



## **RESUMEN**

### **Título: “Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial”**

La finalidad de esta tesis fue extraer, procesar y congelar en pajuelas, el semen canino, almacenándolo en Nitrógeno líquido para posteriormente usarlo en la Inseminación Artificial. Las muestras que se utilizaron pertenecieron a 5 machos caninos. Posterior a su recogida, se realizó la evaluación de su contrastación seminal, se procedió a mezclar cada una con el diluyente Canipro freeze A y B, respetando los protocolos de temperatura que requiere el mismo, evitando de esta manera el shock térmico y por ende la muerte de los espermatozoides, finalizando el procedimiento con la obtención de pajuelas de 0.25 mL, las cuales se almacenaron en el tanque de Nitrógeno. En la parte estadística se utilizó un Diseño de Bloques al Azar (DBA), encontrando los siguientes tratamientos: A. Semen pre congelado de 5 machos caninos. B. Semen post congelado de 5 machos caninos. C. semen fresco (testigo). Obteniendo los mejores resultados en el tratamiento C, tanto en concentración, motilidad individual y morfología, ya que este no estuvo sujeto a ningún cambio, en segundo lugar se encuentra el tratamiento A, por último el B. 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 de las 5 hembras caninas utilizadas en la presente investigación, obteniendo una tasa de preñez del 60%.

**Palabras claves:** congelación de semen canino, nitrógeno líquido, pajuelas caninas, crioconservación semen de perro, pajuelas de semen de perro, inseminación con pajuelas caninas.





## ÍNDICE

I.	Introducción	10
1.	Objetivo general	11
2.	Objetivo específico	11
II.	Revisión de literatura	12
2.1	Anatomía del aparato reproductor canino	12
2.2	Fisiología del aparato reproductor canino	20
2.3	Semen: características y sus componentes	20
2.4	Colección del semen	42
2.5	Semen pre y post congelación	46
2.6	Procesamiento, almacenamiento, descongelación y manejo de semen canino	51
2.7	Citología vaginal, inseminación artificial y gestación	55
III.	Materiales y métodos	65
1.	Materiales	65
2.	Métodos	66
IV.	Diseño estadístico y/o experimental	77
V.	Resultados	80
VI.	Discusión	89
VII.	Conclusiones	92
VIII.	Recomendaciones	93
IX.	Resumen	94
X.	Summary	95
XI.	Bibliografía	96
	Anexos	103





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía del macho canino	12
<b>Figura 2.</b> Anatomía del perro	13
<b>Figura 3.</b> Túbulos seminíferos	14
<b>Figura 4.</b> Próstata canina	15
<b>Figura 5.</b> Anatomía de la hembra canina	17
<b>Figura 6.</b> Irrigación del aparato reproductor femenino	18
<b>Figura 7.</b> Comportamiento durante la cópula	23
<b>Figura 8.</b> Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal de la perra	25
<b>Figura 9.</b> Niveles hormonales durante el ciclo estral de la perra	26
<b>Figura 10.</b> Morfología de un espermatozoide canino	34
<b>Figura 11.</b> Anomalías de los espermatozoides	34
<b>Figura 12.</b> Teratospermia	38
<b>Figura 13.</b> Hematospermia	39
<b>Figura 14.</b> Colección manual del semen	43
<b>Figura 15.</b> Cono de látex	45
<b>Figura 16.</b> Motilidad espermática	48
<b>Figura 17.</b> Motilidad espermática	49
<b>Figura 18.</b> Morfología espermática	49
<b>Figura 19.</b> Tinción Diff Quick	50
<b>Figura 20.</b> Pajuela de semen canino	54
<b>Figura 21.</b> Toma de muestra para citología vaginal	56
<b>Figura 22.</b> Secuencia del correcto hisopado de la vagina de las perras	56
<b>Figura 23.</b> Preparación del portaobjetos con la muestra	56
<b>Figura 24.</b> Células epiteliales vaginales	57
<b>Figura 25.</b> Proestro	58
<b>Figura 26.</b> Estro	59
<b>Figura 27.</b> Diestro	59
<b>Figura 28.</b> Inseminación artificial	60
<b>Figura 29.</b> Cámara de Neubauer	74





## ÍNDICE DE CUADROS ESTADÍSTICOS

<b>Cuadro 1.</b> Distribución de los canes en bloques y tratamientos	78
<b>Cuadro 2.</b> Color del semen fresco	80
<b>Cuadro 3.</b> Volumen promedio del semen precongelado	82
<b>Cuadro 4.</b> Valores promedios de la motilidad individual	83
<b>Cuadro 5.</b> Porcentajes promedios de la morfología espermática	84
<b>Cuadro 6.</b> Valores de concentración espermática pre y pos congelación en comparación con el testigo	85
<b>Cuadro 7.</b> Fechas de inseminación artificial con semen crioconservado	87





## ÍNDICE DE GRÁFICOS ESTADÍSTICOS

<b>Grafico 1.</b> Color del semen de los canes sometidos a estudio	82
<b>Grafico 2.</b> Valores promedio del volumen del semen precongelado	83
<b>Grafico 3.</b> Valores promedio de la motilidad individual	83
<b>Grafico 4.</b> Morfología espermática del semen	85
<b>Grafico 5.</b> Valores promedio de la concentración espermática	87
<b>Grafico 6.</b> Resultados de la inseminación artificial con semen crioconservado	87





## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo1.</b> Resultados de la crioconservación pre evaluación estadística	104
<b>Anexo2.</b> Selección del macho	105
<b>Anexo3.</b> Extracción del semen	106
<b>Anexo4.</b> Utilización de condones plásticos	106
<b>Anexo 5.</b> Contrastación seminal	107
<b>Anexo 5.1.</b> Evaluación macroscópica	107
<b>Anexo 5.2.</b> Evaluación microscópica	107
<b>Anexo 5.2.1.</b> Evaluación de la concentración espermática	108
<b>Anexo 5.2.2.</b> Evaluación de la motilidad espermática	109
<b>Anexo 5.2.3.</b> Evaluación de morfología espermática	109
<b>Anexo 6.</b> Preparación de diluyente	109
<b>Anexo 7.</b> Elaboración de pajuelas	111
<b>Anexo 8.</b> Vapores de nitrógeno líquido	111
<b>Anexo 9.</b> Citología vaginal	112
<b>Anexo 10.</b> Inseminación artificial	113
<b>Anexo 11.</b> Prueba de progesterona.	114





Yo, Adriana Priscila Ochoa Pintado reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Adriana Priscila Ochoa Pintado certifica que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

  
\_\_\_\_\_



Yo, Lissette Eliana Torres Arévalo reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Lissette Eliana Torres Arévalo certifica que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.





Universidad de Cuenca  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial”**

*Tesis de Grado previo a la obtención del título de “Médica Veterinaria Zootecnista”.*

**AUTORAS:**

**Adriana Priscila Ochoa Pintado**

**Lisette Eliana Torres Arévalo**

**DIRECTOR:**

**Dr. Fredi Carpio Alemán**

**Cuenca-Ecuador**

**2012**





## I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen canino en la actualidad es una técnica utilizada para mantener el semen de animales con gran capacidad de transmisión de características físicas y genéticas, al que no todos los criadores caninos tienen acceso, ya sea por el costo de la monta o por la dificultad de la movilización del animal.

El interés de los criadores caninos en la criopreservación de semen y por ende en la IA, ha aumentado en forma creciente, debido a la necesidad del mejoramiento genético de la especie canina.

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco.

Debido a estos antecedentes se han realizado un sin número de investigaciones para satisfacer las necesidades de los criadores caninos, implementando bancos germoplásmicos, para conservar las diferentes razas caninas en el futuro y mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener una tasa de preñez y camadas satisfactorias y de la misma manera, da pautas para futuras investigaciones en especies que se encuentran en peligro de extinción y poder conservar la vida animal.

Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias, ya que el semen canino es muy sensible a los procesos de crioconservación y el desarrollo en esta área es mínimo. Se necesitan más investigaciones para poder mejorar la habilidad de su conservación.





Los objetivos del presente trabajo de investigación son:

### **Objetivo general**

Realizar la extracción, procesamiento y congelación de semen canino para su uso en la Inseminación Artificial.

### **Objetivos específicos**

1. Realizar la congelación del semen canino mediante el uso de nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .
2. Evaluar la viabilidad seminal pre y post congelación del semen canino.
3. Usar el semen canino descongelado en Inseminación Artificial.

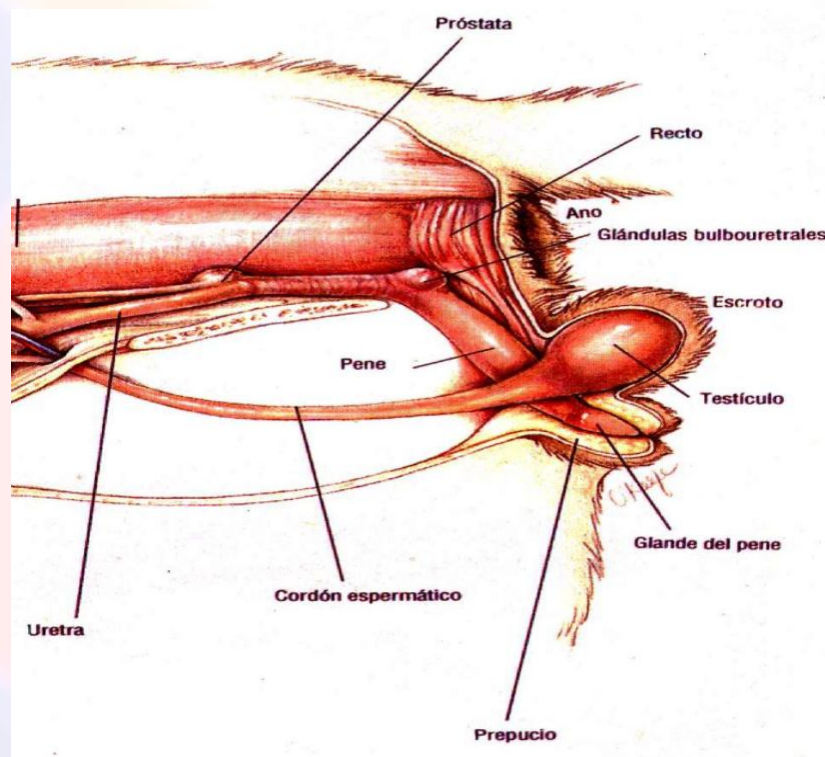


## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR CANINO

#### 2.1.1 ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

El sistema reproductor masculino está conformado 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).



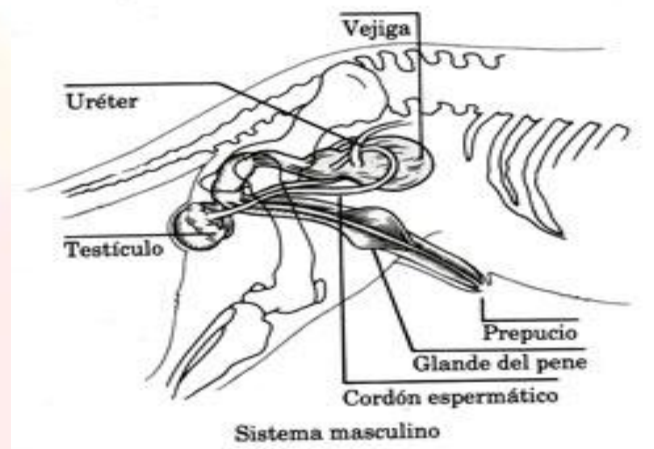
**Figura 1.** Anatomía del macho canino (Junco, 2008).

##### 2.1.1.1. 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). Tiene función doble, ya que produce los gametos masculinos (espermatozoides), y generan una serie de hormonas esteroideas (Alamo, 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'Encís Bulldogs, 2007)

### **2.1.1.2. Escroto y cordón espermático**

#### **2.1.1.2.1. 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 (Valera, 2008).

Esta zona de la piel está cubierta por vello genital (Latinpedia, 2008).

#### **2.1.1.2.2. Cordón espermático**

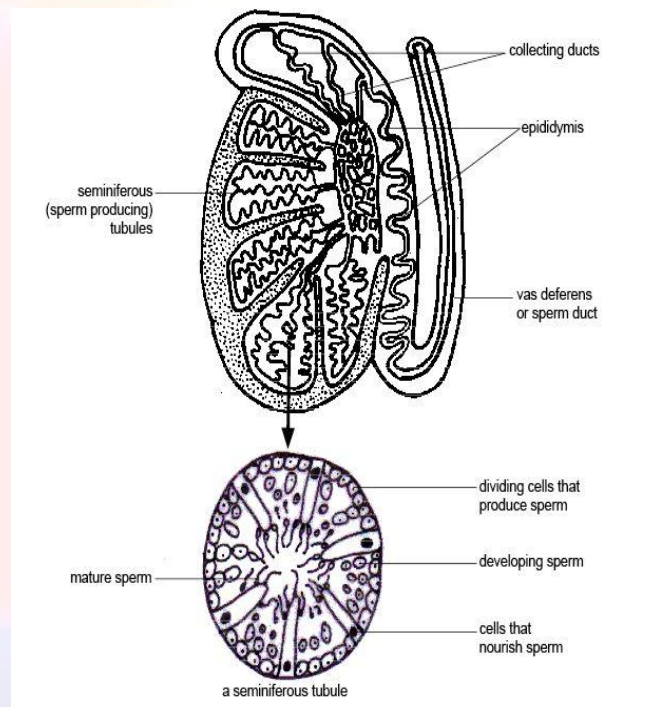
Discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por los siguientes componentes:

- Conducto deferente, músculo cremáster y vena espermática (testicular) (Alamo, 2007).

### 2.1.1.3. 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 (Tendulkar, 2008)

### 2.1.1.4. Uretra y conducto deferente

#### 2.1.1.4.1. Uretra

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

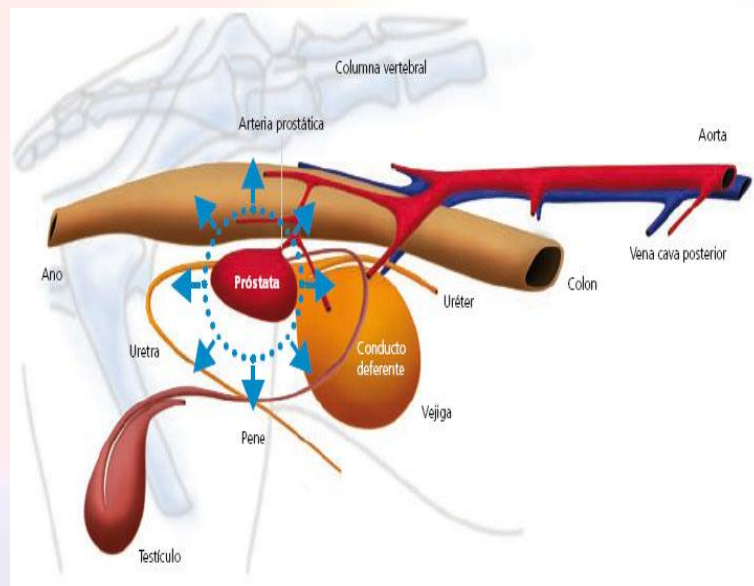
#### 2.1.1.4.2. Conducto deferente

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

#### 2.1.1.5. Glándula accesorias

##### 2.1.1.5.1. 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. (Alamo, 2007., Valera, 2008).



**Figura 4.** Próstata canina (Gil, 2009).

##### 2.1.1.5.2. Vesícula seminal

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



### 2.1.1.5.3. Glándula de Cowper

Las 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).

### 2.1.1.6. 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
- Glante del pene o *glans penis*: Se subdivide en:
  - Bulbo peneano
  - Porción larga del pene
  - Hueso peneano
- Ampolla (Alamo, 2007).

