

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ERICK RICARDO TELLO LANDETA

**TRABAJO DE INVESTIGACION ESTRUCTURADO DE MANERA
INDEPENDIENTE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**“EFECTO DEL DILUYENTE SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA
PARA LA CONSERVACIÓN DE SEMEN A DIFERENTES
TEMPERATURAS EN CANINOS”**

CEVALLOS-ECUADOR

2015

CERTIFICACION DEL TUTOR

En mi calidad de tutora del trabajo de investigación sobre el tema:

“VIABILIDAD ESPERMATICA MEDIANTE USO DE DILUYENTE PARA LA CONSERVACION DE SEMEN CANINO” de Erick Ricardo Tello Landeta estudiante de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, considero que reúne todos los requisitos y méritos suficientes para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista tras ser evaluado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Ambato, Agosto del 2015

El TUTOR

.....
Dra. Mayra Montero

DERECHO DEL AUTOR

Presentar esta tesis como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de Tercer Nivel en la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que haga de esta tesis un documento disponible para su lectura, según las normas de la universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de esta tesis dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer de mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de esta tesis o parte de ella.

.....
Erick Ricardo Tello Landeta

CI. 180379450-0

AUTORIA

Los criterios contenidos en el trabajo de investigación: “Viabilidad espermática mediante el uso de diluyente para la conservación de semen canino” como también en los contenidos, ideas, criterios, condiciones y propuesta son de exclusiva responsabilidad del autor de este Proyecto de Investigación de Grado.

Ambato, 25 Agosto del 2014

Autor:

.....
ERICK RICARDO TELLO LANDETA

DEDICATORIA

A Dios quien siempre me apoyado y me ha guiado desde la niñez, gracias a Él he llegado a ser la persona que soy, este nuevo logro en mi vida es gracias al apoyo y a el favor de Él conmigo. Todos mis logros son tuyos ABBA.

A mis padres quienes con mucho sacrificio, apoyo y sabios consejos, han sido parte imprescindible en la culminación de mi carrera universitaria. Este trabajo y este esfuerzo también es de ustedes, gracias.

AGRADECIMIENTO

Mi eterno agradecimiento primero a Dios por ayudarme a cumplir este objetivo, por no dejarme solo, por guiarme y guardarme en su mano durante toda mi vida, por ser bueno y fiel conmigo.

A mis maestros por inculcarme día a día todos sus valores y enseñanzas, en especial a la Dra. Maryra Montero por brindarme su apoyo, paciencia y sus conocimientos en la elaboración de la presente investigación.

Al Dr. Darwin Villamarin quien me brindó su apoyo y me permitió utilizar su clínica para el desarrollo de esta investigación, además de su ayuda en el aprendizaje teórico y práctico para llegar a la culminación de este proyecto de tesis.

En general a todas las personas que hicieron posible realizar este sueño que aunque no las nombre las tengo presente y les doy mi sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	i
Página de Certificación del tutor.....	ii
Página de Derecho de Autor.....	iii
Página de Autoría del Trabajo	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice General de Contenidos.....	vii
Índice de Tablas.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Resumen.....	xvi
Summary.....	xii

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema	1
1.2 Análisis Crítico del Problema.....	2
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo General	4
1.4.2 Objetivo Específico	4

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO E HIPOTESIS

2.1 Antecedentes Investigativos	5
2.2 Marco Conceptual.....	7
2.2.1 Anatomía del aparato reproductor del macho	7
2.2.1.1 Testículos	7
2.2.1.2 Escroto testículos	8
2.2.1.3 Cordón espermático	8
2.2.1.4 Epidídimo	9
2.2.1.5 Uretra	9
2.2.1.6 Conducto deferente	10
2.2.1.7 Glándulas accesorias	10
2.2.1.7.1 Próstata.....	10
2.2.1.7.2 Vesícula seminal	11
2.2.1.7.3 Glándula de Cowper.....	11
2.2.1.8 Pene	11
2.2.1.9 Prepucio	12
2.2.1.9 Prepucio	12
2.2.2 Fisiología del aparato reproductor canino	12
2.2.2.1 Pubertad	12
2.2.2.2 Proceso de la espermatogénesis	13
2.2.2.2.1 Espermatocitogénesis.....	13
2.2.2.2.2 Espermioogénesis	13
2.2.2.2.3 Espermiación	13
2.2.2.3 Capacitación de los espermatozoides	14
2.2.2.4 Influencia hormonal	14
2.2.2.5 Erección	14
2.2.2.6 Eyaculación	15
2.2.3 Semen.....	15
2.2.3.1 Características y componentes	15

2.2.3.1.1 Características microscópicas	16
2.2.3.1.1.1 Motilidad	16
2.2.3.1.1.2 Mortalidad	17
2.2.3.1.1.2 Morfología	17
2.2.3.2 Características de los espermatozoides	18
2.2.3.2.1 Anomalías espermáticas	19
2.2.3.2.1.1 Cabezas piriformes y angostas	19
2.2.3.2.1.2 Micro y macrocefalia	19
2.2.3.2.1.3 Formas teratoides	19
2.2.3.2.1.4 Defectos del acrosoma	20
2.2.3.2.1.5 Cabezas sueltas	20
2.2.3.2.1.6 Pieza media distal plegada	20
2.2.3.2.1.7 Colas abaxiales, accesorias y múltiples	20
2.2.3.2.1.8 Pieza principal doblada	21
2.2.3.2.1.9 Intermedia arqueada	21
2.2.3.2.1.8.10Gota citoplasmática proximal	21
2.2.3.3 Factores que influyen sobre las características seminales	22
2.2.3.4.1 Temperatura	22
2.2.3.3.2 Individuo-Raza.....	22
2.2.3.3.3 Estado de ánimo y ambiente	22
2.2.3.3.4 Edad	23
2.2.3.3.5 Ritmo de la recogida	23
2.2.3.3.6 Neutrófilos y macrófagos	23
2.2.3.3.7 Eritrocitos	24
2.2.4 Colección del semen.....	24
2.2.4.1 Instalaciones requeridas	24
2.2.4.2 Métodos de colección del semen	25
2.2.4.2.1 Método manual	25
2.2.5 Semen pre y post congelación	26
2.2.5.1 Evaluación de membranas	27
2.2.5.2 Tinciones	27
2.2.5.2.1 Eosina nigrosina	27
2.2.5.2.1 Tinción de Wright	28

2.2.6	Parámetros de evaluación	30
2.2.6.1	Motilidad espermática	30
2.2.6.2	Morfología espermática	30
2.2.6.3	Mortalidad espermática	31
2.2.7	Procesamiento, almacenamiento, descongelación y manejo	31
2.2.7.1	Evolución y desarrollo de congelación de semen canino	31
2.2.7.2	Diluyente	32
2.2.7.3	Composición	32
2.2.7.4	Otros diluyentes	32
2.2.7.5	Tasa de dilución	33
2.2.7.6	Procesamiento de semen canino	33
2.2.7.6.1	Procesamiento	33
2.2.7.6.2	Envasado	34
2.2.7.6.3	Congelación en nitrógeno líquido	34
2.2.7.6.4	Descongelación	35
2.3	Hipótesis	36
2.3.1	Variables de la hipótesis	36
2.4	Operacionalización de variables	37

CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1	Enfoque, modalidad y tipo de investigación	39
3.1.1	Enfoque	39
3.1.2	Modalidad	39
3.1.3	Tipo de investigación	39
3.2	Ubicación del ensayo	40
3.3	Caracterización del ensayo	40
3.4	Factores de estudio	41
3.5	Diseño experimental	41
3.5.1	Población	43

3.6 Datos a tomarse	43
3.6.1 Motilidad	43
3.6.2 Morfología	44
3.6.3 Mortalidad	44
3.7. Procesamiento de la información recolectada	45
3.8. Manejo de la investigación	45
3.8.1 Obtención de materiales	45
3.8.2 Proceso de recolección de semen	47
3.8.3 Evaluación de semen	47
3.8.3.1 Preparación del diluyente	47
3.8.3.2 Evaluación	48

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados, análisis estadístico y discusión	50
4.1.1 Factores en estudio	50
4.1.2 Cuadro de tratamientos y simbología	50
4.1.3 Porcentajes de evaluación de semen pre y post conservación	51
4.1.4 Análisis de varianza general (Test Tukey5%)	55
4.1.5 Análisis dentro del grupo 1 (G1).....	59
4.1.6 Análisis dentro del grupo 2 (G2).....	63
4.1.6 Análisis Comparativo entre grupos (G1 y G2)	63
4.2 Verificación de la hipótesis	71

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	72
5.2 Recomendaciones	76

CAPÍTULO VI PROPUESTA

6.1 Título.....	77
6.2 Fundamentación	77
6.3 Objetivos	77
6.3.1 Objetivo general.....	77
6.3.2 Objetivo específico.....	78
6.4 Justificación e importancia	78
6.5 Desarrollo.....	77

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía	92
--------------------	----

ANEXOS	96
---------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tablas

Tabla. 1 Resultados obtenidos en la evaluación de semen canino para el factor ``Motilidad Individual``	51
Tabla.2 Resultados obtenidos en la evaluación de semen canino para el factor ``Motilidad en masa``	52
Tabla. 3 Resultados obtenidos en la evaluación de semen canino para el factor ``Mortalidad``	53
Tabla. 4 Resultados obtenidos en la evaluación de semen canino para el factor ``Morfología``	54
Tabla. 5 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad individual`` comparados en forma general	55
Tabla. 6 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad en masa`` comparados en forma general	56
Tabla. 7 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Mortalidad`` comparados en forma general	57
Tabla. 8 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Morfología`` comparados en forma general	58
Tabla. 9 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad individual`` comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)	59
Tabla. 10 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad en masa`` comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)	60
Tabla. 11 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Mortalidad`` comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)	61
Tabla. 12 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Morfología`` comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)	62

Tabla. 13 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad individual`` comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente)	63
Tabla. 14 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad en masa`` comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente).....	64
Tabla. 15 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Mortalidad`` comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente)	65
Tabla. 16 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Morfología`` comparados dentro de Grupo 2 (Semen con diluyente).....	66
Tabla. 17 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad individual`` comparados entre el Grupo 1 (Semen sin diluyente) y el Grupo 2 (Semen con diluyente).....	67
Tabla. 18 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Motilidad en masa`` comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y el Grupo 2 (Con diluyente) .	68
Tabla. 19 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Mortalidad`` comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y el Grupo 2 (Con diluyente).....	69
Tabla. 20 Promedios porcentuales de los tratamientos del factor ``Morfología`` comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y Grupo 2 (Con diluyente)	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras

Figura 1. Anatomía del macho canino	7
Figura 2. Anatomía del perro	8
Figura 3. Túbulos seminíferos.....	9
Figura 4. Próstata canina.....	10
Figura 5. Morfología de un espermatozoide	18
Figura 6. Anomalías de los espermatozoides	18
Figura 7. Colección de semen	26
Figura 8. Localización "Clínica Veterinaria Vital Pet"	40

RESUMEN

La presente investigación tuvo como finalidad extraer, procesar y conservar semen canino mediante la evaluación del uso de diluyente, almacenándolo en a diferentes temperaturas y tiempos de conservación. Las muestras que se utilizaron pertenecieron a 10 machos caninos de raza mediana, con condiciones normales de salud y con una edad de entre 2 a 4 años. Una vez que se realizó a la recolección del semen, se separó la muestra de cada animal en 2 partes iguales para utilizar diluyente con la primera fracción y a la segunda fracción conservarla sin diluyente. Seguidamente se realizó la evaluación de las características microscópicas (Motilidad individual y en masa, mortalidad, morfología) para determinar la viabilidad que presento cada muestra. Una vez evaluadas todas las muestras, se procedió a conservarlas a diferentes temperaturas (Temperatura ambiente, Refrigeración a 5°C y Congelación a -192°C) para posteriormente realizar una nueva evaluación al transcurrir un periodo de tiempo determinado. La muestra a temperatura ambiente se la evaluó diariamente hasta que los resultados obtenidos sobrepasaran los rangos aceptables. La muestra refrigerada fue evaluada a los 15 días post-refrigeración. La muestra congelada se evaluó 30 días post congelación en nitrógeno líquido. En la parte estadística se utilizó un Diseño de completamente al azar con prueba de Tukey al 5% con 6 tratamientos y 10 repeticiones. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras que fueron conservadas con diluyente como era esperado.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to extract, to process and to preserve canine semen by means of the use of canine thinner, storing in different temperatures and times of conservation. The samples used were of 10 males canine of medium race, with a normal condition of health and with an age between 2-4 years. After realized the compilation of the semen, total volume was separated in 2 equal parts to use a thinner with the first fraction and the second fraction was preserve without thinner. Immediately was realized the evaluation of the microscopic characteristics (Individual motility, Mass motility, Mortality, Morphology) to determine the viability of every sample. Once evaluated all the samples were proceeded to preserve them at different temperatures (Temperature sets, Refrigeration or 5°C and Freezing or -192°C) and realize a new evaluation before a determinate period of time. The sample to temperature sets was evaluated every day until results exceeding the acceptable ranges. The refreshed sample was evaluated to 15 days post-refrigeration. The frozen sample evaluated 30 days post freezing in liquid nitrogen. In the statistical part a Design was use a completely at random with Tukey's test to 5% with 6 treatments and 10 repetitions. The best results were obtained in the samples that were preserved with thinner since it was awaited.

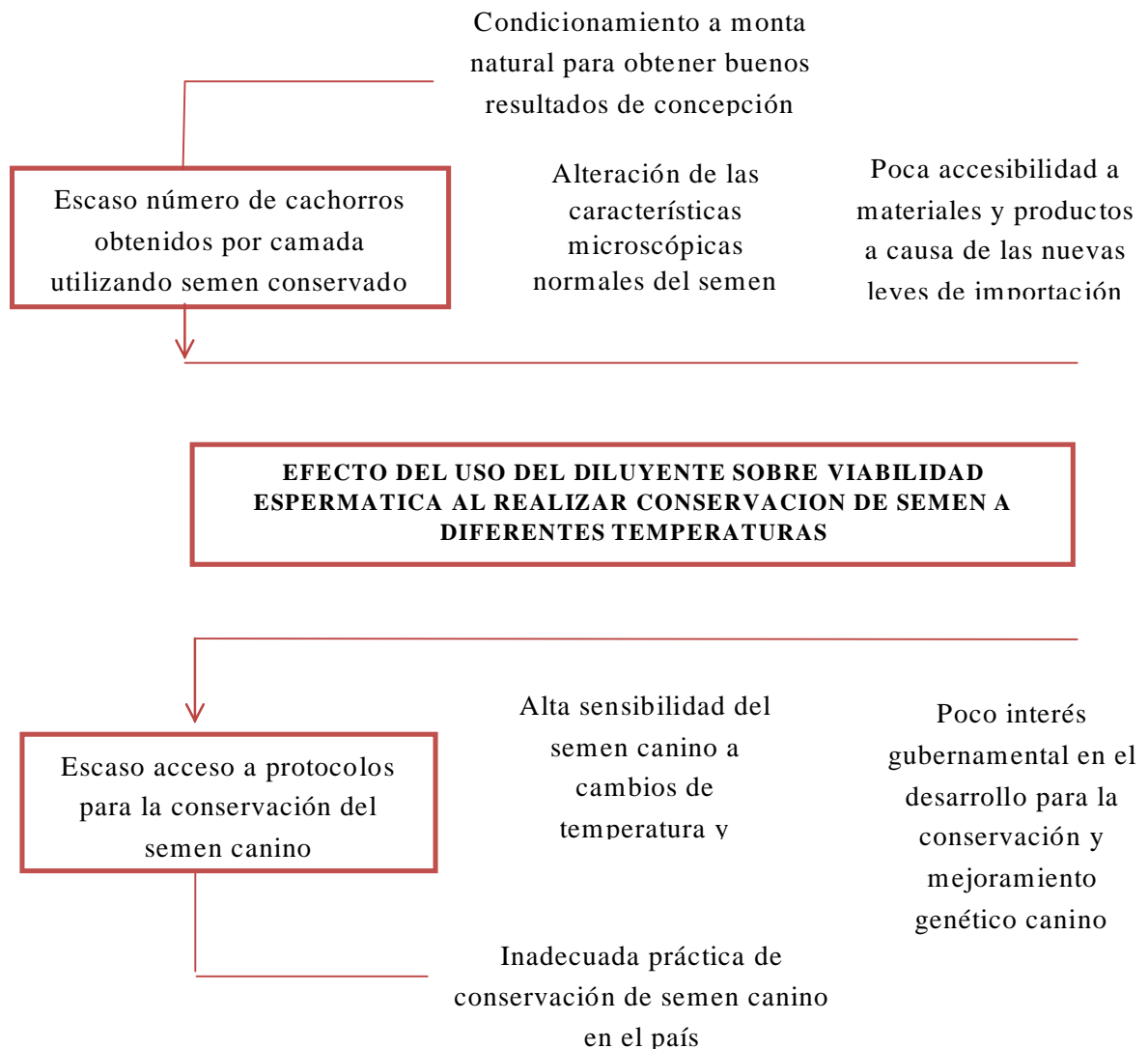
PÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las técnicas de conservación de semen y la inseminación artificial en caninos son prácticas poco conocidas en nuestro medio; estudios realizados en otros países demuestran tasas de fecundidad poco satisfactorias obtenidas con semen conservado, debido a la sensibilidad del semen cuando es sometido a cambios de temperatura. El desarrollo sobre la conservación seminal canina en nuestro país aún es escaso; recientes investigaciones todavía no demuestran los resultados esperados para poder implementar esta técnica.

