



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE  
LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN  
CANINO.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médico  
Veterinario y Zootecnista.

**Autor:**

**PAOLA ESTEFANÍA PROAÑO MONTESDEOCA**

**Tutor:**

**MVZ. JUAN EDUARDO SAMBACHE TAYUPANTA Msc.**

**Latacunga – Ecuador**

**Marzo – Agosto 2019**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **Proaño Montesdeoca Paola Estefanía** declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO”**, siendo el **MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta Msc.** tutor del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

.....  
Proaño Montesdeoca Paola Estefanía

Número de C.I. 180494499-7

.....  
MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta Msc.

Número de C.I. 172179675-1

## **CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR**

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte de PROAÑO MONTESDEOCA PAOLA ESTEFANÍA, identificada/o con C.C. N°, 180494499-7 de estado civil SOLTERA y con domicilio en AMBATO, a quien en lo sucesivo se denominará **LA/EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** - **LA/EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de **MEDICINA VETERINARIA**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Unidad Académica según las características que a continuación se detallan:

Historial académico. – Septiembre 2014 - Agosto 2019

Aprobación HCA. 4 de Abril del 2019

Tutor(a). – MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta Msc.

Tema: Evaluación de la adición de yema de huevo y crema de leche al diluyente, para la crioconservación del semen canino.

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **LA/EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **LA/EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.

b) La publicación del trabajo de grado.

c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA/EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA/EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA/EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuartas, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga a los 22 días del mes de julio del 2019.

-----

Sta. Proaño Montesdeoca Paola Estefanía    Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez

**EL CEDENTE**

**EL CESIONARIO**

## **AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

**“EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO”**, de **PROAÑO MONTESDEOCA PAOLA ESTEFANÍA**, de la carrera de **MEDICINA VETERINARIA**, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del **AVAL DE APROBACIÓN** al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 22 julio, 2019

-----  
MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta MSc.

CC. 1721796751

## **AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Lectores del Proyecto de Investigación con el título:

**“Evaluación de la adición de yema de huevo y crema de leche al diluyente, para la crioconservación del semen canino”**, de Proaño Montesdeoca Paola Estefanía, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 22 de julio del 2019

Para constancia firman:

---

**Lector 1 (Presidente)**

Dr. Mg. Jorge Washington Armas Cajas  
CC: 050155645-0

---

**Lector 2**

Dr. Luis Alonso Chicaiza Sánchez  
CC: 050130831-6

---

**Lector 3**

Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrín  
CC: 150109722-4

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por darme la tenacidad para vivir, salud y fuerzas para cumplir con mis anhelos y objetivos trazados, por darme la sabiduría para recorrer este largo sendero. A mis padres Nancy Montesdeoca y Román Proaño por ser el motor y el pilar fundamental de mi vida. A mis hermanos Diego Proaño y Valentina Peña, quienes me impulsaron a levantarme después de cada caída y que con su alegría y cariño fueron el bastón para no desfallecer ante ningún sendero sinuoso; A mis tíos Fatty, Diana, Sonia, Robín, Fredy, Eddy y abuelitas María y Delia quienes en los momentos difíciles supieron darme un consejo para salir adelante, y a toda mi familia por el apoyo incondicional para cumplir este sueño tan anhelado.

Al Dr. Eduardo Sambache, Dr. Jorge Armas, Dr. Rafael Garzón y el Dr. Alonso Chicaiza por su apoyo y facilitación en el desarrollo de esta investigación.

***PAOLA ESTEFANIA PROAÑO MONTESDEOCA***

## **DEDICATORIA**

Dedico este logro a Dios por darme la fuerza y valentía para enfrentar las dificultades que se me han presentado y por la iluminación mental para saber escoger mis actos. A mi madre Nancy Montesdeoca quien fue mi fuente de inspiración y modelo a seguir. A mis hermanos, Diego Proaño y Valentina Peña, compañeros incondicionales en mi vida. A mis amigas Verónica Tixe y Paulina Nacimba que han sido como mis hermanas, concejeras en los duros momentos, de esta trayectoria Universitaria.

***PAOLA ESTEFANIA PROAÑO MONTESDEOCA***

**UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TITULO: “Evaluación de la adición de yema de huevo y crema de leche al diluyente, para la crioconservación del semen canino”**

**Autora:** Paola Estefanía Proaño Montesdeoca

**RESUMEN**

En la actualidad la crioconservación de semen canino, al ser una técnica que está en pleno auge de desarrollo, y al no existir un crioconservante exclusivo para caninos, ocasiona que se presente un mayor porcentaje de pérdida en la calidad espermática durante el proceso de criopreservación ocasionando una disminución de la motilidad, vitalidad y un aumento de la mortalidad espermática. Por ello el objetivo de este trabajo es determinar la acción del componente de yema de huevo y la crema de leche, adicionado al diluyente, como criopreservante del semen canino. En el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se utilizaron 3 machos caninos seleccionados aleatoriamente, de distintas razas con edades comprendidas de 2 a 6 años y condiciones adecuadas de salud. Se extrajo mediante la técnica de recolección manual, las muestras seminales, y se evaluó con la ayuda de la cámara de Neubauer y el microscopio, se analizaron las características macroscópicas como volumen, color, olor y pH y microscópicas como la concentración, motilidad y mortalidad del eyaculado canino, se realizaron las valoraciones en pre- congelación y post- descongelación, tomando datos puntuales con el uso de la yema de huevo y la crema de leche para el efecto del sustrato biológico, durante el primer paso del procedimiento se obtuvieron los valores iniciales de cada uno de los parámetros evaluados, siendo estos el patrón de comparación al usar, con los datos obtenidos durante el resto del experimento, estos fueron analizados y procesados con la ayuda del programa de Excel. Para cada uno de los parámetros evaluados se encontró que existen diferencias de valores porcentuales entre el uso de la yema de huevo como crioprotector obteniéndose resultados óptimos en las características macroscópicas y microscópicas del material seminal tanto en la valoración pre- congelación y post- descongelación, mientras que con la adición de la crema de leche se obtuvo bajos resultados en las características microscópicas. Con estos resultados se comprueba que al usar la muestra seminal con la adición de yema de huevo, produce mejores resultados durante la

criopreservación con respecto al uso de la crema de leche, posicionando este material como un buen crioconservante para el semen canino.