### 2.1.1.7. Prepucio

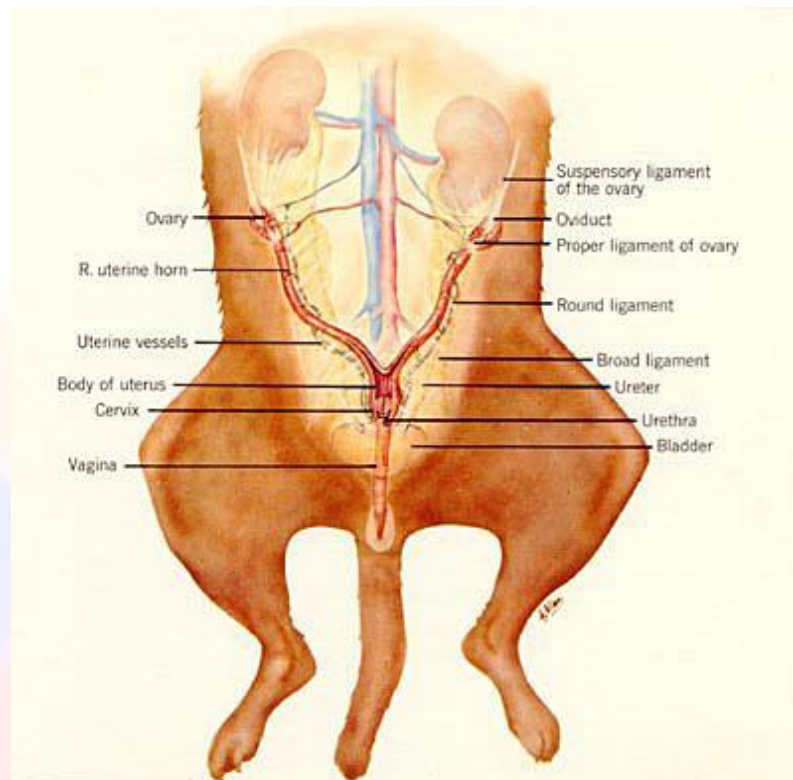
Es una vaina tubular que se origina y es continuación de la piel del abdomen, y que recubre el pene flácido en su totalidad. Segrega un líquido verdoso denominado *esmegma* que lubrica el pene y que es completamente normal (Valera, 2008).

## 2.1.2. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA

Se describirán los órganos desde el interior al exterior.







**Figura 5.** Anatomía de la hembra canina (Jon Vilhauer, 2011).

#### **2.1.2.1. Ovarios**

Son 2 y están en la bolsa ovárica, en la región dorso caudal del abdomen.

Su tamaño es variable según la raza y el aspecto de su superficie cambia según el estado del ciclo estral en que se encuentre la hembra (Valera, 2008).

Tienen dos funciones la producción gametos femeninos que son los óvulos y la secreción de hormonas (Alamo, 2007).

#### **2.1.2.2. Trompa uterina**

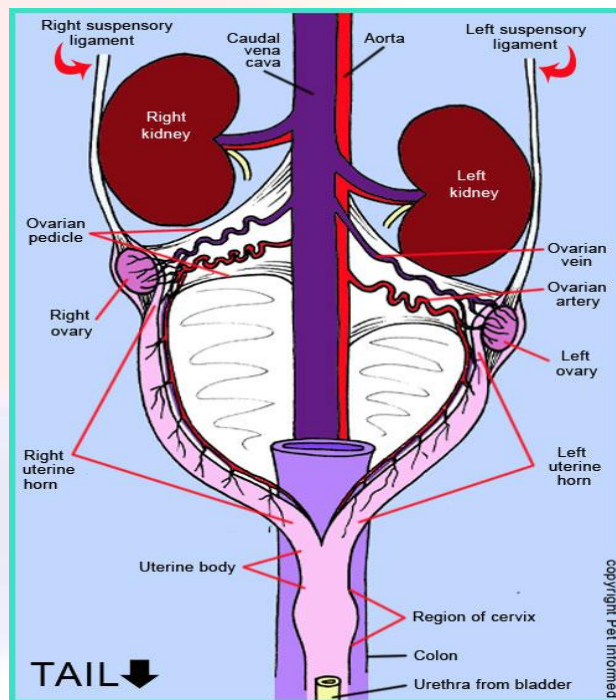
Los oviductos o trompas uterinas son unos conductos estrechos, sinuosos y de músculos membranosos, que siempre se localizan adyacentes al ovario correspondiente. Durante el estro, la mucosa de las trompas uterinas alcanza su máximo estado de hipertrofia y diferenciación (Alamo, 2007; Valera, 2008).

En la perra, la terminación útero-tubárica es brusca, de manera que la extremidad ístmica de la trompa asoma en el interior del cuerno, formando una papila que se corresponde con el orificio uterino de la trompa, que dificulta tanto el acceso de las espermatozoides como del huevo en sentido opuesto. La porción media del oviducto se denomina ámpula, y la inmediata al útero se denomina istmo (Alamo, 2007; Valera, 2008).

### 2.1.2.3. Útero

Es un órgano tubular que se divide en dos cuernos, cuerpo y cuello. Los cuernos son largos y se encuentran ubicados junto a la pared abdominal y alojan a los fetos durante la gestación (Valera, 2008).

El cuerpo del útero es corto y limita cranealmente con la bifurcación de los cuernos y caudalmente con el cuello o *cérvix*. Su función es la de transportar los óvulos y espermatozoides. En caso de gestación, allí se produce la nidación de los huevos o cigotos, los futuros cachorros.



**Figura 6.** Irrigación del aparato reproductor femenino (O'Meara, 2009)



#### **2.1.2.4. Vagina**

Se halla entre el cuello uterino (cérvix) y el vestíbulo vaginal. Su función principal es en la cópula y es la parte final del canal del parto (Valera, 2008).

##### **2.1.2.4.1. Vestíbulo vaginal**

Es el espacio comprendido entre la vagina y la vulva. Su función radica en la cópula (Valera, 2008).

##### **2.1.2.5. Clítoris**

Es el órgano femenino homólogo del pene y está en el suelo del vestíbulo vaginal pero más cerca de la vulva. Su función es la estimulación sexual (Valera, 2008).

##### **2.1.2.6. Vulva**

Está localizada por debajo del ano y es la terminación del sistema reproductivo de la hembra.

Comprende el vestíbulo, el clítoris y los labios vulvares. Es el orificio urogenital externo de a perra. Tiene dos labios fusionados por arriba y dejan por debajo la hendidura vulvar Su función es urogenital, para la monta y como parte final del aparato urinario (Valera, 2008).





## **2.2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR CANINO**

### **2.2.1. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO**

La pubertad abarca los cambios morfológicos, fisiológicos y en el comportamiento que sufren los caninos, ya que se inicia la actividad gonadal (Gobello, 2008).

La pubertad depende de:

- (1) La disminución del mecanismo de retroalimentación negativa, de los esteroides sexuales sobre la secreción de las gonadotropinas
- (2) Aumento en la respuesta de la adenohipofisis a la GnRH (Valera, 2008).

#### **2.2.1.1. Pubertad**

Aparece comúnmente en el perro entre los 6 y 18 meses de edad y es más temprana en razas pequeñas que en grandes (Manteca, 2008).

##### **Testículos:**

Tienen dos funciones básicas que se encuentran totalmente relacionadas:

- La producción de espermatozoides.
- Producción de hormonas, principalmente testosterona.

Funcionalmente es posible distinguir en los testículos 3 compartimentos:

- Compartimento intersticial: células de Leydig, que producen testosterona, dihidrotestosterona, dihidroepiandrosterona, androstendiona y estradiol.
- Los compartimentos restantes, se encuentran en los túbulos seminíferos, producen inhibina, activina y proteína ligadora de andrógenos (Gobello, 2008).

#### **2.2.1.2. El proceso de la espermatogénesis: tiene 3 fases:**

##### **2.2.1.2.1. Espermatocitogénesis:**

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

##### **2.2.1.2.2. Espermiogénesis**

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





### **2.2.1.2.3. Espermiación**

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

### **2.2.1.2.4. 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).

### **2.2.1.3. Comportamiento del macho en el apareamiento**

Los machos son más territoriales que las hembras, por lo tanto, son llevadas al territorio del macho para la cópula (Astenzia, 2010)

El comportamiento del macho abarca las conductas de la monta (Gobello, 2008).

- Erección
- Intromisión
- Eyaculación

### **2.2.1.3.1. Regulación**

#### **2.2.1.3.1.1. Influencia hormonal**

El control de la función testicular se realiza a través de las interacciones entre el eje hipotalámico-pituitario-testicular (Gobello, 2010).

Los andrógenos estimulan la conducta sexual del macho, por lo que la variabilidad individual depende de las respuestas del sistema nervioso central a dichas hormonas. La prolactina aumenta su concentración plasmática después de la eyaculación (Manteca, 2008).





#### **2.2.1.3.1.2. Interacción sexual y social**

Los machos con poca experiencia, así como los que no han mantenido contacto con otros perros antes de la pubertad, quieren montar a la perra desde un lado y se demoran más tiempo para poder penetrarla completamente, en comparación con los que sí son experimentados, pudiendo provocar un fracaso (Manteca, 2008; Astenzia, 2010).

El hipotálamo permite al perro responder a estímulos psíquicos y sensoriales del medio ambiente condicionados por la experiencia adquirida dentro del grupo (Gobello, 2008).

#### **2.2.1.3.1.3. Sentidos**

El principal sentido que determina la conducta es el olfateo por parte del macho del hocico, orejas, cuello, flancos y área vulvar de la hembra, teniendo por parte de la misma 2 respuestas en las siguientes circunstancias:

- Ella toma la misma conducta si se encuentra en estro.
- Si está en proestro, la hembra va a rechazar al macho (Manteca, 2008).

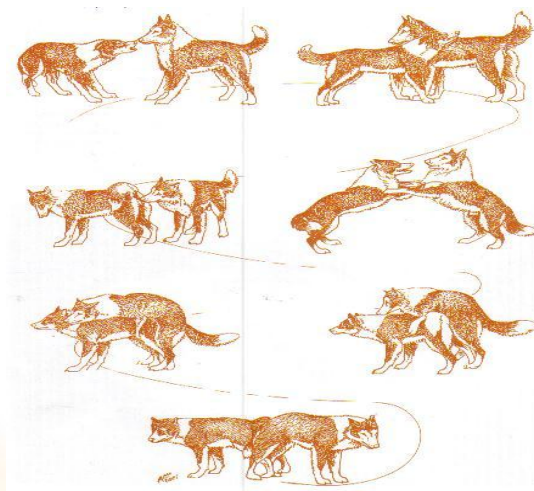
#### **2.2.1.4. Erección y eyaculación**

##### **2.2.1.4.1. 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)





**Figura 7.** Comportamiento durante la cópula (Acrogliano, 2007).

#### 2.2.1.4.2. 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” (Gobello, 2008).
- **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” (Gobello, 2008).
- **La tercera fracción** proviene de la próstata y es de color transparente, de consistencia acuosa, luego de la fracción espermática comienzan movimientos pulsátiles de la uretra. Esta fracción no contiene espermatozoides, es la más abundante y su emisión tiene una duración promedio de 3 a 30 minutos. Del volumen total eyaculado, ocupa el 90%. Se llama “fracción prostática” (Gobello, 2008).

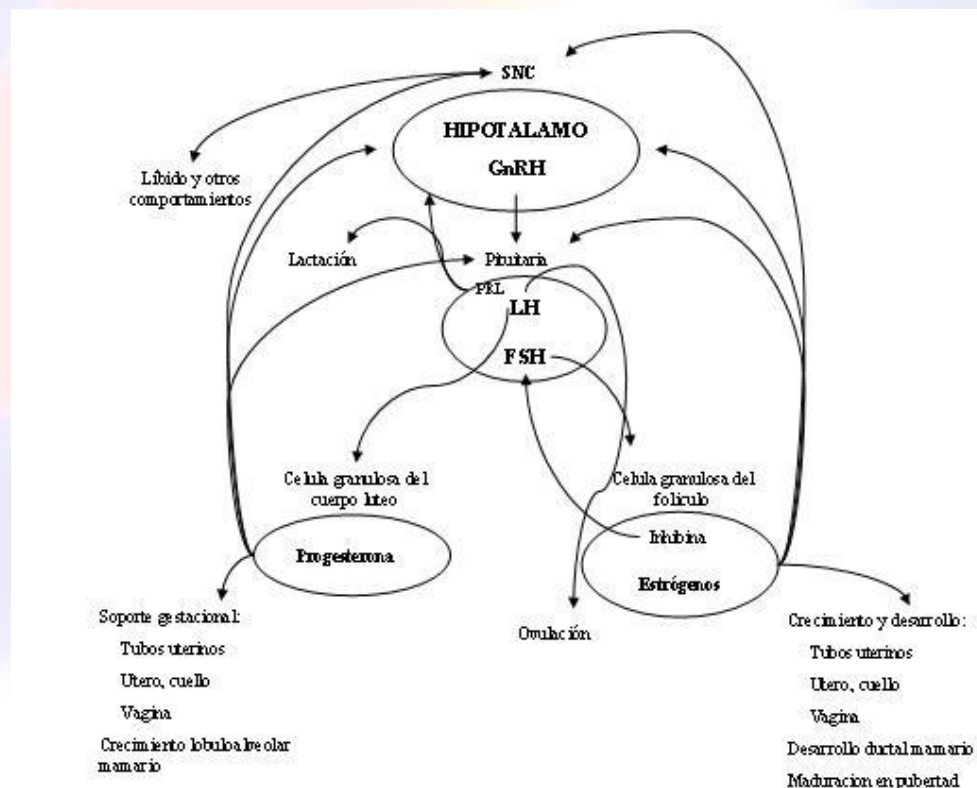
### 2.2.1.5. Problemas en el mantenimiento de la libido

La falta de libido puede deberse a factores otros factores como problemas genéticos, agresividad en las hembras, inexperiencia, bajas concentraciones de testosterona, machos seniles, enfermedades sistémicas, defectos en el pene y prepucio, enfermedades hormonales, administración de testosterona (se produce una retroalimentación negativa). Malnutrición. Los corticosteroides, estrógenos y prostágenos, el ketoconazol, disminuyen la producción de testosterona (Manteca, 2008).

### 2.2.2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA

#### 2.2.2.1. Pubertad

A partir de la pubertad, el funcionamiento del aparato genital adopta un ritmo cíclico que generalmente se exterioriza por dos períodos de celo por año, en esta etapa se produce la primera ovulación (Manteca, 2008).

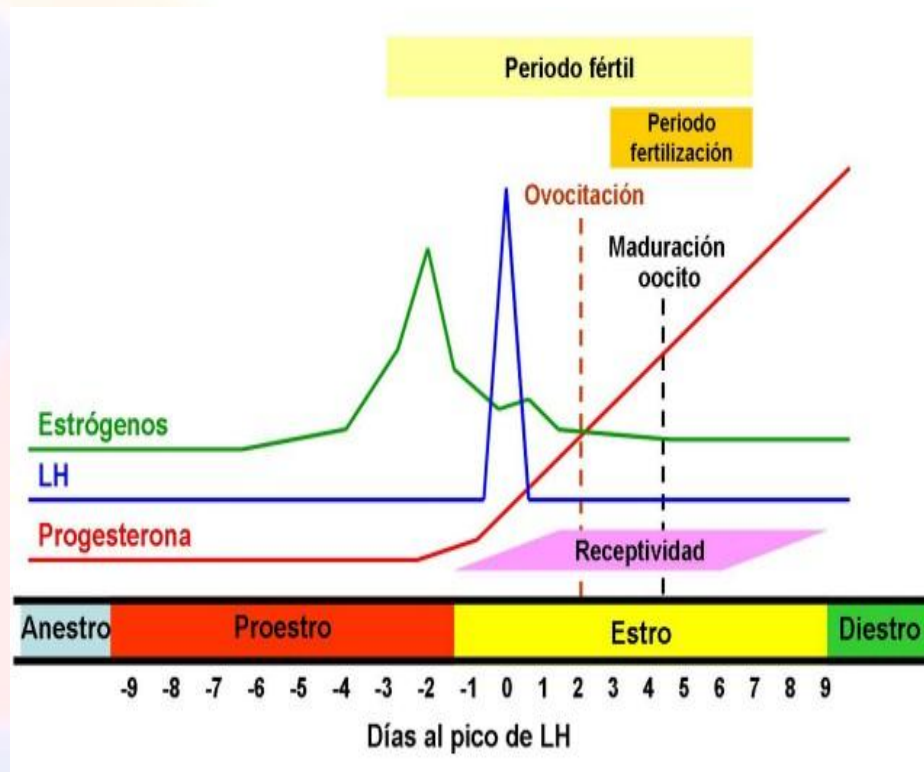


**Figura 8.** Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal de la perra (Velázquez, 2008).



### 2.2.2.2. Niveles hormonales en la perra

La hormona luteinizante y la progesterona están a niveles bajos durante el proestro, mientras que los estrógenos se elevan. La LH produce la ovulación (en 1-3 días). Al final del estro, la progesterona sufre un incremento importante en su nivel, sin preñez, la progesterona no aumenta a más de 30ng por 1mL de suero y desciende en el día 15. Estas interacciones tienen lugar entre el hipotálamo y la hipófisis, junto con el ovario que es la fuente de estrógenos y progesteronas (Alamo, 2007).



**Figura 9.** Niveles hormonales durante el ciclo estral de la perra (Universidad de Córdoba, 2011).

### 2.2.2.3. Estación reproductiva

En ausencia de gestación puede producirse una “seudogestación”, produce desarrollo del útero y de las glándulas mamarias y los cambios psicológicos asociados casi siempre con la gravidez. (Manteca, 2008; Alamo, 2007).



### 2.2.2.3.1. Ciclo estral

Independientemente de si hay o no gestación, la perra tiene un largo período de inactividad ovárica entre ciclos que se denomina “anestro”. (Manteca, 2008; (Gobello, 2008).