1.2. ANÁLISIS CRÍTICO DEL PROBLEMA



El uso de diluyente en conservación de semen canino tienen un efecto directo sobre la viabilidad espermática debido a la sensibilidad del semen a cambios de temperatura; escasos conocimientos sobre una adecuada técnica de conservación forman parte del problema en varios países, donde los materiales y productos necesarios para realizar esta técnica no son de fácil acceso. Por tal motivo, los médicos veterinarios y criadores caninos no realizan esta técnica, ya que todavía no ofrece los resultados deseados; condicionando a la monta natural como primera opción para obtener altos porcentajes de concepción.

1.3.JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la conservación de semen y la Inseminación Artificial son prácticas confiables y ampliamente estudiadas para especies mayores como bovinos, porcinos y equinos para mantener el semen de animales con gran capacidad de transmisión genética; lamentablemente estas técnicas son poco conocidas y escasamente estudiadas en especies menores, y en nuestro país no se ha logrado implementar esta técnica debido a la indisponibilidad de materiales y el desconocimiento de la técnica.

El costo para realizar esta práctica es muy alto, lo que ha provocado que los médicos veterinarios opten por realizar únicamente inseminación artificial con semen fresco.

Debido a la escasa investigación del tema se considera que los criadores caninos no se encuentran capacitados para acceder a la técnica de conservación de semen, pero su interés en esta práctica ha crecido de gran manera en los últimos años.

Es por esto que el presente estudio pretende evaluar la viabilidad espermática mediante el uso del diluyente con diferentes técnicas de conservación, aportando un conocimiento tecnológico y científico a los Médicos Veterinarios implementando el método más idóneo para esta práctica. Con esto, podemos establecer pautas para futuras investigaciones en especies que se encuentran en peligro de extinción; contribuyendo así a la conservación de la vida animal.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del diluyente (Caniplus freeze) sobre la viabilidad espermática para la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Valorar el efecto del diluyente (Caniplus freeze) en el semen canino.
- Determinar la viabilidad espermática en diferentes técnicas de conservación.
- Analizar los resultados e identificar una técnica económica, accesible y práctica para realizar conservación de semen canino en nuestro país.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS

2.1.ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima en el periodo 2010 – 2011, el laboratorio de bioquímica y nutrición animal realizó el estudio “Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática” en donde se evidenció que la motilidad espermática se mantuvo dentro de rangos aceptables durante los días 1-4, bajando el porcentaje de motilidad progresivamente hasta llegar al 60%. Sin embargo la integridad de la membrana se mantuvo superior en los grupos que se aplicaron azúcares para su conservación. A pesar de esto, la glucosa y la sacarosa mostraron los mejores resultados de motilidad y test hipo osmótico (HOS). Por lo tanto se llegó a la conclusión de que no se genera un daño significativo sobre la membrana durante la refrigeración a 5 °C, y que el uso de cualquiera de los azúcares como sustrato energético para los espermatozoides en especial la glucosa y sacarosa, son de gran ayuda para el mantenimiento de la motilidad espermática e integridad de la membrana. **(Flores, 2011)**

En la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín durante el periodo 7 de Abril del 2011 – 12 de Diciembre del 2011, el Médico veterinario-Magister en Biotecnología-Magister en Ciencias Biomédicas Giovanni Restrepo Betancur, realizó el estudio “Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y *Dimetilformamida*” Donde la fracción espermática, pH, color, motilidad masal y concentración concordaron con lo que se reporta en la literatura.

El porcentaje de motilidad progresiva fue de 78.4%, cercano a lo reportado por Sanchez (83.3%). Este resultado cambio un poco, llegando a 78.6 % en el análisis hecho a caninos de raza Pastor alemán, lo cual sea probablemente explicado por la alta variabilidad de las características espermáticas entre las razas caninas, debido a la influencia de factores como la talla, el peso corporal de la raza, la edad, y la alimentación. Se encontró superioridad para el valor de motilidad progresiva, integridad de membrana plasmática y morfología normal en el semen fresco en comparación con el semen conservado a diferentes tratamientos. Este resultado es atribuido a los daños producidos por la preservación sobre las células por efecto del estrés térmico, toxico y osmótico originado por los crioprotectores (hiperosmolaridad) y la formación y dilución de cristales de hielo en el ambiente intracelular y extracelular. En lo que respecta a motilidad progresiva, se encontró superioridad estadística en el glicerol 5% (58%). El resultado para integridad de membrana (79.1%) en semen fresco fue similar a lo reportado por Sánchez (87.9%), siendo superior el tratamiento DMF cuando se realizó criopreservación. El porcentaje de morfología normal fue de 88.8%, similar a lo reportado por Sanchez (87.7%), y tampoco se encontró diferencia estadística entre glicerol 5%, glicerol 3% y DMF, sin embargo el tratamiento DMF fue el estadísticamente inferior a los demás. **(Restrepo, 2011)**.

En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecniade la Universidad CES Medellín-Colombia en el periodo Abril 2010 - Mayo 2011, el Grupo de Investigacion INCA-CES, realizaron el estudio “Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector”, y se determinó que la tasa de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos, que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en el misma. Los mejores resultados obtenidos para mortalidad fueron 4% y 6% . En el estudio se encontró que el menor porcentaje de mortalidad, excluyendo el control, se obtuvo en aquellas muestras que fueron sometidas a concentraciones del 6% de glicerol la mortalidad alcanzo el 28,16% . **(INCA-CES, 2011)**

En la Universidad de Viña del Mar-Chile, en la Escuela de Ciencias Agropecuarias, el Dr. Alfonso Sanchez realizo la investigación “Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la Fertilidad potencial de semen canino refrigerado” con el propósito de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales sobre la fertilidad potencial de espermatozoides caninos conservados a 4 °C, se obtuvieron 20 eyaculados mediante manipulación digital. Cada eyaculado fue evaluado a través de espermioyema y de la prueba hipoosmótica (HOST), para luego ser fraccionado y diluido en relación 1:3 con uno de los siguientes diluyentes: 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 $94.7 \pm 3.6\%$ y la respuesta a HOST de $79.8 \pm 6.6\%$. Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de motilidad progresiva e integridad de membrana con HOST a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen, observándose mayores valores de motilidad progresiva 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. En conclusión, el diluyente en base a leche descremada UHT, de fácil preparación y bajo costo, resulta una alternativa de uso en la clínica de pequeños animales. (Sanchez, A. 2007)

En la Universidad Autónoma de Yucatan-Mexico, en el Cuerpo Académico de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético. Departamento de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias el Dr. Jesus Ake-Lopez realizo la investigación “Efecto de los diluyentes Triladyl y Seagear sobre la congelación de semen canino” Con el objetivo de evaluar el efecto de dos diluyentes sobre la motilidad espermática y la proporción de muestras viables postcongelación del semen canino, se obtuvieron y procesaron 30 muestras de semen.

Cada muestra se dividió en dos fracciones iguales, la primera fracción se diluyó con el diluyente Seager (grupo Seager, n=30) y la segunda fracción con el diluyente Triladyl® (grupo Triladyl, n=30). Una vez realizada la dilución, se procedió al enfriamiento, equilibrio, envasado y congelación de las dosis (pajillas de 0.54 ml, con 50 x 10⁶ espermatozoides). La motilidad espermática se evaluó en el semen fresco/diluido, en el semen frío (4-5°C), y 72 horas después de la congelación, las dosis se descongelaron a 37 °C x 60 segundos. La motilidad espermática entre diluyentes en cada momento de evaluación se analizó mediante pruebas de “t de Student” y la proporción de muestras viables ($\geq 50\%$ de motilidad espermática postcongelación) se analizó mediante Chi cuadrada. La motilidad espermática mostró un descenso lineal del estado fresco a la descongelación, se encontró la primera diferencia en el semen frío (Triladyl = 69.6 %; Seager = 54.8%; $P < 0.05$) y posteriormente la diferencia fue mayor a la descongelación (Triladyl = 35.7%; Seager = 17.2%; $P < 0.05$).

Por último se observó que las muestras diluidas con el Triladyl presentaron mayor porcentaje de muestras viables a la descongelación (46.6 %) en comparación con las diluidas en Seager (13.3%; $P \leq 0.05$). En conclusión, bajo las condiciones del presente estudio el diluyente Triladyl, es una buena alternativa para diluir y congelar el semen canino (**Ake-Lopez, J. 2012**)

En la Universidad Estatal de Bolívar, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y Medioambiente los doctores Lenin Altamirano y Paulina Pereira realizaron la investigación “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” con el objetivo de evaluar la leche descremada UHT y el Tris frente al diluyente comercial Dog Semen Diluyente como diluyentes, su viabilidad en inseminaciones y establecer el diluyente que ofrece mejores resultados en la conservación del semen, por lo tanto mayores índices reproductivos. Se usó 8 muestras de semen canino sin diluir de un macho reproductor de raza American Pitbull Terrier de cinco años. Las muestras del semen canino fueron sometidas a un análisis macro y microscópico con el propósito de establecer la calidad de la muestra previa a su dilución, al

evaluar los tres diluyentes al término de las 72 horas el diluyente Dog semen Diluent, mantuvo el pH neutro, una viabilidad de 92.01%, una motilidad espermática de 82.95% y mortalidad espermática de 8.13%, mientras el diluyente Leche descremada UHT no elevó la viabilidad espermática y se ubicó en 80.44% de células viables; una motilidad espermática de 75.68% y mortalidad espermática de 20.28% el diluyente Tris tampoco elevó la viabilidad espermática se ubicó 73.01% de células viables; una motilidad espermática de 76.98% y mortalidad espermática de 26.61%. Debido a la relación costo-beneficio se recomienda el uso del diluyente comercial Dog Semen Diluent (Canine Pro), por no representar una elevación sustancial del costo y por mantener parámetros óptimos para la utilización de la muestra (Altamirano, L.-Pereira, P. 2011)

En la Universidad de Cuenca, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Provincia del Azuay las Doctoras Adriana Ochoa y Lissette Torres realizaron la investigación “Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial”, la finalidad de la investigación fue extraer, procesar y congelar el semen canino en nitrógeno líquido y posteriormente utilizarlo para inseminación artificial. Las muestras utilizadas fueron obtenidas de 5 machos caninos. Una vez que se realizó la recolección de la muestra espermática y su evaluación mediante contrastación seminal se mezcló con el diluyente Canipro freeze A y B. Siguiendo con el proceso se obtuvieron pajuelas de 0.25 mL las mismas que se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido. Para establecer los resultados se utilizaron los siguientes tratamientos: “A” Semen pre congelado. “B” Semen post congelado. “C” (testigo), donde se obtuvo los mejores resultados en el tratamiento C, en el factor concentración (180.0×10^6), en el factor motilidad individual (86.00×10^6) y en el factor morfología (95.00×10^6), ya que este tratamiento no fue sometido a ningún cambio, el segundo lugar lo obtuvo el tratamiento A con una concentración de (172.58×10^6), motilidad individual (94.60×10^6) y morfología (91.20×10^6), y finalmente se colocó el tratamiento B con una concentración (130.30×10^6), motilidad individual (65.00×10^6) y de morfología (79.00×10^6).

Tras la descongelación de las pajuelas caninas, se realizaron las pruebas microscópicas, en las que los porcentajes de motilidad individual, morfología y valores de concentración disminuyeron como era esperado, ubicándose dentro de los valores aceptables para su uso en la inseminación artificial (prueba de campo) de las 5 hembras caninas utilizadas en la presente investigación, obteniendo una tasa de preñez del 60%.(Ochoa-Torres, 2012)

2.2.MARCO CONCEPTUAL O CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

El sistema reproductor masculino está conformada por una parte externa y otra interna, las partes visibles son el pene y el escroto, en el cual se alojan los dos testículos. En la parte interior está la próstata, las vesículas seminales, conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas de Cowper (Parrado, Pardo, Cruz, 2007).

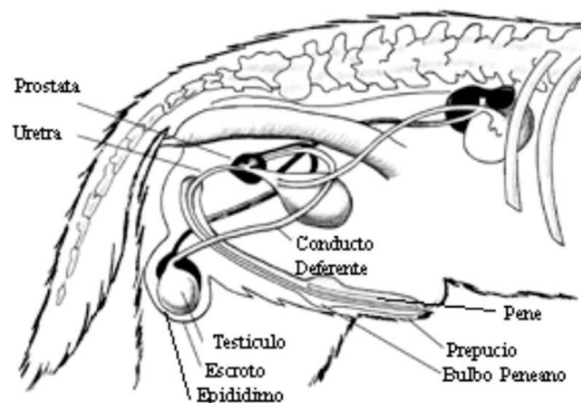


Figura 1. Anatomía del macho canino (Junco, 2008).

- **Testículos**

Son dos, de forma elipsoidal, y alojados en el escroto, están conformados por túbulos seminíferos, en donde se producen los espermatozoides. Los túbulos están revestidos por Células de Sertoli que son células de sostén y nutrición, también contiene a las células de Leydig que segregan las hormonas sexuales masculinas, principalmente la testosterona. (Kustritz M, 2008). Tiene función doble, ya que produce los gametos masculinos (espermatozoides), y generan una serie de hormonas esteroideas (Álamo, 2007).

Cuando el descenso testicular no se completa, quedando uno o ambos testículos retenidos a nivel inguinal o abdominal, se desarrolla una alteración patológica denominada criptorquidia (unilateral o bilateral respectivamente) (Alamo, 2007, Valera, 2008).

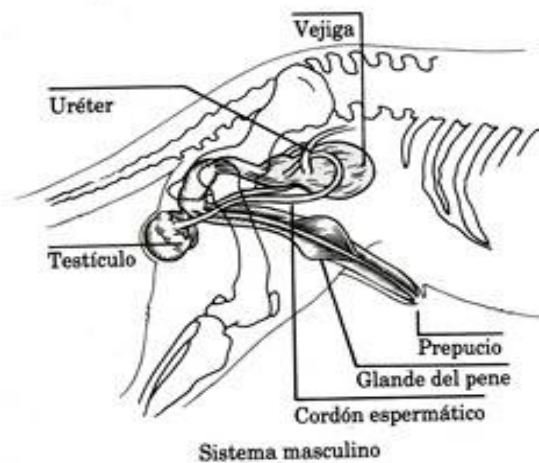


Figura 2. Anatomía del perro (L'Encis Bulldog Ingles, 2007)

- **Escroto**

Es una bolsa que protege a los testículos y los mantiene a una temperatura homogénea inferior a la corporal en unos 2 ° C para no afectar a la espermatogénesis y proteger el parénquima testicular. Esta zona de la piel está cubierta por vello genital (Valera, 2008).