**Palabras claves:** Crioconservación, semen, canino, yema de huevo, crema de leche.

**ABSTRACT**

In the actuality the cryoconservation of canine semen, is a technique that is in full bloom, and there is not a cryoconserve exclusive for canines, having in a higher percentage of lost in the seminal quality through the process of cryoconservation, causing a decrease of the motility and the vitality and an increase the sperm mortality. The objective of this work is to evaluate the addition of egg yolk and milk cream to the diluent, for cryoconservation of canine semen. In the biotechnology laboratory of the reproduction of Universidad Técnica de Cotopaxi. 3 canine dogs were selected randomly, from different races with ages ranging from 2 to 6 years and normal health conditions. It was extracted through a technique of manual collection, the seminal sample was evaluated by the helping of the Neubauer camera and the microscope, macroscopic characteristics were analyzed as volume, color, smell and pH and microscopic characteristics as concentration, motility and mortality of canine ejaculated in pre-freezing and post-thawing making values using specific data with the use of egg yolk and cream of milk for the biological substrate effected, during the first step of the procedure, initial values were obtained from each of the parameters, these being the comparison pattern to be used with the obtained data during the rest of the experiment, these were analyzed and processed with helping of the Excel program. For every one of the evaluated parameters were found there is percentage values differences between the use of egg yolk as cryoconserve getting obtaining optimal results in the seminal quality both in the pre-freezing and post-thaw, while that with the addition milk cream, low results were obtained in the seminal quality. With these results it is verified that when is used the seminal sample with yolk of egg it produces better results regarding the cryoconservation at the use of the cream of milk, positioning this material as a good cryoconserve of the canine semen.

**Keywords:** Cryoconservation, canine semen, egg yolk, cream of milk.

## ÍNDICE PRELIMINAR

PORTADA.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	II
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	III
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	VI
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	VII
AGRADECIMIENTO.....	VIII
DEDICATORIA .....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT .....	XII
ÍNDICE PRELIMINAR .....	XIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XVIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX

## INDICE DE CONTENIDO

1. INFORMACIÓN GENERAL .....	8
Título del Proyecto: DETERMINACIÓN DEL COMPONENTE DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE EN LA ADICIÓN DEL DILUYENTE, UTILIZADO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN CANINO.....	8
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	8
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	9
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	10
Directos.....	10
Indirectos .....	10
5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:.....	10
6. OBJETIVOS: .....	12
General .....	12
Específicos.....	12
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	12
7.1. Anatomía del aparato reproductor del macho. ....	12
7.1.1. Testículos .....	13
7.1.2. Escroto .....	13
7.1.3. Cordón espermático.....	13
7.1.4. Epidídimo.....	13
7.1.5. Uretra .....	14
7.1.6. Conducto Deferente.....	14
7.1.7 Glándulas accesorias .....	14
7.1.7.1. Próstata.....	14
7.1.7.2. Vesícula seminal.....	15
7.1.7.3. Glándula de Cowper .....	15
7.1.8. Pene .....	15
7.1.9. Prepucio .....	15

7.2. Fisiología del macho canino .....	16
7.2.1. Hormonas Hipotalámicas .....	16
7.2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) .....	16
7.2.2. Hormonas Hipofisarias.....	16
7.2.2.1 Hormona Folículo Estimulante (FSH) .....	16
7.2.2.2. Hormona Luteinizante (LH) .....	16
7.2.3. Andrógenos .....	16
7.2.4.  Espermatogénesis .....	17
7.2.5. Control de la temperatura .....	17
7.2.6. Producción espermática.....	17
7.2.7. Maduración sexual .....	18
7.3. Evaluación reproductiva del macho.....	18
7.3.1. Anamnesis:.....	18
7.3.2. Reseña del animal: .....	18
7.3.3. Estado general:.....	19
7.3.4. Examen: .....	19
7.3.5. Pruebas complementarias y de laboratorio:.....	19
7.4. Métodos de recolección del semen .....	19
7.4.1. Manual .....	19
7.4.2. Vagina Artificial.....	20
7.4.3. Electroeyaculación .....	20
7.5. Recolección del semen con método manual .....	20
7.6. Características del semen canino .....	21
7.7. Características del espermatozoide canino.....	21
7.8. Evaluación macro y microscópico del semen .....	22
7.8.1. Evaluación macroscópica del semen canino. ....	22
7.8.1.1. Volumen.....	22
7.8.1.2. Color .....	22
7.8.1.3. pH .....	22

7.8.2. Evaluación microscópica del semen canino .....	23
7.8.2.1. Motilidad.....	23
Motilidad individual.....	23
Motilidad en masa .....	23
7.8.2.2. Concentración.....	24
7.8.2.3. Morfología.....	24
7.8.2.4. Morfo-anomalías .....	25
7.9. Factores que afectan las características del semen .....	26
7.9. 1. Pubertad: .....	26
7.9.2. Frecuencia de la eyaculación: .....	26
7.9.3. Tamaño y patología de la próstata: .....	26
7.9.4. Tamaño testicular. ....	26
7.10. Criopreservación del semen canino .....	26
7.10.1. Choque térmico .....	26
7.10.2. Estrés osmótico .....	27
7.11. Características de un buen diluyente.....	27
7.11.1. Composición .....	28
7.11.3. Los crioprotectores penetrantes .....	28
7.11.4. Agentes crioprotectores no-penetrantes .....	29
7.11.5. Tipos .....	29
7.12. Técnicas para la conservación y criopreservación de semen canino.....	29
7.12.1. Refrigeración:.....	29
7.12.2. Congelación .....	30
7.12.3. Congelación ultrarrápida o vitrificación.....	30
8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS: .....	30
9. METODOLOGÍA: .....	31
9.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO .....	31
9.1.1. Características del lugar de ejecución del proyecto .....	31
9.2. MATERIALES .....	31

9.2.1. Instalaciones.....	31
9.2.2. Materiales de oficina .....	31
9.2.3. Físicos o de campo .....	32
9.2.4. Laboratorio.....	32
9.2.5. Químicos.....	32
9.2.6. Biológicos .....	33
9.3. UNIDADES EXPERIMENTALES .....	33
9.3.1. REGISTRO DE LOS PERROS DONADORES DE SEMEN. ....	33
9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36
9.6. MEDICIÓN Y VALORACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES DEL SEMEN CANINO.....	36
9.6.1. Variables analizadas referentes a la calidad macroscópica del semen .....	36
9.6.1.2. Volumen del eyaculado .....	36
9.6.1.3. Ph del eyaculado.....	37
9.6.2. VARIABLES ANALIZADAS REFERENTES A LA CALIDAD MICROSCÓPICA DEL SEMEN.....	37
9.6.2.1. Evaluación de la concentración espermática .....	37
9.6.2.2. Motilidad espermática .....	38
9.6.2.3. Mortalidad espermática .....	39
9.6.2.4. Morfoanomalías.....	40
9.7. COMPOSICIÓN DE LOS DILUYENTES.....	40
9.7.1. YEMA DE HUEVO DE GALLINA.....	40
9.7.2. CREMA DE LECHE.....	41
9.7.3. AndroMed CSS One Step.....	41
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	42
10.1. RESULTADOS.....	42
10.2. DISCUSIÓN FINAL.....	47
11. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO: .....	48
12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES: .....	48