El ciclo estral consta de las siguientes fases:

- **Folicular:** proestro y estro.
- **Lútea:** diestro.
- **Anestro**

#### 2.2.2.3.1.1. Proestro

Se extiende desde la primera aparición del flujo vulvar hasta que comienza a aceptar al macho. En esta fase comienza el desarrollo folicular hasta el día del pico de la hormona luteinizante. Dura entre 3 y 17 días (promedio 9 días).

**Hormonalmente:** La FSH desempeña un papel fundamental en la maduración de los folículos y en su transformación a cuerpos lúteos tras la ovulación; incrementa la secreción de progesterona por parte de los folículos preovulatorios, en el desencadenamiento de la ovulación y el mantenimiento del estro (Alamo, 2007).

La concentración plasmática de progesterona es basal (<1-2 ng/mL) hasta el final del proestro, cuando comienza a incrementarse fruto de la luteinización de los folículos preovulatorios (Alamo, 2007).

#### 2.2.2.3.1.2. Estro

Dura de 3-21 días (promedio de 8 días). La hembra permite la monta por parte del macho y permanece quieta para ser fertilizada. La hembra libera feromonas, se produce la ovulación (Alamo,2007; (Gobello, 2008).





**Hormonalmente:** Empieza en el pico de LH (24-48 horas) y coincide con el descenso de estrógenos y un aumento en la de progesterona. Las concentraciones de progesterona en el pico de LH son de 2-3 ng/mL (Gobello, 2008).

#### 2.2.2.3.1.3. Diestro

Empieza cuando la hembra rechaza el apareamiento, 5-7 días tras la ovulación (8-10 días después del pico preovulatorio de LH). Dura de 56 a 58 días desde la ovulación si es que hay preñez, caso contrario, tiene una duración de 60-100 días.

**Hormonalmente:** la concentración plasmática de progesterona sigue aumentando desde el inicio del diestro, alcanzando sus valores máximos 20-30 días después del pico de LH; luego disminuye lentamente hasta el día 60, mantiene unos niveles entre 10-60 ng/mL durante unos 2 meses tras el estro. (Alamo, 2007).

En una hembra no gestante, los niveles plasmáticos de progesterona disminuyen de una manera gradual entre los 30-60 días, por ausencia de un mecanismo luteolítico. La concentración plasmática de prolactina es alta durante los días 30 a 60 tras el pico de LH, manteniéndose así entre los días 60 y 90, más en hembras lactantes (Alamo, 2007)

- **En la perra gestante:** los fetos estimulan la síntesis y secreción de prostaglandinas que lisan el cuerpo lúteo y producen un descenso de la progesterona a niveles inferiores 2ng/mL que desencadenará en el parto después del pico de la LH (Gobello, 2008).

#### 2.2.2.3.1.4. Anestro

Es el momento en que la progesteronemia decrece a valores basales hasta el siguiente proestro. La hembra no acepta ni atrae al macho en esta fase (Gobello, 2008; Alamo, 2007).

En hembras no gestantes, es el periodo entre el diestro de un ciclo y el proestro del consecutivo con una duración de 2-9 meses.





**Hormonalmente:** las concentraciones plasmáticas de progesterona alcanzan niveles basales, por debajo de 1-1.5 ng/mL. Concentraciones plasmáticas de estradiol altas, de 10 a 20 días antes de que la perra muestre ninguna manifestación de proestro (Alamo, 2007).

No ha sido descrita desafortunadamente la endocrinología de esta fase, de una manera suficiente (Gobello, 2008).

#### **2.2.2.4. Intervalos irregulares en el estro**

Se presenta en los siguientes casos:

- **Celos divididos**

Se manifiestan con los signos de proestro sin que ocurra ovulación, seguido de un anestro de 2 a 4 semanas, presentándose luego un ciclo ovulatorio normal (Alamo, 2007)

- **Celos silentes**

Se caracteriza por intervalos inter estro prolongados. Las perras presentan poca o ninguna edematización, ni descarga vulvar a pesar de tener un desarrollo folicular y una ovulación normales, pero atraen a los machos, es decir es un estro que no se nota. (Alamo, 2007)

- **Fallas en la ovulación**

Tiene como consecuencia un acortamiento del intervalo inter estro. Se detecta monitorizando las concentraciones séricas de progesterona. En perras anovulatorias, la progesterona no aumenta a concentraciones normales del diestro ( $> 8-10$  ng/mL) (Alamo, 2007)

#### **2.2.2.5. Ovulación y fecundación**

La ovulación tiene lugar en los 3 primeros días del estro.





Los huevos se desplazan en el oviducto desde poco después de la ovulación y permanecen en la porción media de este órgano en espera de la fecundación. Rowlands comprobó índices más elevados de fecundidad cuando se inseminaba a la perra 2 veces durante los 4 primeros días del estro. Como los huevos no han desprendido el primer cuerpo polar en el momento de la ovulación, no son sensibles al envejecimiento como los de otros mamíferos. La capacidad de los huevos para ser fecundados disminuye rápidamente de 8 a 12 horas después de la ovulación, lo que no ocurre en la perra en la que son viables hasta 2 días (Alamo, 2007).





### 2.3. SEMEN: CARACTERÍSTICAS Y SUS COMPONENTE

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.

#### 2.3.1. Características macroscópicas

##### 2.3.1.1. Color

Normalmente es de color blanco lechoso, pero está en estrecha relación con la concentración espermática (Latinpedia, 2008).

- **Alteraciones en la coloración:**

- Coloración amarillenta: se debe a la riboflavina (segregada por las glándulas vesiculares y ampollas del conducto deferente), a la presencia de pus u orina.
- Coloración Rojiza: por presencia de sangre y la muestra tiene que descartarse, ya que los eosinófilos presentan una enzima que destruyen los factores de capacitación producidos en el epidídimo.
- Coloración Verdosa: por Pseudomona aeruginosa en el semen.
- Coloración Amarronada: heces en el semen (Latinpedia, 2008).

El color se evalúa por observación directa en el tubo graduado en el que se recoge la muestra (Alamo, 2007).

##### 2.3.1.2. Olor

Sui generis.

##### 2.3.1.3. Volumen

Se expresa en mililitros (mL). Este parámetro varía en función de la especie y raza, edad, estado fisiológico del individuo, método de recolección, estado nutricional, frecuencia





de la recolección, excitación sexual, época del año y peso vivo del animal (Latinpedia, 2008).

Los valores normales son: (Alamo, 2007)

<b>Fracción</b>	<b>Valores medios</b>
Primera	0,1 - 2mL
Segunda	0,2 - 4mL
Tercera	1- 30mL

#### **2.3.1.4. pH**

Su determinación es muy sencilla con las tiras reactivas específicas para tal fin, colocando unas gotas de semen en ellas, estando sostenidas por una pinza.

El pH del semen canino es de 6.3. La variación del pH disminuye la motilidad, por lo que es importante tomar en cuenta estas características en el uso de los diluyentes y de las sustancias tampón (Alamo, 2007).

#### **2.3.2. 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 (Latinpedia, 2008).

##### **2.3.2.1. Concentración**

En el perro oscilan entre 300-2000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10<sup>6</sup> esp/mL (Gobello, 2008; Alamo, 2007).

Entre las causas de una baja concentración espermática, se podrían mencionar:

- Eyaculación incompleta por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos.
- Perros tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos.





- Recolección excesiva de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal.
- En una aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes.
- Estructuras testiculares fibrosadas, por traumatismos o infecciones.
- Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal e inflamaciones como orquitis o epididimitis.
- Anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc (Alamo, 2007)

#### **2.3.2.2. 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 (Alamo, 2007).

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  $200 \times 10^6$  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  $150-200 \times 10^6$  espermatozoides sean móviles (Alamo, 2007).

#### **2.3.2.3. Vitalidad**

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).

#### 2.3.2.4. Morfología

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

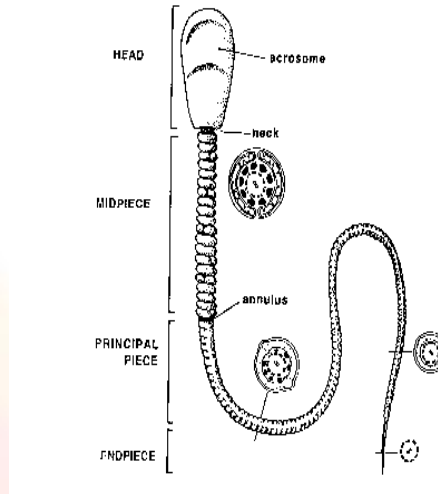
La tinción más utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. Otra técnica de tinción es la de la de Azul de metileno, que de igual manera sirve para la viabilidad seminal y evaluación de las membranas, ayudándonos a diferenciar los espermatozoides vivos de los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

Las morfoanomalías 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 un fallo en la espermiogénesis o a una inadecuada manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). 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).



### 2.3.3. Características de los espermatozoides

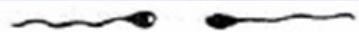


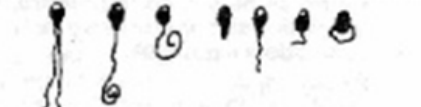


**Figura 10:** Morfología de un espermatozoide canino (Eilts, 2008).

#### 2.3.3.1. Características normales 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) (Muiño, 2009).

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

**Figura 11.** Anomalías de los espermatozoides (Quisperanda, 2008).



### **2.3.3.2. Características anormales de los espermatozoides**

#### **2.3.3.2.1. Anormalidades espermáticas**

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

##### **2.3.3.2.1.1. Cabezas piriformes y angostas**

Presentan la zona post-acrosomal más estrecha, siendo evidentes anormales (Latinpedia, 2008).

##### **2.3.3.2.1.2. 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 (Latinpedia, 2008).

##### **2.3.3.2.1.3. Formas teratoides**

Los espermatozoides con estos defectos tienen generalmente una condensación de ADN anormal, un núcleo pequeño y deforme y la pieza principal está alrededor del núcleo (Latinpedia, 2008).

##### **2.3.3.2.1.4. Defectos del acrosoma**

El acrosoma se encuentra aumentado de tamaño (generalmente conteniendo un quiste) y un cuerpo de inclusión que se pliega en la región apical de la cabeza del espermatozoide (Latinpedia, 2008).

##### **2.3.3.2.1.5. 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 (Latinpedia, 2008).





#### **2.3.3.2.1.6. 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 (Latinpedia, 2008).

#### **2.3.3.2.1.7. 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 (Latinpedia, 2008).

#### **2.3.3.2.1.8. 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 (Latinpedia, 2008).

#### **2.3.3.2.1.9. Pieza intermedia arqueada**

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

#### **2.3.3.2.1.10. 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).





### **2.3.3.2.2. Otras alteraciones**

#### **2.3.3.2.2.1. Aspermia**

Si no hay eyaculación, puede deberse a:

- Falta de orgasmo y eyaculación debido a un déficit neurológico ó de libido.
- Falta u obstrucción de la secreción de líquido prostático de modo que la fracción espermática no es transportada al exterior.
- Falta de secreción de líquido prostático y una pequeña porción de fracción pre-espermática y espermática que no son detectadas ni recogidas. Debe realizarse un nuevo intento de recolección de semen 6 ó más horas más tarde (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.2. Azoospermia**

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

- Los testículos no están produciendo espermatozoides
- Los espermatozoides se producen pero hay una obstrucción en el epidídimo
- Obtención de un eyaculado incompleto (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.3. Leucospermia**

Leucocitos en el eyaculado. Requiere consideraciones acerca de infecciones bacterianas de la próstata, testículo ó epidídimo (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.4. Teratospermia**

Cuando hay demasiadas anormalidades morfológicas. Los perros normales deberían tener un 80% ó más de espermatozoides morfológicamente normales. Puede ser causada por tumores testiculares, orquitis, fiebre, prostatitis, abstinencia ó sobre-utilización, y obesidad (Serrano, 2009).





**Figura 12.** Teratospermia (Quisperanda, 2008).

#### **2.3.3.2.2.5. Astenospermia**

Es la ausencia de motilidad espermática. Causada por un equipo de recolección contaminado y el síndrome de cilio inmóvil. Los residuos de la fabricación del látex y una serie de lubricantes solubles en agua pueden disminuir la movilidad progresiva del semen (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.6. Necrospermia**

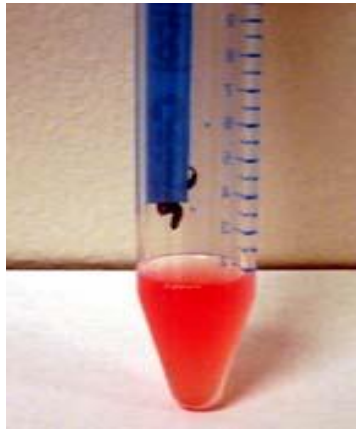
Todos los espermatozoides del eyaculado están muertos. Si es hormono-dependiente, puede ser posible revertirla (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.7. Oligospermia**

Se presenta cuando hay muy pocos espermatozoides en el eyaculado. Un recuento espermático menor a 200 millones de espermatozoides/eyaculado en perros que pesan más de 4,5 kg se considera anormal. En verano puede producirse una oligospermia estacional (Serrano, 2009).

#### **2.3.3.2.2.8. Hematospermia**

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



**Figura 13.** Hematospermia (Rouge, 2002).

#### **2.3.3.2.2.9. Aglutinación espermática**

Infertilidad espontánea, los espermatozoides se ven alterados en su motilidad. En perros afectados crónicamente con *B. canis* y orquitis autoinmune (Serrano, 2009).

#### **2.3.4. Factores que influyen sobre las características seminales**

##### **2.3.4.1. 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).

##### **2.3.4.2. 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).

#### **2.3.4.3. 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).

#### **2.3.4.4. 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).

#### **2.3.4.5. Ritmo de la recogida**

Una recogida seminal diaria produce una reducción de las reservas espermáticas en pocos días y empeora si se realizan dos (Alamo, 2007).

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; Alamo, 2007).

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).

#### **2.3.4.6. Neutrófilos y macrófagos**

Son originarios de la flora de la pared del pene y el prepucio, aunque en ocasiones pueden provenir de la próstata. Los macrófagos, pueden adherirse a los espermatozoides, mientras que los neutrófilos no afectan a la movilidad de la muestra (Alamo, 2007).







#### **2.3.4.7. Eritrocitos**

Se presentan comúnmente con frecuencia en el eyaculado de machos mayores a 5 años, proceden de la próstata e indican que hay enfermedad.

Puede deberse a traumas accidentales que ocurren durante la monta natural o la recogida manual y que se encuentren afectando al pene o al prepucio.

Se presentan generalmente en la primera recogida, cuando el animal es muy joven. La presencia de un 2% (v/v) de sangre en el semen que va a ser congelado, afecta negativamente a la motilidad y al estado del acrosoma (Alamo, 2007).





## 2.4. COLECCIÓN DEL SEMEN

### 2.4.1. Evolución

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).

El electroeyaculador fue inventado por Tinte en 1938. En 1954 Harrop desarrolla la primera vagina artificial para perros (Hernández, 2007).

### 2.4.2. 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.

### 2.4.3. Métodos de colección del semen: existen varios métodos de colección:

#### 2.4.3.1. 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 14.** Colección manual del semen (Autoras).

#### 2.4.3.2. Vagina artificial

Está formada por un cilindro rígido de 15 cm de longitud, que está rodeado por una manga de caucho en donde se coloca agua a 40 ° C a través de una válvula. En un



extremo del cilindro se ubica un embudo también de caucho, el mismo que se encuentra unido a un tubo colector graduado a 37° C de temperatura (Alamo, 2007).

### **Técnica**

- Introducir el pene en la vagina artificial cuando sobrepase el 50% de erección, cuando se haya exteriorizado el bulbo, situando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la misma hasta conseguir la eyaculación (Alamo, 2007).

### **Ventajas:**

- No depende de la presencia de una hembra para estimular al macho.
- Logra una mejor excitación (Alamo, 2007).

### **Desventajas:**

- No es recomendable económicamente.
- Se puede provocar laceraciones e infecciones al retirar el pene, al no tener la precaución de que se haya eliminado completamente la tercera fracción.
- Se pueden producir quemaduras en el pene por el agua excesivamente caliente.
- Hay estudios que han demostrado que la cantidad y calidad del semen es menor a la que se obtiene a través de la estimulación manual y es más difícil aplicarla.
- El contacto prolongado del semen con el látex resulta tóxico y puede provocar su completa inmovilidad (Alamo, 2007).

### **2.4.3.3. Cono de látex**

Es una variante de la técnica anterior, en la que solamente se utiliza un embudo o cono de látex al que se encuentra unido un tubo colector graduado a 37 ° C cubierto de una envoltura protectora (Alamo, 2007)

### **Técnica:**

El cono se ubica sobre el bulbo del pene para conseguir una tensión grande y provocar así la eyaculación (Alamo, 2007).



