

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Efecto de los dilutores Tris, leche descremada sobre
características espermáticas del semen refrigerado de canino**

TESIS

PRESENTADO POR:

MERY QUINTANILLA DUEÑAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

ABANCAY - PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**Efecto de los dilutores Tris, leche descremada sobre
características espermáticas del semen refrigerado de canino**

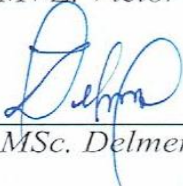
Presentado por **MERY QUINTANILLA DUEÑAS**, para optar el título de: Médico
Veterinario y Zootecnista

Presidente:



MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes

Primer miembro:



MSc. Delmer Zea Gonzales

Segundo miembro:



MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe

Asesor:



Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por abrirme las puertas y por darme la oportunidad de formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAMBA, por mostrarme el sendero del conocimiento y formación académica.

Al Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por asesorarme para llevar cabo el presente trabajo, ya que, sin su apoyo, su exigencia, sus consejos, sus críticas y sin la amistad que surgió, no hubiera sido posible.

A los miembros del Jurado Evaluador de esta tesis MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes, MSc. Delmer Zea Gonzales y MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe, por su aporte esencial en la revisión y participación activa en el desarrollo de esta investigación.



Dedicatoria

A mis queridos padres y hermanos por apoyarme incondicionalmente moral y económicamente para llegar a ser profesional y superarme cada día más.

A mamá Mariel Marca por brindarme su apoyo en todo el transcurso de la tesis.

A mi novio Percy Mallma Marca, con todo mi amor y cariño por su sacrificio y esfuerzo, por creer en mi capacidad, brindarme su comprensión, cariño y amor.

A mi amada hija Alejandra Zoe por ser mi fuente de motivación e inspiración, para poder superarme cada día más y seguir adelante.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema.....	4
1.2 Enunciado	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Justificación.....	6
1.5 Delimitación	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes	7
2.2 Marco referencial.....	10
2.2.1 Semen canino	10
2.2.2 Producción de espermatozoides	10
2.2.3 Colección del semen en caninos	11
2.2.4 Refrigeración del semen.....	11
2.2.5 Susceptibilidad al choque térmico	12
2.2.6 Dilutores del semen.....	12
2.2.7 Uso de yema de huevo en la refrigeración	14
2.2.8 Uso de leche descremada	15
2.2.9 Dilutores en la refrigeración.....	16
2.2.10 Evaluación del semen.....	16
2.3 Definición de términos	21
2.3.1 Espermatozoide	21
2.3.2 Refrigeración espermática.....	22
2.3.3 Dilutor	22
2.3.4 Test de HOST.....	22
CAPITULO III	23
DISEÑO METODOLÓGICO	23
3.1 Definición de variables.....	23

3.2 Operacionalización de variables	24
3.3 Hipótesis de la investigación	24
3.4 Tipo y diseño de la investigación	25
3.5 Población y muestra	25
3.5.1 Población.....	25
3.5.2 Muestra.....	25
3.6 Procedimiento de la investigación.....	25
3.6.1 Localización	25
3.6.2 Animales y diseño experimental	26
3.6.3 Preparación de dilutores	26
3.6.4 Colección de semen.....	27
3.6.5 Refrigeración del semen.....	27
3.6.6 Evaluación del semen.....	27
3.6.7 Análisis estadístico.....	28
3.7 Material de investigación	29
3.7.1 Instrumentos de investigación.....	30
CAPITULO IV.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Descripción de los resultados	31
4.1.1 Motilidad masal.....	31
4.1.2 Motilidad total.....	32
4.1.4 Prueba de endósmosis (HOST).....	36
CAPITULO V	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
Conclusiones	39
Recomendaciones	39
Referencia bibliográfica	40
Anexos.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

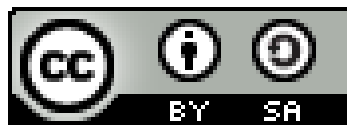
Cuadro 1. Composición química de los componentes del huevo de gallina	15
Cuadro 2. Variables e indicadores de la investigación.....	24
Cuadro 3. Composición del dilutor Tris (T1) y dilutor Leche descremada (T2) según los tratamientos, preparación para 10 mL.	26
Cuadro 4. Grado de motilidad masal (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.	31
Cuadro 5. Porcentaje de motilidad total (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada a diferentes horas de refrigeración.....	33
Cuadro 6. Porcentaje de vitalidad (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluado a diferentes horas de refrigeración.....	34
Cuadro 7. Porcentaje de positividad a endósmosis (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.....	36
Cuadro 8. Ficha de registro de dilutor Tris en las características espermáticas refrigeradas de semen canino criollo.	51
Cuadro 9. Ficha de registro de dilutor leche descremada en las características espermáticas refrigeradas de semen canino criollo.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la motilidad masal de espermatozoides de perros Criollos.	31
Figura 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la motilidad total de espermatozoides de perros Criollos.	33
Figura 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada (LD) sobre la vitalidad espermática de perros Criollos.	35
Figura 4. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la positividad a endósmosis de la membrana citoplasmática de espermatozoides de perros Criollos.	37
Figura 5. Mezcla de los componentes de los dilutores Tris.	52
Figura 6. Preparación del dilutor leche descremada.	52
Figura 7. Dilución de las muestras de semen de cada ejemplar para su evaluación en las distintas horas de refrigeración.	53
Figura 8. Tinción y frotis de las muestras seminales para su examen de vitalidad.	53
Figura 9. Prueba de vitalidad con dilutor leche descremada, visto a microscopía óptica a 100X.	54
Figura 10. Prueba de vitalidad con dilutor Tris, visto a microscopía óptica a 100X.	54
Figura 11. Test de HOST en espermatozoides con dilutor leche descremada, visto a microscopía óptica a 100X.	55
Figura 12. Test de HOST en espermatozoides con dilutor Tris, visto a microscopía óptica a 100X.	55

Efecto de los dilutores Tris, leche descremada sobre características espermáticas del semen refrigerado de canino

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

La preservación del semen constituye una parte fundamental dentro de los programas de reproducción asistida en perros; ya que, es un proceso que compromete la fertilidad potencial del mismo. Los eyaculados, como muestras procesadas, deben mantener la capacidad fecundante (1). El uso de semen refrigerado aparece como una alternativa relativamente más sencilla y barata que el uso de semen congelado (2). La refrigeración, constituye una parte integral de las técnicas y programas de reproducción asistida en la especie canina (3). El interés creciente por la práctica de inseminación artificial en la reproducción de los caninos demanda la búsqueda de protocolos de preservación de semen que permitan un mayor tiempo de viabilidad espermática (4). Sin embargo, la principal limitación del semen refrigerado es que su calidad espermática disminuye durante el proceso de almacenamiento (5).

Se estudiaron diferentes tipos de diluyentes por su capacidad de mantener la motilidad del semen canino sometido a refrigeración a través del tiempo (6). Cuya finalidad es diluir y aumentar el volumen del eyaculado, por lo tanto, facilitar la preservación de la viabilidad del espermatozoide por un tiempo mayor (7). Los dilutores del semen sirven para la preservación de la viabilidad y el mantenimiento de la motilidad espermática e integridad del acrosoma y de la membrana espermática (8). Por tanto, la preservación depende en gran medida del uso de dilutores (9). Sin embargo, todavía existen muchas controversias en el uso de tipos de dilutores, en particular en semen refrigerado.

En el proceso de refrigeración del semen, la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, especialmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares espermáticas sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas (10). El Tris y yema de huevo conservan el semen canino refrigerado (11). La leche descremada es de fácil preparación y bajo costo, resultaría ser una alternativa de conservación de semen refrigerado por algunos días en la clínica de pequeños animales (12). Por las consideraciones mencionadas, se realizó este estudio con el objetivo de evaluar el efecto de dilutores Tris y leche descremada en las características espermáticas del semen canino refrigerado en diferentes horas de refrigeración.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar las características espermáticas del semen canino refrigerado, utilizando dilutores Tris o leche descremada (LD). Se distribuyó en dos grupos de tratamientos (T), T1: dilutor Tris; T2: dilutor LD, cada grupo fue evaluado a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración mantenidos a 4 °C. Se utilizó 5 perros Criollos de tamaño mediano de 2 a 3 años de edad. Se colectó semen 5 veces por animal dos veces por semana, mediante la técnica de manipulación digital frente a una perra en celo, luego se mantuvo en baño María a 37 °C. Seguidamente se evaluó la motilidad masal y total, integridad funcional de la membrana plasmática y vitalidad espermática. Se realizó el análisis de varianza mediante el procedimiento GLM del SAS y prueba de Tukey, bajo el diseño completamente al azar. El dilutor Tris conservó mejor ($P \leq 0.05$) las características espermáticas que el dilutor LD en motilidad masal (Tris: 4.9 ± 0.1 ; 4.0 ± 0.4 ; 3.6 ± 0.5 ; 3 ± 0.4 / LD: 4 ± 0.4 ; 2.2 ± 0.2 ; 1.5 ± 0.1 ; 1.0 ± 0.1), motilidad total (Tris: 89.6 ± 3.5 ; 86.6 ± 5.6 ; 83.9 ± 7.6 ; 80.0 ± 7.6 / LD: 84.5 ± 5.6 ; 57.3 ± 13.8 ; 41.3 ± 10.9 ; 27.4 ± 6.7), vitalidad (Tris: 79.7 ± 2.7 ; 76.2 ± 2.9 ; 71.2 ± 5.2 ; 58.9 ± 8.0 / LD: 68.5 ± 8.6 ; 44.4 ± 7.9 ; 31.8 ± 4.9 ; 21.6 ± 4.1), integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Tris: 80.2 ± 6.7 ; 76.6 ± 6.5 ; 72.9 ± 7.3 ; 65.2 ± 3.5 / LD: 77.7 ± 9.6 ; 69.8 ± 5.6 ; 27.8 ± 3.8 ; 23.8 ± 4.2). Conforme fue mayor el tiempo de refrigeración 0, 12, 24 y 72 h los espermatozoides disminuyen su motilidad masal, motilidad total, positividad a la prueba de endósmosis y vitalidad espermática ($P \leq 0.05$). Se concluye que el dilutor Tris presenta mejores características de conservación en condiciones de refrigeración para el semen canino durante las 0, 12, 24 y 72 horas post colección frente al dilutor LD.

Palabras clave: Espermatozoide, endósmosis, vitalidad, motilidad, dilutor.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the spermatoc characteristics of refrigerated canine semen, using Tris or skim milk (LD) extender. It was distributed in two treatment groups (T), T1: extender Tris; T2: LD extender, each group was evaluated at 0, 12, 24 and 72 h of refrigeration maintained at 4 ° C. We used 5 Creole dogs of medium size from 2 to 3 years of age. Semen was collected 5 times per animal twice a week, using the technique of digital manipulation against a bitch in heat, then kept in a water bath at 37 °C. Next, the mass and total motility, functional integrity of the plasma membrane and sperm vitality were evaluated. Analysis of variance was performed using the SAS GLM procedure and Tukey test, under the completely randomized design. The Tris dilutor retained better ($P \leq 0.05$) sperm characteristics than the LD diluter in mass motility (Tris: 4.9 ± 0.1 , 4.0 ± 0.4 , 3.6 ± 0.5 , 3 ± 0.4 / LD: 4 ± 0.4 , 2.2 ± 0.2 , 1.5 ± 0.1 , 1.0 ± 0.1), total motility (Tris: 89.6 ± 3.5 , 86.6 ± 5.6 , 83.9 ± 7.6 , 80.0 ± 7.6 / LD: 84.5 ± 5.6 , 57.3 ± 13.8 , 41.3 ± 10.9 , 27.4 ± 6.7), vitality (Tris: 79.7 ± 2.7 , 76.2 ± 2.9 , 71.2 ± 5.2 , 58.9 ± 8.0 / LD: 68.5 ± 8.6 , 44.4 ± 7.9 , 31.8 ± 4.9 , 21.6 ± 4.1), integrity of the plasma membrane of the sperm (Tris: 80.2 ± 6.7 , 76.6 ± 6.5 , 72.9 ± 7.3 , 65.2 ± 3.5 / LD: 77.7 ± 9.6 , 69.8 ± 5.6 , 27.8 ± 3.8 , 23.8 ± 4.2). As the cooling time was longer, 0, 12, 24 and 72 h the sperm decreased their mass motility, total motility, positivity to the endosmosis test and sperm vitality ($P \leq 0.05$). It is concluded that the Tris dilutor presents better conservation characteristics under refrigeration conditions for canine semen during the 0, 12, 24 and 72 hours after collection versus the LD extender.