12.1. PLANIFICACIÓN DEL ENTRENAMIENTO DE LOS CANINOS .....	48
13. CONCLUSIONES .....	50
14. RECOMENDACIONES .....	50
15. BIBLIOGRAFÍA .....	51
16. ANEXOS .....	57

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Curriculum del Tutor .....	57
<b>Anexo 2.</b> Curriculum del estudiante .....	58
<b>Anexo 3.</b> Aval de traducción.....	30
<b>Anexo 4.</b> Atemperar todos los materiales a una temperatura de 37°C, antes de extraer las muestras.....	58
<b>Anexo 5.</b> Extracción de la muestra seminal, utilizando la técnica de recolección manual, ejerciendo una presión sobre el bulbo peneano. ....	58
<b>Anexo 6.</b> Valoración de las características macroscópica de la muestra recolectada. ...	58
<b>Anexo 7.</b> Valoración del pH de las muestras seminales.....	58
<b>Anexo 8.</b> Colocación de una alícuota de muestra seminal, en la cámara de Neubauer. ....	58
<b>Anexo 9.</b> Valoración de las características microscópica de la muestra recolectada, de con la ayuda del microscopio.....	58
<b>Anexo  10.</b> Recuento espermático, en la placa de Newbauer. ....	58
<b>Anexo 11.</b> Empaquetamiento, de las muestras seminales en pajuelas de 0.50 .....	58
<b>Anexo 12.</b> Congelación de las pajuelas, en vapores de nitrógeno. ....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía del macho canino <sup>14</sup> .....	13
<b>Figura 2.</b> Túbulos seminíferos <sup>8</sup> . ....	14
<b>Figura 3.</b> Próstata canina <sup>12</sup> . ....	15
<b>Figura 4.</b> Morfología de un espermatozoide canino <sup>9</sup> . ....	25
<b>Figura 5.</b> Conteo Celular con la cámara de Neubauer <sup>38</sup> . ....	38

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores normales del eyaculado canino <sup>9</sup> .....	22
<b>Tabla 2.</b> Tabla de calificación de la motilidad individual <sup>7</sup> . ....	23
<b>Tabla 3.</b> Tabla de calificación de la motilidad en masa <sup>7</sup> . ....	24
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de las anomalías espermáticas en semen canino <sup>12</sup> .....	26
<b>Tabla 5.</b> Cuadro de información de los perros.....	33
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación del vigor de las ondas y la actividad espermática <sup>20</sup> . ....	39
<b>Tabla 7.</b> Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.....	42
<b>Tabla 8.</b> Características microscópicas del eyaculado.....	43
<b>Tabla 9.</b> Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado con la yema de huevo y la crema de leche pre- congelación y post- descongelación. ....	44
<b>Tabla 10.</b> Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo, pre- congelación.....	44
<b>Tabla 11.</b> Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de crema de leche, pre- congelación. ....	45
<b>Tabla 12.</b> Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo, post- descongelación. ....	46
<b>Tabla 13.</b> Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de crema de leche, post- descongelación. ....	46
<b>Tabla 14.</b> Planificación del entrenamiento de los caninos donantes y de la elaboración de las pajuelas, con los diferentes diluyentes.....	49

## **1. INFORMACIÓN GENERAL**

**Título del Proyecto:** EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACION DE SEMEN CANINO.

**Fecha de inicio:** Marzo 2019

**Fecha de finalización:** Agosto 2019

**Lugar de ejecución:** Provincia de Cotopaxi

**Facultad que auspicia:** Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**Carrera que auspicia:** Medicina Veterinaria

**Proyecto de investigación vinculado:** Conservación de Recursos Zoogenéticos Locales de la Zona 3 del Ecuador

**Equipo de Trabajo:**

Paola Estefanía Proaño Montesdeoca (Anexo 1)

MSc.. MVZ. Juan Eduardo Sambache Tayupanta (Anexo 2)

**Área de Conocimiento:** Agricultura, Silvicultura y Pesca.

**Subárea:**

64 Veterinaria.

**Línea de investigación:** Análisis, Conservación y Aprovechamiento de la Biodiversidad Local.

**Sub líneas de investigación de la Carrera:** Fisiología Animal y Reproducción.

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

El presente proyecto tiene como objetivo de contribuir a la reproducción y conservación mediante la crioconservación del semen de especies caninas de alto valor genético, comercial

o afectivos considerados como valiosos, con la adición de yema de huevo y crema de leche en el diluyente a utilizar, como un crioprotector, con la finalidad de evitar el shock de frío, alteraciones en la integridad de la membrana plasmática y motilidad progresiva del espermatozoide, evaluando las diferencias que existen al momento de post-descongelación del semen, observando las características tanto macroscópicas y microscópicas del semen, en el laboratorio de Biotecnología de la reproducción de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

El avance de la biotecnología de la reproducción ha demostrado que los conocimientos sobre recuperación y crioconservación de espermatozoides en especies domesticas pueden ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizado en otras especies<sup>1</sup>.

Actualmente, la crioconservación de semen canino y su posterior utilización mediante inseminación artificial es una biotecnología reproductiva que se encuentra en pleno desarrollo, la crioconservación es una herramienta importante para preservar espermatozoides de reproductores considerados como valiosos<sup>2</sup>.

Los procesos de crioconservación, aún tienen problemas en su desarrollo por la falta de información sobre protocolos, uso erróneo de crioprotectores o diluyentes, algunos provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular de los espermatozoides. El estudio de los diferentes crioprotectores, y su efecto sobre la crioconservación del eyaculado y el desarrollo de nuevos protocolos de congelación, con el fin de obtener los mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado, posibilitaran en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología. En este trabajo se analizará y se discutirá la acción de la adición de yema de huevo y crema de leche, en la crioconservación de semen canino<sup>3</sup>.