### **Desventajas:**

Este método dificulta la separación de las tres fracciones del eyaculado y, además, el látex puede ser tóxico para los espermatozoides. En algunos trabajos se recomienda su uso para animales principiantes o inexpertos, donde las fracciones son difícilmente identificadas, porque es más relajante para el animal. (Alamo, 2007).



**Figura 15.** Cono de látex (Eilts, 2008).

### **2.4.3.4. Condones de plástico**

Tiene algunas variantes de las 2 técnicas anteriores, no necesita un tubo colector graduado, a veces precisa de lubricante. (Autoras, 2012)

#### **Técnica:**

El condón se ubica sobre el bulbo del pene para conseguir una tensión grande, provoca así la eyaculación. Una vez recogida la muestra, se recorta el extremo inferior, se absorbe con jeringa (evitando rozar con el caucho) o pipeta y se la pasa a un tubo de ensayo temperado a 37°C. (Autoras, 2012).



## **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).

### **2.5.1. Pruebas de contrastación seminal**

Dentro de estas pruebas se evalúa: características macroscópicas y características microscópicas.

#### **2.5.1.1. Características macroscópicas**

##### **2.5.1.1.1. Color**

El semen es de color blanco lechoso, tendiendo a la opacidad. La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides (Velásquez, 2010).

Un color anormal determina la no utilización del semen con fines reproductivos (Stornelli, De la Sota, 2008).

Evaluar mediante la observación directa del semen en el tubo graduado (vidrio o plástico) utilizado para la recogida. (Velásquez, 2010).

##### **2.5.1.1.2. Volumen**

Se valora mediante la observación directa en el tubo colector graduado. Desde 0,5-4 mL para la congelación.

##### **2.5.1.1.3. Olor**

Su olor es sui generis. Para su evaluación, acercamos el tubo colector a la nariz.





#### **2.5.1.1.4. pH**

Para su evaluación se utilizan tiras reactivas de pH, se colocan unas gotas de semen en ellas, se espera y se lee el resultado. El rango de pH va desde 6,3 a 8,4. Está determinado por el fluido prostático (Latinpedia, 2008).

#### **2.5.1.2. Características microscópicas**

Es necesario para este tipo de evaluación que todo el material de vidrio se encuentre a 37 grados centígrados (pipetas, portaobjetos, cubreobjetos, diluyentes, colorantes, etc.) (Latinpedia, 2008).

##### **2.5.1.2.1. 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 (Stornelli, De la Sota, 2008).

Existen varias metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Representada por:

- Tinciones
- Evaluación del acrosoma
- Prueba hipo-osmótica

##### **2.5.1.2.1.1. Tinciones**

###### **2.5.1.2.1.1.1. Eosina nigrosina**

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



pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Latinpedia, 2008).

#### 2.5.1.2.1.1.2. Diff-Quick

Esta tinción consta de 3 partes:

- Fijadora
- Eosinófila
- Basófila (Universidad de Córdoba, 2008).



**Figura 16.** Tinción Diff Quick (Universidad de Córdoba, 2008)

#### 2.5.1.2.1.1.3. Azul de metileno

El azul de metileno actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y no produce un color tan intenso, evitando así oscurecer los detalles celulares. Es útil también para detectar la presencia de bacterias en muestras seminales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe (Universidad de Salamanca, 2008)

#### 2.5.1.2.2. Concentración

Es un importante parámetro a tener en cuenta sobre todo si se va a congelar semen y da una clara idea sobre la fertilidad del material.

##### **Valores de concentración espermática fresco:**

Están entre 300-2000 x 10<sup>6</sup>(esp/mL) (Latinpedia, 2008).



### Valores de concentración post congelación:

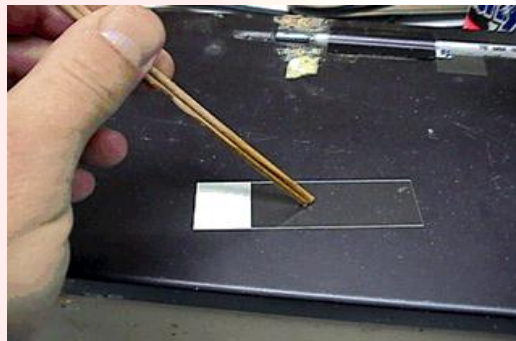
Están entre 50-100 x 10<sup>6</sup>(esp/mL) varía de acuerdo a la concentración en cada pajuela (Latinpedia, 2008).

#### 2.5.1.2.3. Motilidad espermática

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

- 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% (Latinpedia, 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 (Latinpedia, 2008).



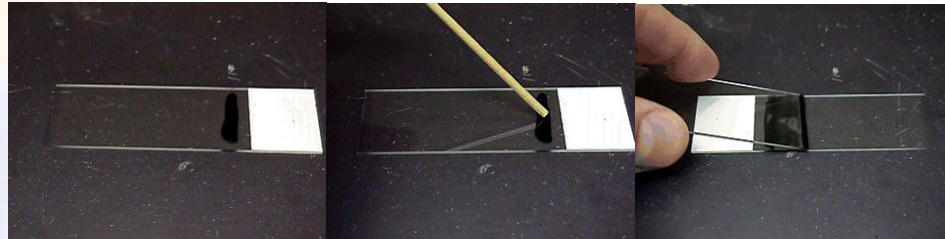
**Figura 17.** Motilidad espermática (Eilts, 2008).



**Figura 18:** Motilidad espermática (Eilts, 2008).

#### 2.5.1.2.4. Morfología

- 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.



**Figura 19:** Morfología espermática (Eilts, 2008).



## **2.6. PROCESAMIENTO, ALMACENAMIENTO, DESCONGELACIÓN Y MANEJO DEL SEMEN CANINO**

### **2.6.1. 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 crioconservación (Stornelli, De la Sota, 2008).

Rota y col. incorporaron Equex STM a un diluyente en base a Tris para la criopreservación de semen canino, obteniendo buenos resultados (Medvet.com, 2008).

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).

### **2.6.2. Diluyentes**

#### **2.6.2.1. Composición**

El diluyente debe reunir una serie de componentes que impida el deterioro de la muestra de semen y que básicamente son los siguientes:

- Agua bidestilada (Alamo, 2007).
- Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio (Alamo, 2007).
- Un energético capaz de atravesar la membrana plasmática (Medvet.com, 2008).
- Macromoléculas protectoras de membranas (Medvet.com, 2008).
- Agentes crioprotectores que garanticen la integridad celular ante los cambios de estado del agua penetrantes de la membrana (Alamo, 2007; Medvet.com, 2008).
- Aditivos, como enzimas, aminoácidos y otros compuestos (Alamo, 2007; Medvet.com, 2008).





- Azúcares no permeables a través de la membrana plasmática (Alamo, 2007; Medvet.com, 2008).
- Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano (Medvet.com, 2008).

#### 2.6.2.2. Tipos

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:

- **Canipro** (diluyente usado)
- Triladyl
- Diluyente de Andersen
- Diluyente Upssala
- Diluyente TRIS-fructosa
- Diluyente TRIS-glucosa
- Diluyente a base de Lactosa
- Diluyente TRIS-citrato
- Diluyente Laiciphos

#### 2.6.2.3. 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  $300-2000 \times 10^6$  esp/mL, en base a esto se han utilizado protocolos de dilución que permitan obtener una concentración final de  $50-250 \times 10^6$  esp/mL (Alamo, 2007).

### 2.6.3. Procesamiento de semen canino

#### 2.6.3.1. Procesamiento

Utilizando el diluyente Canipro:





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 con CaniPro parte A (1:1), agregando lentamente el diluyente (a la misma temperatura del semen).
3. Se refrigera a 4°C la predilución por 2h (equilibrado).
4. Se agrega luego CaniPro parte B (1:1:1), 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.de, 2011).

#### **2.6.3.2. 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).

#### **2.6.3.3. Congelación en nitrógeno líquido**

Es el método más estandarizado y utilizado en la crioconservación del semen.

- (1) 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.



- (2) 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  $-120^{\circ}\text{C}$ .
- (3) Finalmente las pajuelas se sumergen y conservaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Alamo, 2007).

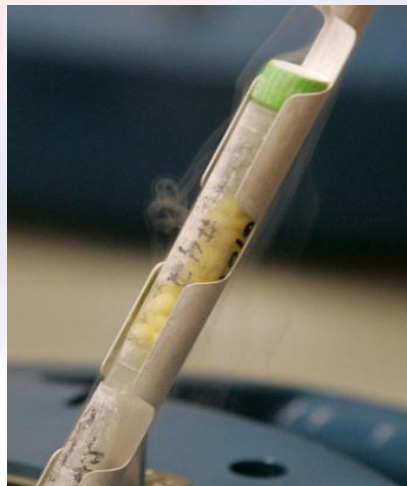
La velocidad de congelación depende del crioprotector (el aumento de su concentración disminuye la velocidad de congelación), del diluyente y de la forma geométrica del envase (Alamo, 2007).

#### 2.6.4. 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  $37^{\circ}\text{C}$  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).



**Figura 20:** Pajuela de semen canino (Weekly, 2011).



## **2.7. CITOLOGÍA VAGINAL, INSEMINACIÓN ARTIFICIAL Y GESTACIÓN**

### **2.7.1. Citología vaginal**

#### **2.7.1.1. Ventajas y desventajas**

##### **Ventajas**

- Útil en la reproducción canina, ya que junto con la observación de la conducta, da una excelente valoración del ciclo estral.
- Es fácil de realizar y económica.
- No es dolorosa.
- Resulta sin importar la presencia o ausencia de secreción vaginal (Gobellos, 2008).

##### **Desventajas**

- No se puede identificar el día preciso de la ovulación
- No se puede determinar preñez (Gobellos, 2008).

#### **2.7.1.2. Técnica**

- Con una torunda, introducir por la comisura dorsal de la vulva hasta alcanzar el conducto pélvico. Después girar la torunda en ambas direcciones y se retira.
- El proceso debe tomar sólo unos segundos y rara vez se produce dolor.
- La perra puede estar intranquila si no hay secreción vaginal. Por tanto, debe humedecerse el algodón con dos ó tres gotas de solución salina estéril, como lubricante, si la secreción vaginal no es obvia. Retirar la torunda.
- La punta de algodón se gira con suavidad de un extremo al otro del portaobjeto unas dos o tres veces en líneas separadas.
- Preparar dos o tres portaobjetos con una torunda. Los portaobjetos con las células deben secarse al aire.



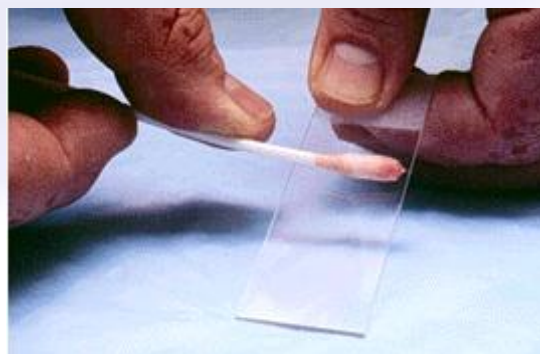
- Luego se tiñe y observa al microscopio (Gobellos, 2008).



**Figura 21:** Toma de muestra para citología vaginal (Tabares, 2009).



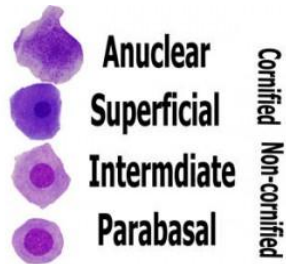
**Figura 22:** Secuencia del correcto hisopado de la vagina de las perras (Vetpraxis, 2010).



**Figura 23:** Preparación del portaobjetos con la muestra (Lugo, 2010).



### 2.7.1.2. Clasificación de las células



**Figura 24.** Células epiteliales vaginales. (Vetpraxis, 2010).

#### 2.7.1.2.1. Parabasales

Estas células son redondas o un poco ovales y tienen un núcleo vesiculado grande y cantidades relativamente pequeñas de citoplasma (Gobellos, 2008).

#### 2.7.1.2.2. Intermedias

Este cambio en la morfología refleja el primer paso en la muerte celular, las células parecen más grandes, tienen cantidades relativamente mayores de citoplasma y muestran núcleos más pequeños (Gobellos, 2008).

#### 2.7.1.2.3. Superficiales

Son las células muertas típicas, son las más grandes que se identifican en la citología. Tienen bordes citoplasmáticos angulares, planos y nítidos, además de núcleos pequeños, picnóticos y atenuados o no muestran núcleo, se subdividen en:

- Nucleadas
- Intermedias
- Anucleadas (Gobellos, 2008).

### 2.7.1.3. Citología vaginal y el ciclo estral

La citología vaginal permite determinar en qué etapa del ciclo estral se encuentra una perra. Esto permite emplear la inseminación artificial precisando el momento más adecuado para llevar a cabo dicha técnica ya que la ovulación ocurre al inicio del estro y por lo tanto, es importante identificar esta etapa (Sobreperros, 2007).

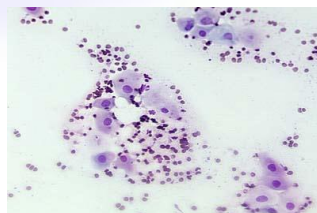
#### 2.7.1.3.1. Metaestro

Por lo general son células vaginales intermedias grandes que parecen tener uno o más neutrófilos contenidos en el citoplasma (Gobellos, 2008).

#### 2.7.1.3.2. Proestro

El frotis vaginal de una perra en proestro temprano es similar al de una en anestro, con una diferencia.

- El proestro suele detectarse por sangre dentro de la vagina que proviene de un endometrio en rápido desarrollo.
- Además de eritrocitos, el frotis vaginal suele contener numerosas células epiteliales parabasales e intermedias, grandes y pequeñas.
- El fondo del frotis a menudo es granular o de aspecto sucio, debido a la presencia de secreciones viscosas cervicales y vaginales que captan una pequeña cantidad de colorante.
- En etapas finales del proestro, el frotis vaginal no contiene neutrófilos (Gobellos, 2008).

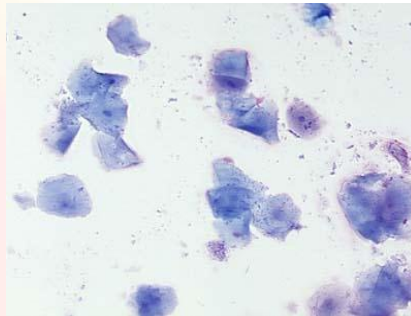


**Figura25.** Proestro (Vetpraxis, 2010)

### 2.7.1.3.3. Estro

Durante el estro, la citología vaginal se mantiene relativamente sin cambios. Ninguna característica de la citología vaginal identifica el día de la secreción máxima de LH, la ovulación o el momento de la fecundación.

- Las células superficiales constituyen más del 80% del total de las células vaginales y a menudo alcanzan el 100%.
- En un periodo de 24 a 48 horas al término del estro, el porcentaje de células superficiales disminuye a casi el 20% y la mayor parte son intermedias, parabasales o de ambos tipos (Gobellos, 2008).

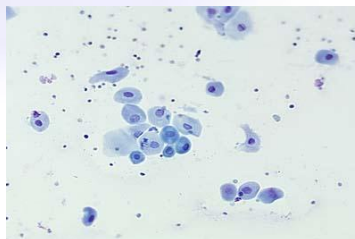


**Figura 26.** Estro (Vetpraxis, 2010)

### 2.7.1.3.4. Diestro

Después de los días iniciales de diestro, los frotis de citología vaginal de esta fase, simulan los del anestro.

- Puede o no haber leucocitos,
- No hay eritrocitos o se encuentran en cifras pequeñas.
- Las células epiteliales, son intermedias pequeñas y parabasales (Gobellos, 2008).



**Figura 27.** Diestro (Vetpraxis, 2010)

**2.7.1.3.5. Anestro:** es relativamente constante.

Se observan sobretodo células epiteliales parabasales e intermedias (Gobellos, 2008).

- Puede o no haber neutrófilos, pero no eritrocitos.
- Pueden o no observarse bacterias, si se presentan, suelen representar a la flora normal. El aspecto del fondo después de la tinción puede ser claro o granuloso (Gobellos, 2008).

**2.7.2. Inseminación Artificial**

Con semen congelado, la IA se retrasa 1-2 días después de la ovulación y se repite otra inseminación 1 día después. Esto se debe a que los procedimientos de congelación-descongelación afectan a la estabilidad del acrosoma y de las membranas, provocando que el tiempo de capacitación sea menor y, además, el semen congelado es menos longevo que el fresco. Para garantizar al máximo la fecundidad, sólo deberían usarse muestras con más de un 50% de motilidad post-congelación y depositar la muestra dentro de los 10 minutos siguientes a su descongelación (Stornelli, De la Sota, 2008).

Con semen congelado se han obtenido tasas de gestación que oscilan desde un 55% hasta un 90%, si bien existe mucha variabilidad con respecto al número de inseminaciones realizadas, el número de dosis/inseminación y la concentración de espermatozoides/inseminación (Stornelli, De la Sota, 2008).