Key words: Spermatozoon, endosmosis, vitality, motility, dilutor.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

La inseminación artificial (IA) en caninos es una práctica que brinda grandes beneficios en la clínica reproductiva diaria y desarrollo biotecnológico. Sin embargo, si los factores como estado de salud, nutrición de los reproductores, detección del momento de mayor fertilidad de la hembra, tipo de manejo y calidad del semen utilizado e implementación de una técnica adecuada, que no son adecuadamente controlados, pueden tornarse una práctica desalentadora (13). De otra parte, existen pocos estudios a nivel nacional que evalúen la calidad de los animales existentes para ser incluidos en programas de reproducción. Siendo así, necesario el desarrollo de estudios reproductivos (14). Dentro de los exámenes reproductivos que se realizan frecuentemente se tiene las evaluaciones andrológicas convencionales que incluyen, en general, el análisis de motilidad, vitalidad espermáticas anomalías morfológicas de los espermatozoides (15). Desafortunadamente, debido a la fisiología particular de la hembra canina, el progreso en otras técnicas de reproducción artificial ha quedado rezagado (16).

Varios dilutores se han utilizado para mantener la fertilidad del espermatozoide (17). Se demostró que la composición de los diluyentes utilizados en los procesos de conservación del semen canino, puede afectar el tiempo de almacenamiento y la calidad de los espermatozoides (18). Por otro lado, el efecto de la dilución lleva a que determinados compuestos presentes en el plasma seminal estén en muy bajas concentraciones en el semen diluidos y alteran la viabilidad espermática, como por ejemplo la reducción de la concentración de potasio o de proteínas plasmáticas (19). La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas, depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura (20). El proceso de enfriamiento del semen genera profundos efectos en el espermatozoide, varios de los cuales llevan daño, consecuente la reducción en su fertilidad (9).

Entre las principales limitaciones en el uso de dilutores son la falta de conocimiento sobre su composición, viscosidad (21). Además, el estado de nutrición y salud de los reproductores, así como el manejo en el momento de inseminación, semen utilizado y técnica de inseminación

determinarán el éxito o fracaso de la IA (13). Esta práctica nos permite la conservación para su utilización en programas de inseminación artificial, pero el daño que provoca el almacenamiento en las estructuras de la membrana se ve reflejado en una disminución de la viabilidad y motilidad de las células expuestas a estas condiciones (22).

1.2 Enunciado

- **General**

¿Cuál de los dilutores, Tris o leche descremada, conserva mejor las características espermáticas del semen refrigerado canino a diferentes horas de refrigeración?

- **Específicos**

a) ¿Qué dilutor, Tris o leche descremada, mantiene mejor la motilidad masal y total de espermatozoides caninos, evaluados a diferentes horas de refrigeración?

b) ¿Cuál de los dilutores, Tris o leche descremada, mantiene mejor la vitalidad de espermatozoides caninos, evaluados a diferentes horas de refrigeración?

c) ¿Cuál de los dilutores, Tris o leche descremada, conserva mejor la integridad de funcionabilidad de la membrana citoplasmática de espermatozoides caninos, evaluados a diferentes horas de refrigeración?

1.3 Objetivos

- **General**

Evaluar el efecto de los dilutores Tris y leche descremada sobre características espermáticas del semen refrigerado de canino.

- **Específicos**

a) Determinar la motilidad masal y total de espermatozoides caninos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.

b) Evaluar la vitalidad de espermatozoides caninos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.

c) Determinar la integridad de funcionabilidad de la membrana citoplasmática de espermatozoides caninos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.

1.4 Justificación

La IA en caninos aumentó su importancia durante los últimos años, dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de distribución mundial; mientras la refrigeración del semen canino constituye en un tema de interés para médicos veterinarios y criadores con el fin de mejorar la reproducción de ejemplares de alto mérito genético, comercial o afectivo; así como de reproductores separados geográficamente, de perras con problemas de conducta o con vagina estrecha, también de perros con dificultades para la cópula. Diversas técnicas son empleadas para la IA y la evaluación de la calidad del semen canino fresco y refrigerado, con el fin de predecir su fertilidad (23).

Los diluyentes seminales tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Proveen sustratos energéticos y permiten la mantención de condiciones estables de pH y osmolaridad en el medio extracelular (24). Un diluyente eficiente mantiene o mejora el medio que rodea al esperma suministrándole energía y protección contra productos del metabolismo y variaciones de temperatura (25). Los dilutores protegen las membranas espermáticas, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (26).

La refrigeración seminal con diluyentes a base de leche descremada, son una alternativa sencilla y eficaz, también económicamente accesible que hacen factible y alientan a los profesionales de nuestro medio, para comenzar con el desarrollo de biotecnologías reproductivas en el perro doméstico (27). Además, considerando las necesidades clínicas reproductivas de diluyente seminal de fácil preparación y bajo costo que permita conservar el semen refrigerado por algunos días, resulta interesante considerar el uso de leche descremada fluida (28). Actualmente se requiere realizar la IA en perras con semen de macho deseado, por el tiempo de duración del celo se requiere inseminar varias veces, para ello es necesario mantener el semen en refrigeración.

1.5 Delimitación

El presente estudio involucró la evaluación de dilutores Tris y leche descremada a distintas horas de refrigeración de semen canino. Cuya unidad de investigación fue semen colectado de perros Criollos. Se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Patibamba Baja, del distrito y provincia de Abancay, Apurímac, Perú. Durante enero a abril de 2018.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Con el objetivo de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales sobre la fertilidad potencial de espermatozoides caninos conservados a 4 °C, se obtuvieron 20 eyaculados mediante manipulación digital. Cada eyaculado fue evaluado a través de espermiograma y de la prueba hipoosmótica (HOST), para luego ser fraccionado y diluido en relación 1:3 con uno de los siguientes diluyentes: yema de huevo + TRIS (EYT) y leche descremada fluida UHT (LD). En el semen fresco, la motilidad progresiva (MP) fue $95.7 \pm 3.6\%$ y la respuesta a HOST de $79.8 \pm 6.6\%$. Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de MP e integridad de membrana con HOST a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen, observándose mayores valores de MP y de espermatozoides dilatados en el diluyente EYT en todos los tiempos ($p < 0.05$). No obstante, los valores de MP ($>70\%$) y HOST ($> 60\%$) observados en cada uno de los tiempos de evaluación, independiente del tipo de diluyente, superaron los valores mínimos establecidos como adecuados para uso del semen canino refrigerado en inseminación artificial. En conclusión, el diluyente en base a leche descremada UHT, de fácil preparación y bajo costo, resulta una alternativa de uso en la clínica de pequeños animales (12).

Los objetivos del estudio fueron evaluar y comparar el efecto de la leche desnatada con yema de huevo (MEY) y leche desnatada sin yema de huevo (SMI) en los espermatozoides caninos incubados a 4 °C *in vitro* y evaluar la eficacia de MEY *in vivo*. Además, el efecto del almacenamiento refrigerado por semen antes de la congelación también se evaluó *in vitro*. Los eyaculados de 10 perros se recogieron, se combinaron, se centrifugaron y se dividieron en 4 alícuotas y se diluyeron en uno de los siguientes 4 diluyentes: fluido prostático (PRO), diluyente comercial (COM), SMI o MEY. Las muestras extendidas se almacenaron a 4 °C y se evaluaron diariamente durante 6 días. El porcentaje de motilidad total ($P < 0.01$) y progresiva ($P < 0.01$), acrosomas intactos ($P < 0.05$) y endosmosis positiva ($P < 0.01$) disminuyó con el tiempo en los diluyentes, con COM y PRO teniendo como mejor y peores actuaciones, respectivamente. Además, La motilidad MEY difiere de PRO ($P < 0.01$) y SMI ($P < 0.01$) pero no de COM. La integridad del acrosoma fue mayor en MEY en comparación

con SMI ($P < 0.05$). Estos resultados muestran que MEY puede considerarse un diluyente simple, económico y eficiente para la refrigeración del semen canino (29).

Con el objetivo de evaluar la utilización de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración, estudiaron los efectos del tiempo de almacenamiento, el grado de dilución y los niveles de fructosa, sobre la movilidad, morfología e integridad acrosomal del espermatozoide. Se utilizaron 5 machos adultos, sin raza definida (SRD), con edades entre 3 y 6 años, clínicamente sanos. Las muestras se obtuvieron mediante manipulación digital del pene. Cada alícuota fue diluida en proporción 1:2., 1:4 o 1:8 hasta un volumen total de 0.5 mL, empleando como diluyentes TRIS-ácido cítrico yema de huevo o TRIS - Citrato de Sodio - Yema de huevo, con 1.3 o 1.6 g de fructosa. Inicialmente las muestras fueron enfriadas gradualmente hasta 4 °C (1 °C /4 min) y luego almacenadas en una nevera convencional (4 ± 2 °C). La evaluación del semen fue realizada antes de la dilución y a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento, determinando % movilidad masal, % viabilidad espermática, anomalías morfológicas e integridad acrosomal; ésta última se evaluó mediante microscopía de contraste de fase. La movilidad fue evaluada por observación directa al microscopio de una gota gruesa de semen y calificada en una escala de 1 a 4, siendo 4 el mayor grado de movilidad. A las seis horas de almacenamiento no se observó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos. Posteriormente, a medida que transcurrió el tiempo, la movilidad espermática disminuyó gradualmente, observándose los menores valores en el semen diluido en proporción 1:2; los efectos de la concentración de azúcar y del tipo de diluyente utilizado no fueron significativos. Por otra parte, los efectos del tiempo de almacenamiento sobre la morfología, viabilidad e integridad acrosomal, tampoco fueron significativos (30).

Con el objetivo de comparar los efectos sobre los espermatozoides caninos de plasma seminal y 3 extensores comúnmente utilizados para la preservación del semen refrigerado en la práctica clínica. Las características evaluadas fueron motilidad espermática; velocidad; estado de la membrana plasmática (evaluado con una técnica de tinción de fluorescencia y prueba hiposmótica); morfología acrosómica; pH; y osmolaridad del semen. Estos criterios se controlaron diariamente en los eyaculados de 11 perros. Los eyaculados se dividieron en 4 alícuotas. Cada alícuota se extendió en plasma seminal autólogo, Tris - yema de huevo, leche - yema de huevo o crema de yema de huevo y se conservaron a 4 °C durante 4 días. En 10 de 11 muestras de semen extendidas en plasma seminal autólogo, la motilidad ya había

disminuido al 0% en el día 2, y el porcentaje de espermatozoides con membranas intactas era menor que en los 3 extensores ($P < 0.05$). La motilidad hasta el día 4 fue mayor en los espermatozoides Tris almacenados en yema de huevo (53.6%) que en los conservados en leche de yema de huevo (30.4%) y crema de yema de huevo (14.1%). Los espermatozoides almacenados en la yema de huevo Tris también tuvieron la mayor velocidad de espermatozoides, mientras que no se encontraron diferencias en la membrana plasmática o el estado del acrosoma ($P > 0.05$). El extensor Tris de yema de huevo parece ser superior a los otros extensores analizados, para preservar el semen canino a 4 °C, aunque las diferencias no fueron significativas para todos los parámetros (31).

Se recogieron eyaculados de tres perros machos de razas mixtas por día durante 3 días. El semen se diluyó en un diluyente de leche sólida sin grasa (NFDMS-G) o citrato de yema de huevo (EYC) a una concentración de 25×10^6 espermatozoides / mL. Las muestras diluidas se expusieron a tres temperaturas de almacenamiento diferentes (35, 22 y 4 °C). También se investigaron tres velocidades de enfriamiento (-1.0, -0.3 y -0.1 °C / min) a la temperatura de almacenamiento más baja (4 °C). El semen fue evaluado por motilidad total, motilidad progresiva y velocidad a las 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la recolección por dos observadores independientes. Las interacciones entre los extensores, las temperaturas y el tiempo después de la recolección se encontraron para cada una de las variables. El diluyente de glucosa sólida sin leche descremada fue superior a EYC ($P < 0.05$) en la preservación de los parámetros de motilidad espermática que se evaluaron para la mayoría de las observaciones. Los parámetros evaluados de motilidad espermática también fueron significativamente superiores ($P < 0.05$) en el semen almacenado a 4 °C que a 35 o 22 °C para la mayoría de las observaciones. La motilidad progresiva y la velocidad de los espermatozoides en el semen enfriado a 4 °C en NFDMS-G fueron mayores ($P < 0.05$) a las velocidades de enfriamiento rápidas y medias (-1.0 y -0.3 °C) que a la velocidad de enfriamiento lento (-0.1 °C / min) a las 24 y 72 h, y a las 48 h, respectivamente. En conclusión, el presente estudio sugiere que la motilidad del espermatozoide canino está bien preservada cuando se agrega un extensor de NFDMS-glucosa al semen y se enfría a una velocidad media o rápida a una temperatura de almacenamiento de 4 °C. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la fertilidad del semen almacenado de esta manera (6).

Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar los efectos de seis extensores y tres niveles de glicerol sobre la motilidad de los espermatozoides almacenados a 5 °C. Usando un diseño

de eyaculación dividida, se diluyó semen de 10 perros y 12 sementales con yema de huevo tris (EYT), yema de huevo y bicarbonato (EGB), Beltsville F-3 (BF-3), Universidad de Cornell (CUE), caprogen (CAP) y extensores de leche descremada calentada (SM). Después de enfriar a 5 °C, se añadió un extensor adicional que contenía 0 a 12% de glicerol para proporcionar una concentración final de 0, 3 o 6% de glicerol. Independientemente del nivel de glicerol, un porcentaje mayor ($P < 0.05$) de espermatozoides canino retuvo su potencial para la motilidad progresiva en el extensor CAP que en los extensores EYT, SM, CUE, EGB o BF-3. El extensor SM fue el mejor ($P < 0.05$) para mantener la motilidad de los espermatozoides equinos. La inclusión de 6% de glicerol deprimido ($P < 0.05$) de la motilidad de los espermatozoides caninos, pero no hubo efecto ($P > 0.05$) de la concentración de glicerol en el porcentaje de espermatozoides equinos móviles. Para ambas especies, la interacción del nivel de glicerol y el extensor no fue significativa. CAP puede ser útil para el almacenamiento de espermatozoides canino a 5 °C y SM puede ser satisfactorio para el almacenamiento de espermatozoides equino (17).

2.2 Marco referencial

2.2.1 Semen canino

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la formación de dicha suspensión que se forma durante la eyaculación se conoce como plasma seminal (32).

El semen eyaculado se compone de los espermatozoides suspendidos en el plasma seminal. El semen canino es eyaculado en tres partes. La primera, clara y sin espermatozoides, se libera antes de alcanzar la erección completa. La segunda se eyacula coincidiendo con la reacción intensa de eyaculación; es ésta la parte en que van los espermatozoides. La tercera es un fluido claro que se eyacula mientras los animales están trabados (33).

2.2.2 Producción de espermatozoides

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (células germinativas masculinas) en los tubos seminíferos de los testículos (34). Las espermatogonias que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen en (mitosis) para dar origen a espermatocitos. Los espermatocitos se dividen posteriormente mediante meiosis, por lo que el número normal de cromosomas queda reducido a la mitad (39), en las células resultantes que son llamadas espermátidas y se describen como haploides (con la mitad del número normal de

cromosomas; las células con 78 cromosomas son llamadas diploides; en este número se incluyen los dos cromosomas sexuales). Las espermatidas se transforman en espermatozoides mediante un complejo reagrupamiento de los organelos; básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centríolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma queda en las células de Sertoli que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos que regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide (35).

La producción espermática diaria, número de espermatozoides potencialmente fértiles producidos por día por los testículos, es una expresión de qué tan bien está funcionando la espermatogénesis. Se estima que se producen entre 15 y 19 millones de espermatozoides por día por gramo de tejido testicular. Esta producción relativa diaria es independiente de la raza, peso corporal, peso testicular y estación (36).

2.2.3 Colección del semen en caninos

La colección consiste en aplicar masajes suaves y de manera alternada sobre el cuerpo del pene del animal ejerciendo una ligera presión sobre el bulbo del pene cada tres segundos, hasta lograr una erección parcial; luego se retrae el prepucio y se sujeta el bulbo con la mano enguantada, ejerciendo una constante presión sobre el mismo, para lograr una total turgencia y marcado movimiento o reflejo pélvico; y cuando el perro levanta alguna de sus extremidades posteriores, se dirige el pene hacia atrás (rotación de 180 grados) para colectar el eyaculado. Para la recolección del semen se utiliza un tubo falcon graduado, estéril y temperado, obviando la primera fracción de eyaculado [dos o tres gotas] (4).

En el momento de la recolección se debe tener en cuenta la libido y facilidad de maniobra; los beneficios de utilizar una perra en celo para la obtención del semen canino facilitan la eyaculación y por lo tanto, la recolección del mismo. Muchos perros tendrán que eyacular sin la presencia de una perra y para esto se pueden utilizar feromonas comerciales en caso de que los perros sean renuentes (37).

2.2.4 Refrigeración del semen

La refrigeración a 4 °C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin

embargo, la refrigeración del semen es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra (38). Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá efectos negativos sobre la motilidad. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse para inseminación artificial lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24 a 48 h. Previo a la inseminación artificial el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (39).

La refrigeración del semen a 5 °C reduce el metabolismo de los espermatozoides con subsiguiente ahorro de reservas energéticas, siempre y cuando se proteja a las células contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la yema de huevo o la leche descremada que aumentan la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio de la membrana. El semen refrigerado puede utilizarse 24 h hasta después de su recogida (40).

2.2.5 Susceptibilidad al choque térmico

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0 °C y cuya señal más evidente de choque de frío es la pérdida de motilidad que no se recupera calentando el semen. También hay una disminución en la tasa de descomposición de la fructosa por los espermatozoides, una disminución en la absorción de oxígeno y una caída en ATP, que hora puede ya no ser sintetizado y utilizado para suministrar energía para el mantenimiento de la motilidad (41). Las lesiones irreversibles asociadas al choque térmico resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide o fases de transición lipídica (42).

2.2.6 Dilutores del semen

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, el cual le suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto reproductivo de la hembra. En el eyaculado, esta

actividad metabólica solo puede mantenerse durante un tiempo muy limitado. Para mantener los espermatozoides por periodos más prolongados, ya sea por enfriamiento o criopreservación, se hace necesaria e imprescindible la adición de sustancias que prolonguen la vida de estas células germinales. El dilutor es el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática (43).

Los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía y un crioprotector no penetrante que es opcional dependiendo de la temperatura y tiempo de refrigeración. Algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental, observándose un aumento en el porcentaje de fertilización “*in vitro*” en los diluyentes que incorporan en su composición y catalasa (44).

Estas sustancias contienen componentes que protegen y permiten la supervivencia espermática fuera del tracto reproductivo y además cumplen la función de aumentar el volumen de la dosis inseminante. Los componentes que hacen parte del diluyente deben suplir las necesidades metabólicas del espermatozoide como son la glucosa que constituye fuente de energía (45).

2.2.6.1 Componentes de los dilutores

La composición de los diluyentes utilizados en los procesos de conservación de semen canino (18). Debe contener sustancias parecidos al plasma seminal ya que este lo deberá proteger durante un determinado tiempo, por ello un diluyente debe tener ciertos compuestos básicos como son: Una fuente de energía (azúcares); un buffer para mantener el balance de pH (Tris o citrato de sodio); osmolaridad de la solución (sustancias iónicas o no iónicas), una fuente de lipoproteínas o material con alto peso molecular para prevenir el choque térmico, tal como la yema de huevo o leche y un crioprotector (glicerol o dimetil sulfoxido); así como aditivos [enzimas y antibióticos] (46).

2.2.6.2 Tipos de dilutores

Los diluyentes se clasifican en dos grandes grupos, que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (menos de 1 a 3 días), y aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 hasta 10 días), estos últimos ofrecen varias ventajas como transportar dosis

seminales a largas distancias, mantener mayor tiempo de refrigeración, permitir realizar pruebas diagnósticas del semen antes de ser usado, entre otras (47).

Diferentes tipos de diluyentes seminales, comerciales o preparados en el laboratorio, han sido evaluados en su capacidad de mantener el potencial fecundante de semen canino refrigerado. La composición de dichos diluyentes incluye sustancias como citrato, hidroximetilaminometano (Tris), N-Tris 2-hidroximetil-2-ácido sulfónico aminometano, fosfato, glicina, leche descremada en polvo reconstituida y calentada a 92 °C, leche descremada fluida (UHT), crema esterilizada, fructosa, glucosa, yema de huevo y antibióticos (5).

2.2.6.3 Dilutor Tris

El compuesto Tris (Tris-hidroximetil-aminometano; $C_4H_{11}NO_3$), es una sustancia soluble en agua, de aspecto cristalino, con un peso molecular de 121.14 g/L; tal sustancia posee la cualidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno, y por su capacidad amortiguadora, tiene la capacidad de neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides, y en particular al ácido láctico (48).

El dilutor Tris muestra un mejor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, en comparación con los demás dilutores, esto podría ser consecuencia a que hubo una mejor protección del acrosoma durante el proceso de enfriamiento, por parte del dilutor Tris, ya que los espermatozoides experimentan daños a nivel de la membrana plasmática, con inevitable reducción de la motilidad y probablemente también a nivel del acrosoma durante su conservación (49).

2.2.7 Uso de yema de huevo en la refrigeración

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, ya que tiene características protectoras contra el frío (50). También preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide, además es un buffer osmótico. Se ha notado que la yema de huevo protege durante la congelación; ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (51).

Los diluyentes a base de yema de huevo son usados principalmente para la conservación de semen debido a su acción protectora la cual es atribuida a la fracción lipoproteína de baja

densidad, los fosfolípidos que se ligan a la membrana plasmática (52). Los principales reportes de las funciones de este componente indican como protectores de shock térmico, preservación de la motilidad espermática, menor producción de enzimas acrosomales (hialuronidasa) y mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial, actúa como amortiguador osmótico, permitiendo una mayor tolerancia de los espermatozoides a las soluciones hipo e hiperosmóticas, esta protección se debe a su adhesión a la membrana plasmática especialmente por las LDL que se asocian con la membrana del espermatozoide y proveen protección para estabilizar la membrana estas lipoproteínas que tras su extracción con agua, solución salina o citrato proporcionan una fracción lipoproteica catiónica que se fija con preferencia a la membrana de los espermatozoides y desarrolla su acción protectora. Sin embargo, hay evidencia contradictoria concerniente a la estabilidad de la membrana del espermatozoide asociadas a las LDL (53).

a) Huevo de gallina

Tiene un 30 % aproximadamente de su peso está constituido por la yema, un 60% por la clara y un 10 % por la cáscara (54).

Cuadro 1. Composición química de los componentes del huevo de gallina (55).

Componente químico (%)	Cascara	Albumen	Yema
Agua	1.6	87-89	46.5-49.0
Proteína	3.3	9.5-11.5	16.0-17.0
Lípidos	-	-	33.0-34.0
Saturados	-	-	11.2-11.7
Insaturados	-	-	18.2-19.0
Colesterol	-	-	1.31-1.38
Glúcidos	-	0.4-0.5	0.15-0.25
Cenizas	95.1	0.5-0.7	1.1-1.6
Calorías	-	40-55	380-400

2.2.8 Uso de leche descremada

La leche tiene diversas propiedades que la hace uno de los componentes más usados en los dilutores de semen. Las proteínas de la leche son las que proveen dichas propiedades a favor de los espermatozoides durante la congelación, y pueden funcionar como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (56).

Los constituyentes de la leche con mayor efecto protector aparentan ser las micelas de caseína. De hecho, se ha demostrado que micelas de caseína aisladas desde la leche pueden proteger semen durante su almacenamiento a 4 a 5 °C. Ya que la leche descremada (libre de lípidos) es tan eficiente en su rol de protección espermática como la leche entera al almacenar semen a 4 °C, los lípidos aparentan no ser el constituyente responsable de la protección espermática entregada por la leche (57).

Para la preservación espermática, se ha utilizado leche descremada o leche entera, con las cuales el semen es diluido directamente y puede ser almacenado a 4 °C. El uso de leche descremada como diluyente de semen fue descrito inicialmente para la especie bovina, uso que se ha ido modificando con el paso del tiempo, pasando por leche esterilizada (58).

2.2.9 Dilutores en la refrigeración

Los diluyentes de refrigeración son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía (glucosa, fructosa) y un crioprotector no penetrante, que es opcional dependiendo de la temperatura y tiempo de refrigeración (leche descremada, yema de huevo). Algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental, observándose un aumento en el porcentaje de fertilización “*in vitro*” en los diluyentes que incorporan en su composición SOD (superóxido dismutasa) y catalasa (59).

La dilución del semen en un medio adecuado para la supervivencia de las células durante su procesado y conservación. El diluyente elegido y los ritmos específicos de refrigeración, son factores altamente importantes en la calidad del semen, pues influyen la motilidad de los espermatozoides, a su vez, influyen los índices de concepción tras la inseminación artificial. En esencia, los diluyentes deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del eyaculado. Es fundamental que el diluyente aporte una fuente de energía y proteja a los espermatozoides (60).

2.2.10 Evaluación del semen

Por medio de la evaluación del semen también podemos confirmar que la espermatogénesis en un perro joven es normal, antes de comenzar a usarlo como semental. También se puede comprobar la producción de semen en un macho que ha padecido alguna enfermedad reproductiva o después haber sometido al semental a una terapia con fármacos (61).

Las células espermáticas se verifican para asegurar que tengan una concentración suficiente, motilidad adecuada, y que son anatómicamente normales. Esto se hace porque sabemos que en muchos machos "estériles", el problema no es la producción células espermáticas, sino que los espermatozoides pueden tener anormalidades, y son incapaces de viajar a través de los oviductos de la hembra, o no pueden penetrar el óvulo para que ocurra la fertilización (62).

a) Evaluación macroscópica

Volumen: El volumen de semen obtenido es muy variable y depende de la edad, el tamaño, la frecuencia de recolección y la cantidad de líquido prostático recolectado del perro. El volumen normal puede variar de 1 a 4 mL por eyaculado (63). Presenta tres fracciones, siendo la primera y la tercera de origen prostático y la segunda es la fracción rica o espermática que contiene a los espermatozoides. Hasta el 90% del volumen total del eyaculado puede estar constituido por fluido prostático (64).