Por otro lado, la yema de huevo, la leche desgrasada, trehalosa, amino ácidos, dextranos y sacarosa son crioprotectores no penetrantes. Estos crioprotectores se caracterizan porque actúan extracelularmente, alterando la membrana plasmática, o actuando como soluto, bajando la temperatura de enfriamiento del medio y disminuyendo la formación de hielo extracelular<sup>4,5</sup>.

La yema de huevo es uno de los crioprotectores no penetrantes más comúnmente usado, sin embargo, la capacidad de la yema de huevo como sustancia crioprotectora es atribuida al contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se adhieren a la membrana celular

del espermatozoide, formando una capa interfacial entre los ácidos grasos y el agua. Las lipoproteínas de baja densidad podrían promover la entrada de fosfolípidos y colesterol dentro de la membrana celular, formando un complejo con las proteínas seminales del plasma, haciéndolas indisponibles para funcionar en la membrana. La utilización de lipoproteínas de baja densidad ha sido exitosa en cerdos y en toros <sup>5</sup>. De la misma manera se han hecho ensayos con semen de perro utilizando dichas lipoproteínas dando resultados benéficos en cuanto a la motilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana, siendo evaluado en semen congelado y semen enfriado. La utilización de ciertos componentes de la yema de huevo en conservantes crea óptimas condiciones para el sometimiento de espermatozoides a la crioconservación <sup>6</sup>.

#### **4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

##### **Directos**

- Los dueños de los caninos, usados en la presente investigación.
- Laboratorio de biotecnología de reproducción animal de la Universidad Técnica de Cotopaxi o bancos de semen de la región o del país.

##### **Indirectos**

- Investigadores vinculados con la producción de la especie en estudio.

#### **5. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:**

Los procesos de refrigeración y crioconservación de materia seminal a nivel mundial son temas ampliamente estudiados en varias especies animales, en especial en bovinos, donde esta práctica es muy común y rutinaria<sup>4</sup>.

La crioconservación de semen en caninos al ser una técnica que está en pleno auge de desarrollo y su práctica no es habitual y no está difundida mundialmente y al no existir un crioconservante exclusivo para caninos, es por ello que tiende a presentar un mayor porcentaje de pérdida en la calidad espermática mediante el proceso de crioconservación, ocasionando que disminuya la motilidad y vitalidad aumentando la mortalidad espermática, pero ya en los países

desarrollados, la inseminación artificial en los perros, se realiza con semen fresco, refrigerado y congelado. El Kennel Club es una entidad encargada de la regulación de IA, crioconservación, congelación y el almacenamiento de semen, solo a determinadas entidades, teniendo registros muy estrictos sobre el semen de perro que se guarda al igual la cantidad de semen que se tiene de cada uno. Las entidades permitidas para congelar y almacenar el semen de perros, generalmente son Escuelas y Facultades de Medicina Veterinaria de estos países (Uppsala, Oslo, Lüttich, Maisons-Alfort, Lyon y pronto en Nantes y Pisa) no aceptándose bancos de semen privados<sup>2</sup>.

La mayoría de países en Sudamérica cuentan con estudios experimentales sobre la congelación de semen canino como los de diferenciación en niveles de glicerol para la congelación de semen canino en Brasil, supervivencia y viabilidad espermática canina de Argentina, determinación de protocolos en crioconservación de semen canino, de Perú habla de investigaciones sobre diluyentes<sup>3</sup>.

El Ecuador tiene pocos estudios de la crioconservación de semen canino, existen estudios de la Universidad Central del Ecuador (UCE) y de la Universidad Técnica de Ambato (UTA) donde tratan de determinar cuál es el método o protocolo y la concentración adecuada de los crioconservantes en el manejo del semen canino congelado con el fin de mantener un porcentaje adecuado de las características seminales, que garantice la preservación y del potencial fecundante de los espermatozoides<sup>8</sup>.

En caninos la crioconservación de semen es más usada para la IA y para el almacenamiento de muestras de alto valor genético, comercial o afectivo, donde se considera una opción económica para el criador ya que se optimiza la accesibilidad de semen a largo plazo<sup>9,10</sup>.

En el proceso de la crioconservación hay un gran número de factores que pueden afectar la capacidad fertilizante del semen canino. En dicho proceso, las células están expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores que evitan la formación de hielo intracelular y el daño en la membrana celular, sin embargo, los crioprotectores pueden igualmente tener efectos adversos sobre los espermatozoides, lo cual limita su función<sup>2,4</sup>. También hay muchos problemas al realizarlo por la falta de información de los protocolos, mala elección de los diluyentes y crioconservantes, el desconocimiento de muchas variables como la andrología del macho, características deseables e indeseables tanto macroscópicas y microscópicas del semen<sup>10,11,12</sup>.

Algunas situaciones hacen relevante el uso de la crioconservación de semen en caninos, como es el caso de reproductores separados geográficamente, en hembras con problemas de conducta y con vagina estrecha, cuando los machos presentan rigidez o debilidad en las extremidades inferiores, presentan rápido engrosamiento del bulbo del pene imposibilitando la penetración o sencillamente son de menor tamaño respecto a las hembras <sup>13,14</sup>.

## **6. OBJETIVOS:**

### **General**

Evaluar el efecto del componente de yema de huevo y crema de leche en la adición del diluyente utilizado para la crioconservación del semen canino, valorando las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado.

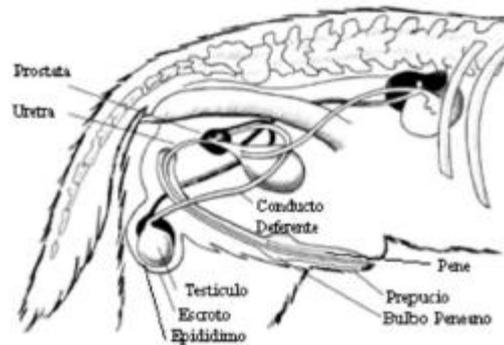
### **Específicos**

- Observar las características macroscópicas y microscópicas del material seminal con el uso de la yema de huevo como crioconservante.
- Valorar las características macroscópicas y microscópicas del material seminal con el uso de la crema de leche como crioprotector.
- Evaluar los efectos del componente yema de huevo y crema de leche en la pre- congelación y post- descongelación del semen canino.

## **7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA**

### **7.1. Anatomía del aparato reproductor del macho.**

El sistema reproductor masculino está conformada por una parte externa y otra interna, las partes visibles son el pene y escroto, en el cual se alojan los dos testículos <sup>15</sup>. En la parte interior está la próstata, las vesículas seminales, conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas de Cowper <sup>16</sup>.



