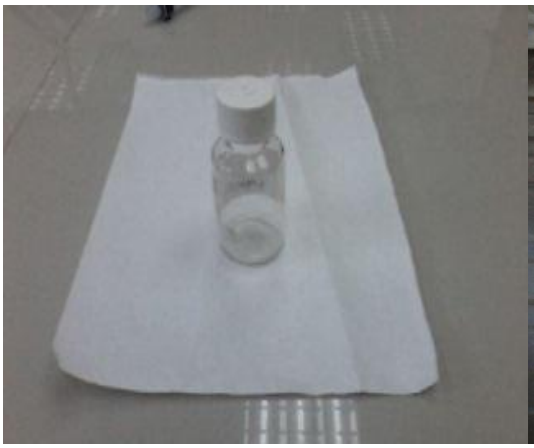

Figura 44. Diluyente CaniPRO

Figura 45. Yema de huevo

9.1.4. Evaluación Post Refrigeración Cada 24 Horas

Figura 46. Semen en refrigeración

Figura 47. Motilidad individual

Figura 48. Visitas de campo al lugar de investigación

9.2. ANÁLISIS DE VARIANZA Y PRUEBA DE DUNCAN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS EN FRESCO

9.2.1. Motilidad Individual

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	70	80	90	90
2	85	60	95	90
3	90	60	98	85
4	70	90	80	95
TOTAL	315	290	363	360
PROMEDIO	157,50	72,50	90,75	90,00

CV: 12,20

Análisis de varianza del % de motilidad individual

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	949,50	3	3,09	9,30	0,0680
Error	1230,50	12	102,54		
Total	2180,00	15			

Duncan Alfa=0,05

Error: 102,5417 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
3	90,75	4	5,06	A
4	90,00	4	5,06	A
1	78,75	4	5,06	A B
2	72,50	4	5,06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.2.2. Motilidad Masal

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	5	3	5	5
2	4	4	4	5
3	4	4	5	5
4	4	4	5	5
TOTAL	17	15	19	20
PROMEDIO	4,25	3,75	4,75	5,00

CV: 9,76

Análisis de varianza para la variable motilidad masal

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	3,69	3	1,23	6,56	0,0071
Error	2,25	12	0,19		
Total	5,94	15			

Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1875 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	5,00	4	0,22	A
3	4,75	4	0,22	A B
1	4,25	4	0,22	B C
2	3,75	4	0,22	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.2.3. Concentración Espermática

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	1190	1295	630	440
2	380	1285	830	1280
3	610	450	695	1610
4	700	1280	600	475
TOTAL	2880	4310	2755	3805
PROMEDIO	720,00	1077,50	688,75	951,25

Análisis de varianza para la concentración espermática

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	418231,25	3	139410,42	0,86	0,4862
Error	1935662,50	12	161305,21		
Total	2353893,75	15			

CV: 46,73

Duncan Alfa=0,05

Error: 161305,2083 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
2	1077,50	4	200,81	A
4	951,25	4	200,81	A
1	720,00	4	200,81	A
3	688,75	4	200,81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.2.4. Espermatozoides Normales

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	90,5	86	97	89,5
2	80	93,5	68,5	92,5
3	89	87,5	97,5	91,5
4	85	85	87,5	84,5
TOTAL	344,5	352	350,5	358
PROMEDIO	86,13	88,00	87,63	89,50

CV: 8,69

Análisis de varianza para % de espermatozoides normales

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	23,06	3	7,69	0,13	0,9392
Error	698,88	12	58,24		
Total	721,94	15			

Duncan Alfa=0,05

Error: 58,2396 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	89,50	4	3,82	A
2	88,00	4	3,82	A
3	87,63	4	3,82	A
1	86,13	4	3,82	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.2.5. Espermatozoides Anormales

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	9,5	14	3	10,5
2	20	6,5	31,5	7,5
3	11	12,5	2,5	8,5
4	15	15	12,5	15,5
TOTAL	55,50	48	49,5	42
PROMEDIO	13,88	12,00	12,38	10,5

CV: 62,62

Análisis de varianza para % de espermatozoides anormales

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	23,06	3	7,69	0,13	0,9392
Error	698,88	12	58,24		
Total	721,94	15			