Color: El color del semen de perro va de blanco a opalescente y opaco (63). Debido a la presencia de los espermatozoides. Sin embargo, estas características varían dependiendo fundamentalmente de la concentración espermática del eyaculado (65).

pH: El pH normal del semen canino oscila entre 6.3 a 7 y depende de la cantidad de líquido prostático recolectado. Una disminución en el pH podría indicar una eyaculación incompleta o una inflamación de testículos o epidídimos (66).

b) Evaluación microscópica

Concentración espermática

Se debe calcular la concentración del eyaculado para conocer el número total de espermatozoides presentes. Se puede emplear cámara de Neubauer y se cuenta el cuadrado central de 1 mm. Se debe permitir que los espermatozoides se sedimenten manteniendo el hemocitómetro en una cámara húmeda durante una hora, esto no es tan esencial, pero incrementa la exactitud del recuento debido a que después de ella todos los espermatozoides habrán precipitado en el hemocitómetro en lugar de flotar. El número de espermatozoides contados en el cuadrado central grande equivale al número en millones de los mismos por mL; Este valor es multiplicado por el volumen total del eyaculado para calcular el número total de células en el mismo. Para el perro se considera normal de 200 a 500 millones de espermatozoides normales/eyaculado (67).

Es el número de espermatozoides por mililitro de muestra, se realiza por medio del hemocitómetro y una pipeta de dilución 1:200. Se realiza la lectura al microscopio en áreas determinadas de la cuadrícula, multiplicando el total de espermatozoides contados por un factor conocido y así se obtiene la cuenta de espermatozoides por mililitro (68). Una concentración normal para el semen canino está entre 200 y 1200 millones de espermatozoides por mililitro (69).

Motilidad espermática

Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (70).

La evaluación de la motilidad espermática es el parámetro más utilizado para la evaluación del semen, y es definida como el porcentaje de espermatozoides motiles de la muestra evaluada inmediatamente después de la recolección o después de la criopreservación del semen (71).

Motilidad masal

Esta técnica se ha utilizado desde hace mucho tiempo como método rápido, aunque subjetiva, para determinar la concentración y viabilidad de los espermatozoides de un eyaculado. Este examen se determina observando una gota de semen no diluido (sobre un portaobjetos sin cubre objetos), a aumento 10X, y con luz de poca intensidad. En toda la gota se observan movimientos de flujo y reflujo que tienen apariencia de “oleadas” (ondas y remolinos espermáticos) que se forman y desaparecen rápidamente. Cuanto más grande es la intensidad de la formación de los remolinos, mayor es la motilidad y el número de espermatozoides móviles (72).

En masa, este movimiento debe ser progresivo, intenso, un buen semen deberá presentar movimientos de más del 80 a 85% para considerarse de buena calidad, el movimiento ondulatorio tiene 4 categorías; Muy bueno (Torbellino intenso con ondas oscuras y claras);

Bueno (onda en torbellino más lentas, no tan intensas); Regular (movimiento lento con menos ondas); Malo [muy poca actividad en torbellino o ninguna] (73).

Motilidad individual

La evaluación de la motilidad individual en el microscopio necesita también cierto grado de experiencia y se hace con el fin de diferenciar los distintos tipos de movimientos de los espermatozoides y especialmente para poder establecer el porcentaje total de movimiento progresivo de la célula espermática. El movimiento rectilíneo representa la característica típica vital de los espermatozoides y tiene una relación muy estrecha con la fertilidad. Sin embargo, la motilidad progresiva no significa lo mismo que fertilidad, porque esta desaparece más rápido que la motilidad rectilínea. Todos los otros tipos de movimiento confirman una mala calidad del semen y los espermatozoides afectados han perdido prácticamente el poder de fecundar (74).

La técnica consiste en la observación microscópica a 400 aumentos (40X) de una muestra de semen diluido en una lámina portaobjetos temperada. Se consideran espermatozoides móviles aquellos que aparecen activos y con movimiento progresivo. La motilidad individual es el porcentaje de espermatozoides móviles con respecto al total de espermatozoides visualizados (75).

Morfología

La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación seminal, dado que intrínsecamente está implicada en los problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies (76). Las anomalías encontradas en los espermatozoides se clasifican en dos: anomalías primarias y secundarias. Las primeras ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden ocurrir a nivel del acrosoma (pérdida del borde apical, con abultamiento, arrugado, incompleto, desdoblado), cabeza (piriforme, flagelado, lanceolado, irregular, angosta, cabeza doble, macrocéfalo, microcéfalo), cuello (fractura, retroacción, con presencia de gota citoplasmática) y cola (corta, doble, retorcida, con presencia de gota citoplasmática). Las anomalías secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su salida por la uretra durante la eyaculación. En este tipo de anomalías tenemos cabezas sueltas, acrosoma desprendido, etc. (77).

Vitalidad

El estudio del semen para determinar la cantidad de espermatozoides que se encuentran vivos o muertos se conoce con el nombre de vitalidad espermática. La principal técnica utilizada para valorar este parámetro es la utilización de tinciones supravitales, elaboradas a partir de colorantes vitales como la eosina-nigrosina, eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test (HOST), capaces de teñir a los espermatozoides en función de la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática (78).

La evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos es basada en la suposición de que los espermatozoides muertos poseen membrana plasmática desintegrada permitiendo la penetración de la eosina. Por lo tanto, el porcentaje de células positivas para eosina teñidas con tinción nigrosina- eosina se considera como porcentaje de células muertas. El semen de perro normal consiste en el porcentaje máximo del 30% de las células espermáticas muertas. La evaluación del porcentaje de vida y espermatozoides muertos y el porcentaje de defectos morfológicos se pueden realizar en los mismos portaobjetos teñidos de nigrosina-eosina (79).

Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. 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 (80).

La funcionalidad e integridad de la membrana espermática, son vitales para la viabilidad del espermatozoide y metabolismo, además para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y por lo tanto, para la fertilidad del macho (81). La integridad de la membrana no solo es importante para el metabolismo de los espermatozoides, sino también se necesita un cambio correcto en las propiedades de la membrana espermática para la capacitación de los espermatozoides, la reacción acrosómica y, por lo tanto, para la fertilización (82).

Test Hipoosmótico (HOST)

La prueba de endósmosis celular *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen y se pueden observar cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (83).

Consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula con el objetivo de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento y enrollamiento de la cola, mientras que las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma de la cola. Por lo tanto, esta prueba se constituye en un signo de integridad funcional de la membrana espermática (23).

Esta prueba seminal se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que la célula trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular; considerando un aumento del volumen del espermatozoide. Esta situación se evidencia por cambios morfológicos característicos, tales como dilatación y enrollamiento de la cola (84).

2.3 Definición de términos

2.3.1 Espermatozoide

Gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos, son células alargadas consistentes, con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular (85).

El espermatozoide es una célula altamente especializada que no solamente ayuda a preservar la integridad celular, sino que también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación. (86).

El espermatozoide es una célula especializada que se puede dividir en tres segmentos principales: cabeza, pieza intermedia y cola. Las dimensiones del espermatozoide canino son longitud total $68 \pm 0,3 \mu\text{m}$, longitud de la cabeza $7 \mu\text{m}$, ancho de la cabeza $5 \pm 0,1 \mu\text{m}$, longitud de la pieza intermedia $11 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y longitud de la cola, $50 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (87).

2.3.2 Refrigeración espermática

La refrigeración implica un descenso de temperatura del eyaculado desde 37 °C (temperatura de dilución) hasta 15 o 5 °C (temperaturas de conservación óptimas), siendo la temperatura de refrigeración utilizada inversamente proporcional al tiempo de conservación (88).

El proceso de refrigeración consiste en mantener los espermatozoides a una temperatura de 15 a 20 °C o entre 4 a 5 °C, con la finalidad de evitar la muerte de los espermatozoides y mantener su carácter fecundante (89).

2.3.3 Dilutor

El diluyente o dilutor es un la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (90).

2.3.4 Test de HOST

Es una simple prueba basada en la semipermeabilidad de la membrana de una célula intacta en presencia de agua, expandiendo el volumen de la célula. Consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo (91).

CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Definición de variables

a) Variables independientes

- Dilutor Tris: Se refiere al compuesto Tris, es una sustancia soluble en agua, de aspecto cristalino.
- Dilutor leche descremada: Es un extensor que tiene efecto eficiente en su rol de protección espermática.

b) Variables dependientes

- Motilidad masal: Es el movimiento en masa de espermatozoides caninos, se mide subjetivamente en 0 a 5 grados.
- Motilidad total: Es la movilidad individual total de espermatozoides.
- Vitalidad: Es el número de espermatozoides vivos respecto al total de espermatozoides.
- Integridad de la membrana plasmática: Es el número de espermatozoides positivos a la prueba de HOST, mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas flectados o curvos.

3.2 Operacionalización de variables

Cuadro 2. Variables e indicadores de la investigación.

Variables	Indicador	Índice
Independiente		
Dilutor Tris	Cantidad de dilutor Tris agregado al semen	
Dilutor leche descremada	Cantidad de leche descremada agregada al semen	
Dependiente		
Motilidad masal	Movimiento en masa de espermatozoides caninos a escala de 0 a 5 grados	Motilidad masal del espermatozoide sobre el total de espermatozoides contados
Motilidad total	Movilidad individual total de espermatozoides	Movilidad total de espermatozoides sobre el total de espermatozoides contados
Vitalidad	Número de espermatozoides coloreados considerados como vivos	Espermatozoides vivos sobre el total de espermatozoides contados
Integridad de la membrana plasmática	Número de espermatozoides positivos a la prueba de HOST	Espermatozoides positivos a la prueba de HOST sobre el total de espermatozoides contados

3.3 Hipótesis de la investigación

- **Hipótesis general**

El dilutor Tris es mejor que la leche descremada, en la conservación de las características espermáticas refrigeradas del semen canino.

- **Hipótesis específica**

- El dilutor Tris es mejor que leche descremada en la preservación de la motilidad masal de espermatozoides caninos evaluados a diferentes horas en refrigeración.

- El dilutor Tris preserva mejor que leche descremada en la motilidad total de espermatozoides caninos evaluados a diferentes horas en refrigeración.
- El dilutor Tris mantiene mejor que leche descremada en la vitalidad de espermatozoides caninos evaluados a diferentes horas en refrigeración.
- El dilutor Tris conserva mejor que leche descremada en la integridad funcional de la membrana citoplasmática de espermatozoides caninos evaluados a diferentes horas en refrigeración.

3.4 Tipo y diseño de la investigación

Según la intervención del investigador, esta investigación es de tipo experimental, prospectivo, longitudinal, analítico (92).

Nivel de investigación explicativo. Pertenece a este nivel porque explica el comportamiento de una variable en función de otra(s); por ser estudios de causa-efecto (92).

3.5 Población y muestra

3.5.1 Población

Se utilizó 5 perros Criollos clínicamente sanos, sexualmente maduros de 2 a 3 años de edad de tamaño mediano, procedentes de la ciudad de Abancay.

3.5.2 Muestra

El método y tamaño muestra fue por conveniencia, que es un procedimiento no probabilístico (93). Fue representada por 25 eyaculados de semen de perros Criollos.

3.6 Procedimiento de la investigación

3.6.1 Localización

El presente experimento fue realizado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, Perú. Está localizado a 13° 38' 31.40" Latitud Sur y 72° 53' 17.03" Longitud Oeste, a 2180 m de altitud (94).

3.6.2 Animales y diseño experimental

Se utilizó semen de 5 perros Criollos descrito en el ítem 3.5.1. De cada animal se colectaron 5 eyaculados 2 veces por semana, en total fueron 25 eyaculados. Se formaron dos grupos de tratamiento (T) con dilutores de semen, T1: Tris; T2: Leche descremada, cada grupo tuvo 5 repeticiones. El semen de cada canino se destinó una parte al grupo T y la otra al LD. Las muestras de cada tratamiento de espermatozoides, se evaluaron a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración a 4 °C.

3.6.3 Preparación de dilutores

Los dilutores se prepararon individualmente para los dos tratamientos, según Cuadro 3, los componentes se pesaron en una balanza analítica, se preparó en tubos cónicos de 45 mL 12 h antes de su uso. La dilución fue 3: 1 (3 partes de dilutor y 1 parte de semen) diluidos a temperatura de 37 °C.

Para los dilutores Tris y LD se utilizó yema de huevo de gallina. Se obtuvo la yema separando la clara del huevo sobre papel toalla, luego, se colocó en tubos cónicos de plástico de 15 mL que permanecieron mantenidos a 37 °C en baño María hasta su utilización.

Cuadro 3. Composición del dilutor Tris (T1) y dilutor Leche descremada (T2) según los tratamientos, preparación para 10 mL.

	Tris - yema de huevo *	Leche descremada **
Tris (g)	0.302	-
Glucosa (g)	0.125	-
Ácido cítrico (g)	0.17	-
Yema de huevo	2 mL	2 mL
Penicilina	10000 UI	10000 UI
Agua bidestilada	8 mL	-
Leche descremada	-	8mL

* Sánchez *et al.* (12); ** Diaz (27).