**Figura 1.** Anatomía del macho canino <sup>14</sup>.

### 7.1.1. Testículos

Son dos en forma elipsoidal, y alojados en el escroto, están formados por túbulos seminíferos, en donde se producen los espermatozoides, los túbulos seminíferos están revestidos por las células de Sertoli que son las células de sostén y nutrición, también contiene a las células de Leydig que son las encargadas de segregar las hormonas sexuales masculinas, principalmente la testosterona. Tiene doble función ya que produce los gametos masculinos y generan la serie de hormonas esteroideas <sup>5</sup>. Atraviesan el canal inguinal entre los cuatro y cinco días de edad y alcanzan su ubicación en el escroto a los 35 días <sup>17,18</sup>.

### 7.1.2. Escroto

Es un saco dividido por un septum medio en dos cavidades, ocupadas cada una por los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático, un musculo especial en la piel del escroto, el dartos, regula la proximidad de los testículos a la pared abdominal influyendo así sobre su temperatura, al igual que la compleja red de suministro de sangre, esto permite el desarrollo óptimo de los espermatozoides <sup>19</sup>.

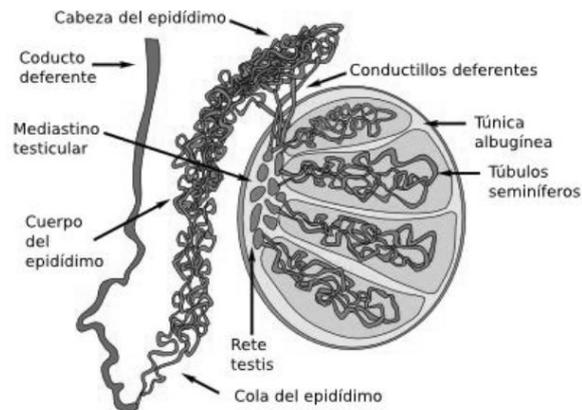
### 7.1.3. Cordón espermático

El cordón espermático discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por los siguientes componentes como el conducto deferente, musculo cremáster y vena espermática (testicular) <sup>20</sup>.

### 7.1.4. Epidídimo

Este se caracteriza por ser largo y extremadamente enrollado sobre sí mismo e íntimamente unido a lo largo de la parte dorsal de la superficie lateral del testículo, es una estructura formada por cabeza, cuerpo y cola, esta última parte es la más importante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que

se produce la eyaculación y desemboca en el conducto deferente <sup>21</sup>. Los espermatozoides maduran en su paso a través de él, y en el perro este recorrido se efectúa en 14 días <sup>22</sup>.



**Figura 2.** Túbulos seminíferos <sup>8</sup>.

### 7.1.5. Uretra

Es un conducto que se encarga del transporte de la orina desde la vejiga, los espermatozoides y el líquido prostático en el eyaculado <sup>23</sup>.

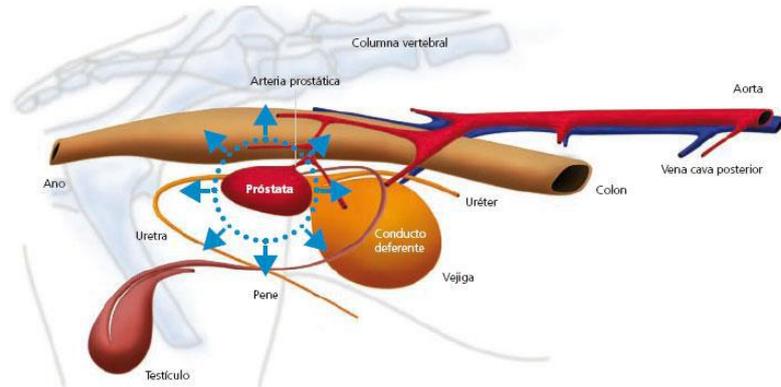
### 7.1.6. Conducto Deferente

Tiene su origen en la cola del epidídimo, y su principal función es la de transportar los espermatozoides <sup>23</sup>.

### 7.1.7 Glándulas accesorias

#### 7.1.7.1. Próstata

Es una glándula simétrica, bilobulada mediante un septo intermedio, es la única glándula significativa en el perro y se localiza al borde craneal de la pelvis, y el tamaño va a depender en función del peso, raza y edad del perro, y esta glándula produce tanto la primera como la tercera fracción del eyaculado <sup>24</sup>.



**Figura 3.** Próstata canina <sup>12</sup>.

#### 7.1.7.2. Vesícula seminal

Las vesículas seminales son dos reservorios membranosos que se utilizan para la acumulación de espermatozoides antes de su eliminación al exterior por el conducto deferente <sup>25</sup>.

#### 7.1.7.3. Glándula de Cowper

También llamadas glándula bulbo uretrales, se encuentran debajo de la próstata y secretan un líquido alcalino que lubrica y neutraliza la acidez de la uretra antes del paso del semen en la eyaculación, y este puede o no contener espermatozoides <sup>8</sup>.

#### 7.1.8. Pene

El pene está conformado de raíz, cuerpo y glande, es el órgano que permite la penetración y el abotonamiento durante la cópula, en el interior hay un hueso peneano, que ayuda en la penetración manteniendo erecto el pene <sup>8</sup>. En su parte craneal hay un hueso, él *os penis*, que es un hueso rodeado por el glande, y en los perros grandes alcanza una longitud de 10cm o más <sup>26</sup>.

#### 7.1.9. Prepucio

Es de forma tubular y es la continuación de la piel del abdomen, la cual tiene una función protectora por lo que recubre el pene flácido en su totalidad. Segrega un líquido verdoso denominado esmegma que lubrica el pene y que es completamente normal <sup>8,9</sup>.

## **7.2. Fisiología del macho canino**

### **7.2.1. Hormonas Hipotalámicas**

#### **7.2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)**

Esta es una hormona producida por el hipotálamo (en la base del encéfalo) y transportada hasta la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos, esta hormona determina la forma selectiva la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), que juntas participan en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras <sup>27</sup>.

### **7.2.2. Hormonas Hipofisarias**

#### **7.2.2.1 Hormona Folículo Estimulante (FSH)**

Esta es sintetizada y liberada en la Adenohipófisis por la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH), y en la hembra es la responsable de estimular el desarrollo de los folículos en los ovarios, mientras que en el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos de la espermatogénesis <sup>28,29</sup>.