- **Cordón espermático**

Discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por los siguientes componentes: Conducto deferente, músculo cremáster y vena espermática (testicular) (Alamo, 2007).

- **Epidídimo**

Es un conducto que se encuentra fuertemente enrollado sobre sí mismo y forma gradualmente el conducto deferente. Cumple la función de almacenamiento, transporte y maduración espermática. Se divide en cabeza, cuerpo y cola (Valera, 2008).

La estructura anatómica más importante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que se produce la eyaculación y desemboca en el conducto deferente. Los espermatozoides maduran a lo largo de su paso por el epidídimo; este período es de aproximadamente 14 días (Alamo, 2007).

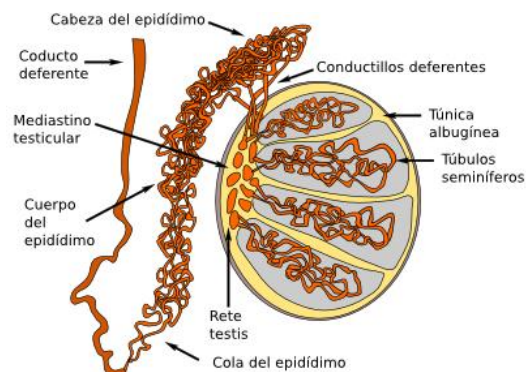


Figura 3. Túbulos seminíferos (Atlas de histología vegetal y animal, 2008)

- **Uretra**

Es un conducto que transporta tanto la orina desde la vejiga, como los espermatozoides y del líquido prostático en el eyaculado (Alamo, 2007).

- **Conductodeferente**

Tiene su origen en la cola del epidídimo. Su función es transportar espermatozoides (Alamo, 2007).

Glándulas accesorias

- **Próstata**

Es una glándula simétrica, bilobulada mediante un septo intermedio. Es la única glándula significativa en el perro y se localiza en el borde craneal de la pelvis. El tamaño prostático es variable en función del peso, raza y edad del animal. En los perros, la próstata produce tanto la primera como la tercera fracción del eyaculado. (Álamo, 2007, Valera, 2008).

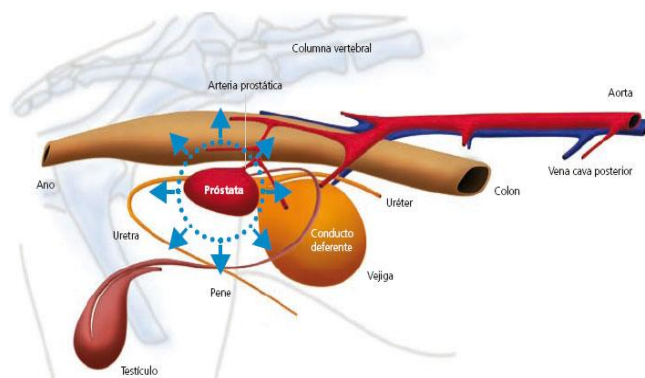


Figura 4. Próstata canina (Gil, 2009).

- **Vesícula seminal**

Las vesículas seminales son dos reservorios membranosos que se utilizan para la acumulación de esperma antes de su eliminación al exterior por el conducto deferente (Kustritz, 2009).

- **Glándula de Cowper**

También llamadas glándulas bulbo uretrales, se encuentran debajo de la próstata y secretan un líquido alcalino que lubrica y neutraliza la acidez de la uretra antes del paso del semen en la eyaculación, puede contener o no espermatozoides (Kustritz, 2009).

- **Pene**

El pene es el órgano que permite la penetración y el abotonamiento durante la cópula. En estado de flacidez el pene se encuentra totalmente dentro del prepucio. Posee un tejido eréctil (cavernoso y esponjoso) que garantiza la erección necesaria para la cópula. En el interior hay un hueso peneano, ayuda en la penetración al mantener erecto el pene (Valera, 2008).

Tiene 4 porciones bien definidas: Raíz del pene, cuerpo del pene, glande del pene o glans penis Se subdivide en: Bulbo peneano o Porción larga del pene o Hueso peneano, Ampolla (Alamo, 2007).

- **Prepucio**

Es una vaina tubular que se origina y es continuación de la piel del abdomen, y que recubre el pene flácido en su totalidad. Segrega un líquido verdoso denominado esmegma que lubrica el pene y que es completamente normal (Valera, 2008).

2.2.2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR CANINO

- **Proceso de la espermatogénesis:**

Espermatocitogénesis

Es la formación de espermátides a partir de las espermatogonias (Gobello, 2008).

Espermiogénesis

Las espermátidas se transforman en espermátidas maduras que se liberarán al lumen de los túbulos seminíferos, transformadas en espermatozoides (Alamo, 2007).

Espermiación

Es la liberación de los espermatozoides desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Alamo, 2007).

Capacitación de los espermatozoides

Se da mientras los espermatozoides avanzan por la región caudal del istmo del oviducto. Solamente los espermatozoides vivos que tiene acrosomas reactivos pueden capacitarse (Alamo, 2007).

- **Erección**

Se inicia la erección del pene y las siguientes fases: El macho monta a la hembra e introduce el pene dentro de la vagina (penetración) mediante movimientos rítmicos, “acometida”. En este periodo se eyacula la primera fracción de semen. A continuación el perro gira (volteo) completando la erección y eyaculando la segunda fracción. Después el perro desmonta, quedando unido a la perra en sentido opuesto a ella (abotonamiento) y en esta fase tiene lugar la emisión de la tercera fracción del eyaculado. El glande se relaja y el perro se desabotona. (Manteca, 2008)

- **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”. 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”.

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% y se llama “fracción prostática” (Gobello, 2008).

2.2.3. SEMEN

Características y componentes

Inmediatamente después de la recolección, cada eyaculado deberá ser sometido a una serie de análisis de rutina. No existe una sola característica en el semen que de por sí sea capaz de evaluar la fecundidad del macho.

Características microscópicas

El examen microscópico del semen fresco es de una importancia absoluta para juzgar el destino del eyaculado obtenido, es decir su procesamiento para la posterior inseminación artificial o su descarte. Es necesario para esta evaluación que todo el material de vidrio se encuentre a 37°C (pipetas, portaobjetos, cubreobjetos, diluyentes, colorantes, etc.), utilizando el Baño María (Alamo, 2008).

- **Motilidad**

Se mide por el porcentaje de espermatozoides en movimiento, se considera el movimiento flagelar productivo en progresión rápida y lineal (DeCs, 2011).

En la valoración de la motilidad tomamos en cuenta la motilidad masal y la individual. Puede alterarse por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección. El valor normal de la motilidad del semen fresco en los perros oscila entre 85-95%. En referencia a la motilidad seminal post-congelación se describen valores superiores a 50% para considerar que tiene buena calidad. Se ha comprobado que 200 x 10⁶ espermatozoides móviles en fresco, es un buen valor para obtener tasas de fertilidad comparables a los obtenidos mediante monta natural. Al usar semen congelado y realizar una inseminación intrauterina se recomiendan que entre 150-200 x 10⁶ espermatozoides sean móviles (Alamo, 2007).

- **Mortalidad**

A través de técnicas de tinción vital se pueden diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (por la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales) las células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida. Se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco. En cuanto al semen congelado, el valor mínimo aceptable de vitalidad es del 80% (Alamo, 2007).

- **Morfología**

Es importante en la valoración de la fertilidad, con el fin de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías. Existe una alta correlación entre los defectos espermáticos e infertilidad. El uso de colorantes es importante para visualizarlos (Alamo, 2008).

La tinción más utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. Otra técnica de tinción es la de la de Azul de metileno, que de igual manera sirve para la viabilidad seminal y evaluación de las membranas, ayudándonos a diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (Serrano, 2009).

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% (Alamo, 2007).

-Secundarias: debidas a una inadecuada manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). 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. Porcentaje normal 10-20% (Alamo, 2007).

-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., (Alamo, 2007).

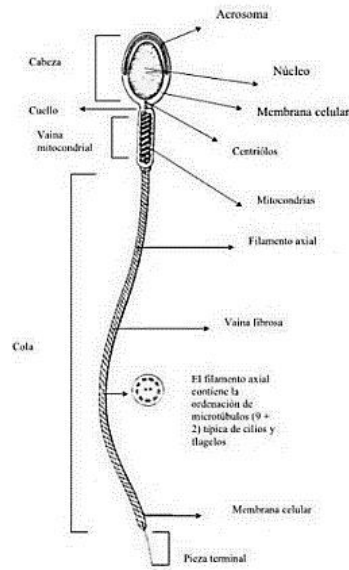


Figura 5: Morfología de un espermatozoide (Eilts, 2008).

- **Características de los espermatozoides**

La estructura básica del espermatozoide consta de partes claramente diferenciadas: La cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide (que se divide en intermedia, pieza principal, pieza terminal y el axonema (Miño, 2009).

NORMAL		
ANOMALIAS DE LA CABEZA	<ul style="list-style-type: none"> • Cabezas duplicadas • Cabezas gigantes • Cabezas pequeñas • Cabezas redondas • Cabezas alargadas • Cabezas amorfas • Cabezas encogidas 	
ANOMALIAS DEL CUELLO	<ul style="list-style-type: none"> • Engrosado • Largo • Inmaduro • Ausente 	
ANOMALIAS DE LA COLA	<ul style="list-style-type: none"> • Bifida • Mal implantada • Enrollada • Ausente 	

Figura 6. Anomalías de los espermatozoides (Quisperanda, 2008).

- **Anormalidades espermáticas**

Las anomalías espermáticas pueden presentarse por errores de la técnica de coloración o manipulación del semen, esto puede originar confusiones (Quisperanda, 2008).

- **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 (Quisperanda, 2008).

- **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 (Quisperanda, 2008).

- **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 espermatogénesis (Quisperanda, 2008).

- **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 (Quisperanda, 2008).

- **Pieza principal doblada**

La pieza principal se encuentra doblada, en forma de rulo o espiral. Se presenta generalmente asociada con la presencia de espermatozoides con las piezas medias dobladas. En la mayoría de los casos, se observa una gota citoplasmática distal en el centro del rulo. Este defecto se origina en el epidídimo (Quisperanda, 2008).

- **Pieza intermedia arqueada**

Tienen forma de arco iris o de “U”. Este defecto es generalmente producido por la tinción (Serrano, 2009).

- **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 (Serrano, 2009).

- **Factores que influyen sobre las características seminales**

Temperatura

El espermatozoide es una célula altamente sensible a cambios de temperatura y la exposición a la luz, el Médico Veterinario debe extremar sus precauciones para evitar la muerte espermática por un mal manejo de la muestra (Alamo, 2007).

Individuo-raza

Algunas investigaciones han conseguido demostrar la relación entre la raza y la calidad del 2do eyaculado. Del Pastor Alemán se puede obtener un mayor volumen seminal al igual que una mayor concentración total cuando se realiza una segunda recogida, en comparación con otras razas (Alamo, 2007).

Estado de ánimo-ambiente

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.

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 (Alamo, 2007).

Edad

La calidad seminal en animales menores de 6 meses no es muy buena, pero mejorará a partir de esta edad en aspectos como la motilidad, morfología y la concentración (Alamo, 2007).

Ritmo de la recogida

Una recogida seminal diaria produce una reducción de las reservas espermáticas en pocos días y empeora si se realizan dos. Se ha comprobado que si se logran 2 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. Si se realizan recogidas de semen cada 2 días, no ocurre una reducción significativa de las reservas espermáticas. (Gobello, 2008).

Si el periodo de abstinencia es exageradamente largo, se puede dar un envejecimiento de las reservas espermáticas, que serán excretadas con el semen o la orina (Alamo, 2007).

2.2.4 COLECCIÓN DEL SEMEN

Antiguamente se recogía el semen luego de estimular manualmente el bulbo peneano, luego se depositaba el eyaculado en un tubo de cristal calibrado y temperado (Medvet.com).

Instalaciones requeridas

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.

Métodos de colección del semen:

- **Método manual**

Se utiliza con mayor frecuencia ya que es sencilla, es barata, no afecta la calidad del eyaculado y es indolora e inocua para el animal. Puede hacerse con o sin la presencia de la hembra (Alamo, 2007; Hernández, 2007).

Procedimiento:

1. Material estéril.
2. El perro y la perra (en caso de tenerla), deben estar con sus manejadores.

3. Aplicar un suave masaje sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empiece a aumentar de tamaño.
4. Antes de que se produzca la erección, se corre el prepucio para dejar expuesto el pene y el bulbo
5. Se gira 180 grados el pene, hacia atrás aplicando estímulos pulsátiles alrededor y por detrás del bulbo peneano con el objeto de simular el abotonamiento que ocurre en una monta natural, provocando la excitación del macho y la obtención de un buen eyaculado.
6. El perro al eyacular la segunda fracción empuja con fuerza y antes de la tercera fracción, trata de desmontar y por lo general trata de pasar por encima del brazo del colector.
7. Cuando la colección esté completa, el pene debe ser monitoreado para garantizar que regrese el prepucio y vuelva a su posición (Alamo, 2007; Hernández, 2007).

Nota: tener cuidado al momento de la eyaculación ya que el perro origina una serie de movimientos que a veces son muy violentos y podrían suceder accidentes en la colección.

Las fracciones seminales se distinguen visualmente con facilidad, se debe estar seguro de haber colectado la segunda fracción. El pene se mantiene húmedo al no estar en contacto con el aire así no pierde lubricación el perro (Hernández, 2007).

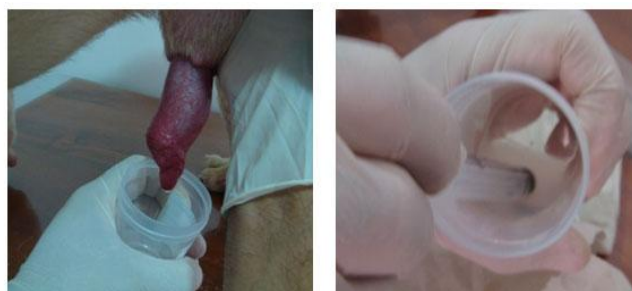


Figura 7. Colección del semen

2.2.5. SEMEN PRE Y POST CONGELACIÓN

Existen varias pruebas de laboratorio para evaluar la calidad del semen pre y pos congelación, que va a ser usado para Inseminación Artificial, y predecir así la capacidad fecundante del mismo (Stornelli, De la Sota, 2008). Las mismas pruebas que se realizan para la evaluación del semen antes de la congelación, se utilizan para evaluar al semen después de la congelación inmediatamente tras la recogida, la fracción espermática deberá ser analizada para determinar su volumen, concentración y motilidad, así como el porcentaje de vitalidad y de morfo-anomalías (Stornelli, De la Sota, 2008).

- **Evaluación de las membranas**

Se considera que el principal sitio de daño, son las membranas espermáticas y esto debe a los cambios de temperatura. La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es por la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación. Existen varias metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana (Stornelli, De la Sota, 2008).

Representada por:

- Tinciones
- Evaluación del acrosoma
- Prueba hipo-osmótica

Tinciones

- **Eosina nigrosina**

FUNDAMENTO

La eosina-nigrosina de Mortimer resulta la más adecuada para el examen de vitalidad y formas anormales, ya que la fórmula resulta isosmótica con la muestra seminal.