**Figura 28.** Inseminación artificial (Tabares, 2009).



### 2.7.2.2. Ventajas de la IA con semen congelado

- Por una parte la conservación casi ilimitada del poder fecundante del esperma en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Pazos, 2010).
- El semen puede ser utilizado varios años después de su recolección y su congelación (Pazos, 2010).

Esta técnica permite por consiguiente:

- Utilizar semen de un animal si él no está disponible (fallecimiento, enfermedad, accidente) (Pazos, 2010).
- Si él ha sido vendido
- Ayudar a salvaguardar las razas caninas en vía de desaparición.
- Utilizar racionalmente un animal de valor genético conocido en un acoplamiento programado, así los cruzamientos consanguíneos entre generaciones utilizados frecuentemente en la selección canina son facilitados grandemente.
- Favorecer los cambios internacionales de semen particularmente en casos de barreras sanitarias (Pazos, 2010; Stornelli, De la Sota, 2008)

### 2.7.2.3. Inseminación artificial con semen canino congelado

Es un procedimiento que no puede realizarse en la práctica veterinaria diaria ya que requiere equipos especiales y personal especializado en el área. El uso de semen congelado puede implementarse respetando algunas normas básicas manejo y descongelado del mismo (Stornelli, De la Sota, 2008).

Con semen congelado, la IA se retrasa 1-2 días después de la ovulación y se repite otra inseminación 1 día después. Esto se debe a que los procedimientos de congelación-descongelación afectan a la estabilidad del acrosoma y de las membranas, provocando que el tiempo de capacitación sea menor y, además, el semen congelado es menos longevo que el fresco. Para garantizar al máximo la fecundidad, sólo deberían usarse





muestras con más de un 50% de motilidad post-congelación y depositar la muestra dentro de los 10 minutos siguientes a su descongelación (Stornelli, De la Sota, 2008).

Cuando se utiliza semen congelado, aunque es posible realizar una IA intravaginal profunda y obtener gestaciones, la mayoría de los autores recomiendan una IA intrauterina pero esta técnica posee desventajas evidentes como son la necesidad de someter al animal a una intervención quirúrgica con anestesia gaseosa, y definir con máxima precisión el momento óptimo de inseminación para reducir al mínimo este tipo de intervenciones. Con semen congelado se han obtenido tasas de gestación que oscilan desde un 55% hasta un 90%, si bien existe mucha variabilidad con respecto al número de inseminaciones realizadas, el número de dosis/inseminación y la concentración de espermatozoides/inseminación (Corti, 2010).

#### **2.7.2.3.1. Técnicas**

La IA intravaginal es una técnica sencilla que se aplica también con semen refrigerado. Cuando se trabaja con semen congelado la IA es usualmente intrauterina, aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (Stornelli, De la Sota, 2008).

##### **2.7.2.3.1.1. Intravaginal**

En la IA intravaginal el semen será depositado en la vagina craneal la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal. La vagina de la hembra canina es de una longitud apreciable, y varía enormemente con la raza considerada. Es así que el tamaño de los catéteres también tendrá gran variación (Stornelli, De la Sota, 2008).

El catéter se introducirá a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia dorsal para luego dirigirse hacia craneal adecuándose a la anatomía de la hembra canina (Corti, 2010).





- Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado a través de él mediante una jeringa y depositado en vagina craneal (Stornelli, De la Sota, 2008; Corti, 2010).
- Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobre elevado (Stornelli, De la Sota, 2008).

La totalidad del material utilizado deberá estar estéril, libre de sustancias que alteren la viabilidad espermática y precalentado a 37 °C para evitar alterar la calidad del eyaculado (Stornelli, De la Sota, 2008).

Otras técnicas de IA con semen congelado: Intrauterina, transcervical y quirúrgica.

### **2.7.3. Gestación canina**

La gestación de la perra es de  $63 \pm 5$  días, considerando la variación que existe con respecto al tiempo de ovulación, fertilización, número de montas y duración del período fértil (estro) (Esquivel C). En caso de que se realice la citología vaginal es más certero predecir el día de parto (Asteinza, 2010).

#### **2.7.3.2. Fertilización**

Se lleva a cabo en el ampulla del oviducto. Los embriones permanecen en el oviducto 6 a 12 días tiempo en el que alcanzan el estadio de desarrollo conocido como mórula tardía (32 células) o blastocito temprano (64 células) para posteriormente llegar al útero (Esquivel, 2002).

#### **2.7.3.3. Implantación**

Los embriones se implantan 17 a 21 días después de la fecundación y ocupan ambos cuernos uterinos sin importar el ovario del que proceden. (Esquivel, 2002)

#### **2.7.3.4. Diagnóstico de gestación**

Los métodos utilizados para diagnosticar gestación en la perra son:





#### **2.7.3.4.1. Palpación**

Se puede realizar a partir de los 25 días de gestación pero su principal desventaja es que no permite detectar al o los productos con facilidad y por lo tanto, el palpador puede confundir estructuras fetales con excremento y es difícil identificar el número de cachorros (Esquivel, 2002).

#### **2.7.3.4.2. Radiografía**

Se puede realizar a partir de los 40 días de gestación que es cuando ocurre la mineralización de las estructuras fetales (Esquivel, 2002).

#### **2.7.3.4.3. Ultrasonografía (ecografía)**

Se puede realizar a partir de los 18 días de gestación teniendo más precisión si se realiza a los 30 días después de la última monta (Esquivel, 2002).

Esta técnica se basa en detectar 3 signos positivos de gestación:

- Presencia de vesícula amniótica
- Presencia de latido cardiaco
- Presencia de masa embrionaria.

Para el cálculo preciso del tiempo de gestación en la perra, algunos autores recomiendan tomar como base el día en el que se presenta el pico LH, por lo que puede contarse a partir de la última monta (Esquivel, 2002).

#### **2.7.3.4.4. Progesterona**

La prueba de ECLIA, quimioluminiscencia que mide los niveles de progesterona en la sangre, para determinar si existe o no preñez.

Técnica:

- Tomar la muestra de sangre (hembra en ayunas)
- Centrifugarla, para separar el suero.







- Realizar la medición en el equipo con técnica de quimioluminiscencia (en esta brilla las moléculas de la hormona bajo diferentes longitudes de la onda de luz) (Información, Dr. Pablo Guillen)

#### **2.7.4. El parto**

La perra debe colocarse en un ambiente tranquilo, cálido y sin corrientes de aire.

El parto completo puede durar desde 1 a más de 24 horas. (Gobello, 2008)

##### **2.7.4.2. I estadio**

Tiene una duración normal de 12 a 24 horas, asociadas con dilatación cervical. no hay pujos abdominales (contracciones visibles). (Gobello, 2008)

##### **2.7.4.3. II estadio**

Durante este período la perra suele presentar anorexia, jadeo y temblor.

Comienza cuando se observan pujos abdominales, que acompañan a las contracciones miométricas para culminar con el nacimiento del neonato.

Estos pujos no duran más de 1 a 2 horas entre cachorros. La secreción vaginal puede ser transparente, serosa o hemorrágica o verde (uteroverdina). (Gobello, 2008).

##### **2.7.4.4. III estadio**

Es la salida de la placenta.





### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. FÍSICOS

- Esterilizador
- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de Neubauer
- Tanque de Baño María
- Centrifugadora
- Tubos de ensayo
- Tiras de pH
- Guantes
- Pajuelas de 0.25mL
- Tanque de Nitrógeno líquido
- Cooler de espuma flex
- Rampilla metálica
- Condones plásticos
- Catéteres
- Hisopos de algodón
- Termómetro
- Pipeta de Thoma
- Pipetas
- Jeringuillas de insulina
- Jeringuillas de 3mL.





### 3.1.2. QUÍMICOS

- Gel lubricante
- Solución salina formulada
- Nitrógeno líquido
- Tinción Diff Quick
- Tinción de Wright
- Diluyente CaniPro parte A y B
- Polvo PVC

### 3.1.3. BIOLÓGICOS

- Semen canino
- Orina de perra en celo
- Yema de huevo





### 3.2. MÉTODOS

#### 3.2.1. Ubicación Del Ensayo

La presente investigación se realizó en la Universidad de Cuenca, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Provincia del Azuay, localizada en la Av. 12 Octubre y Diego de Tapia.

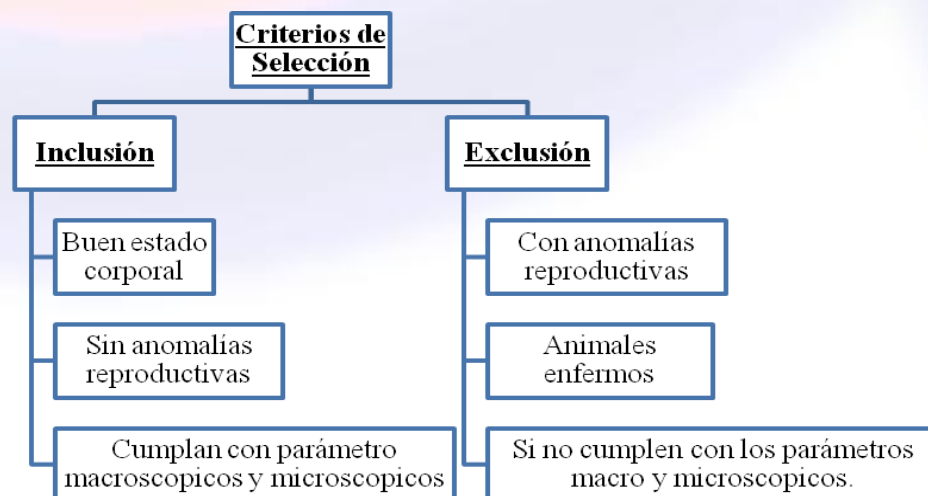
#### 3.2.2. Unidades Experimentales

Las Unidades experimentales utilizadas para efectuar el experimento fueron 5. Para su distribución se utilizó un Diseño de Bloques al Azar (DBA) y fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- A. Semen pre congelado de 5 machos caninos.
- B. Semen post congelado de 5 machos caninos.
- C. Testigo. Sin aplicación de tratamientos (Semen fresco).

### 3.3. Manejo de la investigación

#### 3.3.1. Fase preliminar



### 3.3.1.1. Planificación del trabajo experimental

Para llevar a cabo el proceso, se realizó un esquema, especificando cada proceso desde el momento de la recolección hasta la evaluación post-congelación del semen canino.

**Esquema 1.** Procedimiento de crío conservación de semen canino



### 3.3.1.2. Selección del macho donante

Para esta investigación experimental, se utilizó un total de 5 machos y 5 hembras de la especie canina, ubicados en la ciudad de Cuenca.

La selección de los 5 machos donantes se efectuó después de someter a exámenes físicos a 10 machos sexualmente activos entre las edades de 2 a 4 años, que no presentaron afecciones en el tracto reproductivo, descartando a aquellos que no colaboraron en la



extracción seminal y que en las pruebas microscópicas presentaron azoospermia o valores inferiores a los ideales para la congelación seminal.

A continuación se presentará una tabla en la que consta el número de donante y edad.

**Tabla 1.** Número de donante utilizado y variable de edad

Donante	1	2	3	4	5
Edad (meses)	24	36	48	52	36

### 3.3.1.3. Estadio sanitario

En los donantes seleccionados no se presentó ningún tipo de proceso patológico que pudiese provocar una disminución de la calidad del semen o que afectase negativamente al estado de salud del animal.

## 3.3.2. Fase experimental

### 3.3.2.1. Recogida seminal

Antes de la extracción del semen, se realizó una valoración andrológica del donante para descartar patologías que puedan alterar calidad seminal.

Para la obtención de los eyaculados se realizó la siguiente técnica:

- Se estimuló manualmente sobre el bulbo del pene, hasta q alcanzó un 30 – 40% de excitación.
- Se exteriorizó el cuerpo peneano y el bulbo cavernoso fuera del prepucio.
- Luego se rotó caudalmente en 180° el pene.
- Se continuó estimulando el bulbo, iniciándose así la eyaculación.
- Se recogió de manera simultánea las dos primeras fracciones, ya que la segunda fracción es la que tiene el contenido espermático. Esta recogida se llevó a cabo en condones plásticos.





- Posteriormente se colocó cada eyaculado en tubos de ensayos temperados a 37°C.
- Una vez completada la recogida, se comprobó la detumescencia del pene y su correcta retracción al interior del prepucio.

### 3.3.2.2. Parámetros técnicos para realizar contrastación seminal

Tabla 2. Parámetros técnicos óptimos para la congelación

Parámetros macroscópicos			
Color	Olor	Volumen	pH
Blanco lechoso	Sui géneris	0,5-4mL	6,3-8,4

Parámetros microscópicos			
Movilidad		Morfología normal	Concentración
Masa	Individual		
3,5	85-95%	>65%	300 - 2000 x 10 <sup>6</sup> (esp / mL)

### 3.3.2.3. Contrastación seminal

Una vez finalizada la recogida, se valoraron una serie de características:

- Macroscópicas: volumen, color, olor, pH.
- Microscópicas: morfología, motilidad individual, motilidad en masa y concentración de cada uno de los eyaculados.

Esto se realizó con el objeto de determinar la calidad seminal y valorar la posible influencia que ésta pudiese tener sobre los posteriores procedimientos del semen.





### **3.3.2.3.1. Evaluación macroscópica**

#### **3.3.2.3.1.1. Olor**

El olor del eyaculado es sui géneris. Para ello se acercó el tubo colector a la nariz, determinando su típico olor.

#### **3.3.2.3.1.2. Color**

Se valoró en el tubo colector por observación directa.

#### **3.3.2.3.1.3. Volumen**

Se determinó por observación directa de los tubos colectores graduados utilizados.

#### **3.3.2.3.1.4. pH**

Se determinó introduciendo la tira de pH dentro del semen canino, observando la coloración adquirida y comparando en la tabla de medida.

### **3.3.2.3.2. Evaluación microscópica**

#### **3.3.2.3.2.1. Motilidad espermática**

##### **a. Motilidad individual progresiva**

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles se realizó la siguiente técnica:

- Se colocó una gota de semen fresco sin diluir entre un portaobjetos y cubreobjetos (temperados a 37°C), con la técnica de refracción de la luz, se observó en el microscopio a 40x.

##### **La valoración del movimiento espermático**

- Se realizó en espermatozoides que mostraron un movimiento progresivo.
- Los espermatozoides que presentaron movimientos rotatorios, circulares o vibratorios, fueron descartados.







- Para este estudio, se seleccionaron sólo las muestras que presentaban, como mínimo una motilidad individual progresiva superior al 80%.

#### **b. Motilidad masal**

Esta prueba se realizó utilizando la misma muestra de la evaluación de la motilidad individual progresiva, con la diferencia que en ésta se observó la motilidad total en forma de ondas, en el microscopio con 10x.

El rango de evaluación de la motilidad masal considerada es desde 1-5, como mínimo para que sea una muestra aceptable es 3 para que este dentro de la selección.

#### **3.3.2.3.2.2. Morfología**

Para llevar a cabo la valoración de la morfología espermática, se evaluó un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

La técnica que se llevó a cabo fue tinción con Diff Quick.

- Se colocó una gota de semen fresco temperado en un portaobjetos, dejándolo secar.
- Se sumergió en el fijador (metanol) de 5 – 10 veces,
- Luego en el en colorante rojo (eosina)
- Por último en la solución azul (azul de metileno),
- Se lavó y se dejó secar la muestra para evaluar la morfología mediante la observación al microscopio a 100x.
- Sólo aquellas muestras que presentaron hasta un máximo del 20% de morfoanomalías, se utilizaron para ser sometidas a los procesos de dilución y crio-conservación.