#### **7.2.2.2. Hormona Luteinizante (LH)**

En el macho es la responsable de la estimulación de las células intersticiales (células de Leydig) en el testículo para producir testosterona y dihidrotestosterona, y por lo tanto se le conoce como hormona estimulante de las células intersticiales. Al inicio de la pubertad, los niveles altos de Hormona Luteinizante inducen a los testículos para producir testosterona, que llevará a la maduración de los espermatozoides <sup>29</sup>.

### **7.2.3. Andrógenos**

Son producidos por células en los testículos que forman pequeños islotes entre los túbulos seminíferos; estas son las células intersticiales o células de leydig. La conversión de testosterona a dihidrotestosterona inducirá el desarrollo de la glándula próstata, la uretra masculina, el pene, y el escroto. Después, los testículos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino <sup>30</sup>.

Los efectos adicionales de la testosterona incluirán la inducción de otras características físicas del género, así como los rasgos de conducta, incluyendo la conducta de apareamiento y marcando de territorio con orina. En los perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0,5 y 5,0 ng. /mL. En perros castrados, los valores son inferiores a 200

pg./ml. Se desconocen las funciones de estas hormonas en la perra, pero se sabe que sus concentraciones circulantes alcanzan un máximo al mismo tiempo que la oleada de LH <sup>31</sup>.

#### **7.2.4. Espermatogénesis**

Proceso en donde las espermatogonias se transforman en espermatozoides. En el perro comienza a los 4 meses de edad, aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10-12 meses<sup>15</sup>.

Se pueden distinguir dos fases: espermiogénesis, que es la transformación de espermátides a partir de espermatogonias. La segunda fase es conocida como espermiogénesis en donde las espermatogonias van a iniciar un proceso de divisiones mitóticas seguido de la reducción meiótica del genoma diploide para formar células haploides <sup>28,32</sup>.

Las espermátidas pasan a espermatozoides mediante un complejo reagrupamiento de los organelos; donde 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 <sup>33</sup>.

#### **7.2.5. Control de la temperatura**

La espermatogénesis no puede darse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos, los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal, mediado por el músculo cremáster, el músculo de dartos en la pared escrotal que puede influir en el tamaño del escroto y en consecuencia sobre la posición de los testículos<sup>8</sup>.

#### **7.2.6. Producción espermática**

La producción de espermatozoides está relacionada con la masa testicular y el tamaño del animal; esta producción va a ser superior en perros de mayor tamaño. La reserva extragonadal de espermatozoides es el total de espermatozoides contenidos en el epidídimo y conductos deferentes, los perros que eyaculan una vez por día o más, van a tener mayor cantidad de espermatozoides, esto se debe a la producción diaria de semen y a la frecuencia de las eyaculaciones <sup>29,34</sup>.

La producción diaria de espermatozoides en el perro está entre 11,7 y 16,7 millones por gramo de parénquima testicular; la frecuencia de eyaculación no afecta la producción diaria de espermatozoides <sup>35</sup>.

### 7.2.7. Maduración sexual

La edad en la que el perro se considera fértil va a depender de la raza. Las razas más pequeñas se pueden considerar fértiles a partir de los seis meses de edad, las razas medianas se consideran fértiles aproximadamente a partir de los ocho a diez meses y las razas grandes, gigantes se consideran fértiles a partir de los quince meses de edad <sup>19</sup>.

La pubertad, activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y se induce la espermatogénesis por efecto de la FSH y la testosterona <sup>36</sup>.

### 7.3. Evaluación reproductiva del macho

Dentro de la evaluación reproductiva realizada al macho canino se debe incluir una buena anamnesis con el fin de obtener una historia clínica completa, así mismo un examen físico completo con el fin de descartar alteraciones o enfermedades que produzcan algún desorden reproductivo. En esta evaluación, el tracto reproductivo del perro debe examinarse parte por parte empezando por el (escroto, testículo, epidídimo, continuando al pene y finalmente examinar la glándula próstata), en busca de afecciones y/o alteraciones como inflamación, trauma, nódulos, adherencias y neoplasias <sup>16,36</sup>.

Los testículos deben ser simétricos y a la palpación deben moverse libremente en el escroto; los epidídimos se encuentran dorsales a cada testículo y estos deben ser similares en tamaño y forma <sup>37</sup>.

La próstata es una glándula bilobulada, simétrica y de consistencia uniforme que puede palparse por vía rectal, el tamaño y consistencia anormal entre los lóbulos o dolor a la palpación refieren una alteración de la glándula que requiere una evaluación más especializada <sup>18,37</sup>.

La edad se correlaciona negativamente con el porcentaje de normalidad de los espermatozoides; los perros tienden a producir eyaculados con menor porcentaje de espermatozoides normales con la edad; así mismo el peso corporal en los perros se correlaciona significativamente con la producción de espermatozoides y velocidad curvilínea <sup>6, 38</sup>.

Se debe realizar un plan de exploración clínica general del macho canino reproductor que consta de:

**7.3.1. Anamnesis:** datos que facilita el propietario o encargado del animal por medio de preguntas realizadas y así hacer saber de diferentes antecedentes que puedan guiar u orientar sobre las enfermedades posibles que padece o pudo haber padecido el animal <sup>5</sup>.

#### 7.3.2. Reseña del animal:

- Propietario: nombre, dirección, teléfono.

- Especie
- Edad: aparente y real
- Raza
- Sexo
- Color
- Peso
- Genero de servicio: compañía, deportes, etc <sup>5</sup>.

### **7.3.3. Estado general:**

- Constitución y temperamento: asténico (nervioso), apoplético (sanguíneo), linfático.
- Actitudes y comportamiento
- Inspección general <sup>5</sup>.

### **7.3.4. Examen:**

Piel, ganglios, mucosas, temperatura, y, finalmente, examen por sistemas<sup>4</sup>.

### **7.3.5. Pruebas complementarias y de laboratorio:**

Es importante en todas las situaciones, complementar con la exploración física (semiológico) e interrelacionarlo con los resultados de las pruebas radiográficas o exámenes de laboratorio como: cuadro hemático, química sanguínea, etc. Y fundamentalmente tener en cuenta las condiciones genéticas de cada animal para así poder eliminar de la reproducción animales con desordenes hereditarios como la displasia de cadera, criptorquidismo, etc <sup>5</sup>.