Duncan Alfa=0,05

Error: 58,2396 **gl:** 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	13,88	4	3,82	A
3	12,38	4	3,82	A
2	12,00	4	3,82	A
4	10,50	4	3,82	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.2.6. Viabilidad Espermática

Nº Animal	T1	T2	T3	T4
1	99,5	96	99,5	97
2	99	99	92,5	99
3	98,5	99,5	99	98,5
4	98	98,5	95	99
TOTAL	395	393	386	393,5
PROMEDIO	98,75	98,25	96,50	98,38

CV: 1,97

Análisis de varianza para % de viabilidad

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	12,05	3	4,02	1,08	0,3951
Error	44,69	12	3,72		
Total	56,73	15			

Duncan Alfa=0,05

Error: 3,7240 **gl:** 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	98,75	4	0,96	A
4	98,38	4	0,96	A
2	98,25	4	0,96	A
3	96,50	4	0,96	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p> 0,05)

9.3. CALIDAD DEL SEMEN POST REFRIGERACIÓN

9.3.1. % de Motilidad Individual a las 24 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	60	75	80	85	
2	75	50	90	87	
3	80	50	95	85	
4	60	80	70	95	
Total	275	255	335	352	
Promedio	68,75	63,75	83,75	88	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	530	66,25	**T**	627	78,375
Ey	687	85,875	**CH**	590	73,75

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 14,82

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	1626,69	542,23	4,27	0,0287
Fuentes de colecta	1	1540,56	1540,56	12,13	0,0045
Diluyentes	1	85,56	85,56	0,67	0,4278
FXD	1	0,56	0,56	4,4E-03	0,9480
Error	12	1524,25	127,02		
Total	15	3150,94			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 127,02 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	85,88	8	3,98	A
E	66,25	8	3,98	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 127,02 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	78,38	8	3,98	A
CH	73,75	8	3,98	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 127,02 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.			
4	88	4	5,64	A		
3	83,75	4	5,64	A	B	
1	68,75	4	5,64		B	C
2	63,75	4	5,64			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.2. % de Motilidad Individual a las 48 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	50	60	70	80	
2	60	45	85	85	
3	70	40	80	80	
4	45	75	65	90	
Total	225	220	300	335	
Promedio	56,25	55	75	83,75	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	445	55,63	**T**	560	70,0
Ey	635	79,38	**Ch**	520	65,0

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 16,21

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p- valor
Tratamientos	3	2412,50	804,17	6,71	0,0065
Fuentes de colecta	1	2256,25	2256,25	18,83	0,0010
Diluyentes	1	100,00	100,00	0,83	0,3789
FXD	1	56,25	56,25	0,47	0,5062
Error	12	1437,50	119,79		
Total	15	3850,00			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 119,7917 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	79,38	8	3,87	A
E	55,63	8	3,87	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 119,7917 **gl:** 12

Diluyente	Medias	n	E.E.	
T	70,00	8	3,87	A
Ch	65,00	8	3,87	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 119,7917 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	83,75	4	5,47	A
3	75,00	4	5,47	A
1	56,25	4	5,47	B
2	55,00	4	5,47	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.3. % Motilidad Individual a las 72 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	**Ch**	**Ch**	**T**	
1	40	45	60	70	
2	45	35	80	80	
3	60	25	70	78	
4	30	60	50	88	
Total	175	165	260	316	
Promedio	43,75	41,25	65	79	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	340	42,5	**T**	491	61,375
Ey	576	72	**Ch**	425	53,125

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 21,40

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	3885,50	1295,17	8,63	0,0025
Fuentes de colecta	1	3481,00	3481,00	23,19	0,0004
Diluyentes	1	272,25	272,25	1,81	0,2030
FXD	1	132,25	132,25	0,88	0,3665
Error	12	181,50	150,13		
Total	15	5687,00			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 150,1250 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	72,00	8	4,33	A
E	42,50	8	4,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyentes

Error: 150,1250 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	61,38	8	4,33	A
Ch	53,13	8	4,33	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 150,1250 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	79,00	4	6,13	A
3	65,00	4	6,13	A
1	43,75	4	6,13	B
2	41,25	4	6,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.4. % de Motilidad Individual a las 96 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	30	35	50	68	
2	40	20	70	75	
3	40	15	50	75	
4	20	50	40	85	
Total	130	120	210	303	
Promedio	32,5	30	52,5	75,75	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	250	31,25	**T**	433	54,125
Ey	513	64,125	**Ch**	330	41,25