3.6.4 Colección de semen

Se colectaron mediante la técnica de manipulación digital con ayuda de una hembra en celo, según Sanchez y Garrido (83), que consistió en aplicar masajes suaves y alternados sobre el cuerpo del pene del animal ejerciendo una ligera presión sobre el bulbo del pene cada tres segundos aproximadamente, hasta lograr una erección parcial; luego se retrajo el prepucio y se sujetó el bulbo del glande del pene con la mano enguantada, ejerciendo una presión sobre el mismo, para lograr turgencia y marcado movimiento o reflejo pélvico; logrando el eyaculado.

La colección del semen se realizó en tubos cónicos de 45 mL, luego, se llevó a baño María a 37 °C hasta su utilización.

3.6.5 Refrigeración del semen

Las muestras contenidas en tubos cónicos de plástico según los tratamientos se colocaron a refrigeración a 4 °C, desde allí se tomaron muestras para la evaluación espermática a los diferentes tiempos a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración post colección de espermatozoides.

3.6.6 Evaluación del semen

a) Motilidad espermática

i. Motilidad masal

Las muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo a la metodología propuesta por Maxwell y Evans (95), se colocó 5 µL de semen canino sobre la lámina portaobjeto a 37 °C y se observó con microscopio óptico a 10X, se le dio la valoración subjetiva de 0 a 5 grados considerando 0 cuando hay ausencia de movimiento y 5 cuando existen ondas con movimiento muy rápido y vigoroso.

ii. Motilidad total

Las muestras de semen fueron evaluadas de acuerdo con el método descrito por Baquero (30), con ciertas modificaciones, se consideró el total de espermatozoides móviles o móviles expresada en porcentaje. Para esta evaluación de motilidad, se mezcló 5 µL de semen con 10 µL de cloruro de sodio a 0.9% a 37 °C en viales de plástico de 2 mL. De esa dilución se aspiró 2 µL y se colocó a la lámina portaobjeto que esta sobre una platina atemperada a 37 °C, luego fue recubierta por un cubreobjetos y se observó en un microscopio a 40X. La motilidad total, se consideró al total de espermatozoides móviles

(rectilíneos progresivos, curvilíneos, circulares, en sitio). Se observó diferentes campos microscópicos y se contabilizaron 200 células espermáticas. Se grabaron en video al menos 4 campos de cada muestra (31).

b) Vitalidad espermática

Para la evaluación de vitalidad se siguió la técnica de Baquero (30), que consiste en el uso de una solución de Eosina-Nigrosina. Se colocó una alícuota de 5 μ L de Eosina-Nigrosina y semen, en una lámina portaobjeto precalentada a 37 °C, se mezcló y se hizo el frotis. Se contaron 200 células espermáticas en microscopio óptico a 100X, se consideró espermatozoides vivos aquellos no coloreados y fueron expresados en porcentajes.

c) Integridad funcional de la membrana citoplasmática

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Sanchez y Rubilar (81), utilizando 0.9 mL de solución hiposmótica y 0.1 mL de semen diluido y luego se agregó 0.1 mL de formaldehído al 4%. Se contaron 200 células espermáticas por microscopía a 100X. La positividad a la prueba de endósmosis se consideró cuando las células espermáticas presentaron edema, evidenciado por enrollamiento de la cola. Los espermatozoides se sometieron a la prueba de endósmosis (hiposmótica - Host), incubados por 30 min a 37 °C en solución citrato de sodio más fructosa.

3.6.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de sistema de análisis estadístico (SAS) v 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron la normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk que fue a través del procedimiento UNIVARIATE, luego se transformaron los datos a arcoseno. Luego se realizó el análisis de varianza mediante el Modelo Lineal General bajo el diseño completamente al azar con arreglo factorial 2A x 4B (factor A: dilutor Tris y leche descremada; factor B: 0, 12, 24, 72 h de refrigeración). La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey determinando la significancia ($P \leq 0.05$) entre grupos.

El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + A + B + AB + e$$

Dónde:

Y = Es la variable de respuesta (motilidad masal, motilidad total, vitalidad e integridad de la membrana plasmática).

μ = Es la constante, media de las observaciones.

A = Es el efecto del factor dilutor con dos niveles: Tris y Leche descremada.

B = Es el efecto del factor hora de refrigeración con cuatro niveles: 0, 12, 24, 72 h.

AB = Es el efecto de la interacción de los factores A y B

e = Es el efecto del error experimental, que está distribuido como ε DNI (0, σ^2e).

3.7 Material de investigación

Material biológico

- Caninos
- Semen

Materiales para la obtención de muestras

- Jeringas descartables de 5, 10 mL
- Jeringas de tuberculina
- Tips de micropipetas
- Bolsas plásticas “Zip lock”
- Guantes quirúrgicos
- Termómetro

Materiales de evaluación de espermatozoides

- Agua destilada
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos
- Eosina (2%)
- Nigrosina (5%)
- Solución salina (0.9% NaCl)
- Huevo de gallina
- Tris
- Leche descremada
- Formaldehído al 4%

Materiales de conservación del semen

- Refrigeradora
- Tubos cónicos de 15 y 45 mL
- Baño María
- Termocupla

3.7.1 Instrumentos de investigación

El instrumento que se usó además de los materiales mencionados fue el formato de registros que figura en el anexo cuadro 8 y 9.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Descripción de los resultados

4.1.1 Motilidad masal

Los resultados de motilidad masal de semen refrigerado se muestran en el Cuadro 4. Existe mayor ($P \leq 0.05$) motilidad masal del semen refrigerado con el dilutor Tris que el dilutor LD a las 0, 12, 24 y 72 h. Hubo mayor ($P \leq 0.05$) motilidad masal del semen refrigerado a 0 h seguidos por 12, 24 y 72 h con el dilutor Tris y descende de manera progresiva en las distintas horas de evaluación. Presenta mayor ($P \leq 0.05$) motilidad masal del semen refrigerado a 0 h seguidos por 12, 24 y 72 h con el dilutor LD y descende de manera progresiva en las distintas horas de evaluación.

Cuadro 4. Grado de motilidad masal (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.

Dilutor	Tiempo de refrigeración (horas)			
	0	12	24	72
Tris	4.9 \pm 0.1 ^{aA}	4.04 \pm 0.4 ^{aB}	3.6 \pm 0.5 ^{aC}	3 \pm 0.4 ^{aD}
Leche descremada	4 \pm 0.4 ^{bA}	2.24 \pm 0.2 ^{bB}	1.5 \pm 0.1 ^{bC}	1.04 \pm 0.1 ^{bD}

^{a, b} Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias ($P \leq 0.05$)

^{A, B, C, D} Diferentes superíndices dentro de la fila indican diferencias ($P \leq 0.05$)

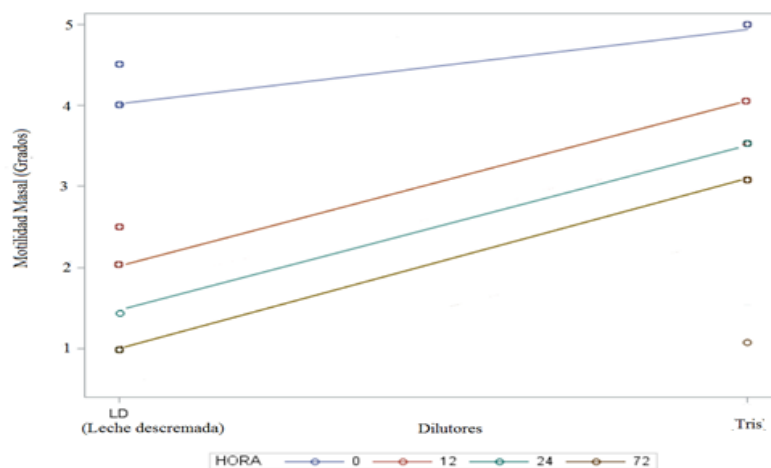


Figura 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la motilidad masal de espermatozoides de perros Criollos.

Los resultados de motilidad masal del presente estudio para Tris fue 4.9 ± 0.1 , 3.6 ± 0.5 , 3 ± 0.4 y LD 4 ± 0.4 , 1.5 ± 0.1 , 1.04 ± 0.1 estos resultados son menores a los reportes de Rota *et al.* (31) que evaluaron, utilizando una escala de 0 (ausencia de cualquier movimiento) a 5 (movimiento hacia adelante fuerte y vigoroso) en Tris- yema de huevo el cual fue 4.7 ± 0.5 ; 5.0 ± 0.0 ; 4.5 ± 0.5 para 0, 24, y 72 h de refrigeración de espermatozoides, mientras que disminuyó por debajo de 4 en 24 h para dilutores de leche - yema de huevo 5.0 ± 0.0 ; 4.4 ± 0.6 ; 3.5 ± 0.9 . Esta diferencia posiblemente se deba a la técnica, ya que la motilidad fue estimada subjetivamente que dependerá del técnico evaluador Rota *et al.* (31). La densidad del diluyente con yema de huevo puede influir en la dirección o movimiento espermático. Lo cual podría explicar la inferior tasa de movilidad (30).

En otro estudio Baquero *et al.* (30), muestran resultados de 3.2 ± 0.4 ; 2.6 ± 0.5 ; 1.4 ± 0.5 ; en Tris – Ácido Cítrico a las 12, 24, 72 h a medida que fueron pasando las distintas horas la movilidad espermática fue disminuyendo gradualmente. Estos valores son inferiores a nuestro estudio, posiblemente a la fracción de yema de baja densidad, compuesta principalmente de lipoproteínas de baja densidad, podría ser en gran parte responsable de la resistencia contra choque frío y para la mejora de la motilidad tras el almacenamiento (96). En otro estudio Guillen (97) observó con dilutor Tris, a las 0 horas, muestra un valor superior 4.20 ± 0.79 a comparación con del semen refrigerado a las 24 y 48 horas, 2.95 ± 0.80 y 2.30 ± 0.92 respectivamente, indica que el factor tiempo de refrigeración tiene influencia significativa en la motilidad masal a las 0 horas respecto a 24 y 48 horas.

4.1.2 Motilidad total

Los resultados de motilidad total del semen refrigerado se muestran en el Cuadro 5. Hubo mayor ($P \leq 0.05$) motilidad total del semen refrigerado con el dilutor Tris que el dilutor LD a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración. Existe mayor ($P \leq 0.05$) motilidad total del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72 h con el dilutor Tris. Descienden por acción del tiempo según las horas de refrigeración. Existe mayor ($P \leq 0.05$) motilidad total del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72 h con el dilutor LD. A medida que pasa las horas de refrigeración la motilidad descende.

Cuadro 5. Porcentaje de motilidad total (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada a diferentes horas de refrigeración.

Dilutores	Tiempo de refrigeración (horas)			
	0	12	24	72
Tris	89.6 \pm 3.5 ^{aA}	86.6 \pm 5.6 ^{aB}	83.9 \pm 7.6 ^{aC}	80.0 \pm 7.6 ^{aD}
Leche descremada	84.5 \pm 5.6 ^{bA}	57.3 \pm 13.8 ^{bB}	41.3 \pm 10.9 ^{bC}	27.4 \pm 6.7 ^{bD}

^{a, b} Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias ($P \leq 0.05$).

A, B, C, D Diferentes superíndices dentro de la fila indican diferencias ($P \leq 0.05$)

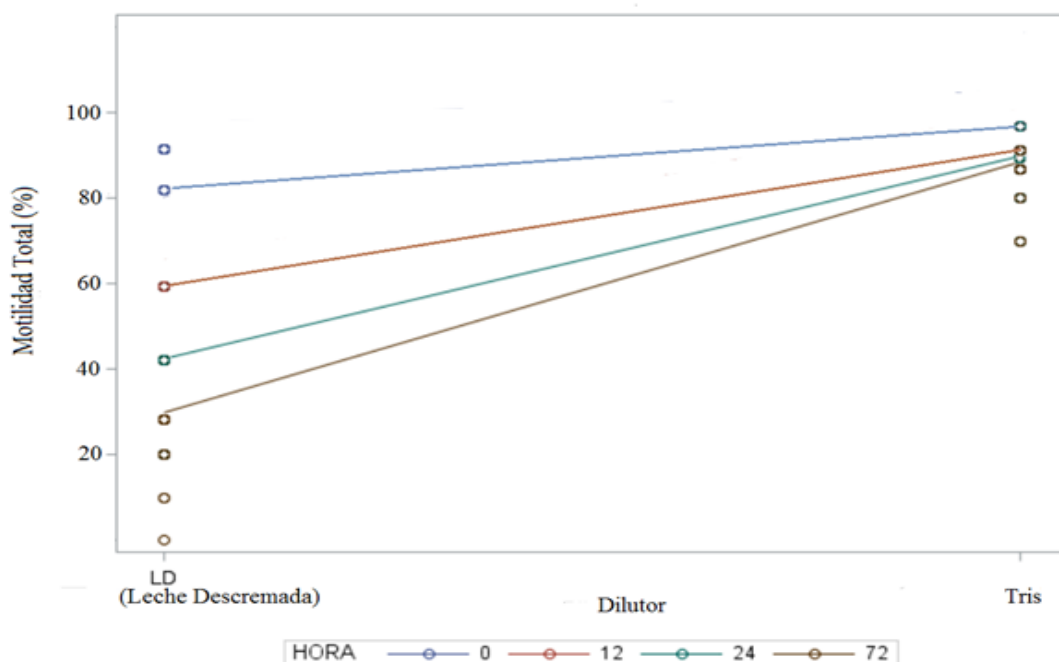


Figura 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la motilidad total de espermatozoides de perros Criollos.