## **7.4. Métodos de recolección del semen**

### **7.4.1. Manual**

La extracción se logra masajeando sobre el prepucio para lograr una erección parcial y luego se presiona sobre el bulbo del glande protruyendolo fuera del prepucio y tomándolo fuertemente una mano, y con la ayuda de la otra mano se mantiene el recipiente recolector, evitando que toque la mucosa peneana, por que corre el riesgo de producirse un sangrado abundante que dañará el material. La primera fracción del eyaculado es descartable, la segunda fracción es la parte importante porque es rica en espermatozoides. La tercera fracción (fracción prostática) es descartable; se recoge lo necesario para mantener un volumen físico manejable <sup>8</sup>.

#### **7.4.2. Vagina Artificial.**

Se utiliza una vagina de látex en la que se introduce el pene luego de protruirlo. La misma debe ser lubricada y al final de la misma se inserta el artefacto recolector. No es un método de mucha aceptación, y la presencia de lubricantes puede afectar la motilidad espermática <sup>7</sup>.

#### **7.4.3. Electroeyaculación**

Es un método experimental, que requiere anestesia general.

Causas más comunes de fallas en la recolección de Semen:

- 1) Fracasas al intentar exponer el bulbo del glande
- 2) Momento inapropiado para extraer el pene
- 3) Excesiva fuerza o presión aplicada sobre el pene
- 4) Golpear el pene con el artefacto colector
- 5) Ambiente desestimulante para el perro <sup>8</sup>.

#### **7.5. Recolección del semen con método manual**

Se puede realizar mediante procedimiento manual, que es el sistema más popular debido a que no se requiere de herramientas especializadas y por lo tanto es de bajo costo. Se recomienda dejar un descanso sexual de 5 días al macho reproductor <sup>6</sup>.

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 <sup>6,7</sup>.

Para la recolección manual primeramente se toma el pene y se lo masajea vigorosamente a través del prepucio por detrás del bulbo del glande sosteniéndolo con presión moderada pero constante hasta que se produzca una erección parcial con engrosamiento del bulbo del glande, en este momento el prepucio es rápidamente retraído caudalmente por detrás del bulbo del glande, dirigir el pene hacia ventral hasta un Angulo de 45° y realizar presión pulsátil sobre el bulbo. Otra forma es realizar un movimiento rápido y rítmico de atrás hacia adelante sobre la zona del bulbo. Las pulsaciones uretrales comienzan casi en forma inmediata y algunos perros muestran movimientos de empuje mientras se desarrolla la erección completa, una vez esto ocurra el pene completamente erecto es rotado 180° manteniendo el dorso del pene dorsalmente

el recolector debe continuar aplicando una ligera presión por detrás del bulbo del pene la eyaculación comenzara inmediatamente el pene está posicionado <sup>5,6</sup>.

### **7.6. Características del semen canino**

Compuesto por espermatozoides y plasma seminal, éste proporciona condiciones favorables a la motilidad, sobrevivencia y transporte de los espermatozoides <sup>23</sup>.

El semen canino está distinguido por presentar tres fracciones en el momento de la eyaculación; la primera fracción, la cual no posee espermatozoides, corresponde a la secreción uretral y glándula prostática; la segunda, procede del conducto deferente y es la fracción rica en espermatozoides aunque esta también se produce en bajas cantidades, y la última procede de la próstata y es, como la primera, sin espermatozoides pero se secreta una cantidad mayor, en comparación con las dos primeras fracciones <sup>36</sup>.

La primera secreción tiene como finalidad servir de lubricante, su aspecto es acuoso y transparente y es posible obtenerlo en un intervalo de 30 a 50 seg, se obtienen entre 0.2 y 2 ml y no posee espermatozoides. La segunda fracción, rica en espermatozoides, tiene un aspecto viscoso, el tiempo de obtención es de 2 a 3 minutos, y tiene aproximadamente 400 millones de espermatozoides por ml. Finalmente se encuentran la tercera fracción la cual tiene una función protectora y como vehículo para los espermatozoides, es de color claro blanquecino un volumen de 2 a 50 ml siendo la cantidad de espermatozoides mínima <sup>27</sup>.

### **7.7. Características del espermatozoide canino**

El espermatozoide canino, tiene una longitud total de  $61.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , la longitud de la cabeza es de  $6.1 \pm 0.04 \mu\text{m}$  y un ancho de  $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , la pieza o segmento medio mide  $10.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$  y la cola mide alrededor de las  $50 \mu\text{m}$ ; está cubierto enteramente por la membrana plasmática y conformado por una cabeza y una cola que contiene el motor celular necesario para la motilidad. Sobre la cabeza se encuentra el acrosoma, contiene enzimas hidrolíticas necesarias para el proceso de fecundación del ovocito <sup>31</sup>.

La membrana plasmática, que envuelve al espermatozoide, es una bicapa lipídica. En los espermatozoides, la bicapa fluida de la membrana lipídica tiene un papel activo en la capacidad fecundante. Los movimientos continuos del espermatozoide son del tipo ondulatorio empujando al espermatozoide hacia adelante <sup>34</sup>.

## 7.8. Evaluación macro y microscópico del semen

El examen del semen debe estar incluido en la evaluación por una posible infertilidad o subfertilidad.

Las razones para la valoración del semen son:

- Confirmación de espermatogénesis normal antes de comenzar a usarlo como semental.
- Casos de infertilidad que puedan ser adjudicados al perro.
- Comprobación de la producción de semen tras enfermedades <sup>12</sup>.

<b>Valores normales del eyaculado</b>	
Cantidad	1-30ml
Color	Blanco-lechoso
pH	6.5-7
Concentración	> de 100 millones/ml
Anormalidades	> de 80% de normales

**Tabla 1.** Valores normales del eyaculado canino <sup>9</sup>.

### 7.8.1. Evaluación macroscópica del semen canino.

#### 7.8.1.1. Volumen

Es muy variable, depende de la edad, talla, técnica utilizada para su obtención, periodicidad del procedimiento y cantidad de líquido prostático recolectado. Varía de 1 a 40ml. El volumen no tiene correlación con la fecundidad, a menos que el animal no eyacule <sup>4,19</sup>.

#### 7.8.1.2. Color

Este puede variar de blanco opalescente a opaco; la intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un semen claro e incoloro sugiere azospermia; amarillo sugiere presencia de orina; verde con o sin grumos o coágulos, sugiere infección; un tinte rojo insinúa presencia de sangre. Cualquier agente que modifique el color puede alterar concentración, motilidad y viabilidad de los espermatozoides <sup>23</sup>.

#### 7.8.1.3. pH

El pH habitualmente se mide con tiras reactivas, el normal va de 6.3 a 6.7. Un aumento en el pH se relaciona con una eyaculación incompleta o inflamación de testículos, epidídimos o próstata <sup>29</sup>.