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 24,57

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	5416,69	1805,56	13,16	0,0004
Fuentes de colecta	1	4323,06	4323,06	31,50	0,0001
Diluyentes	1	663,06	663,06	4,83	0,0483
FXD	1	4030,56	4030,56	3,14	0,1019
Error	12	1646,75	137,23		
Total	15	7063,44			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 137,2292 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	64,13	8	4,14	A
E	31,25	8	4,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 137,2292 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	54,13	8	4,14	A
Ch	41,25	8	4,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 137,2292 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	75,75	4	5,86	A
3	52,50	4	5,86	B
1	32,50	4	5,86	C
2	30,00	4	5,86	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.5. % de Motilidad Individual a las 120 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	**Ch**	**Ch**	**T**	
1	20	20	40	60	
2	25	5	30	70	
3	30	5	35	70	
4	10	30	30	82	
Total	85	60	135	282	
Promedio	21,25	15	33,75	70,5	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	145	18,125	**T**	367	45,875
Ey	417	52,125	**Ch**	195	24,375

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 25,73

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	P-valor
Tratamientos	3	7403,25	2467,75	30,20	<0,0001
Fuentes de colecta	1	4624,00	4624,00	56,59	<0,0001
Diluyentes	1	1849,00	1849,00	22,63	0,0005
FXD	1	930,25	930,25	11,39	0,0055
Error	12	980,50	81,71		
Total	15	8383,75			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 81, 7083 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	52,13	8	3,20	A
E	18,13	8	3,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 81, 7083 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	45,88	8	3,20	A
Ch	24,38	8	3,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 81, 7083 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
4	70,50	4	4,52	A	
3	33,75	4	4,52	B	
1	21,25	4	4,52	B	C
2	15,00	4	4,52		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.6. % de Motilidad Individual a las 144 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	15	10	15	50	
2	15	1	5	68	
3	15	3	5	67	
4	3	15	15	78	
Total	48	29	40	263	
Promedio	12	7,25	10	65,75	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	77	9,625	**T**	311	38,875
Ey	303	37,875	**Ch**	69	8,625

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 33,01

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	9453,50	3151,17	51,27	<0,0001
Fuentes de colecta	1	3192,25	3192,25	51,94	<0,0001
Diluyentes	1	3660,25	3660,25	59,56	<0,0001
FXD	1	2601,00	2601,00	42,32	<0,0001
Error	12	737,50	61,46		
Total	15	10191,00			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 6145,83 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	37,88	8	2,77	A
E	8,63	8	2,77	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyentes

Error: 6145,83 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	38,88	8	2,77	A
Ch	8,63	8	2,77	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 6145,83 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	65,75	4	3,92	A
1	12,00	4	3,92	B
3	10,00	4	3,92	B
2	7,25	4	3,92	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.7. % de Motilidad Individual a las 168 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	**Ch**	**Ch**	**T**	
1	5	2	5	45	
2	8	0	0	65	
3	5	0	0	60	
4	0	8	10	70	
Total	18	10	15	240	
Promedio	4,5	2,5	3,75	60	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	28	3,5	**T**	258	32,25
Ey	255	31,875	**Ch**	25	3,125

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 36,30

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	9556,69	3185,56	77,26	<0,0001
Fuentes de colecta	1	3220,56	3220,56	78,11	<0,0001
Diluyentes	1	3393,06	3393,06	82,30	<0,0001
FXD	1	2943,06	2943,06	71,38	<0,0001
Error	12	494,75	41,23		
Total	15	10051,44			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 41, 2292 gl: 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	31,88	8	2,27	A
E	3,50	8	2,27	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 41, 2292 **gl:** 12

Diluyente	Medias	n	E.E.	
T	32,25	8	2,27	A
Ch	3,13	8	2,27	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 41, 2292 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	60,00	4	3,21	A
1	4,50	4	3,21	B
3	3,75	4	3,21	B
2	2,50	4	3,21	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.8. % de Motilidad Individual a las 192 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	1	0	0	40	
2	2	0	0	50	
3	2	0	0	50	
4	0	0	5	60	
Total	5	0	5	200	
Promedio	1,25	0	1,25	50	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	5	0,625	**T**	205	25,625
Ey	205	25,625	**Ch**	5	0,625