La motilidad total de espermatozoides encontrados en esta investigación fue superior en dilutor Tris respecto a los reportes de Palomino (98) quien encontró con el dilutor Tris-citrato-yema de huevo 82.2 ± 6.2 ; 75.0 ± 4.3 ; 70.6 ± 3.0 ; 61.7 ± 2.5 menor para dilutor leche 87.2 ± 4.4 ; 82.2 ± 5.7 ; 77.8 ± 6.2 ; 71.1 ± 3.3 a las 0, 12, 24, y 72 h de refrigeración, esta diferencia del dilutor leche descremada posiblemente se deba a la viscosidad del medio diluyente que influye en las características de motilidad (99), mientras Maxwell y Evans (95) manifiestan que el empleo de la leche descrita como diluyente de semen, no siempre da resultados uniformes por la variabilidad en su composición. Otros resultados señalan

porcentajes de motilidad total con Tris - yema, 71.0 ± 13.3 ; 73.8 ± 13.3 ; 70.3 ± 15.9 , a las 0, 24, 48, 72 h. fue de Goericke (100).

La motilidad total de espermatozoides caninos encontrado en este estudio para Tris fue 89.6 ± 3.5 ; 83.9 ± 7.6 ; 80.0 ± 7.6 , el cual fue mayor que la leche descremada 84.5 ± 5.6 ; 41.3 ± 10.9 ; 27.4 ± 6.7 a las a 0, 24, y 72 h de refrigeración estos resultado son similares al reporte de Rota *et al.* (31), quienes estudiaron los efectos de dilutores, Tris - yema de huevo, leche - yema de huevo, en el semen canino almacenado a 4 °C durante 72 h, La motilidad total de Tris - yema de huevo fue significativamente mayor 76.8 ± 14.0 ; 73.6 ± 15.5 ; 60.9 ± 18.9 que el dilutor leche de yema de huevo, 75.0 ± 14.5 ; 57.7 ± 4.5 ; 35.9 ± 18.7 durante las 0, 24 y 72 h.

Para las 0, 24 y 72 h la motilidad total en este estudio fue 89.6 ± 3.5 ; 83.9 ± 7.6 ; 80.0 ± 7.6 para dilutor Tris, siendo estos resultados similares al reporte de Michael *et al.* (101) que muestran valores medios de 84.2 ± 0.5 ; 64.8 ± 0.9 ; 52.7 ± 1.0 para 0, 24 y 72 h de refrigeración a 4 °C. Así mismo Tittarelli *et al.* (102) muestran 25.5 ± 4.9 ; 22.5 ± 5.1 para 24 y 72 h, mientras que García (103) reporta 48.9 ± 0.5 para las 24 h.

4.1.3 Vitalidad

Los resultados de vitalidad en semen refrigerado se observan en el Cuadro 6. Se muestra mayor ($P \leq 0.05$) vitalidad espermática, utilizando Tris que el dilutor LD a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración. Hubo mayor vitalidad espermática del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72 h con el dilutor Tris. Presenta mayor vitalidad espermática del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72h con el dilutor LD.

Cuadro 6. Porcentaje de vitalidad (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluado a diferentes horas de refrigeración.

Dilutor	Tiempo de refrigeración (horas)			
	0	12	24	72
Tris	79.7 ± 2.7^{aA}	76.2 ± 2.9^{aB}	71.2 ± 5.2^{aC}	58.9 ± 8.01^{aD}
Leche descremada	68.5 ± 8.6^{bA}	44.4 ± 7.9^{bB}	31.8 ± 4.9^{bC}	21.6 ± 4.1^{bD}

^{a, b} Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias ($P \leq 0.05$).

^{A, B, C, D} Diferentes superíndices dentro de la fila indican diferencias ($P \leq 0.05$).

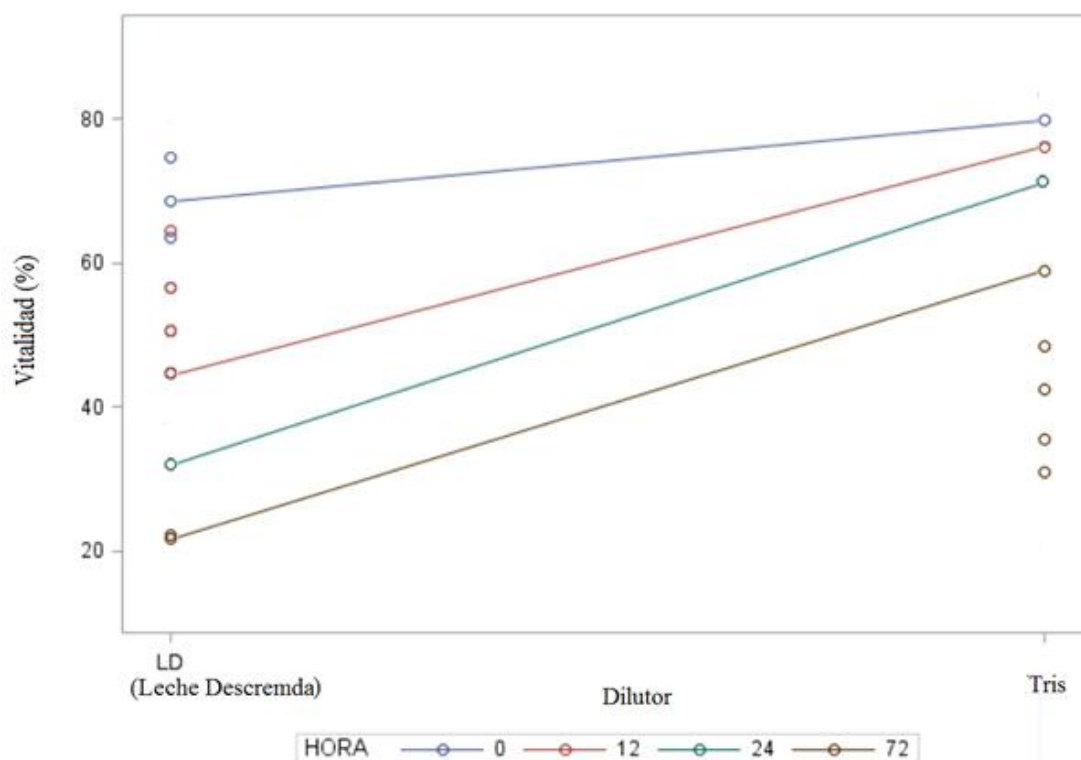


Figura 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada (LD) sobre la vitalidad espermática de perros Criollos.

El porcentaje de espermatozoides vivos encontrados en este estudio mantienen valores mayores a los resultados de Guillen (97) en la prueba de tinción supravital (Eosina-Nigrosina), en la vitalidad espermática, utilizando el dilutor elaborado a base de Tris-yema evaluado a las 0 horas, presenta mayor porcentaje de espermatozoides vivos ($64.2 \pm 3,4$) en comparación con el semen refrigerado a las 24 ($53,4 \pm 5,5$) y 48 horas ($45,8 \pm 4,1$), indicando una influencia significativa del tiempo de refrigeración ($P < 0.01$). Tittarelli *et al.* (102) muestran; 64.5 ± 3.0 ; 57.3 ± 3.5 para 24 y 72 h; García *et al.* (103) 58.3 ± 3.1 para 24 h.

En el caso de vitalidad espermática, se evidenció que los espermatozoides analizados a las 0, 12, 24 y 72 horas con dilutor Tris, presentaron diferencias con resultados de 79.7 ± 2.7 ; 76.2 ± 2.9 ; 71.2 ± 5.2 ; 58.9 ± 8.01 y con dilutor leche descremada 68.5 ± 8.6 ; 44.4 ± 7.9 ; 31.8 ± 4.9 ; 21.6 ± 4.1 . Estos resultados son menores a los reportes por Palomino *et al.* (98) donde encontraron una vitalidad seminal 91.7 ± 2.5 ; 85.6 ± 3.0 ; 81.7 ± 5.0 ; 75.6 ± 3.9 para Tris-citrato-yema de huevo y para leche 93.9 ± 2.2 ; 88.3 ± 2.5 ; 85.0 ± 3.5 ; 80.0 ± 3.5 . Esto probablemente se deba al contenido de yema de huevo y leche (104), en los dilutores, que

presenten una visualización opaca en las tinciones de las muestras de espermatozoides. También a problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen o alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento (105). Así mismo Michael *et al.* (101) reportaron con el dilutor Tris 92.1 ± 0.5 ; 82.3 ± 0.8 ; 74.5 ± 1.2 para 0, 24, y 72 h. de refrigeración. Similarmente Rodríguez-Gil (106) encuentran 86.3 ± 1.8 para 24 h.

4.1.4 Prueba de endósmosis (HOST)

Los resultados de positividad a endósmosis en semen refrigerado se observan en el Cuadro 7. Donde presenta mayor reacción positiva del semen refrigerado con el dilutor Tris que el dilutor LD a 0, 12, 24 y 72 h de refrigeración. Hubo mayor ($P \leq 0.05$) espermatozoides positivos a endosmosis del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72 h con el dilutor Tris. También hubo mayor ($P \leq 0.05$) cantidad de espermatozoides positivos a endosmosis del semen refrigerado a 0 h seguido por 12, 24 y 72 h con el dilutor LD.

Cuadro 7. Porcentaje de positividad a endósmosis (media \pm desviación estándar) de espermatozoides de perros Criollos, diluidos con Tris y leche descremada, evaluados a diferentes horas de refrigeración.

Dilutores	Tiempo de refrigeración (horas)			
	0	12	24	72
Tris	80.2 ± 6.7^{aA}	76.6 ± 6.5^{aB}	72.9 ± 7.3^{aC}	65.2 ± 3.5^{aD}
Leche descremada	77.7 ± 9.6^{bA}	69.8 ± 5.6^{bB}	27.8 ± 3.8^{bC}	23.8 ± 4.2^{bD}

^{a, b} Diferentes superíndices dentro de columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

A, B, C, D Diferentes superíndices dentro de la fila indican diferencias ($P \leq 0.05$)

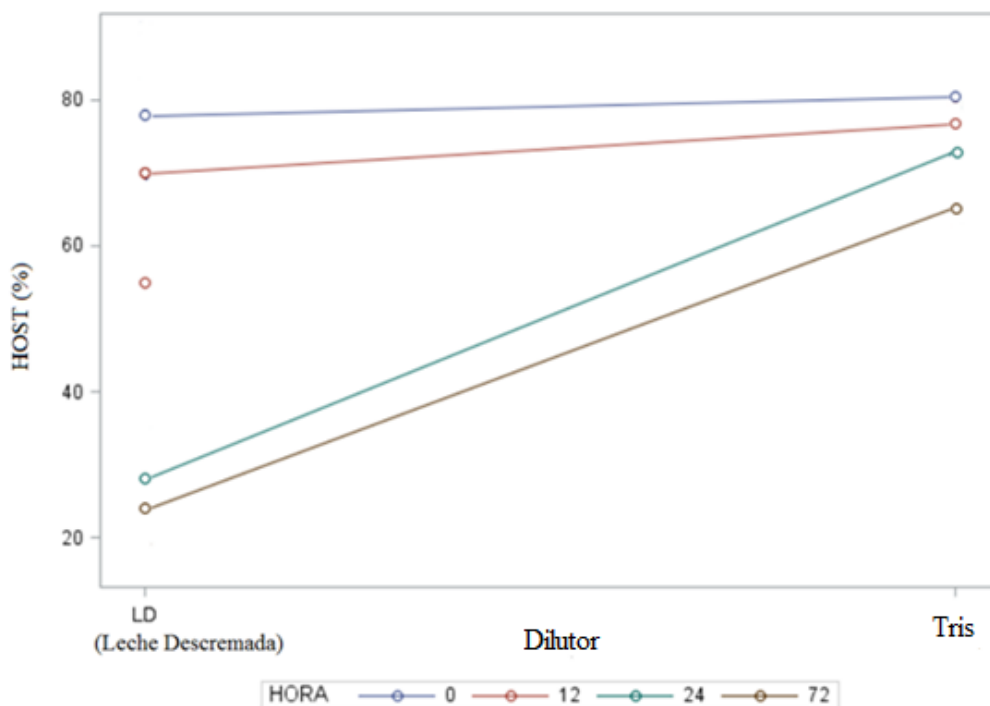


Figura 4. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 72 h) y dilutores Tris y leche descremada sobre la positividad a endósmosis de la membrana citoplasmática de espermatozoides de perros Criollos.