Una célula con la membrana celular intacta no se tiñe con eosina Y, mientras que una célula muerta, p.ej. con la membrana celular dañada, absorbe el colorante rojo. La nigrosina se utiliza como tinción de fondo para contrastar las células vivas sin teñir, blancas.

Procedimiento

1. Sobre una placa calentable a 37-38°C, mezclar una gota de 20-50 µL, de semen o dosis seminal con una gota del mismo volumen de eosina-nigrosina.
2. Incubar durante 30 segundos.
3. Extender la mezcla a lo largo de todo el portaobjetos con la ayuda de un cubreobjetos delante de la gota. No debe realizarse la extensión demasiado gruesa porque el color de fondo podría ser demasiado oscuro y cubrir los espermatozoides.
4. Dejar secar al aire y examinar directamente, al menos 200 espermatozoides a una magnificación de 1000x, o 1250x, usando un objetivo de alta calidad 100x sin contraste de fases en aceite de inmersión
5. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como “vivos”, y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como “muertos”.

CONSERVACIÓN:

Una vez abierto el envase conservar en nevera. (Humeco, 2011)

- **Tinción de Wright**

La tinción de Wright es un tipo de tinción usada en histología para facilitar la diferenciación de los tipos de células de la sangre.

Se usa principalmente para teñir frotis de sangre y punciones medulares, para ser examinadas al microscopio. En citogenética se usa para teñir cromosomas, para facilitar el diagnóstico de síndromes y enfermedades. Lleva el nombre de James Homer Wright, su descubridor, que la obtuvo modificando la tinción de Romanowsky, en 1902. Debido a que ayuda a distinguir fácilmente las células de la sangre se convirtió en una técnica muy usada para el conteo de los glóbulos blancos, una técnica rutinaria usada cuando hay sospecha de infecciones.

FUNDAMENTO

La tinción de Wright es una tinción de tipo Romanowsky. Una tinción de Romanowsky consiste en azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina. La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky que da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofílicos y da color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el azul y la eosina. Las propiedades de tinción de Romanowsky dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul y la eosina.

Los agrupamientos de ácidos nucleicos, las proteínas de los núcleos celulares y el citoplasma inmaduro reactivo, fijan el azul, colorante básico. La eosina, colorante ácido, se fija a los agrupamientos básicos de las moléculas de hemoglobina y a las proteínas básicas.

Procedimiento:

- La fijación de la muestra se realiza agregando unas gotas de alcohol metílico y dejando secar
 - Tinción con el reactivo de Wright
 - Tomar 200 µL de Wright-Giemsa Stain
 - Distribuir homogéneamente
 - Después de 1 minuto agregar 500µL de Agua destilada y homogenizar
 - Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente
 - Lavar con agua corriente durante 1 minuto
 - Observar al microscopio (Chambergo, 2010)
-
- **Parámetros de evaluación**

Motilidad espermática

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la crioconservación.

- El valor normal de la motilidad del semen fresco en la especie canina oscila entre 85-95%.
- En la motilidad seminal post-congelación se describen valores de 50-60% (García, 2008).

Se considera normal los valores mayores de 70 %. Por debajo se califica como subfétil. El vigor es también otra medida subjetiva y que depende de la experiencia del operador; está dado por la velocidad del movimiento de los espermatozoides (García, 2008).



Figura 17. Motilidad espermática (Eilts, 2008).

Morfología espermática

El valor considerado normal para la evaluación de la morfología oscila entre 80 – 90%. Se considera un límite del 20% de anomalías dentro de la muestra para que pueda ser aceptado.

Mortalidad espermática

A través de técnicas de tinción vital se pueden diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (por la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales) las células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida. Se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco. En cuanto al semen congelado, el valor mínimo aceptable de vitalidad es del 80% (Alamo, 2007).

2.2.6. PROCESAMIENTO, ALMACENAMIENTO, DESCONGELACIÓN Y MANEJO DEL SEMEN CANINO

Evolución y desarrollo de la congelación de semen canino

En 1954, Rowson notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos. En 1969 Seager registra la primera camada obtenida por conservación (Stornelli, De la Sota, 2008).

Rota y col. incorporaron Equex STM a un diluyente en base a Tris para la conservación de semen canino, obteniendo buenos resultados. Stornelli y col. estudiaron el efecto producido por diferentes concentraciones de Equex STM sobre la supervivencia espermática al descongelado encontrando que la adición de 1,5% de este compuesto permitía obtener mejores índices de descongelación que cantidades inferiores (Medvet.com, 2008).

- **Diluyente**

CANIPLUS FREEZE

Composición:

- Agua purificada
- TRIS(tris-hidroximetil-aminometano)
- Ácido cítrico
- Azúcar

- Antioxidantes
- Componentes propios del fabricante
- Glicerina
- Antibiótico (Minitub Manual, 2014)

Otros diluyentes

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris.

Entre los principales tipos están:

- CaniPlus
- Triladyl
- Diluyente de Andersen
- Diluyente Upssala
- Diluyente TRIS-fructosa
- Diluyente TRIS-glucosa

Tasa de dilución

La tasa de dilución que debe tener una muestra, está determinada por la concentración final necesaria para obtener una buena tasa de fertilidad, la concentración normal en fresco oscila entre 300-2000 x 10⁶ esp/mL, en base a esto se han utilizado protocolos de dilución que permitan obtener una concentración final de 50-250 x 10⁶ esp/mL al diluir en proporciones 2:1(Alamo, 2007).

- **Procesamiento de semen canino**

1. La muestra recolectada se mantiene en baño María a 37° C.
2. Luego de la evaluación macroscópica y microscópica, el semen es pre diluido, agregando lentamente una porción del diluyente (a la misma temperatura del semen).
3. Se refrigera a 4°C la predilución por 2h (equilibrado).
4. Se agrega el diluyente, previamente refrigerado a 4°C, lentamente (2-3 minutos).
5. Se coloca el semen en las pajuelas de 0,25mL (refrigeradas) y se retira aproximadamente un centímetro del mismo, con una jeringa. Se sella con polvo PVC y se seca.
Se sacuden las pajuelas para dejar el vacío en el centro.
6. Se deben mantener las pajuelas a 4°C por 20 minutos.
7. Se determina el número de células espermáticas por pajuela pre-congelación, mediante la cámara de Neubauer.
8. Se somete a vapores de Nitrógeno por 10 minutos.
9. Se sumergen en el tanque de Nitrógeno Líquido (Minitube, 2011).

- **Envasado**

El método más utilizado para el envasado del semen congelado son las pajuelas de 0.25 mL por su fácil manipulación, identificación, almacenamiento, transporte y descongelación, además estudios recientes demostraron que una hora luego de ser descongeladas las mismas, el porcentaje de acrosomías es bajo y hay mayor motilidad, comparándolas con las de 0,50 mL (Wanke M, Gobello 2010).

- **Congelación en nitrógeno líquido**

Es el método más estandarizado y utilizado en la conservación del semen. Las pajuelas se congelan en el interior de una caja de poliestireno, situándolas en un estante metálico a 4-8 cm por encima de la superficie de nitrógeno líquido. Se colocan horizontalmente en el estante durante 8-15 minutos, permitiendo que sean congeladas por acción de los vapores de nitrógeno líquido, que tienen una temperatura entre -110 y -120° C. Finalmente las pajuelas se sumergen y conservaron en nitrógeno líquido a -196° C. La velocidad de congelación depende del crioprotector (el aumento de su concentración disminuye la velocidad de congelación), del diluyente y de la forma geométrica del envase (Alamo, 2007).

- **Descongelación**

Se puede seguir los siguientes pasos en el caso de las pajuelas de 0,5 mL:

1. Se extraen las pajuelas del tanque de Nitrógeno líquido y se sumergen en Baño María a 37 °C durante 60 segundos.
2. Se secan las pajuelas, frotándolas con un toalla de papel limpia.
3. Por aplicación de fuerza centrífuga, se mueve la burbuja de aire hacia el extremo del sellado, se corta en dicho extremo, manteniendo a la pajuela en posición vertical (Minitube.de, 2011)

Se valora el porcentaje de motilidad (superior a 60%), el porcentaje de vitalidad (80%) y morfoanomalías (20%) (Alamo, 2007).

2.3 HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H₀)

Eldiluyente tiene un efecto sobre la viabilidad espermática en la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos.

Hipótesis alternativa (H_a)

El diluyente no tiene un efecto sobre la viabilidad espermática en la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos.

2.3.1 Variables de la hipótesis.

Variable independiente: Diluyente (Caniplus freeze)

Variable dependiente: Viabilidad espermática

2.4 OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES.

VARIABLE DEPENDIENTE: Viabilidad espermática.

CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
<p>La Viabilidad espermática se conceptúa como:</p> <p>La viabilidad seminal es un parámetro general que encierra las características microscópicas del semen, que tras una evaluación se puede determinar si el semen del animal es viable o no.</p>	<p>1.Motilidad</p> <p>2.Mortalidad</p> <p>3.Morfología</p>	<p>1.Porcentaje -Motilidad individual -Motilidad en masa</p> <p>2.Porcentaje</p> <p>3.Porcentaje</p>	<p>1. ¿Qué porcentaje de motilidad individual y en masa existe?</p> <p>2. ¿Qué porcentaje de mortalidad existe?</p> <p>3. ¿Qué porcentaje de morfología normal existe?</p>	<p>1. Microscopia directa.</p> <p>2. Microscopia directa, tinción con eosina-nigrosina.</p> <p>3. Microscopia directa, tinción de Wright</p>	<p>1. Microscopio, Porta objetos, Hoja de campo</p> <p>2. Microscopio, Tinción Eosina-nigrosina, Hoja de campo</p> <p>3. Microscopio, Tinción de Wright, Hoja de campo</p>

- VARIABLE INDEPENDIENTE: Diluyente (Caniplus freeze)

CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
<p>El diluyente de semen se conceptúa como:</p> <p>El diluyente de semen es un producto utilizado para la conservación de semen que brinda sustancias y elementos importantes que aportan al desarrollo metabólico de los espermatozoides en un medio externo.</p>	<p>1. Sin utilizar diluyente</p> <p>2. Utilizando diluyente</p>	<p>1. Viabilidad -Motilidad -Morfología -Mortalidad</p> <p>2. Viabilidad -Motilidad -Morfología -Mortalidad</p>	<p>1. Que efecto se presenta sobre laviabilidad espermática al no utilizar diluyente para su conservación?</p> <p>2. Que efecto se presenta sobre laviabilidad espermática al no utilizar diluyente para su conservación?</p>	<p>1. Microscopia directa Tinción Wright (Morfología) Tinción Eosina-Nigrosina (Mortalidad) Microscopia directa</p> <p>2. Microscopia directa Tinción Wright (Morfología) Tinción Eosina-Nigrosina (Mortalidad)</p>	<p>1. Hoja de campo</p> <p>2. Hoja de campo</p>

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. ENFOQUE, MODALIDAD Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Enfoque

Esta investigación se realizó con un enfoque cualitativa-cuantitativo por ser una investigación de campo aplicada dentro de un laboratorio.

3.1.2. Modalidad

La modalidad de la investigación utilizada fue experimental; debido a que se intenta dar una solución a la conservación de semen canino mediante el uso de productos coadyuvantes.

3.1.3. Tipo de la investigación

Esta investigación fue de tipo mixta; ya que se representaron las características de los diferentes datos que se obtuvieron de la población en estudio.

3.2. UBICACIÓN DEL ENSAYO

El presente ensayo se realizó en las instalaciones de la “Clínica Veterinaria VitalPet” ubicada en el Barrio El Tropezón, en la Av. Manuelita Sáenz y Agramonte, en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua, con las coordenadas geográficas: 1°16'11.64''S 78°38'08.75''W



Figura 9. Localización “Clínica Veterinaria Vital Pet” (Google Earth, 2015)

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

Clima	Templado
Temperatura	12°C – 18°C
Longitud	1°16'11.64''S
Latitud	78°38'08.75''W
Altitud	Promedio de 2577 msnm.
Superficie	120 m ²

3.4. FACTORES DE ESTUDIO

- **Uso de diluyente**

Con diluyente (Caniplus Freeze)

Sin diluyente

- **Viabilidad espermática**

Motilidad individual y en masa

Mortalidad

Morfología

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con Test Tukey al 5%. El tamaño de la unidad experimental fue de 10 caninos de raza mediana (2 a 4 años de edad), con condiciones normales de salud.

En la investigación se obtendrían 60 muestras al realizar 6 tratamientos (sin diluyente/temperatura ambiente, sin diluyente/5°C, sin diluyente/-192°C, con diluyente/temperatura ambiente, con diluyente/5°C, con diluyente/-192°C) y de 10 repeticiones (10 caninos).

Para un correcto desarrollo se utilizó la siguiente simbología:

A) DILUYENTE

A1 (Sin Diluyente)

A2 (Con Diluyente)

B) CONSERVACION DE SEMEN

B1 (Temperatura Ambiente / Semen fresco)

B2 (5°C / Semen refrigerado)

B3 (-192°C / Semen congelado)

Cuadro de tratamientos y simbología

Nº	SIMBOLOGIA	DESCRIPCION
1	A1 B1	Semen sin diluyente a temperatura ambiente
2	A1 B2	Semen sin diluyente a 5 °C
3	A1 B3	Semen sin diluyente a -192 °C
4	A2 B1	Semen con diluyente a temperatura ambiente
5	A2 B2	Semen con diluyente a 5 °C
6	A2 B3	Semen con diluyente a -192 °C

Fuente: Erick Tello

3.5.1. POBLACIÓN

La población para la investigación estuvo constituida por 10 caninos (2 a 4 años) con condiciones normales de salud; todos de raza mediana. Las razas participantes fueron French Poodle (8) y Schanauzer (2).

3.6. DATOS A TOMARSE

3.6.1. Motilidad

La motilidad espermática es un examen que puede efectuarse inmediatamente después de la recolección colocando una gota de semen en un portaobjetos precalentado a 37°C y observar al microscopio. Los espermatozoides deben moverse normalmente de modo anterógrado, rápido y recto a través del campo. La motilidad puede clasificarse como individual y en masa, las mismas que pueden presentar diferentes porcentajes:

PORCENTAJE DE MOTILIDAD	CALIDAD
80 – 100 %	Muy buena
60 – 79 %	Buena
40 – 59 %	Regular
< 40 %	Pobre

Fuente: Quisperanda 2008

3.6.2 Morfología

Para evaluar morfología se realizan extendidos sobre un porta objetos, realizando una tinción mediante la tinción Wright, lo que nos permite visualizar no sólo células espermáticas sino también células germinales inmaduras y somáticas.

El valor considerado normal para la evaluación de la morfología oscila entre 80-90%, se considera un límite de hasta el 20% de anomalías dentro de la muestra para que pueda ser aceptado. Dentro de este porcentaje se evalúa cabeza, cuello y cola tomando en cuenta las siguientes anomalías:

Anomalías				
Cabeza	Ovalada	Acintada	Periforme	Doble
Cuello	Grueso	Doblado	Roto	Doble
Cola	Corta	Doblada	Rota	Enrollada

Fuente: Quisperanda 2008

3.6.3 Mortalidad

La mortalidad se evalúa calculando el porcentaje de espermatozoides muertos en el eyaculado. La evaluación de mortalidad se hace mediante un conteo de 200 espermatozoides previa tinción con el reactivo Eosina-Nigrosina. El porcentaje máximo para considerar que el semen es de buena calidad es del 5%.

El porcentaje de espermatozoides normales que debe de contener un eyaculado para considerarlo de buena calidad es del 90% o más. Aunque algunos autores consideran que una tasa de hasta el 20% de mortalidad post-descongelación, está dentro de rango normal.

3.7. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN RECOLECTADA

La información fue recolectada en hojas de campo, para posteriormente analizar los datos en el programa estadístico INFOSTAT, con un diseño completamente al azar y con prueba de Tukey al 5%.