#### **3.3.2.3.2.3. Concentración espermática**

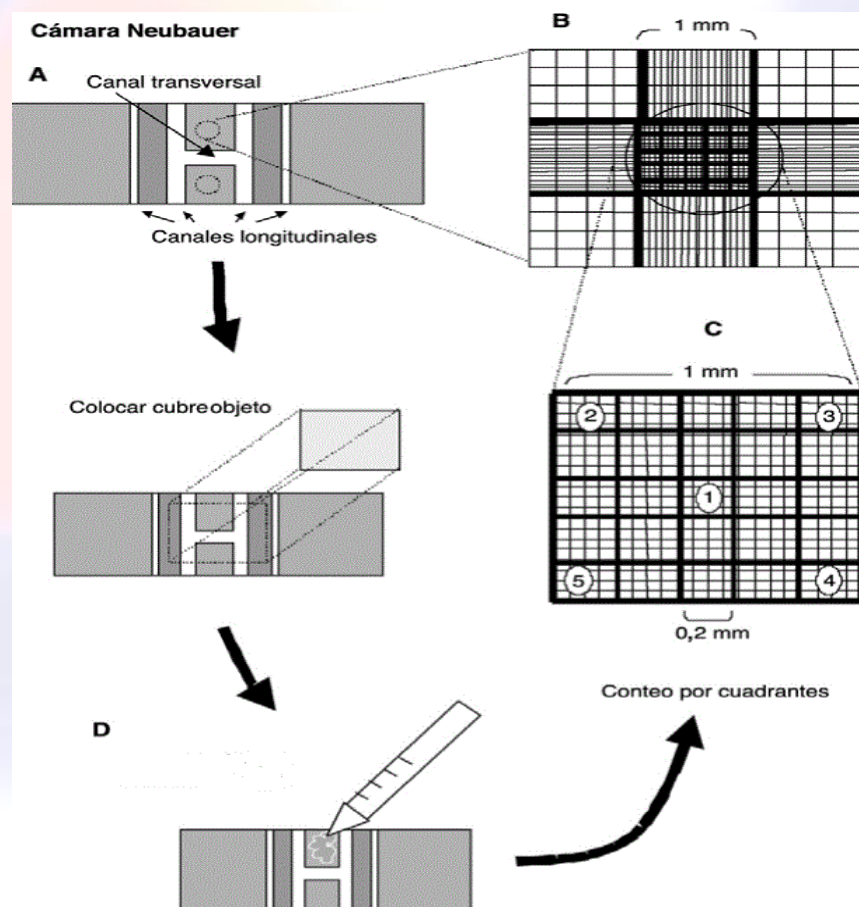
De acuerdo a la concentración seminal se realizó de la siguiente manera:



- Se mezcló 0,5 mL de semen en 0,6 mL de solución salina formolada, hasta obtener una muestra de 1,1mL. (1:200).
- Se homogenizó la muestra.
- Se dejó caer las 4 primeras gotas y luego se llenó por capilaridad la cámara de Neubauer para observarla al microscopio a 40x.

### Conteo

- Siguiendo las manecillas del reloj, empezamos desde el cuadrante medio, luego el extremo izquierdo superior, el derecho superior, el derecho inferior y finalmente, el izquierdo inferior.
- No se toma en cuenta lo parte externa de los cuadrantes.



**Figura 29.** Cámara de Neubauer (Rodríguez, 2011).



### 3.3.2.4. Elaboración de pajuelas:

#### 3.3.2.4.1. Procesamiento

Utilizando el diluyente Canipro:

- La muestra recolectada se mantuvo en baño María a 37° C.
- Se preparó las diluciones parte A y B con yema de huevo.
- La parte A se mantiene a baño María a una temperatura de 37°C
- La parte B se colocó en refrigeración a 4°C.
- Se realizó la evaluación macroscópica y microscópica,
- El semen fue pre diluido con CaniPro parte A (1:1), agregando lentamente el diluyente que debe estar a 37°C.
- Se refrigera a 4°C la predilución por 2h (equilibrado).
- Se agrega luego CaniPro parte B (1:1:1) lentamente por 2-3 minutos.
- 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.
- Se deben mantener las pajuelas a 4°C por 20 minutos.
- Se determina el número de células espermáticas por pajuela pre-congelación, mediante la cámara de Neubauer.
- Se coloca las pajuelas sobre una gradilla de 10 cm de altura dentro del cooler la cual está sobre una superficie de 4cc de Nitrógeno líquido, esto se realiza en un tiempo de 10min.
- Se somete a vapores de Nitrógeno por 10 minutos.
- Se sumergen inmediatamente en el tanque de nitrógeno líquido (Minitube.de, 2011)

### 3.3.3. Descongelación de pajuelas

Descongelamos 2 pajuelas por animal:





- Se sumergieron las pajuelas en agua a 37 °C durante 60 segundos.
- Se valoraron los porcentajes de motilidad individual progresiva, vitalidad y morfoanomalías. Utilizando exactamente los mismos procedimientos que los usados en el semen fresco.

#### **3.3.2.5. Citología vaginal**

- Introducimos una torunda por la comisura dorsal de la vulva hasta alcanzar el conducto pélvico.
- Giramos la torunda en ambas direcciones y la retiramos.
- Si la hembra está intranquila por la ausencia de secreción vaginal, debe humedecerse la torunda con dos o tres gotas de solución salina estéril, como lubricante.
- La punta de algodón se gira con suavidad de un extremo al otro del portaobjeto unas dos o tres veces en líneas separadas.
- Teñimos, observamos y evaluamos en el microscopio (sugerencia Director).

#### **3.3.2.6. Inseminación artificial**

- Preparamos el catéter con la pajuela descongelada.
- Elevamos el tren posterior de la hembra.
- Introducimos el catéter por la comisura vaginal, hasta el conducto pélvico.
- Depositamos el semen dentro del útero y retirar el catéter (sugerencia Director).





#### IV. DISEÑO ESTADÍSTICO Y/O EXPERIMENTAL

Para medir la viabilidad del semen canino, se utilizó un Diseño de Bloques al Azar, con tres tratamientos y cinco repeticiones, dando un total de 15 unidades experimentales, siendo el siguiente el modelo matemático:

Modelo matemático:

$$X_{ij} = \mu + T_i + B_j + \sum_{ij}$$

En donde:

- $X_{ij}$  = Valor típico del peso vivo de las Unidades Experimentales en estudio.
- $\mu$  = Medida general de la población.
- $T_i$  = Efecto del tratamiento.
- $B_j$  = Efecto de bloques o repeticiones.
- $\sum_{ij}$  = Efecto del error experimental.

##### 4.1. Conformación De Los Bloques

Se utilizaron 15 unidades experimentales, cada una de estas estuvo formada por semen de caninos de diferentes edades; se conformaron 5 bloques o repeticiones, de acuerdo a la edad de los machos caninos.

Los bloques quedaron conformados de la siguiente manera: el primero de 24 meses; el segundo de 36 meses; el tercero de 48 meses; el cuarto de 52 meses y por último el bloque quinto con el can cuya edad comprendía los 36 meses.

##### 4.2. Distribución de las unidades experimentales por bloques y tratamientos.





Para el inicio del experimento, las unidades experimentales fueron distribuidas en los bloques y tratamientos tal como se aprecia en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Distribución de los canes en los bloques y tratamientos (No. y edad en meses).

Bloques	Edad	Tratamientos	
		A	B
		No	No
I	24	A1	B1
II	36	A2	B2
III	48	A3	B3
IV	36	A4	B4
V	52	A5	B5



$\bar{x}$	39,20
$S\bar{x}$	4,20
CV%	28,32

**Fuente:** Registro de Campo.

**Elaboración:** Autoras.

### 4.3. Variables y toma de datos

Las variables que se analizaron en la presente investigación fueron:

- Viabilidad del semen fresco.
  - Macroscópicas: volumen, color, olor, pH.
  - Microscópicas: morfología, motilidad individual y concentración de cada uno de los eyaculados.





- Viabilidad del semen canino pre congelación.
  - Microscópicas: morfología, motilidad individual, y concentración de cada uno de los eyaculados.
- Viabilidad del semen canino post congelación
  - Microscópicas: morfología, motilidad individual, y concentración de cada uno de los eyaculados.

Los valores de concentración de espermatozoides fueron sometidos a las siguientes pruebas estadísticas:

Análisis de Varianza mediante la prueba de “F”, determinándose su Coeficiente de Variación (C.V.) expresado en porcentaje. Para el contraste de medias se usó la prueba de Significación de DUNCAN al 5%.





## V. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS

Una vez concluida la presente investigación, en base a los objetivos propuestos se obtuvieron los siguientes resultados.

#### 5.1.1. Viabilidad del semen canino previo al proceso de criocongelación.

##### 5.1.1.1. Color

**Cuadro 2.** Color del semen fresco de los canes sometidos al estudio, en relación a su concentración.

Bloque	Concentración	Color	Respecto al color		
			+concentrado	%+	Dif. %
IV	700*10 <sup>6</sup>	Blanco opaco	-1220*10 <sup>6</sup>	36,46	-63,54
V	854*10 <sup>6</sup>	Blanco lechoso	-1066*10 <sup>6</sup>	44,48	-55,52
III	1002*10 <sup>6</sup>	Blanco lechoso	-918*10 <sup>6</sup>	52,19	-47,81
II	1790*10 <sup>6</sup>	Blanco lechoso	-130*10 <sup>6</sup>	93,23	-6,77
I	1920*10 <sup>6</sup>	Blanco lechoso	0,00	100,00	

**Fuente:** Registro de Campo

**Elaboración:** Autoras

El cuadro anterior nos permite determinar que la coloración del semen fresco está





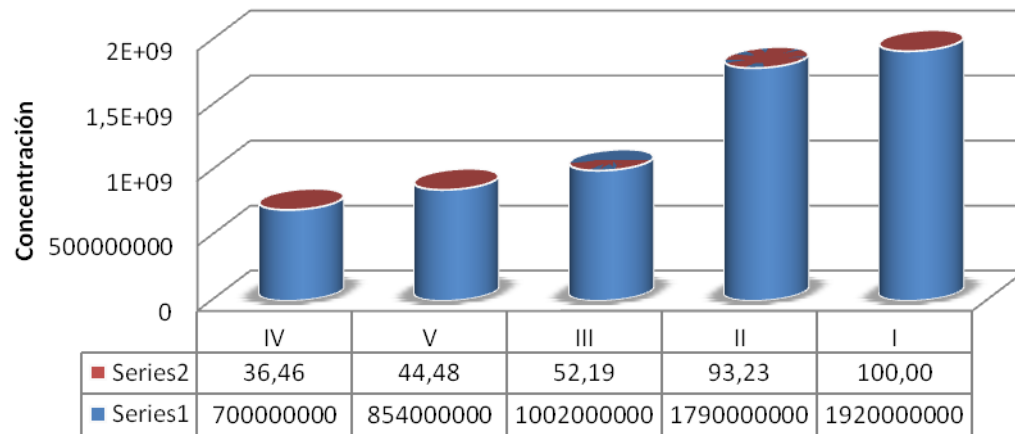


influenciada directamente por la concentración de los espermatozoides, además de otros factores no analizados en esta investigación. El semen cuya concentración es mayor, pertenece al bloque I (ejemplar canino de 24 meses de edad) con una concentración de  $1920 * 10^6$  esp/mL, representando el 100%. Le sigue la concentración de  $1790 * 10^6$  esp/mL, que le corresponde al bloque II, que presenta una diferencia de 6,77% con relación al bloque I (93,23). Luego el bloque III con una concentración de  $1002 * 10^6$  de esp/ mL, que presenta una diferencia de 47,81% (52,19%) en relación al bloque de mayor concentración. A continuación tenemos el bloque 5, con una concentración de  $854 * 10^6$  esp/mL, con una diferencia de 55,52% (44,48%) en relación al bloque I. Finalmente el ejemplar canino de 52 meses (bloque IV), presenta la menor concentración,  $700 * 10^6$  esp / mL, con una diferencia de 63,54% respecto al bloque I (36,36%).

Debemos señalar basándonos en los resultados anteriores, que la edad constituye un factor influyente en el color del semen, ya que mientras mayor es la edad del canino, mayor es la opacidad de su semen, así el ejemplar canino correspondiente al bloque I (24 meses) presenta la mayor concentración y la coloración de su semen es blanco lechosa, mientras que el de menor concentración, correspondiente al bloque IV, es el ejemplar canino de mayor edad (52 meses), con una coloración blanco opaco en su semen.



**Gráfico 1.** Color del semen fresco de los canes sometidos al estudio, en relación con su concentración



**5.1.2. Volumen de la fracción espermática del semen pre congelado de los caninos sometidos al estudio.**

**Cuadro 3.** Volumen promedio de la fracción espermática del semen pre congelado de los canes sometidos a estudio y comparación con el can de mayor edad.

Bloques	Volumen	Rango	Respecto al > edad		
	ml		+mL	%+	Dif. %
I	0,5	Normal	-1,00	33,33	-66,67
II	1,0	Normal	-0,50	66,67	-33,33
III	1,0	Normal	-0,50	66,67	-33,33
IV	1,0	Normal	-0,50	66,67	-33,33
V	1,5	Normal	0,00	100,00	

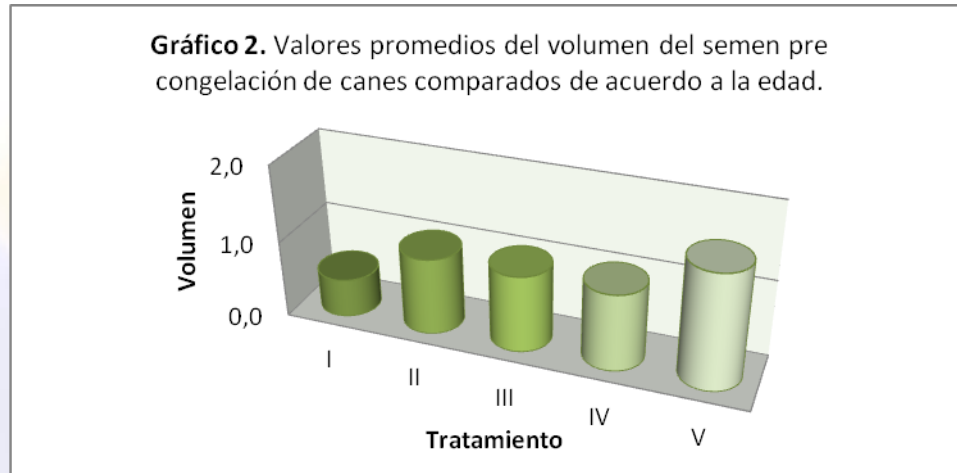
**Fuente:** Registro de Campo

**Elaboración:** Autoras

Al igual que en el color, la cantidad de fracción espermática eyaculada varía notablemente de acuerdo a algunos factores: el individuo, raza (tamaño), edad, experiencia, grado de excitación, etc. En nuestra investigación, luego de comparar a los distintos caninos, concluimos que el mejor volumen de fracción espermática pertenece al bloque “V” con un volumen de 1.5mL y el menor volumen está presente en el bloque “I”



con 0.5mL, que correspondería a un 67% menos cantidad de eyaculado que el del bloque “V”. Es importante considerar que este resultado por sí solo no es indicativo de viabilidad del semen a congelarse.



## 5.2. Viabilidad del semen canino pre y post al proceso de crioconservación en comparación con el testigo.

### 5.2.1. Evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides encontrados en el semen de los canes sometidos a tratamiento.

**Cuadro 4.** Valores promedios de la motilidad individual de los espermatozoides de cada uno de los tratamientos de los canes de distintas edades, en comparación con el testigo.

Tratamiento	Motilidad	Rango	Respecto al Testigo		
	Individual		+%	%+	Dif. %
A(pre congelación)	94,60	Alta	-1,400	98,542	-1,458
B(post congelación)	65,00	Media	31,000	67,708	-32,292
C (testigo)	96,00	Alta	0,000	100,000	0,000

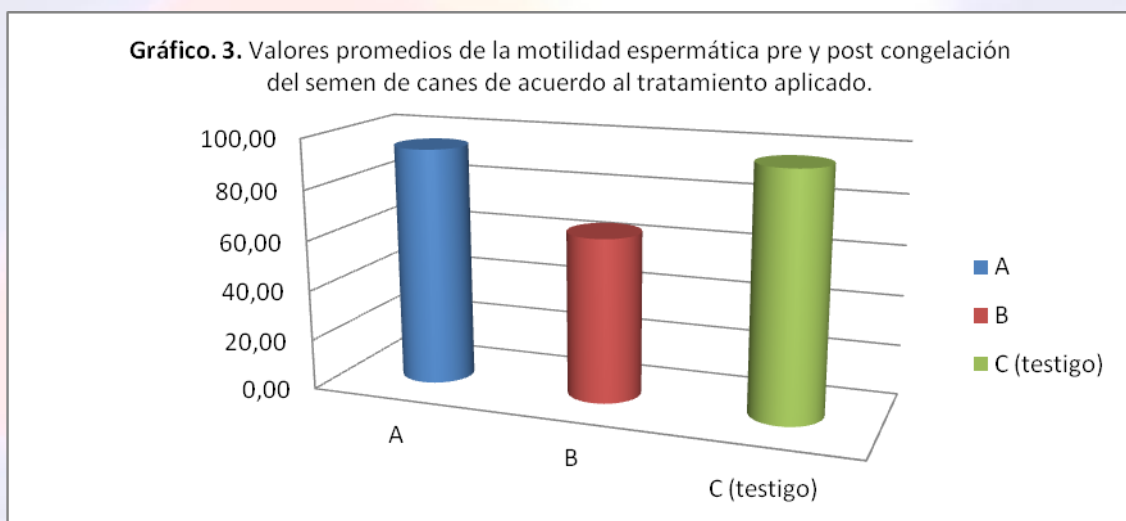




**Fuente:** Registro de Campo.

**Elaboración:** Autoras

Como se observa en el cuadro 4, el semen cuyos espermatozoides presentan un movimiento progresivo e intenso pertenece al tratamiento C, que corresponde al testigo, cuyo valor de motilidad individual es de 96,00: representando el 100%, el tratamiento A con 65,00 de motilidad individual tiene una diferencia de motilidad de 1.4% en relación con el testigo (98.542%) y finalmente encontramos al tratamiento B con 65,00 de motilidad individual, tendría una diferencia de 32.292% en relación con el testigo (67.708%)



### 5.2.2. Evaluación de la morfología de los espermatozoides del semen canino de los distintos tratamientos.

**Cuadro 5.** Porcentajes promedios de la morfología espermática de los tratamientos realizados a caninos de distintas edades.