La respuesta de los espermatozoides sometidos a la prueba hipoosmótica en el presente estudio, alcanzó a 80.2 ± 6.7 ; 72.9 ± 7.3 ; 65.2 ± 3.57 con dilutor Tris y 77.7 ± 9.6 ; 27.8 ± 3.8 ; 23.8 ± 4.2 dilutor LD, la cual fue similar a lo descrito en espermatozoides caninos por Sánchez *et al.* (12), en yema de huevo + TRIS (EYT) 79.8 ± 6.6 ; 75.4 ± 10.0 ; 73.2 ± 8.5 y en leche descremada fluida UHT (LD) 79.8 ± 6.6 ; 66.8 ± 11.2 ; 64.9 ± 10.6 ; observados en cada uno de los tiempos de evaluación (0; 24 y 72 horas). Luego de ser sometidos a la prueba hipoosmótica los espermatozoides presentaron cambios morfológicos evidenciados por curvatura de la cola y pieza media, lo cual concuerda con las observaciones de Rota *et al.* (31). Esta prueba permiten señalar que la prueba hipoosmótica estima de manera eficiente la fertilidad potencial del perro, y dado su bajo costo y facilidad de realización, podría sugerirse su implementación para el análisis seminal de rutina en clínica reproductiva de animales pequeños (81).

Guillen (97) observó que el porcentaje de integridad de membrana según prueba de HOST, tuvo una reacción positiva decreciente a las 0 y 24 con el dilutor Tris siendo de 71.5 ± 3.9 y 60.8 ± 7.0 datos que son menores al presente estudio, la explicación podría ser principalmente

por el tipo de dilutor que en el caso usó Tris – fructuosa – yema. Siendo estos resultados similares a los reportes de Sánchez (83) fueron 76.0 ± 10.1 ; 70.5 ± 11.1 ; 64.4 ± 10.6 a las 24, 48 y 72 h, en el semen refrigerado. Otros resultados Rodríguez-Gil *et al.* (106) señalan porcentajes de 77.8 ± 2.5 para las 24 h; García *et al.* (103) muestra 39.8 ± 1.4 para las 24 h.

La prueba de endosmosis host de espermatozoides encontrados en esta investigación fue menor al reporte de Flores *et al.* (4), quienes encontraron 91.5 ± 2.9 ; 91.0 ± 1.9 ; 86.1 ± 4.1 ; 84.3 ± 4.9 a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración. Así mismo Rota *et al.* (31) encontraron 91.2 ± 4.1 ; 91.3 ± 4.2 ; 86.2 ± 5.3 y 92.0 ± 3.3 ; 90.9 ± 2.6 ; 85.9 ± 5.3 para 0, 24 y 72 h en Tris de yema de huevo y leche de yema de huevo, donde se evidenció que el dilutor T es mejor que LD.

El dilutor Tris permite destacar como un método de dilutor, para mantener las características espermáticas en espermatozoides caninos refrigerados, así como establecer pruebas de parámetros convencionales de evaluación usados de rutina en el estudio de fertilidad del macho canino.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La motilidad masal del semen con los dilutores Tris y leche descremada disminuyó progresivamente según el transcurso de las horas de evaluación (0, 12, 24 y 72 h) post colección del semen, siendo el dilutor Tris el que mostró mejores resultados de motilidad masal del semen de perros Criollos.
- La motilidad total del espermatozoide fue mayor con el dilutor Tris que la LD en las distintas horas (0, 12, 24 y 72 h) de refrigeración, esta última mantuvo motilidad aún hasta 72 h de refrigeración.
- La vitalidad de los espermatozoides de perros Criollos en distintas horas de refrigeración (0, 12, 24 y 72 h), presentó mayor cantidad de espermatozoides vivos con el dilutor Tris que la LD.
- La prueba de positividad a endósmosis de la membrana citoplasmática de espermatozoides de perros criollos, fue mejor con el dilutor Tris en todas las horas de refrigeración (0, 12, 24 y 72 h) que el dilutor LD.
- El dilutor Tris presenta mejores características de conservación en condiciones de refrigeración para el semen canino durante las 0, 12, 24 y 72 horas, post colección frente al dilutor leche descremada.

Recomendaciones

- Realizar estudios con técnicas de criopreservación y observar las mismas características que se evaluaron en el presente trabajo.
- Realizar estudios de comparación del efecto de la leche descremada, sin el agregado de yema de huevo, sobre las características del semen canino refrigerado a 4 °C.
- Evaluar el uso de los dilutores mencionados en otras especies.
- Evaluar la fertilidad, utilizando inseminación artificial con semen refrigerado.
- Utilizar distintas razas de perros con los dilutores mencionados.

Referencia bibliográfica

1. Gálvez Lagares MJ. Estudio de la influencia del proceso de preservación y de la centrifugación coloidal sobre la calidad seminal y la estructura de las subpoblaciones cinéticas identificadas en el semen canino. Universidad de Córdoba; 2015.
2. Shahiduzzaman AKM, Linde-Forsberg C. Induced immotility during long-term storage at +5 °C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2007;68(6):920–33.
3. Kim SH, Yu DH, Kim YJ. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim Reprod Sci*. 2010;119(1–2):106–14.
4. Flores J, Fernández V, Huamán H, Ruiz L, Santiani A. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Rev investig vet Perú*. 2010;21(1):26–34.
5. Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Long-term preservation of chilled canine semen: Effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 2001;55(2):671–84.
6. Bouchard G., Morris J., Sikes J., Youngquist R. Effect of Storage Temperature , Cooling Rates and Two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. 1990;34(1):147–67.
7. Gordon I. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. vol 2. 1996. 30-133 p.
8. Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, Viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 2000;54:579–85.
9. Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, et al. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biol Reprod*. 2006;74(2):359–65.
10. Parks J., Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.

- Theriogenology. 1992;38:209–22.
11. Linde-Forsberg C. Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen. *Recent Adv Small Anim Reprod.* 2001;21(category 1):1–5.
 12. Sánchez R A, Cartagena P A, Berland O M. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet Perú.* 2006;17(1):1–7.
 13. Stornelli M., Stornelli M., Arauz M., De La Sota L. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado; aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Vet.* 2001;(May 2014):58–66.
 14. Hernandez Corredor L. Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema casa. Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD; 2014.
 15. Hidalgo Prieto M. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos del espermatozoide de macho cabrío. Universidad de Córdoba; 2004.
 16. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 2000;53(1):175–86.
 17. Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology.* 1984;22(4):409–15.
 18. Sirivaidyapong S, Cheng F., Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology.* 2000;301(5):1163–78.
 19. Harrison RAP, Dott HM, Foster GC. acromolecules on the maintenance of motility and the Effect of ionic strength, serum albumin and other surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J Reprod Fertil.* 1978;52(i):65–73.
 20. Hammerstedt H, Graham K, Nolan P. Cryopreservation What of Mammalian Sperm :

- We Ask Them to Survive. *J Androl.* 1990;11(1):73–88.
21. Bustinza V. La alpaca, conocimiento de gran potencial andino. Libro 1. Oficina de Recursos de Aprendizaje. Puno- Perú: Universidad Nacional de Puno; 2001. 343 p.
 22. Puente MA, Tartaglione M. Evaluación de tres diluyentes sobre la calidad del semen refrigerado de conejo. *Vet Arg.* 2013:298.
 23. Restrepo Betancur G, Vásquez Araque N, Garcia EA. Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Rev CES Med Vet y Zootec.* 2009;4(2):119–29.
 24. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, et al. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* 2001;68(3–4):181–90.
 25. Chahuayo Chancha C, Paytan Huamán I. Influencia de los dilutores tris, sp-talp y andromed sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios refrigerados de alpacas (*Lama pacos*). Universidad Nacional de Huancavelica; 2013.
 26. Ström Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J Reprod Fertil.* 2000;119(1):77–83.
 27. Diaz JD. Desarrollo de diluyentes de baja complejidad y costo para la preservación a corto y mediano plazo de semen canino. Universidad Nacional de la Plata; 2015.
 28. Sánchez A, Rubilar J. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile. *Arch Med Vet.* 2001;33(1):105–10.
 29. Diaz JD, Corrada Y, Blanco PG, Gobello C. In vitro and in vivo assessment of skim milk with and without egg yolk on canine spermatozoa incubated at 4°C. *Anim Prod.* 2013;10(4):670–6.
 30. Baquero Parrado JR, Pardo Romero EA, Cruz Casallas PE. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de

- fructosa. Orinoquia [Internet]. 2004;8(1):26–33.
31. Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology*. 1995;44(6):885–900.
 32. Hafez ES., Hafez B. *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales*. Séptima Ed. Mexico: Mc Graw-Hill; 2002.
 33. Cole H., Cupps P. *Reproduction in domestic animals*. España: Acribia; 1984. 551 p.
 34. Davol PA. *Reproduction and the Male Dog*. Part 4. *Reprod Canine*. 2001;1–6.
 35. Cunningham JG, Hernández F, Octavio V. *Fisiología Vetrinaria*. 2a. ed. McGraw-Hill; 1999. 763 p.
 36. Olar TT, Amann RP, Pickett BW. Relationships Among Testicular Size, Daily Production and Output of Spermatozoa, and Extragonadal Spermatozoal Reserves of the Dog. *Biol Reprod*. 1983;29:1114–20.
 37. Root Kustritz M V. Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology*. 2005;64(3):734–46.
 38. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*. 2004;62(8):1498–517.
 39. Linde-Forsberg C. Artificial Insemination with Fresh, Chilled Extended, and Frozen-Thawed Semen in the Dog. *SeminVetMedSurgSmallAnim*. 1995;10:48–58.
 40. Garde Lopez-Brea JJ, Gallego Martinez L. *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la reproducción animal*. Cuenca: Universidad de Castillo la Mancha; 1996. 248 p.
 41. Mann T, Lutwak-Mann C. Biochemical changes underlying the phenomenon of cold-shock in spermatozoa. *Arch Sci Biol*. 2018;39(6):578–88.
 42. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Ancho doguy TJ, Overstreet JW, Crowe JOHNH. Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: A

- Demonstration Using Sperm as a Model. *J Exp Zool.* 1993;265:432–7.
43. Illera MM. Reproducción de los animales domésticos. AEDOS. España; 1994. 118-175 p.
 44. Amann RP, Hammerstedt RH. In Vitro Evaluation of Sperm Quality: An Opinio. *J Androl.* 1993;14(6).
 45. Brinsko SP, Varner DD. Artificial insemination and preservation of semen. *Vet Clin North Am Equine Pract.* W.B. Saunders Company; 1992;8(1):205–18.
 46. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 2000;62:23–53.
 47. Hidalgo DM. “ Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado ” Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. Universidad de Extremadura; 2013.
 48. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I . Processing , freezing , thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Prod Sci.* 1995;37(94):185–249.
 49. Vargas Cahuana P. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
 50. Phillips PH, Lardy HA. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. *J Dairy Sci.* 1940;23:390–404.
 51. Carpio Chuchuca VS. Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Universidad Politecnica Salesiana Sede Cuenca; 2015.
 52. Ijaz A, Ducharme R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 °C. *Theriogenology.* 1995;44(95):1039–50.
 53. Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA, Loaiza-eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, et al. Natural , but not lyophilized , low density lypoproteins were an acceptable

- alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. Elsevier Inc.; 2011;75(2):300–7.
54. Carbajal Azcona Á. Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud. Dpto Nutr Fac Farm UCM Rev Nutr Práctica [Internet]. 2006;10:73–6. Available from: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-11-26-CARBAJAL-NutrPractica-2006.pdf>
 55. Sauveur B. *Reproduction des volailles et production d'œufs*. INRA; 1988.
 56. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Prod Sci*. 2000;62:77–111.
 57. Bergeron A, Manjunath P. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1338–44.
 58. Macpherson JW. Sterile Milk as a Semen Diluent. *Can Vet J*. 1960;I(12):551–3.
 59. Hammerstedt RH. Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation: a Review of the Effect on Design of Storage Preservation Systems. *Reprod Fertil Dev*. 1993;5:675–90.
 60. England GCW. Cryopreservation of Dog Semen. *JReprodFertilSuppl*. 1993;47:243–55.
 61. Allen WE. *Fertility and Obstetrics in the Dog (Library of Veterinary Practice)*. Blackwell. Oxford; 1992. 198 p.
 62. Foster R, Smith M. Artificial Insemination (AI) in Dogs [Internet]. 2001. Available from: <http://www.peteducation.com/article.cfm?c=2+2109&aid=890>
 63. Hafez ESE. Evaluación de semen. En *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 3a Edición. McGraw – Hill, México; 1996. 542 p.
 64. Farstad WK. Artificial insemination in dogs. *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology*. 2da Edicio. 2010. 80-88 p.
 65. Medina Robles MV. Estandarizacion de un protocolo para la crioconservación de semen canino con congelador programable (cl-8800). Universidad de los Llanos -

- Unillanos; 2006.
66. Sorribas CE. Atlas de Reproducción canina. 1a edcion. Inter - Medica. Buenos Aires; 2005. 348 p.
 67. Bonilla Hernández CL, Ballesteros Mejia R. Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y dmsol como crioprotectores en el diluyente tris- glucosa-yema de huevo. Universidad de la Salle; 2007.
 68. Navarrete Mendoza J V. Procesamiento De Semen Caprino. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2005.
 69. Gobello C, Olivera M. El libro latinoamericano de reproducción canina y felina. 2a. ed. Medellín: Biogénesis; 2005. 338 p.
 70. Daas N Den. Laboratory assessment of semen characteristics. Anim Reprod Sci. 1992;28:87-94.
 71. Seager SW, Fletcher WS. Progress on the use of frozen semen in the dog. Vet Rec. 1973;92(1):6-10.
 72. Padrón Durán RS, López Fernández G, Gallardo Rios M. Interpretación del análisis seminal. Rev Cuba Endocrinol. 1998;9(1):81-90.
 73. Feldman EC, Richard NW. Endocrinología y reproducción canina y felina. 3ra ed. Inter Medica; 2007. 1234 p.
 74. Meza Ortíz A. Motilidad Individual y Viabilidad de Espermatozoides Caprinos a Diferentes Temperaturas de Mantenimiento en Semen Diluido. Universidad Veracruzana. Veracruz, México; 2012.
 75. Geoffrey HA, Noakes ED, Pearson H. Reproducción y obstetricia en veterinaria: (teriogenología). 6 ed. New York: Interamericana-Mc Graw-Hill.; 1991. 10-11 p.
 76. Oettlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. J Reprod Fertil Suppl. 1993;47:257-60.