3.8. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación mantuvo la siguiente jerarquización:

3.8.1. Obtención de materiales

Para la investigación se utilizaron los siguientes materiales:

Materiales Físicos:

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- Gradilla
- Pipeta graduada de 10 a 1000ul
- Jeringas de 3ml y 5ml
- Pajuelas de 0.25ml
- Plástico adherente
- Guantes de examinación
- Vaso recolector de muestra de boca ancha
- Refrigerador
- Tanque de Nitrógeno líquido
- Baño maría
- Computador
- Esferos
- Hoja de campo
- Cocina

Materiales Químicos:

- Gel Lubricante
- Colorante Wright
- Colorante Eosina-Nigrosina
- Nitrógeno líquido
- Diluyente de semen canino (Caniplus Freeze)
- Polvo PVC(Cloruro de Polivinilo)

Materiales Biológicos

- Semen canino

3.8.2. Proceso de recolección de semen

- Seleccionamos animales sanos, de raza mediana y con una edad entre 2 a 4 años.
- Se preparó el lugar y los materiales para realizar la recolección del semen.
- Se realizó la extracción del semen utilizando el método manual
- Inmediatamente se trasladó la muestra recolectada al laboratorio para su evaluación

3.8.3. Evaluación del Semen

Preparación del diluyente

- Antes de empezar la evaluación se realizó la preparación del diluyente Caniplus Freeze, según refiere el manual de minitube
- Separamos la yema de huevos frescos y limpios; con la ayuda de una jeringa de 10ml recolectamos 7ml de yema de huevo y los incorporamos directamente al diluyente (Caniplus Freeze); por último agitamos vigorosamente durante 10 segundos para dejar reposar a temperatura ambiente.

Evaluación

- Para empezar separamos la muestra obtenida en 2 partes iguales; la primera parte fue para la evaluación sin diluyente, y; la segunda para la evaluación con diluyente.

- Una vez separada la muestra, tomamos la porción destinada para la dilución y utilizamos la mezcla anteriormente constituida y la diluimos en proporción de 2 a 1 (2 partes de semen: 1 de diluyente)
- Luego de realizar la dilución, procedemos a evaluar las muestras, examinando los siguientes parámetros: motilidad individual y en masa, mortalidad y morfología.
- Para evaluar el factor motilidad individual y en masa, se coloca 10ul de semen sobre un portaobjetos precalentado y se observa al microscopio utilizando el lente 40X. La valoración se la obtiene mediante observación directa y se determina el porcentaje solamente mediante percepción basándonos en la tabla de porcentajes.
- El factor mortalidad se evalúa a partir de la tinción Eosina-Nigrosina de la siguiente manera: Se coloca una gota de semen en el portaobjetos precalentado, inmediatamente se añade 10ul del colorante Eosina-Nigrosina, se lo deja reposar durante 2 minutos y se realiza un frotis para finalmente observar al microscopio usando el lente 40X. Para establecer el porcentaje de mortalidad, se realiza un conteo de 200 espermatozoides al azar dentro de toda la placa; y se establece el valor mediante una regla de 3, determinando el porcentaje de espermatozoides vivos (no se tiñen) y espermatozoides muertos (se tiñen de rosado)
- La morfología se evalúa mediante la tinción Wright; para lo cual tomamos 10ul de semen y lo colocamos sobre un portaobjetos precalentado; seguidamente se realiza un frotis y se inunda la placa con el colorante Wright para dejarlo reposar durante 1 minuto, una vez transcurrido el minuto se procede a añadir agua destilada para luego esperar durante 3 minutos, luego de transcurrido este tiempo se toma el portaobjetos y se somete a chorro de agua durante 1 minuto para eliminar el exceso de colorante y una vez que la placa se seque se observa al microscopio utilizando el lente 40X. Para establecer el porcentaje de morfología normal, se realiza un conteo de 200 espermatozoides al azar dentro de toda la placa, y se establece el valor

mediante una regla de 3; determinando el porcentaje de espermatozoides normales y con alteraciones morfológicas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÒN

4.1. RESULTADOS, ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN

4.1.2. Análisis de varianza

Tabla 1. Análisis de varianza del factor ``Motilidad individual`` comparados en forma general

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD INDIVIDUAL	60	0,91	0,90	5,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTOS	8717,08	5	1743,42	111,08	<0,0001
Error	847,50	54	15,69		
Total	9564,58	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,23442

Error: 15,6944 gl: 54

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A1B1	85,00	10	1,25	A
A2B1	83,00	10	1,25	A
A2B2	60,50	10	1,25	B
A2B3	60,00	10	1,25	B
A1B3	57,50	10	1,25	B
A1B2	56,50	10	1,25	B

Al evaluar la motilidad individual en forma general, se pueden observar que los tratamientos A1B1 (Sin diluyente con semen fresco) y A2B1 (Con diluyente con semen fresco) comparten el mismo nivel de significancia, difiriendo de los demás tratamientos; debido a que el semen fresco posee las mejores condiciones para los espermatozoides; coincidiendo con los resultados obtenidos por Ochoa, A. y Torres, L. 2012; donde la motilidad individual se registró con semen fresco (86%).

Tabla 2. Análisis de varianza del factor "Motilidad en masa" comparados en forma general

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD MASA	60	0,87	0,86	6,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTOS	7993,33	5	1598,67	74,10	<0,0001
Error	1165,00	54	21,57		
Total	9158,33	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,13708
 Error: 21,5741 gl: 54

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A1B1	89,50	10	1,47	A
A2B1	80,50	10	1,47	B
A2B2	63,00	10	1,47	C
A1B2	62,00	10	1,47	C
A2B3	60,00	10	1,47	C
A1B3	60,00	10	1,47	C

Luego de la evaluación general del factor motilidad en masa se puede observar que existe diferencias estadísticas entre los tratamientos; donde A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) difiere del tratamiento A2B1 (Con diluyente, semen fresco) y el resto de tratamientos comparten el nivel de significancia; sin embargo el tratamiento A1B1 es superior para el factor motilidad en masa debido a las condiciones que el semen fresco posee para la movilidad de los espermatozoides coincidiendo con los resultados obtenidos por Sánchez, A. 2007, donde el semen fresco registro el mejor resultado alcanzando $94.7 \pm 3.6\%$ de motilidad progresiva en masa.

Tabla 3. Análisis de varianza del factor "Mortalidad" comparados en forma general.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORTALIDAD	60	0,89	0,87	17,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTOS	1875,15	5	375,03	83,21	<0,0001
Error	243,38	54	4,51		
Total	2118,53	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,80505					
Error: 4,5070 gl: 54					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
A2B1	4,84	10	0,67	A	
A1B1	5,00	10	0,67	A	
A2B3	11,65	10	0,67		B
A2B2	15,05	10	0,67		C
A1B3	16,40	10	0,67		C
A1B2	19,65	10	0,67		D

Al evaluar en forma general la mortalidad espermática, se deduce que el tratamiento A2B1 (Con diluyente, semen fresco) y el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) comparten el mismo nivel de significancia, difiriendo del tratamiento A2B3 (Con diluyente, congelado), y los tratamientos A2B2 (Con diluyente, refrigerado); A1B3 (Sin diluyente, congelado) comparten el 3er nivel de significancia pero difieren del tratamiento A1B2 (Sin diluyente, refrigerado) en el factor mortalidad, lo que nos refieren que los tratamientos con el primer nivel de significancia son superiores, ya que el semen fresco tienen las mejores condiciones para los espermatozoides; estos resultados son similares a los obtenidos por el Grupo de investigación INCA-CES en 2011, donde los mejores resultados fueron de 4% y 6% de mortalidad.

Tabla 4. Análisis de varianza del factor "Morfología" comparados en forma general.

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
MORFOLOGIA	60	0,04	0,00	1,17	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
TRATAMIENTOS	2,69	5	0,54	0,42	0,8346
Error	69,53	54	1,29		
Total	72,21	59			

PORCENTAJES

TRATAMIENTOS	Porcentajes	.
A2B2	97,00	10 0,36 A
A1B2	97,00	10 0,36 A
A1B1	97,25	10 0,36 A
A2B3	97,40	10 0,36 A
A2B1	97,50	10 0,36 A
A1B3	97,50	10 0,36 A

Al evaluar en forma general el factor morfología, se registra que todos los tratamientos comparten el mismo nivel de significancia ya que estadísticamente son iguales; esto se debe a que los animales de la investigación fueron escogidos con parámetros específicos de estado de salud (normal), edad (entre 2 a 4 años) y raza (mediana). Estos resultados son muy cercanos a los obtenidos por Ochoa, A. y Torres, L. 2012, donde el semen fresco utilizado como testigo presentó porcentajes de morfología de 95.00*100.

4.1.4 Análisis entre tratamientos sin diluyente (Grupo 1)

Tabla 5. Análisis de varianza del factor "Motilidad individual" dentro del Grupo 1
(Semen sin diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD INDIVIDUAL	30	0,91	0,90	6,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G1	5231,67	2	2615,83	137,14	<0,0001
Error	515,00	27	19,07		
Total	5746,67	29			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,84269					
Error: 19,0741 gl: 27					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
A1B1	85,00	10	1,38	A	
A1B3	57,50	10	1,38		B
A1B2	56,50	10	1,38		B

Al evaluar los resultados de motilidad individual dentro del grupo 1 (semen sin diluyente), se puede ver que el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) es estadísticamente superior, ya que difiere de los demás tratamientos los mismos que comparten un nivel de significancia diferente al primero; demostrando así que el semen fresco brinda las mejores condiciones para que los espermatozoides se desenvuelvan con normalidad. No existen registros donde se hayan comparado los resultados entre tratamientos realizados; por lo que se puede considerar estos datos como los primeros realizados en este tipo de investigación.

Tabla 6. Análisis de varianza del factor "Motilidad en masa" comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD MASA	30	0,92	0,91	6,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G1	5435,00	2	2717,50	152,07	<0,0001
Error	482,50	27	17,87		
Total	5917,50	29			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,68739					
Error: 17,8704 gl: 27					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
A1B1	89,50	10	1,34	A	
A1B2	62,00	10	1,34		B
A1B3	60,00	10	1,34		B

Al evaluar el factor motilidad en masa dentro del grupo 1 (semen sin diluyente) se puede observar que existen diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, donde el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) presenta un nivel estadísticamente superior a los demás, ya que los demás comparten el mismo nivel de significancia, esto nos refiere que el semen fresco ofrece los mejores resultados por sus características físico químicas que brindan las condiciones necesarias para la movilidad de los espermatozoides.

Tabla 7. Análisis de varianza del factor ``Mortalidad`` comparados dentro del Grupo 1
(Semen sin diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORTALIDAD	30	0,85	0,84	20,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G1	1183,82	2	591,91	76,86	<0,0001
Error	207,93	27	7,70		
Total	1391,74	29			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,07706
Error: 7,7009 gl: 27

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
A1B1	5,00	10	0,88	A
A1B3	16,40	10	0,88	B
A1B2	19,65	10	0,88	C

Luego de la evaluación del factor mortalidad dentro del grupo 1 (semen sin diluyente) se puede observar que existe una diferencia significativa entre los 3 tratamientos, donde A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) presenta un nivel estadísticamente superior; el tratamiento A1B3 (Sin diluyente, semen congelado) tiene otro nivel con menor significancia estadística y el tratamiento A1B2 (Sin diluyente, semen refrigerado) presenta el último nivel de significancia; demostrando que el semen fresco tiene los mejores resultados, seguido de la congelación y posteriormente la refrigeración.

Tabla 8. Análisis de varianza del factor "Morfología" comparados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORFOLOGIA	30	0,03	0,00	1,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G1	1,25	2	0,63	0,43	0,6541
Error	39,13	27	1,45		
Total	40,38	29			

Porcentajes

TRATAMIENTOS	Porcentajes	.
A1B2	97,00	10 0,38 A
A1B1	97,25	10 0,38 A
A1B3	97,50	10 0,38 A

En cuanto al factor morfología dentro del grupo 1 (Semen sin diluyente) los tratamientos A1B2 (Sin diluyente, semen refrigerado), A1B1 (Sin diluyente, Semen fresco) y A1B3 (Sin diluyente, semen congelado) no muestran diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, debido a que los animales fueron seleccionados con la misma edad, raza y condición de salud.

4.1.5. Análisis entre los tratamientos con diluyente (Grupo 2)

Tabla 9. Análisis de varianza del factor "Motilidad individual" comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD INDIVIDUAL	30	0,91	0,91	5,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
DENTRO de G2	3451,67	2	1725,83	140,14	<0,0001	
Error	332,50	27	12,31			
Total	3784,17	29				

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,89116						
Error: 12,3148 gl: 27						
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.			
A2B1	83,00	10	1,11	A		
A2B2	60,50	10	1,11		B	
A2B3	60,00	10	1,11			B

Luego de evaluar el factor motilidad individual dentro del grupo 2 (semen con diluyente) el tratamiento A2B1 (Con diluyente, semen fresco) tiene un nivel estadísticamente superior a los demás tratamientos, demostrando nuevamente que el semen fresco tiene las condiciones óptimas para la movilidad de espermatozoides y si se añade diluyente, las propiedades del semen mejoran por el aporte de nutrientes.

Tabla 10. Análisis de varianza del factor "Motilidad en masa" comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD MASA	30	0,78	0,77	7,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G2	2451,67	2	1225,83	48,49	<0,0001
Error	682,50	27	25,28		
Total	3134,17	29			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,57486
 Error: 25,2778 gl: 27

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
A2B1	80,50	10	1,59 A
A2B2	63,00	10	1,59 B
A2B3	60,00	10	1,59 B

Al evaluar del factor motilidad en masa dentro del grupo 2 (semen con diluyente) el tratamiento A2B1 (Con diluyente-Semen fresco) presenta un nivel estadísticamente superior a los tratamientos A2B2 (Con diluyente semen refrigerado) y A2B3 (Con diluyente semen congelado), esto se debe a que el semen fresco brinda las mejores condiciones para el movimiento normal de los espermatozoides; a pesar de que se añadió diluyente; provocando que la muestra se torne más densa por su composición; sin embargo los resultados son superiores en el semen fresco.

Tabla 11. Análisis de varianza del factor "Mortalidad" comparados dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORTALIDAD	30	0,94	0,93	10,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G2	540,60	2	270,30	205,85	<0,0001
Error	35,45	27	1,31		
Total	576,05	29			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,27062					
Error: 1,3131 gl: 27					
TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
A2B1	4,84	10	0,36	A	
A2B3	11,65	10	0,36	B	
A2B2	15,05	10	0,36	C	

Al evaluar el factor mortalidad dentro del grupo 2 (Semen sin diluyente) se puede observar que existen diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos, donde el tratamiento A2B1 (Con diluyente-Semen fresco) presenta un nivel superior a los demás tratamientos, seguido de A2B3 (Con diluyente-Semen congelado) y por último A2B2 (Con diluyente-semen refrigerado). Sin embargo el tratamiento A2B1 es superior debido a que el semen fresco juntamente con el diluyente aporta sustancias ricas en nutrientes mejorando la supervivencia de espermatozoides.

Tabla 12. Análisis de varianza del factor ``Morfología`` comparados dentro de Grupo 2
(Semen con diluyente)

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
MORFOLOGIA	30	0,04	0,00	1,09	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Dentro de G2	1,40	2	0,70	0,62	0,5445
Error	30,40	27	1,13		
Total	31,80	29			

Porcentajes

TRATAMIENTOS	Porcentajes	.
A2B2	97,00	10 0,34 A
A2B3	97,40	10 0,34 A
A2B1	97,50	10 0,34 A

Luego de evaluar el factor morfología dentro del grupo 2 (Semen con diluyente) podemos deducir que no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos A2B2 (Con diluyente-Semen refrigerado), A2B3 (Con diluyente-Semen congelado), A2B1 (Con diluyente-Semen fresco), posiblemente esto se debe a que los animales de la investigación se eligieron con iguales condiciones de salud, edad y raza.