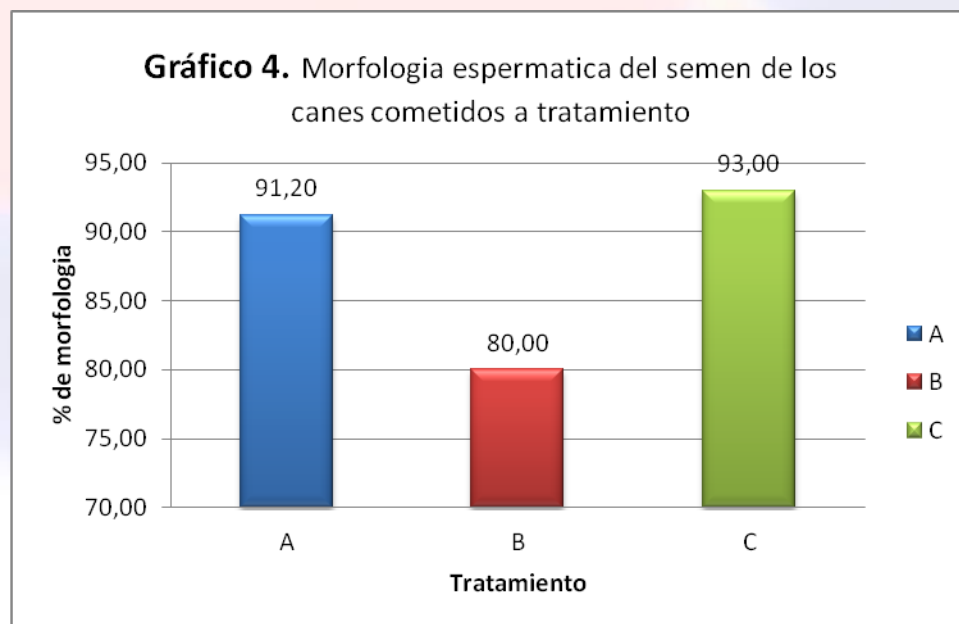


Tratamiento	Morfología	Rango
	%	
A(pre congelado)	91,20	Normal
B((post congelado)	80,00	Normal
C (testigo)	93,00	Normal

**Fuente:** Registros

**Elaboración:** Autoras.

Luego de la tinción y evaluación al microscopio del semen fresco y del pre y post congelación, llegamos a la conclusión de que cada uno de los porcentajes de los tratamientos de estudio, se encuentran dentro de los rangos aceptables (> 80%), a excepción del B cuya morfología obtenida fue del 80%; pero que si se lo considero semen de buena calidad para ser utilizado en el proceso de inseminación.





### 5.2.3. Evaluación de la concentración espermática del semen de los canes de los diferentes tratamientos sometidos a estudio.

**Cuadro 6.** Valores de concentración espermática, pre y post congelación y comparación adicional respecto al testigo, de los canes involucrados en el estudio.

Tratamiento	Concentración espermática		Δ Respecto al Testigo		
	$\bar{x}$ esp. / mL		+Valor.	%-	Dif. %
A (semen precongelado)	172,5*10 <sup>6</sup>	b	-1627.8*10 <sup>6</sup>	9,582	-90,418
B (semen postcongelado)	130,3*10 <sup>6</sup>	b	-1670*10 <sup>6</sup>	7,235	-92,765
C (Testigo)	180,0*10 <sup>6</sup>	a	0	100,000	0,000

**Fuente:** Registro de Campo

**Elaboración:** Autoras

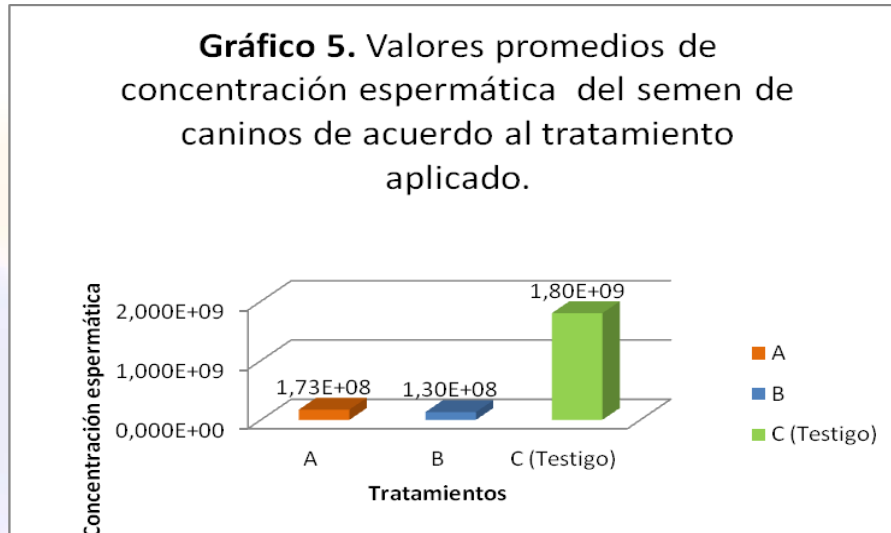
En el cuadro anterior se presenta una evaluación de la concentración espermática del semen pre y post congelación, frente al testigo (semen fresco); el tratamiento con mejor eficiencia en cuanto a concentración fue el C con  $1.800 \times 10^9$  esp/ml, el más eficiente de todos, siendo este el testigo. Los tratamientos A y B poseen una menor concentración, sus valores fueron 9% y 7% menos eficientes que C.

El ADEVA de la concentración espermática, mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$  y  $0.01$ ) entre tratamientos y no significativas para repeticiones; la prueba de DUNCAN estableció dos rangos: en el rango “a” se encontró a los espermatozoides del semen en fresco que corresponden al tratamiento C; en el rango “b” el del tratamiento A y B; siendo el tratamiento B, el tratamiento que quedo en último lugar. El CV de 20% nos indica que la investigación se llevo acabo de una manera eficiente.

De esta manera se analizó la concentración espermática del semen involucrado en el estudio; debemos señalar que esta no es una medida exacta que permita evaluar la



viabilidad del semen canino, será pues la inseminación artificial la prueba que permita determinar la funcionalidad de los espermatozoides post congelación.



#### 5.2.4. Evaluación de la viabilidad espermática del semen de los caninos del tratamiento b (semen post congelado) sometido a estudio a través de inseminación artificial

**Cuadro 7.** Fechas de inseminación de las perras y resultados luego de efectuada la prueba de progesterona.

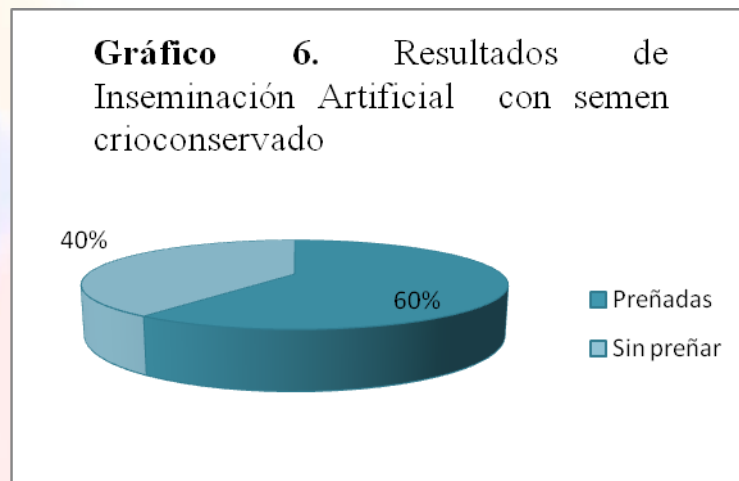
Tx	Macho	Hembra	Raza	Fecha		Dosis/ pajuela	N°pajuelas	Progesterona	
				1 inseminación	2 inseminación			Prueba	Resultado
A	Chuck Torres	Ita Pacheco	Golden Retriever	15/03/2012		20000000	1	30/03/2012	si
B	Aaron Cordero	Daysi Tenenpaguay	Bóxer	16/03/2012		17300000	1	30/03/2012	no
C	Adonis Cano	Luna Solano	Golden Retriever	15/03/2012	16/03/2012	81000000	4	30/03/2012	si
C	Osama Cordero	Bianca Cordero	Akita Inu	15/03/2012	16/03/2012	58000000	6	30/03/2012	si
D	Tobías Ochoa	Jackie Becerra	French Poodle	16/03/2012		67000000	3	30/03/2012	no



**Fuente:** Registro de Campo.

**Elaboración:** Autores.

Posterior a la Inseminación Artificial y a la correspondiente evaluación de sus resultados a través de la prueba de la progesterona, obtuvimos un 60% de preñez; constatando de esta manera, que existe viabilidad del semen canino post congelado.







## VI. DISCUSIÓN

Esta investigación muestra por primera vez en la ciudad de Cuenca-Ecuador, los resultados obtenidos tras congelar semen canino usando el diluyente comercial CaniPro Freeze part A y B.

### 6.1. Calidad seminal

#### 6.1.2. Características seminales en fresco

En el semen fresco, las características seminales macroscópicas y microscópicas mostraron ligeras variaciones entre individuos.

##### 6.1.2.1. Volumen

La media de la fracción espermática utilizada en nuestra investigación es de 1mL, que en comparación con la publicación de Alfonso Sánchez R., Arlette Cartagena P. y Marco Berland O., titulada “Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado”, 2007, cuya media de volumen de  $1,7 \pm 0,5$ mL, es baja pero se debe considerar que el tamaño de los caninos en investigación, es grande al igual que en la tesis de Desirée Alamo Santana, titulada “Influencia de la técnica de congelación, nitrógeno líquido versus ultra congeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario” cuyo resultado es de  $3,5 \pm 0,5$ mL.

##### 6.1.2.2. Motilidad

Los valores fueron homogéneos estando dentro de un rango de 93 - 95%, entre individuos.

Estos valores se consideran recomendables comparándolos con otras investigaciones como la de Desireé Alamo Santana, que utiliza el semen de los ejemplares con motilidad





desde 80%, en su tesis titulada “Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido *vs* ultra congelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ ”; 2007.

Alfonso Sánchez R., Arlette Cartagena P. y Marco Berland O., utilizan un rango entre 92.1 – 99.3% en la tesis “Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado”, 2007.

### **6.1.2.3. Concentración Espermática**

El rango de la concentración que utilizamos en nuestra investigación fue de 700 - 1920\*  $10^6$  esp/mL para la elaboración de las pajuelas, considerándolo óptimo en relación a publicaciones como la de Alfonso Sánchez R., Arlette Cartagena P. y Marco Berland O., “Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado”, 2007, en la que se utiliza una concentración mínima  $260,4 \pm 72.9 \times 10^6$  esp/mL; y a la de Desirée Alamo Santana en su trabajo titulado “Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido *vs* ultra congelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ ”; 2007, que utilizó un rango de  $529,6-1156 \times 10^6$  esp/mL.

### **6.1.2.4. Morfología**

En nuestra tesis obtuvimos un rango de morfoanomalías de 2-15%, óptimo en relación a la tesis de Desireé Alamo Santana, titulada “Influencia de la técnica de congelación, nitrógeno líquido versus ultra congeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario”, cuyo porcentaje de morfoanomalías se encuentra en el rango de 10 – 18%.

## **6.1.3. Características seminales post congelación**

### **6.1.3.1. Motilidad**

En nuestra investigación, evaluando la motilidad individual progresiva, obtuvimos resultados positivos, consiguiendo una concentración que varía desde 60 – 70%. En el trabajo de Desirée Álamo Santana, “Influencia de la técnica de congelación, nitrógeno





líquido versus ultra congeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario” (2007), se obtuvieron resultados desde 51 – 63%. También en la tesis titulada “Cricoconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ ” de la misma autora (2007), se obtuvieron resultados que varían entre 60 – 70% de motilidad.

#### **6.1.3.2. Morfología**

En nuestra investigación obtuvimos una media de morfoanomalías de 21% que es alta en comparación con la tesis de Desirée Alamo Santana, titulada “Cricoconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ ” (2007), cuya media es de 17,5%.

#### **6.1.3.3. Concentración**

En nuestra tesis obtuvimos un porcentaje promedio de concentración post congelación de  $130,3 \cdot 10^6$  esp/mL, considerado óptimo en relación con la tesis titulada: “Influencia de la técnica de congelación, nitrógeno líquido versus ultra congeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario” de Desirée Alamo Santana, se obtuvo una concentración espermática media de  $128.1 \cdot 10^6$  esp/mL.

#### **6.1.4. Preñez**

Se generaron resultados positivos de preñez en nuestra investigación equivalentes al 60%, estando dentro del rango conseguido en el 2007 por María Alejandra Stornelli y R. Luzbel de la Sota (40-70%), en su investigación titulada “Canine frozen semen”. Además coincidimos con dichas autoras, en que estos resultados tan dispares se deben a varios factores relacionados con la calidad del semen utilizado, como el momento de la inseminación, la técnica usada para la Inseminación Artificial.





## VII. CONCLUSIONES

Luego de obtener los resultados de la presente investigación, se pudo llegar a concluir lo siguiente:

**7.1.** La edad del perro si influye en la viabilidad espermática, por lo que se aceptó la hipótesis nula.

**7.2.** El semen fresco cuya concentración es mayor, pertenece al bloque “I” (ejemplar canino de 24 meses de edad) con una concentración de  $1920 \cdot 10^6$  esp/mL, representando el 100%. Le sigue la concentración de  $1790 \cdot 10^6$  esp/mL, que le corresponde al bloque “II”, que presenta una diferencia de 6,77% con relación al bloque I (93,23). Luego el bloque “III” con una concentración de  $1002 \cdot 10^6$  de esp/mL, que presenta una diferencia de 47,81% (52,19%) en relación al bloque de mayor concentración. A continuación tenemos el bloque “V”, con una concentración de  $854 \cdot 10^6$  esp/mL, con una diferencia de 55,52% (44,48%) en relación al bloque “I”. Finalmente el ejemplar canino de 52 meses (bloque “IV”), presenta la menor concentración,  $700 \cdot 10^6$  esp / mL, con una diferencia de 63,54% respecto al bloque I (36,36%). Debemos señalar basándonos en estos resultados, que la edad constituye un factor influyente en el color del semen, ya que mientras mayor es la edad del canino, mayor es la opacidad de su semen, así el ejemplar canino correspondiente al bloque I (24 meses) presenta la mayor concentración y la coloración de su semen es blanco lechosa, mientras que el de menor concentración, correspondiente al bloque IV, es el ejemplar canino de mayor edad (52 meses), con una coloración blanco opaco en su semen.

**7.3.** El mejor volumen de fracción espermática pertenece al bloque “V” con un volumen de 1.5mL y el menor volumen está presente en el bloque “I” con 0.5mL, que correspondería a un 67% menos cantidad de eyaculado que el del bloque “V”.





- 7.4.** El semen cuyos espermatozoides presentan un movimiento progresivo e intenso pertenece al tratamiento C (semen fresco), que corresponde al testigo, cuyo valor individual indica un 96% de motilidad. Le sigue el tratamiento A, que posee una motilidad individual inferior al testigo en un 1%. Finalmente encontramos al tratamiento B, con una motilidad individual de 65%, inferior en un 32%, al compararlo con el testigo.
- 7.5.** Luego de la tinción morfológica se obtuvo el 20% de morfoanomalías, por lo que se ha considerado aceptable la muestra seminal.
- 7.6.** El tratamiento con mejor eficiencia en cuanto a concentración fue el C (testigo) con  $1.800 \times 10^9$  esp/ml, A y B poseen una menor concentración, sus valores fueron 9% y 7% menos eficientes que C. El ADEVA de la concentración espermática, mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$  y  $0.01$ ) entre tratamientos y no significativas para repeticiones; la prueba de DUNCAN estableció dos rangos: en el rango “a” se encontró a los espermatozoides del semen en fresco que corresponden al tratamiento C; en el rango “b” el del tratamiento A y B; siendo el tratamiento B, el tratamiento que quedó en último lugar. El CV de 20% nos indica que la investigación se llevó a cabo de una manera eficiente.
- 7.7.** Posterior a la Inseminación Artificial y a la correspondiente evaluación de sus resultados a través de la prueba de la progesterona, obtuvimos un 60% de preñez; constatando de esta manera, que existe viabilidad del semen canino post congelado.