77. Garreth E, Maxwell WC. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. CAB Direct. 6a ed. Nueva York; 1987;10-1.
78. Peña Martínez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim Reprod Sci. 2004;32-83:209-24.
79. Payan-Carreira R, Miranda S, Nizański W. Artificial Insemination in Dogs. CECAV – Univ Trás-os-Montes Alto Douro. 2011;(29).
80. Stornelli MA, Sota RL De. Fertility and survival of canine semen criopreservation. Analecta Vet. 2006;25(2):29-38.
81. Sanchez A, Rubilar J, Gatica R. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. Arch Med Vet. 2002;34(1):1-7.
82. Brooks KA, Webster BW. Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. 1st Editio. Boston; 1990. 448 p.
83. Sánchez Riquelme A, Garrido Burgos D. Evaluation of a Simplified Hypoosmotic Swelling Test in Fresh and Chilled Canine Semen. Rev Científica, FCV-LUZ. 2013;6:506-10.
84. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil. 1984;70(1):219-28.
85. Knobil E, Skinner MK, Neill JD. Encyclopedia of Reproduction. vol 1. Academic Press; 1998. 4768 p.
86. Morris G., Clarke A. Effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press, New York. Cryobiology. 1981;241-62.
87. Wanke M., Gobello C. Reproducción en caninos y felinos domésticos. 1st ed. Buenos Aires- Argentina: Inter Medica; 2006.
88. Cortés Gallego S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen

- caprino. Universidad Complutense de Madrid; 2003.
89. Muñoz Cuevas AK. Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de Sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro; 2018.
90. Gadea J. Review : Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish J Agric Res. 2003;1(2):17–27.
91. Mellisho E. Manual de Laboratorio de Reproducción Animal. Evaluacion de Calidad Seminal. 2010.
92. Supo J. Cómo empezar una tesis. Primera ed. 2015.
93. Jordi Casal EM. Tipos de muestreo. Rev Epidem Med Prev. 2003;1:3–7.
94. Google E. Google Earth [Internet]. 2018. Available from: <https://earth.google.com/web/@-13.64187874,-72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=ClkaVxJRChYweDA6MHg5ZDU0MDk4OGI1MmRmZDA3Gd5ab7ajSCvAIYmd2InVOFLAKiVGYWN1bHRhZ>
95. Maxwell WN., Evans G. Inseminación artificial de ovejas y cabras. ACRIBIA S.A. Zaragoza. España; 1990. 192 p.
96. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method : cryoprotective effect on frozen ± thawed bull semen. Theriogenology. 2002;57:1695–706.
97. Guillen Portugal MA. Fertilidad en ovejas dohne merino por inseminación artificial con semen refrigerado, diluido en tris y triladyl de 24 y 48 horas en la estacion experimental agraria - ILLPA - PUNO. Universidad Nacional Jorge Basahadre Grohmann - Tacna; 2016.
98. Palomino JM, Cervantes M, Rodríguez A, Cisneros F, Huanca W. Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen

- refrigerado de caprinos. APPA- ALPA-Cusco, Perú. 2007;
99. Amann RP. Seminal Can Sample the Fertility Be Predicted Potential of a Accurately ? *J Androl*. 1989;10(2).
 100. Goericke-pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Anim Reprod Sci*. Elsevier B.V.; 2012;135(1–4):97–105.
 101. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2009;112:119–35.
 102. Tittarelli C, Augusto C, Arnaudi E, Stornelli C, Stornelli A, Luzbel R, et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*. 2006;66:1637–40.
 103. García W V, Alarcón VB, Bravo W p. Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. *Rev Inv Vet Perú* 2017. 2017;28(2):337–44.
 104. Garner DL, Johnson LA, Allen CH. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology*. 1988;30(2):369–78.
 105. Quinn PJ, White IG. The Effect Of Cold Shock And Deep-Freezing On The Concentration Of Major Cations In Spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1966;12:263–70.
 106. Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 1994;42:815–29.

Anexos

Cuadro 8. Ficha de registro de dilutor Tris en las características espermáticas refrigeradas de semen canino criollo.

REPETICION N°		TRATAMIENTO N° 1 DILUTOR TRIS																							
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA		Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:							
pH: P1(); P2(); P3(); P4(); P5()		Color:				Color:				Color:				Color:				Color:							
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA		Densidad:				Densidad:				Densidad:				Densidad:				Densidad:							
Fecha de inicio de la evaluación		/ /				/ /				/ /				/ /				/ /							
		Perros				Nicola				Shado				Spot				Sebastián				Toto			
Horas de evaluación		0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72
Motilidad Masal		Puntuación																							
Motilidad individual	Tipos de movimiento en 5 campos distintos con 200 células	Rectilíneo progresivo																							
		Curvilíneo																							
		Circular																							
		En sitio																							
		Sin movimiento																							
		Total																							
Vitalidad		Vivos																							
		Muertos																							
test de host	Cola hinchada																								
	Cola no hincha																								
	total																								

Cuadro 9. Ficha de registro de dilutor leche descremada en las características espermáticas refrigeradas de semen canino criollo.

REPETICION N°		TRATAMIENTO N° 2 Leche Descremada																							
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA		Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:				Vol Eyc:							
pH: P1(); P2(); P3(); P4(); P5()		Color:				Color:				Color:				Color:				Color:							
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA		Densidad:				Densidad:				Densidad:				Densidad:				Densidad:							
Fecha de inicio de la evaluación		/ /				/ /				/ /				/ /				/ /							
		Perros				Nicola				Shado				Spot				Sebastián				Toto			
Horas de evaluación		0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72	0	12	24	72
Motilidad Masal		Puntuación																							
Motilidad individual	Tipos de movimiento en 5 campos distintos con 200 células	Rectilíneo progresivo																							
		Curvilíneo																							
		Circular																							
		En sitio																							
		Sin movimiento																							
		Total																							
Vitalidad		Vivos																							
		Muertos																							
Test de host	Cola hinchada																								
	cola no hinchada																								
	total																								



Figura 5. Mezcla de los componentes de los dilutores Tris.



Figura 6. Preparación del dilutor leche descremada.



Figura 7. Dilución de las muestras de semen de cada ejemplar para su evaluación en las distintas horas de refrigeración.



Figura 8. Tinción y frotis de las muestras seminales para su examen de vitalidad.

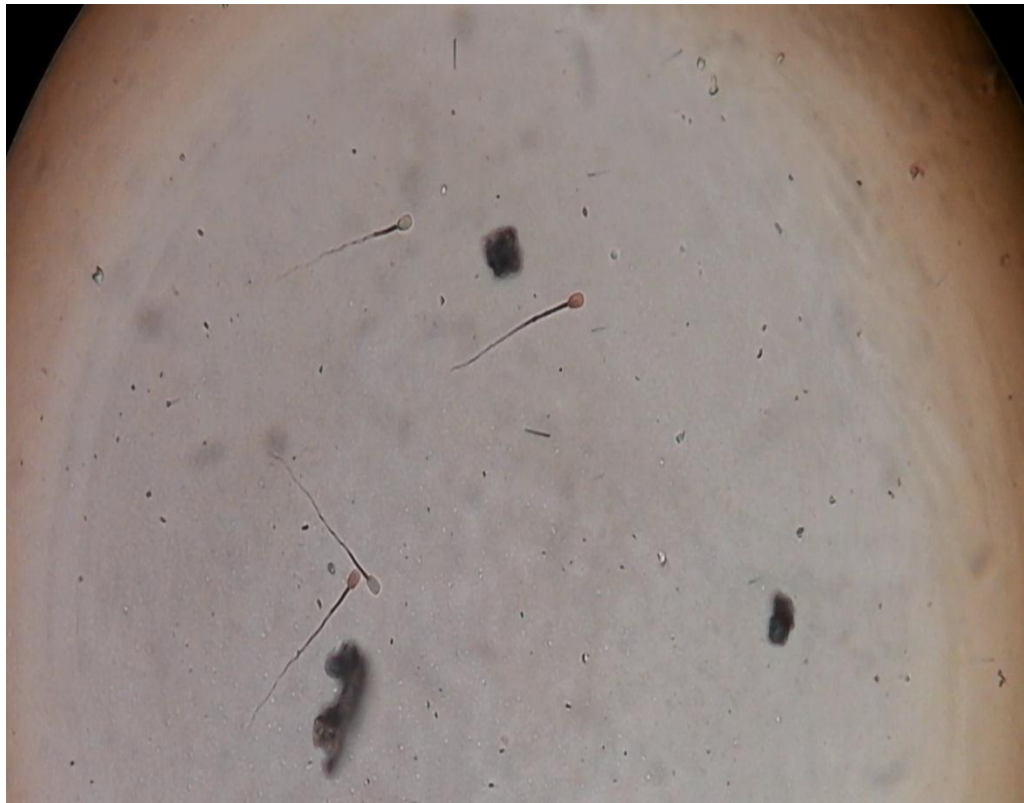


Figura 9. Prueba de vitalidad con dilutor leche descremada, visto a microscopía óptica a 100X.



Figura 10. Prueba de vitalidad con dilutor Tris, visto a microscopía óptica a 100X.

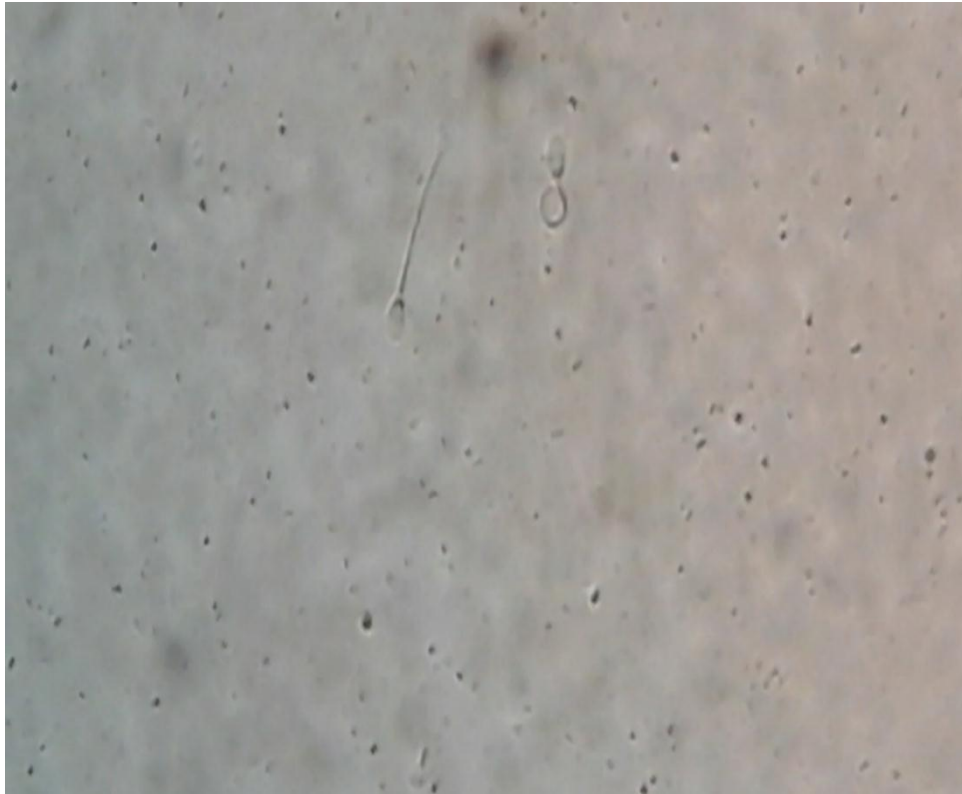


Figura 11. Test de HOST en espermatozoides con dilutor leche descremada, visto a microscopía óptica a 100X.



Figura 12. Test de HOST en espermatozoides con dilutor Tris, visto a microscopía óptica a 100X.