4.1.6 Análisis comparativo entre Grupos (G1 y G2)

Tabla 13. Análisis de varianza del factor "Motilidad individual" comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y el Grupo 2 (Con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD INDIVIDUAL	60	3,5E-03	0,00	19,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
GRUPOS	33,75	1	33,75	0,21	0,6521
Error	9530,83	58	164,32		
Total	9564,58	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,62535
 Error: 164,3247 gl: 58

GRUPOS	Medias	n	E.E.
G2	67,83	30	2,34 A
G1	66,33	30	2,34 A

En cuanto al factor motilidad individual comparada entre grupos (G1 y G2), se deduce que no existe una diferencia estadística entre los grupos. Esto nos demuestra que la motilidad individual tanto del semen sin diluyente (G1) como del semen con diluyente (G2) brindan las condiciones adecuadas para el movimiento normal de los espermatozoides.

Tabla 14. Análisis de varianza del factor "Motilidad en masa" comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y el Grupo 2 (Con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD MASA	60	0,01	0,00	18,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
GRUPOS	106,67	1	106,67	0,68	0,4118
Error	9051,67	58	156,06		
Total	9158,33	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,45665				
Error: 156,0632 gl: 58				
GRUPOS	Medias	n	E.E.	
G1	70,50	30	2,28	A
G2	67,83	30	2,28	A

Al determinar los valores del factor motilidad en masa comparada entre grupos, podemos deducir que no existen diferencias estadísticas significativas, demostrando que el semen sin diluyente (G1) y con diluyente (G2) brindan condiciones similares para el movimiento de los espermatozoides en masa.

Tabla 15. Análisis de varianza del factor "Mortalidad" comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y el Grupo 2 (Con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORTALIDAD	60	0,07	0,06	48,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
GRUPOS	150,73	1	150,73	4,44	0,0394
Error	1967,80	58	33,93		
Total	2118,53	59			

Test Tukey 5%

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,01046

Error: 33,9275 gl: 58

GRUPOS	Medias	n	E.E.	
G2	10,51	30	1,06	A
G1	13,68	30	1,06	B

Al evaluar el factor mortalidad comparado entre grupos, existe una diferencia estadísticamente significativa, donde el grupo 2 (Semen con diluyente) tiene un nivel superior al grupo 1 (Semen sin diluyente), esto nos refiere que el uso de diluyente mejora las condiciones para la supervivencia de los espermatozoides.

Tabla 16. Análisis de varianza del factor "Morfología" comparados entre el Grupo 1 (Sin diluyente) y Grupo 2 (Con diluyente)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MORFOLOGIA	60	5,2E-04	0,00	1,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
GRUPOS	0,04	1	0,04	0,03	0,8628
Error	72,18	58	1,24		
Total	72,21	59			

Porcentajes

GRUPOS	Porcentajes	.
G1	97,25	30 0,20 A
G2	97,30	30 0,20 A

Al evaluar el factor morfología comparado entre los grupos, se puede deducir que el grupo 1 (Semen sin diluyente) y el grupo 2 (Semen con diluyente) son estadísticamente iguales y no existe diferencia significativa, demostrando que el semen sin diluyente y el semen con diluyente brindan las mismas condiciones para la morfología; este es uno de los factores que menos diferencia presenta tras comparar todos los tratamientos.

4.2. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos luego de la evaluación de la viabilidad espermática, nos permite aceptar la hipótesis nula (H_0), ya que tras la investigación se pudo concluir que el diluyente tiene un efecto sobre la viabilidad espermática en la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos, al evaluar los factores motilidad, mortalidad y morfología.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El uso de diluyente en la conservación de semen canino brindó mejores resultados, superando al semen conservado sin diluyente; sin embargo los factores motilidad individual, motilidad en masa y morfología, fueron estadísticamente iguales en los tratamientos con diluyente y sin diluyente, a excepción del factor mortalidad donde mejor nivel de significancia se encontró en las muestras de semen con diluyente.
- La viabilidad espermática (motilidad, mortalidad y morfología) alcanzó los valores establecidos en el rango de evaluación; obteniendo datos similares a los obtenidos en investigaciones referentes al mismo tema.
- El diluyente (Caniplus freezee) brindó mejores condiciones para la supervivencia y desarrollo normal de los espermatozoides, ya que su composición y las sustancias propias del mismo aportaron positivamente a la muestra seminal.
- Al evaluar el factor motilidad individual en el análisis general, los tratamientos A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) con 85% y A2B1 (Con diluyente, semen fresco) con 83%, compartieron el nivel de significancia más alto, demostrando que el semen fresco tiene mejores condiciones para el desarrollo de los espermatozoides.

- En la evaluación del factor motilidad en masa en el análisis general, el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) obtuvo un 89.50% siendo el tratamiento con mayor nivel de significancia, superando a los demás tratamientos que presentaron distintos niveles estadísticos.
- Al evaluar el factor mortalidad en el análisis general, el tratamiento A2B1 (Con diluyente, semen fresco) obtuvo 4.84% y el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) un 5%, alcanzando conjuntamente el mayor nivel de significancia. Los demás tratamientos presentaron diferentes niveles y diferencias significativas las mismas que sobrepasaron el porcentaje de mortalidad normal de una muestra fecundante.
- En la evaluación del factor morfología en el análisis general, se dio como resultado un mismo nivel de significancia en todos los tratamientos, alcanzando porcentajes de 97 a 97.5%, esto es resultado de realizar el mismo proceso para la selección de animales y para evaluación del semen.
- Al evaluar los resultados dentro del Grupo 1 (Semen sin diluyente), se demostró que el tratamiento A1B1 (Sin diluyente, semen fresco) presentó el mayor nivel de significancia en los factores motilidad individual con un 85%, motilidad en masa con 89.5% y mortalidad con 5%, sin embargo en el factor morfología todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales alcanzando valores entre 97% y 97.5%.
- En la evaluación de los factores dentro del Grupo 2 (Semen con diluyente) el tratamiento A2B1 (Con diluyente, semen fresco) con un porcentaje de motilidad individual del 83%, motilidad en masa del 80.5%, mortalidad del 4.84% presentaron un nivel superior de significancia en comparación a los demás tratamientos; en lo que respecta a morfología todos los tratamientos compartieron el mismo nivel de significancia, ya que alcanzaron valores similares entre el 97% a 97.5%.

- La evaluación comparativa entre el Grupo 1 (Semen sin diluyente) y el Grupo 2 (Semen con diluyente), para los factores motilidad individual y motilidad en masa tanto el Grupo 1 como el Grupo 2 presentaron el mismo nivel de significancia; mientras que en el factor mortalidad el Grupo 2 obtuvo un porcentaje de 10,51% lo que nos refiere a un nivel estadísticamente superior al Grupo 1; el factor morfología nuevamente presentó niveles estadísticamente similares entre los grupos 1 y 2 con porcentajes entre 97.25% y 97.30%.
- Al aplicar diferentes técnicas de conservación seminal, la investigación demostró que la crioconservación de semen, presentó mejores resultados que la refrigeración de semen; a pesar de que el tiempo congelación-evaluación (30 días) fue mayor al tiempo refrigeración-evaluación (15 días)
- Los mejores resultados se obtuvieron al congelar las muestras debido ya que tanto en la refrigeración como en la congelación se produce la formación de cristales a partir de las sustancias líquidas de la muestra seminal, sin embargo, debido a la temperatura, y al tiempo que transcurre para la formación de los cristales en la refrigeración, estos alcanzan un tamaño considerablemente superior a los cristales formados en la congelación, causando daño a la estructura de los espermatozoides.
- De acuerdo con los resultados arrojados por la investigación se determina que el uso de diluyente influye de manera positiva sobre las características metabólicas del semen, dando como resultado mejores porcentajes de los factores evaluados, especialmente la mortalidad

5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar el semen fresco como primera opción para conseguir los resultados deseados en la inseminación artificial.
- Para conservación de semen se recomienda utilizar diluyente ya que este ayuda a mantener y mejorar la calidad del semen post-descongelación.
- Realizar la extracción seminal con los materiales limpios y estériles en un lugar tranquilo para el animal, de esta manera se obtiene un semen de buena calidad y libre de contaminación.
- Realizar el centrifugado de las muestras de semen antes de realizar la evaluación, ya que hay autores que recomiendan realizar este proceso para mejorar la evaluación de las características microscópicas y conseguir el número adecuado de células espermáticas por dosis de inseminación.
- Utilizar productos coadyuvantes existentes en el mercado como Caniplus Chill para el lavado del semen pre-evaluación; ya que este sirve para evitar contaminación con agentes bacterianos y elimina la fracción prostática que puede producir falsos resultados al momento de la evaluación.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. TÍTULO

“Protocolo de crioconservación seminal en caninos implementando el uso de diluyente”

6.2. FUNDAMENTACIÓN

La crioconservación de semen es una práctica que se viene realizando desde hace años atrás en diferentes especies con el fin de mantener las características reproductivas del semen de animales con alto valor genético, así como para almacenar muestras durante prolongados periodos de tiempo evitando en lo posible que se pierdan las propiedades y características fecundantes de las muestras almacenadas.

En lo que respecta a la crioconservación de semen canino la técnica aplicada es básicamente igual a que se realizada en otras especies, a pesar de esto, la aplicación de la técnica para esta especie es poco conocida dentro del país y no existen registros sobre protocolos a seguir para realizarla adecuadamente.

6.3 OBJETIVOS

6.3.1 Objetivo general

Desarrollar un manual protocolario para la técnica de crioconservación de semen canino mediante el uso de diluyente

6.4. Objetivos específicos

- Elaborar un manual detallado con pasos a seguir para realizar la crioconservación de semen canino en nuestro país
- Presentar y dejar disponible el manual para que pueda ser utilizado cuando se lo requiera.

6.4. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA

En nuestro medio la crioconservación de semen canino es una técnica poco aplicada y conocida debido a la falta de información o al desconocimiento de las ventajas que este proceso brinda. Debido a esto se pretende elaborar un manual protocolario para aportar una guía detallada, para determinar paso a paso el proceso a seguir para la crioconservación de semen canino. La elaboración de este manual es de gran importancia, debido a la inexistencia de uno en nuestro país y los pocos que existen disponibles en otros países, son poco detallados y de escasa accesibilidad.

6.5 DESARROLLO

“MANUAL PROTOCOLARIO PARA LA CRIOCONSERVACION DE SEMEN CANINO IMPLEMENTANDO EL USO DE DILUYENTE”

SELECCIÓN, ENTRENAMIENTO Y RECOLECCIÓN

Selección de animales

El objetivo de realizar una selección de los animales es establecer parámetros fisiológicos propios de machos con altas características genéticas, de esta manera se podrá asegurar la calidad del semen conservado y posteriormente al utilizarlo se conseguirán los resultados esperados.

Los principales parámetros a establecer son aquellos que brinden la mejor condición física y sanitaria del animal, entre estos tenemos la edad, peso, estado de salud, entre otras. A continuación se presentan algunas condiciones que deben ser tomadas en cuenta para seleccionar los machos:

- La condición física de los animales será determinada al realizar un examen general de sus condiciones y sus constantes fisiológicas para descartar cualquier problema existente.
- Los animales no deben presentar ningún tipo de enfermedad o lesión física que puedan influir directa o indirectamente sobre la producción de semen.
- Los animales seleccionados deben presentar condiciones físicas adecuadas y tener una edad en la cual la producción de semen (cantidad - calidad) sea excelente.

ENTRENAMIENTO DE MACHOS

El entrenamiento de machos es uno de los aspectos que pueden ser determinantes en la obtención de los resultados que se desean para la conservación y la concepción. Dentro del entrenamiento se deben evitar los procesos estresantes y experiencias traumáticas al momento de realizar la recolección del semen. Generalmente este entrenamiento se lo realiza a los animales que han sido escogidos como reproductores, y también puede ser realizado a aquellos machos que cuando se requiera, su material genético pueda ser obtenido sin contratiempos.

Con frecuencia el entrenamiento se lo realiza con el fin de que el animal que fue seleccionado para la extracción, no presente problemas pre y post recolección, y al contrario, el animal conozca cuál es el motivo de la visita a la clínica veterinaria, disminuyendo el tiempo y el estrés que pueden afectar a los animales no entrenados.

El entrenamiento en si se trata de la constante repetición del proceso de recolección, brindando al animal las mejores condiciones externas para que se sienta seguro y no se presenten problemas, logrando que cada vez que el animal acuda a la recolección, se acorte el tiempo y el eyaculado sea de mejor calidad.

RECOLECCIÓN

AMBIENTE

El ambiente apropiado para la recolección de semen, debe ser tranquilo y sin ruidos fuertes. A pesar de que la clínica veterinaria puede tener los requisitos y materiales necesarios para la recolección, tal vez no sea el mejor lugar para hacerlo, debido a los ruidos, aromas que suelen presentarse por la presencia de otros animales. Debido a que el animal debe mantenerse de pie durante el proceso de recolección, es recomendable tener una superficie o un tapete antideslizante donde el animal pueda mantenerse en la posición correcta.



Se puede utilizar una perra en celo para estimulación del macho, evitando que la perra se voltee o muestre agresión hacia al macho. Existen esencias disponibles comercialmente, o se puede optar por congelar hisopos con secreciones de la perra en celo y descongelarlos cuando se lo solicite.

MATERIALES

Los materiales y equipos que se utilizaran para la recolección deben ser limpios, secos y calibrados, a excepción de los materiales que tendrán contacto directo con el semen, los cuales deberán ser materiales estériles.

Entre los materiales que se utilizara tenemos:

Para la preparación del animal:

- Perra en celo o hisopos
- Piso o tapete antideslizante

Recolección:

- Gel lubricante
- Guantes
- Recipiente o vaso para toma de muestras estéril

EXTRACCIÓN DEL SEMEN

Existen varios métodos para la extracción del semen, cualquiera que sea el método a realizar se debe tener un ambiente adecuado y contar con la presencia de personal suficiente para sujetar al animal y para la recolección. En algunos casos la presencia del propietario o de una persona de confianza del animal puede ser necesaria. El método más común y accesible para la extracción del semen es el método manual.

Para el método manual se recomienda seguir los siguientes pasos:

- Estimular al animal mediante el olfateo con la perra en celo o con hisopos descongelados.
- Colocar de pie al animal en el lugar donde se realizara la extracción y sujetarlo, evitando en lo posible el estrés y la manipulación innecesaria (es recomendable apagar las luces y cerrar cortinas, ya que los espermatozoides son sensibles a la luz)
- La extracción empieza realizando un masaje sobre el prepucio utilizando gel lubricante, hasta lograr que se presente un erección parcial

- Posteriormente se presiona sobre el bulbo peneano hasta conseguir que se protruya completamente fuera del prepucio para poder sujetarlo con la mano
- Cuando se logre una protrusión completa se debe realizar una ligera presión
- Con la mano sujetando detrás del bulbo peneano hasta lograr la eyaculación
- Con la otra mano se debe sostener el recipiente donde se recolectara el semen, evitando que la mucosa del pene tenga contacto directo con los bordes o el interior del recipiente (si la mucosa toca el recipiente pueden producirse sangrados que contaminaran la muestra)
- La primera fracción o fracción pre-espermática es descartable debido a que la cantidad de espermatozoides que posee es escasa o nula. La segunda fracción o fracción espermática es rica en espermatozoides y la más importante de la recolección. La tercera fracción o fracción prostática, puede ser descartada o recolectar lo suficiente para obtener un volumen de eyaculado aceptable.