## VIII. RECOMENDACIONES

Consideramos importante tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- 8.1.** Tener precaución en los cambios de temperatura o con contaminantes, pues perjudican la viabilidad de los espermatozoides.
- 8.2.** Realizar periodos de descongelación menos prolongados, para estudiar el efecto que ejerce el nitrógeno líquido sobre los espermatozoides.
- 8.3.** Realizar inseminaciones con pajuelas que tengan concentraciones mínimas, para evaluar su eficacia.
- 8.4.** Desarrollar experiencias con un mayor número de hembras para definir de esta manera la tasa de fertilización tras la inseminación con semen descongelado.
- 8.5.** Continuar con la investigación, separando los tratamientos por razas y tamaños.





## IX. RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Universidad de Cuenca, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Provincia del Azuay. La finalidad de la tesis fue extraer, procesar y congelar el semen canino en nitrógeno líquido para usarlo en la inseminación artificial. Las muestras que se utilizaron fueron de 5 machos caninos, posterior a la recogida de la muestra espermática y la evaluación de su contrastación seminal se procedió a mezclarla con el diluyente Canipro freeze A y B, respetando los protocolos de temperatura que requiere dicho diluyente, evitando de esta manera el shock térmico y por ende la muerte de los espermatozoides, siguiendo con el procedimiento del diluyente se obtuvieron las pajuelas de 0.25 mL las cuales se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido. En la parte estadística de la tesis se utilizó un Diseño de Bloques al Azar (DBA) y en el cual se encontraron los siguientes tratamientos: “A”. Semen pre congelado de 5 machos caninos. “B” Semen post congelado de 5 machos caninos. “C” semen fresco (testigo). Obteniendo los mejores resultados en el tratamiento C, tanto en concentración ( $180.0 \cdot 10^6$ ), motilidad individual ( $96.00 \cdot 10^6$ ) y morfología ( $93.00 \cdot 10^6$ ), ya que este no estuvo sujeto a ningún cambio, en segundo lugar se encuentra el tratamiento A con una concentración ( $172.58 \cdot 10^6$ ), motilidad individual ( $94.60 \cdot 10^6$ ) y morfología ( $91.20 \cdot 10^6$ ), por último el tratamiento B con una concentración ( $130.30 \cdot 10^6$ ), motilidad individual ( $65.00 \cdot 10^6$ ) y de morfología ( $79.00 \cdot 10^6$ ). 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%.





## X. SUMMARY

This research was performed at Cuenca's University, at Agricultural Sciences Faculty, Veterinary Medicine School, at Azuay Province of Ecuador. The purpose of the thesis was to extract, process and freeze canine semen in liquid nitrogen for the purpose of artificial insemination. The samples were taken from 5 male dogs, after the sperm samples were collected and the canine semen contrasting evaluated, the next step was to mix the different canine semen samples with the Canipro freeze diluents A and B, obeying the protocol of temperature that the diluents above require; therefore, avoiding thermal shock and thus the death of sperm. Following the procedures of the diluents, straw of 0.25mL were obtained; which were stored in liquid Nitrogen. In the statistical section of the thesis, the Randomized Block Design (RBD) was used from which the following treatments straw were found: "A" Pre-frozen Semen of 5 male dogs. "B" Post-frozen semen of 5 male dogs. "C" Fresh Semen (witness). The best results were obtained in treatment C as follows: concentration ( $180.0 * 10^6$ ), individual motility ( $96.00 * 10^6$ ) and morphology ( $93.00 * 10^6$ ); it was not subjected to any alterations; in second place is treatment A as follows: concentration ( $172.58 * 10^6$ ), individual motility ( $94.60 * 10^6$ ) and morphology ( $91.20 * 10^6$ ); finally in third and last place treatment B as follows: concentration ( $130.30 * 10^6$ ), individual motility ( $65.00 * 10^6$ ) and morphology ( $79.00 * 10^6$ ). After thawing the canine samples straw, microscopic tests were conducted in which the percentages of individual motility, morphology and concentration values decreased as expected, positioning them within the acceptable values for use in artificial insemination (Field Test) of 5 female dogs used for the purpose of this investigation, obtaining a pregnancy rate of 60%.







## XI. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1. **Abreu E.** Estudio comparativo del sistema genital femenino. [Sede we]. Venezuela: Abreu, E., [acceso 19 de marzo de 2010]. 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. [Acceso 11 de agosto de 2010]. 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](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]. [Acceso 01 de enero de 2011]. 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 Martin 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] 2007 [consultado el 01 de agosto del 2010]; 2 (5). 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. [Acceso 07 de agosto de 2010]. 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/?lisisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&previous\\_page=homepage&task=exact\\_term&interface\\_language=e&search\\_language=e&search\\_exp=Motilidad%20Espermatica](http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?lisisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&previous_page=homepage&task=exact_term&interface_language=e&search_language=e&search_exp=Motilidad%20Espermatica)>
  9. **Esquivel, C.** Gestacion en la perra. [Sede web]. Esquivel, C., [actualizado 2008; acceso 26 de marzo de 2011]. Disponible en: <[http://www.ecografiavet.com/pdf/Gestacion\\_en\\_la\\_perra.pdf](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. Acceso 15 de agosto de 2010]. Disponible en: <[http://www.foyel.com/cartillas/20/citologia\\_vaginal\\_canina.html](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; acceso 18 de septiembre de 2010]. 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. [Acceso 13 de agosto de 2010]. Disponible en:





- <[http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/138\\_Jurado\\_ME\\_s\\_emen\\_canino.pdf](http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/138_Jurado_ME_s_emen_canino.pdf)>
14. **Kustritz M.** Manual de reproducción del perro y del gato. [Libro on line]. Esquivel, C., [actualizado 2009; acceso 18 de marzo de 2011]. Disponible en: <<http://books.google.com.ec/books?id=ExKoTVjUTQ4C&printsec=frontcover&hl=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; acceso 19 de marzo de 2011]. 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; acceso 12 de agosto de 2010]. 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. Acceso 26 de septiembre de 2011]. Disponible en: <[http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0250\\_Canipro\\_en\\_250906.pdf](http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0250_Canipro_en_250906.pdf)>
  19. **Muiño, 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: Muiño, R., [acceso 25 de marzo de 2011]. Disponible en: <[http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2406/1/978849750986\\_content.pdf](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]. [Acceso 02 de agosto de 2010]. Disponible en: <[www.san-bernardos.es/tiposde.htm](http://www.san-bernardos.es/tiposde.htm)>
  22. **Pet Care Gt.** Female dog reproductive system. [Sede web]. Unites States [Actualizado 2010; acceso 19 d emarzo de 2011]. 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] 2009 [consultado el 29 de octubre de]; 2 (4). Disponible en: <[http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo\\_12.pdf](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, [acceso 02 de agosto de 2010]. Disponible en: <[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2002000100014&script=sci\\_arttext](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](http://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; acceso 20 de marzo de 2011]. Disponible en: <[http://www.sobreperros.com/articulos/citologia\\_canina\\_en\\_la\\_perra](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, [acceso 05 de agosto de 2010]. 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; acceso 15 de agosto de 2010]. Disponible en:  
<<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/1500/>>
29. **Stornelli M, De la Sota R.** Fertilidad y Supervivencia del Semen Canino Criopreservado. [Sede Web]. La Plata. [Acceso 10 de agosto de 2010]. 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 acceso 20 de marzo de 2011]. Disponible en: <<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. [Acceso 03 de abril de 2011]. Disponible en:  
<<http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf>>
32. **Valera M.** Reproducción Canina, 2008. [Sede Web]. [Acceso 02 de agosto de 2010]. 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. [Acceso 07 de agosto de 2010]. Disponible en:  
<<http://reynaldovelazquez.wordpress.com/2008/08/16/examen-y-diagnostico-androlgico-en-el-perro-extraccion-de-semen/>>





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





**ANEXOS**





**Anexo 1.** Cuadro sobre resultados de la crioconservación.

Bloque	Nombre	Edad	Raza	Color	Volumen mL	Pre-congelación					Post-congelación			
						pH	Motilidad		Concentración	Morfología	Motilidad	Concentración	Morfología	
							Fresco Ind	Ind %	Masa	Pajuelas esp/mL	%	Ind %	Pajuelas	%
I	Chuck Torres	24 meses	Golden Retriever	Blanco lechoso	0,5	6,5	98	95	5	240000000	95	70	200000000	88
II	Aaron Cordero	36 meses	Bóxer	Blanco lechoso	1	6,5	98	95	5	225000000	98	65	173000000	90
III	Adonis Cano	48 meses	Golden Retriever	Blanco opaco	1	6,5	98	95	5	125000000	90	60	81000000	77
IV	Osama Cordero	52 meses	Akita Inu	Blanco lechoso	1	6,5	96	93	5	87000000	88	60	58000000	70
V	Tobías Ochoa	36 meses	French Poodle	Blanco lechoso	1,5	6,5	98	95	4,5	100000000	85	70	67000000	70





**Anexo 2.** Selección de macho.



**Anexo 3.** Extracción de semen.



**Anexo 4.** Utilización de condones plásticos

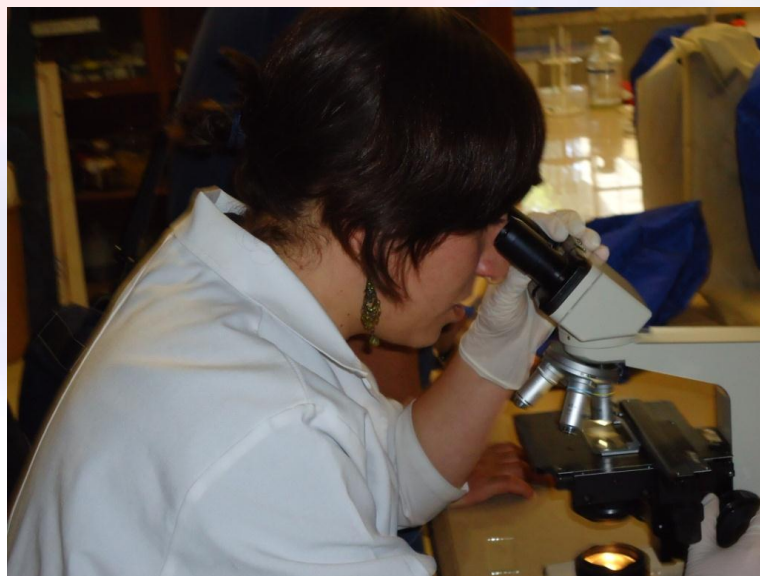


**Anexo 5.** Contrastación seminal.

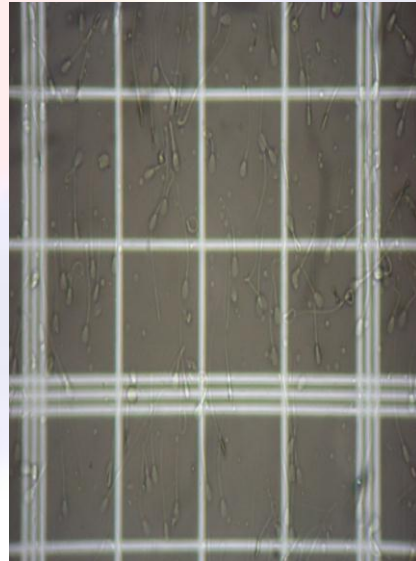
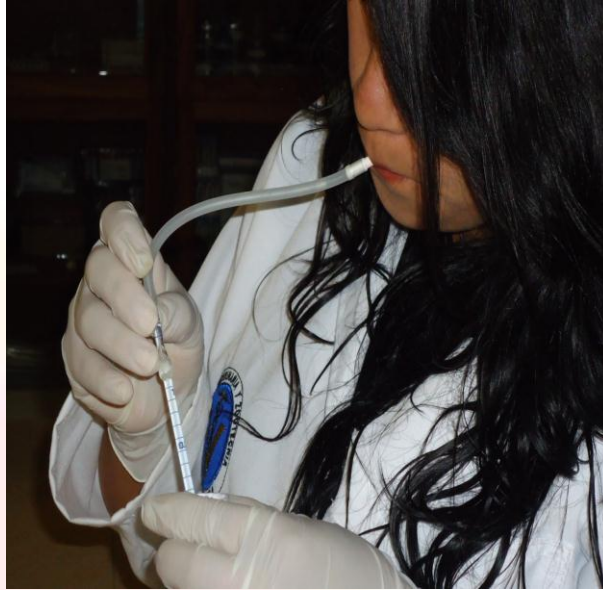
**Anexo 5.1.** Evaluación macroscópica



**Anexo 5.2.** Evaluación microscópica.



Anexo 5.2.1. Evaluación de concentración.





**Anexo 6.** Preparación de diluyentes.





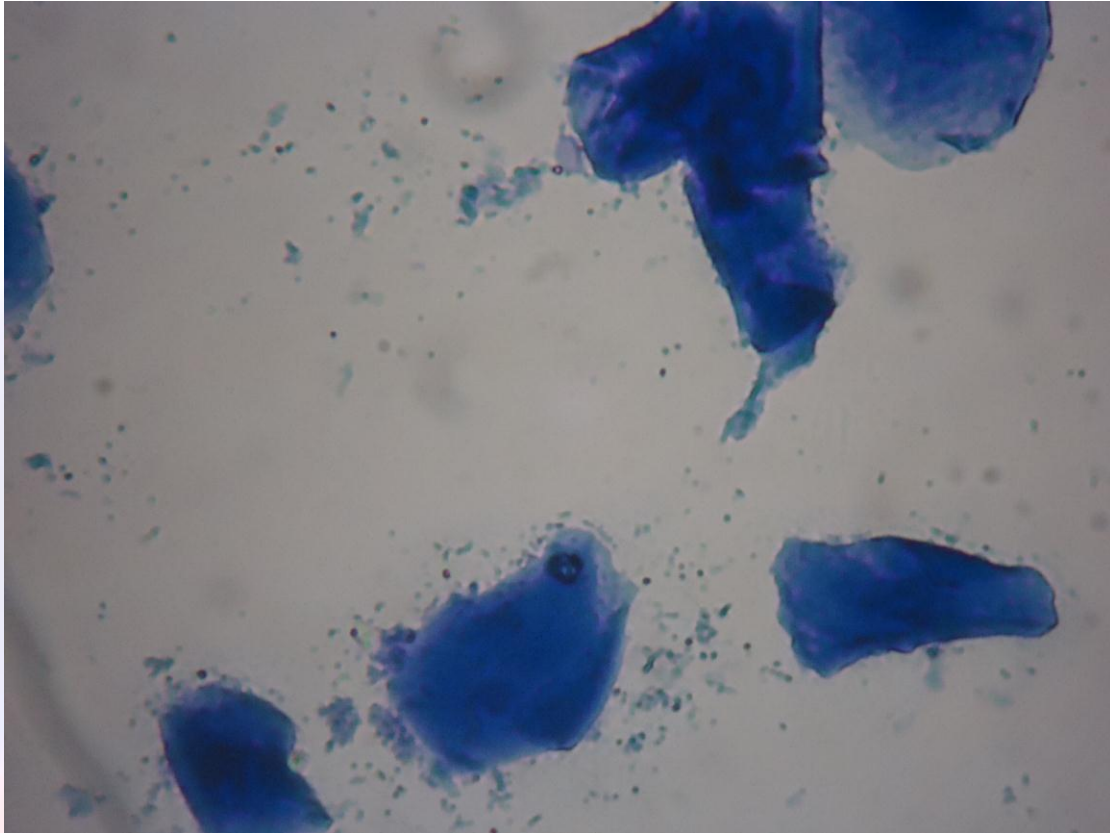
**Anexo 7.** Elaboración de pajuelas



**Anexo 8.** Vapores de nitrógeno líquido.



**Anexo 9.** Citología vaginal (estro).





**Anexo 10. Inseminación artificial.**





**Anexo 11.** Prueba de progesterona.

**EXAMENES DE PROGESTERONA**

**Realizados en:** Laboratorio Clínico Veterinario Dr.Pablo Guillén.

**Dirección:** Alejandro Vega Toral 1-53 y Nicanor Aguilar

**Teléfono:** 099909780

**Fecha:** 30 de marzo de 2012

HORMONAS:		
Luna		
Progesterona:	>60,00	ng/ml
Jacky Becerra		
Progesterona:	5,15	ng/ml
Daysi		
Progesterona:	0,18	ng/ml

HORMONAS:		
Ita Pacheco		
Progesterona: (ECLIA)	49,11	ng/ml
Bianca cordero		
Progesterona: (ECLIA)	51,98	ng/ml

**Progesterona**

Hombres: 0,27 - 0,9  
Mujeres: F.Folic: 0,32 - 2,0  
F.Ovu: 0,8 - 3,0  
F.Lutea: 1,70 - 28  
Posmenopausia: 0,1 -0,8  
Embarazo: 1er trim: 9,0 - 35,0  
2do trim: 29,0 - 80,0  
3er trim: 83,0- 160,

**Atentamente**

Pablo Guillén A. MVZ