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 32,73

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	7256,25	2418,75	131,04	<0,0001
Fuentes de colecta	1	2500,00	2500,00	135,44	<0,0001
Diluyentes	1	2500,00	2500,00	135,44	<0,0001
FXD	1	2256,25	2256,25	122,23	<0,0001
Error	12	221,50	18,46		
Total	15	7477,75			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 18,4583 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	25,63	8	1,52	A
E	0,63	8	1,52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyente

Error: 18,4583 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	25,63	8	1,52	A
Ch	0,63	8	1,52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 18,4583 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	50,00	4	2,15	A
1	1,25	4	2,15	B
3	1,25	4	2,15	B
2	0,00	4	2,15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.9. % de Motilidad Individual a las 216 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	0	0	0	36	
2	0	0	0	40	
3	0	0	0	45	
4	0	0	0	50	
Total	0	0	0	171	
Promedio	0	0	0	42,75	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	0	21,375	**T**	171	21,375
Ey	171	0	**Ch**	0	0

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 28,43

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	5482,69	1827,56	198,02	<0,0001
Fuentes de colecta	1	1827,56	1827,56	198,02	<0,0001
Diluyentes	1	1827,56	1827,56	198,02	<0,0001
FXD	1	1827,56	1827,56	198,02	<0,0001
Error	12	110,75	9,23		
Total	15	5593,44			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 9, 2292 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	21,38	8	1,07	A
E	0,00	8	1,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyentes

Error: 9, 2292 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	21,38	8	1,07	A
Ch	0,00	8	1,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 9, 2292 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	42,75	4	1,52	A
1	0	4	1,52	B
3	0	4	1,52	B
2	0	4	1,52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.10. % de Motilidad Individual a las 240 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	0	0	0	20	
2	0	0	0	35	
3	0	0	0	30	
4	0	0	0	40	
Total	0	0	0	125	
Promedio	0	0	0	31,25	
Fuente de colecta	Total	Promedio	Diluyente	Total	Promedio
E	0	0	T	125	15,625
Ey	125	15,625	Ch	0	0

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 54,55

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	2929,69	976,56	53,57	<0,0001
Fuentes de colecta	1	976,56	976,56	53,57	<0,0001
Diluyentes	1	976,56	976,56	53,57	<0,0001
FXD	1	976,56	976,56	53,57	<0,0001
Error	12	218,75	18,23		
Total	15	3148,44			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 18,2292 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	15,63	8	1,51	A
E	0,00	8	1,51	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyentes

Error: 18,2292 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	15,63	8	1,51	A
Ch	0,00	8	1,51	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 18,2292 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	31,25	4	2,13	A
1	0	4	2,13	B
3	0	4	2,13	B
2	0	4	2,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

9.3.11. % de Motilidad Individual a las 264 Horas Post Refrigeración

Nº Animal	Fuente de colecta (E)		Fuente de colecta (Ey)		
	T	Ch	Ch	T	
1	0	0	0	3	
2	0	0	0	20	
3	0	0	0	15	
4	0	0	0	25	
Total	0	0	0	63	
Promedio	0	0	0	15,75	
Fuente de colecta	**Total**	**Promedio**	**Diluyente**	**Total**	**Promedio**
E	0	0	**T**	63	7,875
Ey	63	7,875	**Ch**	0	0

E: Epidídimos, **Ey:** Manual, **T:** CaniPRO, **Ch:** CaniPlus Chill

CV: 119,74

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamientos	3	744,19	248,06	11,16	0,0009
Fuentes de colecta	1	248,06	248,06	11,16	0,0059
Diluyentes	1	248,06	248,06	11,16	0,0059
FXD	1	248,06	248,06	11,16	0,0059
Error	12	266,75	22,23		
Total	15	1010,94			

Prueba de Duncan

Fuente de colecta

Error: 22,2292 **gl:** 12

Fuente de colecta	Medias	n	E.E.	
Ey	7,88	8	1,67	A
E	0,00	8	1,67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Diluyentes

Error: 22,2292 **gl:** 12

Diluyentes	Medias	n	E.E.	
T	7,88	8	1,67	A
Ch	0,00	8	1,67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tratamientos

Error: 22,2292 **gl:** 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
4	15,75	4	2,37	A
1	0	4	2,37	B
3	0	4	2,37	B
2	0	4	2,37	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)