EVALUACIÓN Y CONGELACIÓN

EVALUACION SEMINAL

La evaluación seminal es un proceso indispensable para conocer las características cualitativas y cuantitativas de la muestra seminal antes de ser sometida a congelación. Existen varios factores que deben ser evaluados para determinar la calidad seminal

EVALUACION MACROSCOPICA.

Color: La evaluación del color se realiza mediante observación directa en el recipiente donde fue recolectado el semen. Este debe presentar un color blanco lechoso, casi opaco (la opacidad dependerá de la concentración de espermatozoides)

Volumen: Para evaluar el volumen se debe medir la cantidad de eyaculado que se obtuvo en la recolección.

Olor: El olor de la muestra siempre será ``suis generis``

pH: Para determinar el pH se utilizan tiras reactivas, colocando unas gotas de semen sobre la tira reactiva, luego se debe esperar unos minutos hasta obtener el resultado. El rango aceptable del pH es de 6.3 a 6.7.

EVALUACIÓN MICROSCOPICA

Para la evaluación microscópica, se recomienda que los materiales sean precalentados a una temperatura de 37° C para evitar choque térmico.

Motilidad: Para evaluar la motilidad seminal existen dos parámetros, motilidad individual y en masa. Estas características se evalúan mediante microscopia directa, siguiendo estos simples pasos:

- Se coloca una gota de semen sobre un portaobjetos precalentado
- Se observan inmediatamente en el microscopio (también se puede hacer una extensión o frotis para la observación)
- La motilidad individual debe determinarse por el movimiento recto y continuo que presenta individualmente cada espermatozoide.
- La motilidad en masa se determina por el movimiento rápido y continuo que presentan los espermatozoides grupalmente.
- Los porcentajes se establecen únicamente mediante percepción, la persona que evalúa, debe determinar el porcentaje de motilidad, donde se puede considerar como aceptable las muestras que presentan un porcentaje mayor al 70%.

Los porcentajes pueden basarse en tablas establecidas por diferentes autores o en la tabla presentada a continuación:

PORCENTAJE DE MOTILIDAD	CALIDAD
80 – 100 %	Muy buena
60 – 79 %	Buena
40 – 59 %	Regular
< 40 %	Pobre

Mortalidad: Para la evaluación de mortalidad existen distintas técnicas de tinción. La técnica más recomendada y accesible es la tinción Eosina-Nigrosina, debido a su técnica y efectividad.

TINCION EOSINA-NIGROSINA

Para realizar esta tinción se debe seguir los siguientes pasos:

- Colocar una gota de semen sobre un portaobjetos precalentado
- Añadir una gota del colorante eosina
- Colocar un cubreobjetos para que las gotas se mezclen.
- Añadir una gota del colorante nigrosina y dejar secar durante un minuto
- Realizar un frotis y dejar secar completamente
- Observar al microscopio con el aumento 40X o 100X (inmersión)

Para determinar el porcentaje de mortalidad se realiza un conteo de 200 espermatozoides al azar dentro de toda la muestra en el portaobjetos, determinando la cantidad de espermatozoides muertos (teñidos de rosado) y espermatozoides vivos (sin teñir) que se contabilizaron dentro de los 200. Para considerar que muestra es de buena calidad se puede presentar un máximo de 5% de mortalidad.

Morfología: Para la evaluación de la morfología se puede realizar varias técnicas de tinción. La técnica más recomendable y accesible para evaluar este factor es la tinción de Wright. Para realizar la tinción se deben seguir los siguientes pasos:

- Colocar una gota de semen sobre el portaobjetos precalentado
- Realizar una extensión o frotis para fijar la muestra en el portaobjetos
- Sobre la muestra seca colocar el colorante Wright homogéneamente sobre todo el portaobjetos
- Con ayuda de un cronometro dejar reposar la muestra durante 1 minuto.
- Una vez transcurrido el minuto se agrega agua destilada sobre el colorante hasta conseguir que el portaobjetos se llene completamente.
- Nuevamente con ayuda de un cronometro se deja reposar la muestra durante 3 minutos
- Luego de transcurridos los 3 minutos, se lava el portaobjetos con agua potable durante 1 minuto para eliminar el exceso de colorante.
- Finalmente se deja secar completamente el portaobjetos y se procede a observar en el microscopio con lente de aumento 40X, 100X o uno superior.

Las anomalías que se pueden presentar se las clasifica como:

Anomalías de cabeza	Anomalías de cuello	Anomalías de cola
Ovalada	Grueso	Corta
Acintada	Delgado	Enrollada
Periforme	Doblado	Doblada
Redonda	Roto	Rota
Doble	Doble	Doble

Además de estas anomalías suelen presentarse otros tipos de anomalías como la presencia de gota citoplasmática, la misma que puede presentarse en cualquier parte del espermatozoide.

Para establecer el porcentaje de Morfología normal de la muestra, se debe realizar un conteo de 200 espermatozoides al azar, contabilizando la cantidad de espermatozoides normales y anormales. Para que una muestra sea considerada buena, debe tener un porcentaje de anomalías menor al 15%.

Concentración: Para evaluar la concentración seminal es necesario realizar una dilución en proporciones 1:100, y realizar un conteo con ayuda de la Cámara de Neubauer. La cantidad normal de espermatozoides en una muestra es de $300-2000 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

CONGELACION DEL SEMEN

Como se mencionó anteriormente la dilución es un requisito necesario para la determinar la concentración espermática, pero la dilución también tiene un papel importante dentro de la congelación del semen, debido a esto es indispensable utilizar un diluyente para obtener buenos resultados pre y post congelación.

En el mercado existen diferentes productos para realizar la dilución seminal, sin embargo no todos son accesibles debido a sus costos y disponibilidad dentro del país. A pesar de esto es indispensable la adquisición del diluyente si se desea realizar una buena práctica de Crioconservación. Cada diluyente tiene diferentes características dentro de su composición y sus tasas de dilución, pero a continuación se describirá de manera general las características, preparación y técnica de dilución que puede ser aplicada en diferentes tipos de diluyentes disponibles en el mercado.

DILUCIÓN

PREPARACION DEL DILUYENTE:

Generalmente los diluyentes disponibles en el mercado requieren ser conservados en refrigeración para mantener sus características físico-químicas. Debido a esto es indispensable temperar el diluyente a temperatura ambiente antes de empezar el proceso de dilución. La mayoría de diluyentes requieren adicionar yema de huevo, debido a que aporta protección a los espermatozoides frente a los cambios de temperatura y al choque térmico. Para la preparación y adición de la yema de huevo se deben seguir los siguientes pasos:

- Obtener huevos frescos
- Lavar, enjuagar y secar los huevos
- Se recomienda frotar los huevos con un cepillo empapado en alcohol propílico al 70% y dejar secar al aire para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Partir los huevos y separar la yema manualmente o con ayuda de un separador metálico evitando que se rompa la membrana que encierra la yema.
- Luego de separar la mayor cantidad posible de la clara del huevo, se debe colocar la yema con su membrana intacta sobre una toalla de papel de cocina (no reciclada) y hacer que la yema ruede cuidadosamente sobre el papel, de esta manera se consigue retirar todo los restos de clara restantes.
- Con la ayuda de una jeringa de 5ml se procede a succionar la yema, o también se puede romper la membrana cuidadosamente para recoger la yema en un envase o en una probeta graduada (es importante que no existan restos de membrana mezclados con la yema de huevo)
- Posteriormente se debe adicionar cuidadosamente la cantidad exacta de yema de huevo al diluyente, utilizando un instrumento calibrado como una pipeta, una jeringa o una balanza.
- Finalmente se debe agitar vigorosamente la mezcla durante 10 a 20 segundos.

DILUCION DEL SEMEN

Para la aplicación del diluyente sobre el semen, se recomienda en lo posible que las dos sustancias se encuentren a la misma temperatura, para evitar choque térmico ya que se podría obtener falsos resultados.

Se recomienda:

- Utilizar únicamente la fracción rica en espermatozoides (2da fracción)
- No incluir la 1ra fracción del eyaculado y si es posible también descartar la 3ra fracción por cuanto pueden causar daño a la calidad de la muestra.

La dilución debe hacerse dependientemente de la cantidad del eyaculado del animal en proporciones donde el número mínimo de células espermáticas motiles sea de 50 millones por pajuela de 0.5ml. Una dosis de inseminación debería contener entre 50 millones hasta 150 millones de células espermáticas, dependiendo de la calidad del eyaculado y de la técnica de inseminación.

Debido a esto es recomendable la evaluación del semen antes de realizar la dilución, para poder determinar la concentración y la motilidad.

Nota: Para alcanzar el número recomendado de células espermáticas por dosis, puede ser necesario centrifugar el eyaculado

CONGELACIÓN DEL SEMEN

Para el proceso de congelación es indispensable tener todos los materiales necesarios listos y limpios para conseguir los resultados deseados.

Para la congelación se utilizara:

- ✓ Pajuelas de 0.5 ml
- ✓ Polvo PVC
- ✓ Refrigerador
- ✓ Tanque de nitrógeno líquido
- ✓ Racks para congelación

Para realizar la congelación se recomienda seguir los siguientes pasos:

- Envasar el semen diluido a temperatura ambiente en pajuelas de 0.5ml mediante succión, hasta conseguir que la pajuela este llena completamente.
- Retirar aproximadamente 1ml de semen de la pajuela con ayuda de una jeringa
- Sellar la pajuela usando polvo PVC y dejar que este se seque
- Colocar las pajuelas dentro del refrigerador para que estas se enfríen a 5 °C durante 1 hora.
- Sacar las pajuelas del refrigerador y colocarlas en racks a una altura de 4 o 5 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido permitiendo que las pajuelas se someta a los vapores durante un periodo de 20 minutos.
- Finalmente se sumerge las pajuelas dentro del tanque de nitrógeno líquido para que se mantengan almacenadas hasta que sean requeridas para la Inseminación Artificial

DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

Para que la descongelación del semen sea adecuada se recomienda realizar el proceso tomando todas las precauciones posibles y asegurándose de que el tiempo que transcurra entre descongelación-inseminación, sea el más corto posible.

Para la descongelación se debe seguir los siguientes pasos:

- Sacar las pajuelas del tanque de nitrógeno líquido, evitando la manipulación innecesaria.
- Descongelar las pajuelas sometiéndolas a baño maría durante 1 minuto, hasta conseguir que toda la muestra seminal tenga una temperatura adecuada.
- Seque las pajuelas cuidadosamente con ayuda de un papel de cocina
- Corte un extremo de las pajuelas y extraiga una pequeña cantidad de semen que permita realizar una evaluación de las características microscópicas dentro de un periodo de 10 a 15 minutos post-descongelación (se puede requerir un periodo de

tiempo hasta que las células descongeladas recuperen completamente la motilidad)

- Finalmente si el semen presenta las características deseadas post-descongelación, se puede proceder a utilizar el semen para realizar la inseminación ya sea quirúrgica o trans-cervical utilizando un estimado de 1-3 ml de semen, dependiendo del tamaño de la perra.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que antes de cada uso del diluyente, se examine cuidadosamente comprobando que se muestren las propiedades propias descritas, especialmente las referidas a su consistencia y aspecto.
- Si el diluyente muestra un aspecto y consistencia fuera de lo normal, se recomienda no utilizarlo antes de contactar con el laboratorio fabricante del diluyente.
- Se recomienda tener todos los materiales y equipos limpios, secos, calibrados y disponibles antes de empezar el proceso de crioconservación de semen.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Abreu E. Estudio comparativo del sistema genital femenino. [Sede we]. Venezuela: Abreu, E., Disponible en: <<http://biblioteca.unefm.edu.ve/anatomia%20comparada%20de%20los%20animales%20domesticos/sistema%20genital%20femenino-comparada.pdf>>
2. Alamo Santana D. Crioconservación y viabilidad espermática en la Especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152° C. [tesis doctoral]. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 2007. Disponible en: <<http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/1910/1/3031.pdf>>
3. Andrade A. Influencia de la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid 2005. Disponible en: <<http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t28575.pdf>>
4. Asteinza I. Gestación y parto en perras. [sede web]. México-Tlalpan [actualizado 2010; acceso 25 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.animalhome.com.mx/PDF_Perros_Pura_Sangre/gestacion_y_parto_en_perras_perros.pdf>
5. Avila E. Factores que afectan el comportamiento sexual en los perros. [Sede Web]. Disponible en: <<http://www.veterinariadelbosque.com/articulos/factores-que-afectan-el-comportamiento-sexual-en-los-perros.aspx>>
6. Batista Arteaga M, Alamo Santana D, González Valle F, Rodríguez Dorta N, Cabrera Martín F, Gracia Molina A. Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido versus ultracongeladores de -152° C) y variación individual sobre la calidad seminal en

el Dogo Canario. Revista Electrónica de Clínica Veterinaria RECVET [Internet]. Disponible en: <<http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050507.html>>

7. Corti L. Evaluación de la Capacidad Fecundante del Semen Congelado del Perro (Canis familiaris), en Ova Recuperadas de perras en celo inducido. Valdivia. [Sede Web]. Chile. Disponible en: <<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc829e/doc/fvc829e.pdf>>

8. DeCs. Motilidad espermática. [Sede web]. DeCS, [actualizada enero del 2011; acceso 19 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgibin/decserver/decserver.xis&previous_page=homepage&task=exact_term&interface_language=e&search_language=e&search_exp=Motilidad%20Espermática>

9. Esquivel, C. Gestación en la perra. [Sede web]. Esquivel, C., [actualizado 2008]. Disponible en: <http://www.ecografiavet.com/pdf/Gestacion_en_la_perra.pdf>

10. Gobellos G. Diagnóstico del ciclo estral en la perra. [Sede Web]. Argentina. [Actualizado 2009]. Disponible en: <http://www.foyel.com/cartillas/20/citologia_vaginal_canina.html>

11. Hernández J. Colección y Evaluación del semen. [Sede Web]. México: Club Rottweiler. [Actualizada 30 de noviembre del 2007]. Disponible en: <<http://www.clubrottweiler.net/foro/showthread.php?t=204>>

12. Histolabveterinaria. Citologías. [Sede web]. Chile-Vilches: Histolabveterinaria, [acceso 20 de marzo de 2011]. Disponible en: <<http://www.histolabveterinaria.com/citologias.htm>>

13. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli A. La Microscopía Electrónica como Herramienta en la Evaluación del Semen Canino. [Sede Web]. La Plata. Disponible en:

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/138_Jurado_ME_semen_caniño.pdf>

14. Kustritz M. Manual de reproducción del perro y del gato. [Libro on line]. Esquivel, C., [actualizado 2009]. Disponible en: <<http://books.google.com.ec/books?id=ExKoTVjUTQ4C&printsec=frontcover&fl=es#v=onepage&q&f=false>>

15. Latinpedia. Examen de la calidad del semen para su uso en inseminación artificial. [Sede web]. Latinpedia, [actualizada 03 de julio de 2008]. Disponible en: <<http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Examen-de-la-calidad-del-semen-para-su-uso-en-inseminacion-artificial-ad498.html>>

16. Manteca Vilanova X. Etología Clínica Veterinaria del perro y del gato. 3ª ed. Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias; 2008.

17. MedVet.com. Congelación Semen Canino [sede Web]. Buenos Aires: MedVet.com, [Actualizada 23 de julio de 2009]. Disponible en: <<http://www.medvet.com.ar/index.php/comisiones-y-departamentos/186>>

18. Minitube.de. The Standard for Bovine Semen Production base don an egg yolk extender [sede Web]. Alemania: Minitube.de, [actualizado 2011]. Disponible en: <http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0250_Canipro_en_250906.pdf>

19. Muño, R. Evaluacion de la motilidad y Viabilidad del semen bovino, mediante el uso de sistemas casa y citometria de flujos: identificación de subpoblaciones espermáticas, 2009. [sede web]. España: Muño, R. Disponible en: <http://dSPACE.usc.es/bitstream/10347/2406/1/978849750986_content.pdf>

20. Parrado J, Pardo E. Cruz P. Evaluación de dos diluyentes para la evaluación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de frutuosa. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal REDALIC Internet 2007. Consultado el 01 de agosto del 2010. 8 (001), Disponible en: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/896/89680106.pdf>>
21. Pazos J. Tipos de Inseminación Artificial. [Sede Web]. Disponible en: <www.sanbernardos.es/tiposde.htm>
22. Pet Care Gt. Female dog reproductive system. [Sede web]. Unites States [Actualizado 2010]. Disponible en: <<http://www.petcaregt.com/dogcare/femaledogreproductivesystem.html>>
23. Restrepo G, Vásquez N, García A. Criopreservación de Semen Canino y su Aplicación en la Inseminación Artificial. Revista Electrónica CES [Internet]. Disponible en: <http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo_12.pdf>
24. Sánchez A. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado, 2007. [Sede web]. Valdivia 2002. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2002000100014&script=sci_arttext>
25. Serrano S. Parámetros Seminales anormales. [Sede web]. Colombia 2009, [Actualizada 01 de julio 2009, acceso 02 de agosto de 2010]. Disponible en: <www.campusveterinariosenweb.com/file.php/1/moddata/forum/14/34311/parametros_seminales_anormales.doc>
26. Sobreperros.com. Citología Vaginal Canina. [Sede web]. Sobreperros, [actualizado 2007]. Disponible en: <http://www.sobreperros.com/articulos/citologia_canina_en_la_perra>

27. Stornelli A, Stornelli M, Arauz M. Inseminación Artificial con Semen Fresco, Refrigerado y Congelado, aplicado y desarrollado en caninos. [Sede Web]. La Plata. Disponible en: [<www.fcv.unlp.edu.ar/.../056_VE21n1_stornelli_inseminacion_caninos.pdf>](http://www.fcv.unlp.edu.ar/.../056_VE21n1_stornelli_inseminacion_caninos.pdf)
28. Stornelli M, De la Sota L. Congelación de semen en caninos. [Sede Web]. La Plata: PV ARGOS.com, [Actualizada 08 de diciembre de 2008]. Disponible en: [<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/1500/>](http://argos.portalveterinaria.com/noticia/1500/)
29. Stornelli M, De la Sota R. Fertilidad y Supervivencia del Semen Canino Criopreservado. [Sede Web]. La Plata. Disponible en: [<http://www.voraus.com/adiestramientocanino/modules/wfsection/html/a000502_115_Stornelli_criopreservacion.pdf>](http://www.voraus.com/adiestramientocanino/modules/wfsection/html/a000502_115_Stornelli_criopreservacion.pdf)
30. Universidad de Córdoba. Reproducción animal. [Sede web]. España: Universidad de Córdoba. [Actualizada 2008]. Disponible en: [<http://www.uco.es/organiza/departamentos/medicina-cirugia/reproduccion/proyecto/metodos1.html>](http://www.uco.es/organiza/departamentos/medicina-cirugia/reproduccion/proyecto/metodos1.html)
31. Universidad de Salamanca. Técnicas de Microbiología básica: Aislamiento y resiembra de Microorganismos y manejo del microscopio y tinciones. [Sede web]. España: Universidad de Salamanca, 2008. Disponible en: [<http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf>](http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf)
32. Valera M. Reproducción Canina, 2008. [Sede Web]. Disponible en: [<www.centauroveterinarios.com/tienes/reproduccionCanina.pdf>](http://www.centauroveterinarios.com/tienes/reproduccionCanina.pdf)
33. Velásquez R. Examen y Diagnóstico Andrológico en el perro. Extracción de semen. [Sede Web]. Venezuela. Disponible en: [<http://reynaldovelazquez.wordpress.com/2008/08/16/examen-y-diagnostico-andrologico-en-el-perro-extraccion-de-semen/>](http://reynaldovelazquez.wordpress.com/2008/08/16/examen-y-diagnostico-andrologico-en-el-perro-extraccion-de-semen/)

34. Wanke M, Gobello C. Reproducción en Caninos y Felinos Domésticos. 1ª ed. termédica; 2008.

ANEXOS

Animal No		MOTILIDAD (Valor de referencia 80-90%)				MORFOLOGIA (Valor de referencia 80-90%)										MORTALIDAD (Valor de referencia 5%)		
Muestra	DILUYENTE		Muy buena (%)	Buena (%)	Regular (%)	Pobre (%)	Cabeza					Cuello			Cola		Normal (%)	Anormal (%)
	SI	NO					Ovalada	Acintada	Periforme	Redonda	Doble	Dobaldo	Grueso	Roto	Corta	Doblada		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		

VALORES DE REFERENCIA

MOTILIDAD:	Morfología:	Mortalidad:
Muy buen 80-100%	Normal 80%	Normal 5-10%
Buena 60-79%	Anomalías primarias Menos del 10%	Anormal Mas del 10%
Regular 40-59%	Anomalías secundarias Menos del 20%	
Pobre Menos del 40%		

1. Hoja de campo utilizada para la toma de datos de la investigación



2. Diluyente Caniplus Freeze



3. Preparación del diluyente



4. Extracción de yema de huevo (7ml) para mezclar con el diluyente



5. Proceso de extracción de semen (método manual)



5. Toma de la muestra seminal utilizando pipeta graduada para posterior evaluación en el microscopio

6. Tabla de porcentajes obtenidos en la investigación al realizar 6 tratamientos y 10 repeticiones

Motilidad individual

TRATAMIENTOS	REPETICIONES									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 B1	90%	80%	80%	80%	80%	90%	90%	80%	90%	90%
A1 B2	50%	50%	55%	60%	60%	55%	60%	60%	60%	55%
A1 B3	55%	50%	60%	60%	55%	60%	55%	60%	60%	60%
A2 B1	80%	90%	80%	80%	80%	80%	90%	80%	80%	90%
A2 B2	70%	60%	55%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%
A2 B3	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%

Motilidad en masa

TRATAMIENTOS	REPETICIONES									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
A1 B1	90%	90%	80%	90%	90%	90%	90%	95%	90%	90%
A1 B2	80%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%
A1 B3	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%
A2 B1	90%	80%	80%	80%	80%	75%	80%	80%	80%	80%
A2 B2	80%	60%	75%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	55%
A2 B3	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%	60%

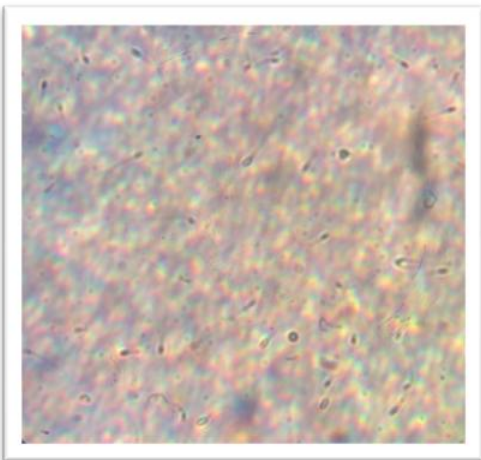
Mortalidad

TRATAMIENTOS	REPETICIONES									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
A1 B1	4.5%	5.5%	4%	6%	3%	3.5%	8.5%	4.5%	6%	4.5%
A1 B2	17%	23%	15.5%	19.5%	18.5%	23%	19.5%	20%	21%	19.5%
A1 B3	27%	15%	15%	14%	14%	16.5%	14.5%	15%	17.5%	15.5%
A2 B1	6.5%	4%	4%	5%	4%	4.5%	5%	4.5%	5.5%	5.5%
A2 B2	14.5%	14.5%	15.5%	15.5%	15%	15%	14.5%	13.5%	14.5%	18%
A2 B3	10.5%	11%	12.5%	9%	11.5%	13%	13%	11%	11.5%	13.5%

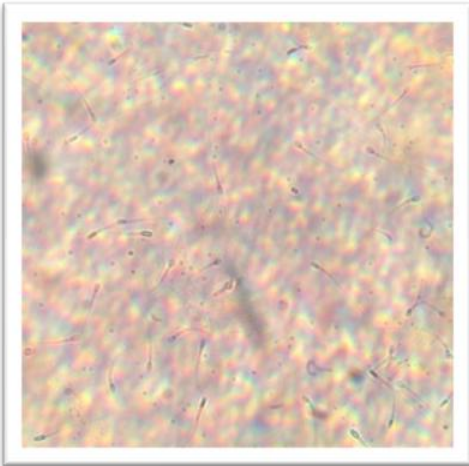
Morfología

TRATAMIENTOS	REPETICIONES									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
A1 B1	95.5%	97.5%	98.5%	98%	99%	94.5%	96.5%	98%	97%	98%
A1 B2	95.5%	94.5%	97%	98.5%	97%	97.5%	96.5%	97.5%	99%	97%
A1 B3	96.5%	97.5%	98%	99%	97.5%	97.5%	98%	97.5%	97.5%	96%
A2 B1	96.5%	98.5%	97.5%	97.6%	97.5%	96%	96%	99%	99%	97.5%
A2 B2	97.5%	97.5%	96.5%	98%	97.5%	95%	95.5%	98%	97%	97.5%
A2 B3	96.5%	96%	98.5%	96.5%	97%	97.5%	98.5%	96.5%	98%	99%

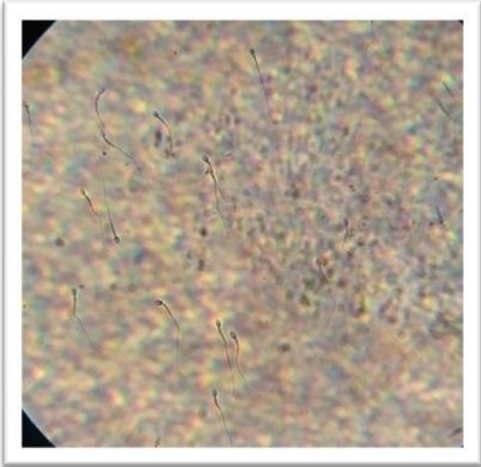
7. Vista microscópica de algunas placas evaluadas en la investigación



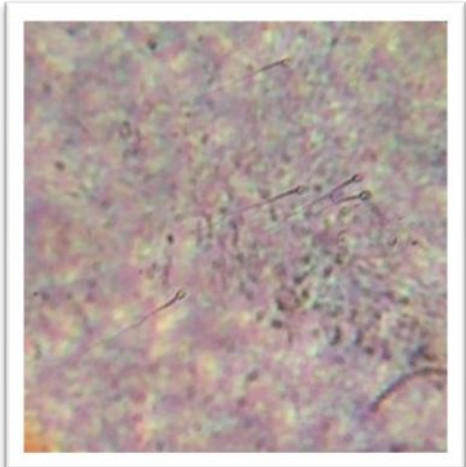
Lente aumento 40X



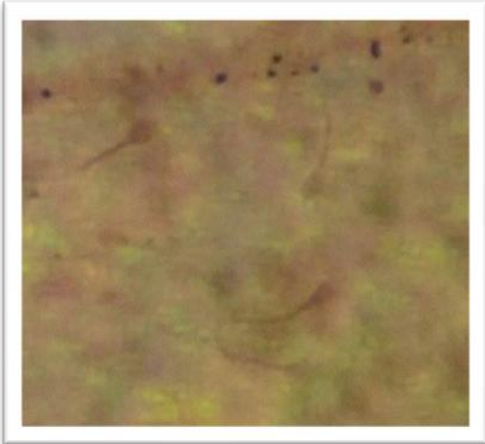
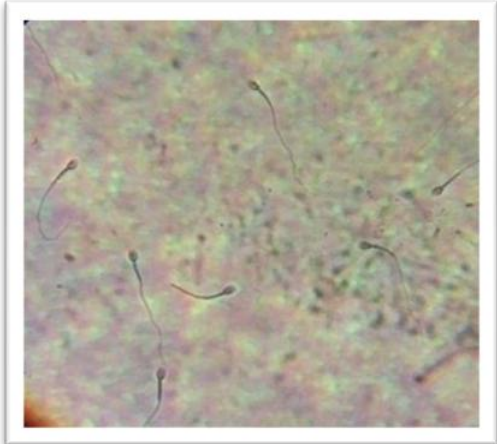
Lente aumento 40X



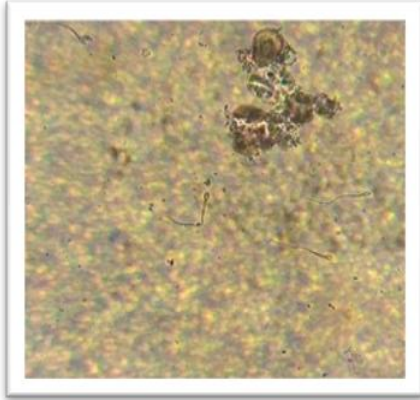
Lente aumento 40X



Lente aumento 100X

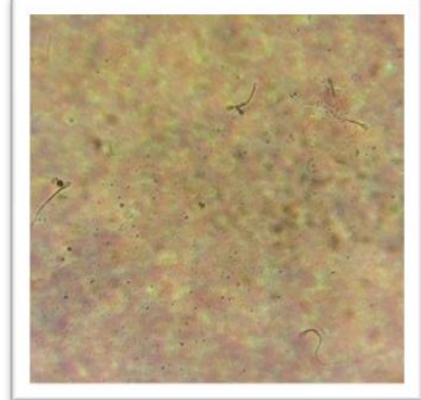


Lente aumento 40X

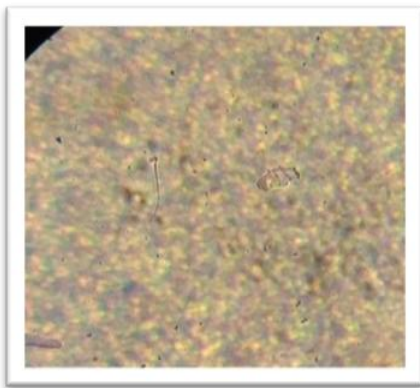


Lente aumento 40X

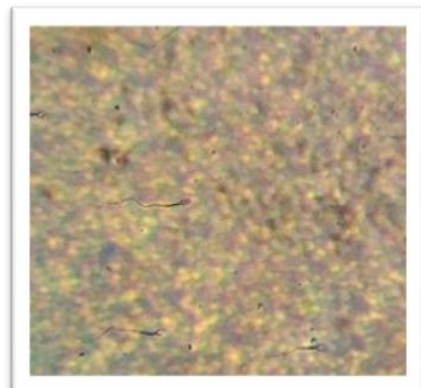
Lente aumento 100x



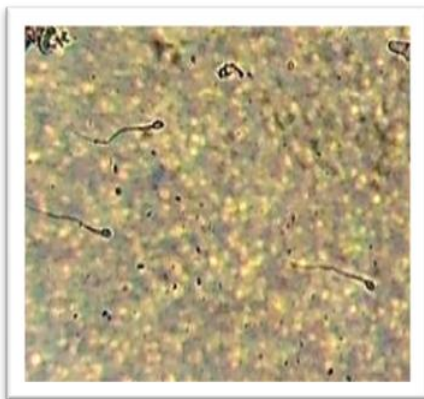
Lente aumento 40X



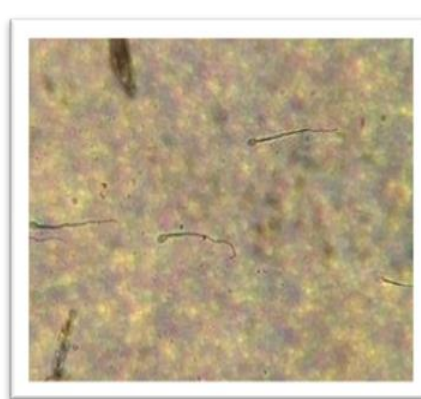
Lente de aumento 40X



Lente aumento 40X



Lente aumento 40X



Lente aumento 40X