## 7.8.2. Evaluación microscópica del semen canino

### 7.8.2.1. Motilidad

Se refiere al porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra; la proporción con motilidad total y progresiva, es estimada subjetivamente. El resultado se expresa en porcentaje. La motilidad progresiva de avance refleja la viabilidad y capacidad de fecundar; una muestra normal de semen debe tener más del 70% de espermatozoides con motilidad vigorosa de avance<sup>11</sup>.

De manera individual se evalúa a los espermatozoides; es normal cuando el espermatozoide presenta movimiento progresivo y avanza con rapidez. Debe estudiarse otra muestra de semen, siempre que se encuentre un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles o muertos<sup>6</sup>.

#### Motilidad individual

Se valora de manera individual a los espermatozoides; es normal cuando el espermatozoide presenta movimiento progresivo y avanza con rapidez. Debe estudiarse otra muestra de semen, siempre que se encuentre un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles o muertos<sup>14</sup>. (Tabla 2)

Motilidad Individual	
Descripción	Calificación
Motilidad progresiva	Muy buena (80-100%)
	Buena (60-79%)
	Regular (40-59%)
	Pobre (<40%)

**Tabla 2.** Tabla de calificación de la motilidad individual<sup>7</sup>.

#### Motilidad en masa

Se examina una muestra no diluida, y se establece la existencia de “oleadas”, movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior dispersión de espermatozoides; estas ondas se consideran como indicio de buena vitalidad y alta concentración de espermatozoides<sup>14</sup>.

Calificación de Motilidad en Masa		
Grado	Calificación	Descripción
5	Muy bueno (90%)	Ondas rápidas
4	Bueno (70-85%)	Movimiento vigoroso

3	Regular (45-65%)	Bajo movimiento
2	Pobre (20-40%)	Ausencia de ondas
1	Muy pobre (10%)	Solo el 10% muestra vitalidad
0	Muertos (0%)	No existe actividad de ningún espermatozoide

**Tabla 3.** Tabla de calificación de la motilidad en masa <sup>7</sup>.

### 7.8.2.2. Concentración

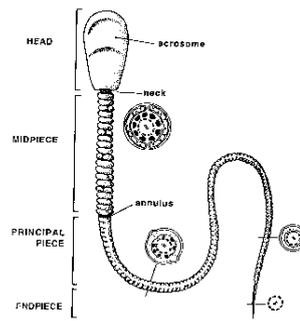
Se debe calcular la concentración del eyaculado para conocer el número total de espermatozoides presentes. Se puede emplear el sistema Unopette para leucocitos, en este, se extrae semen con la pipeta de 10  $\mu$ l para su colocación en 2 ml de diluyente, la solución se coloca en ambos laterales de un hemacitometro y se sedimenta por una hora. 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<sup>16</sup>.

La concentración de espermatozoides se establece, multiplicando el número de espermatozoides por mililitro de semen (determinado en una cámara de Neubauer) por volumen total recolectado, normal es de 200 millones hasta más de 1000 millones<sup>10</sup>.

### 7.8.2.3. Morfología

La morfología está implicada en problemas de fertilidad. Su evaluación se hace en un frotis seminal coloreado; los colorantes comúnmente utilizados son Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Giemsa.

Se observan anomalías espermáticas individualmente en cabeza, pieza media y cola. Un semen normal presenta más del 70% de espermatozoides con morfología normal, a mayor porcentaje de espermatozoides anormales, menor fertilidad. Las anormalidades comunes, son: macrocefalia, microcefalia, cabeza doble, gota citoplasmática proximal y distal, cabezas sueltas, colas enrolladas<sup>9</sup>.



**Figura 4.** Morfología de un espermatozoide canino<sup>9</sup>.

#### 7.8.2.4. Morfo-anomalías

Las anomalías de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anomalías en primarias y secundarias. La suma entre anomalías primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20%, para poder considerar un semen apto para usar <sup>32</sup>.

Las morfo-anomalías se clasifican en:

**Primarias:** aparecen como consecuencia de una alteración de la espermatogénesis (malformaciones de cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo), porcentaje normal 10-15% <sup>38</sup>.

**Secundarias:** debidas a una impropia manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). En el caso de la gota citoplasmática proximal se ha visto que en la especie canina afecta a la fertilidad; sin embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece tener efecto sobre la fertilidad en el perro. Porcentaje normal 10-20% <sup>16</sup>.

**Por manejo:** en este grupo se encuentran todas las alteraciones que se producen en el momento de recolección del semen, tinciones, manipulación de la muestra, etc <sup>22</sup>. **(Tabla 4)**

Clasificación de las anomalías espermáticas	
Anomalías Primarias	Cabeza
	Microcefalia
	Macrocefalia
	Doble Cabeza
	Cabeza deformada
Cuello	Edema
	Gota Proximal

	Cola	Muy Enrollada
<b>Anormalidades secundarias</b>	Gota distal	
	Acrosoma Desprendido	
	Colas dobladas, enrolladas, enredadas	

**Tabla 4.** Clasificación de las anomalías espermáticas en semen canino <sup>12</sup>.

## 7.9. Factores que afectan las características del semen

**7.9. 1. Pubertad:** los eyaculados iniciales de un perro después de la pubertad contienen espermatozoides anormales y muertos, con las eyaculaciones posteriores se incrementa la concentración espermática y disminuye el número de anomalías; la testosteremia también aumenta después de la pubertad <sup>27</sup>.

**7.9.2. Frecuencia de la eyaculación:** la periodicidad eyaculatoria tiene un efecto contraproducente sobre el volumen seminal y la concentración espermática. Un perro con actividad sexual frecuente u oligospermia puede retornar a la actividad cuando se emplea espaciadamente para permitir que los espermatozoides se depositen en los epidídimos<sup>5,6</sup>.

**7.9.3. Tamaño y patología de la próstata:** Es una semejanza directa entre el volumen seminal total por eyaculado y el tamaño prostático en los perros con próstatas normales e hiperplasia prostática glandular <sup>2</sup>.

**7.9.4. Tamaño testicular.** A medida que el peso (tamaño) testicular aumenta la producción espermática diaria y el número de espermatozoides por eyaculado también incrementa <sup>5</sup>.

## 7.10. Criopreservación del semen canino

En la criopreservación, células o tejidos son congelados o enfriados, con el fin de interrumpir las funciones vitales y mantener vivas las células, pero en un estado de suspensión; se trata de la interrupción de cualquier actividad biológica. Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de cambios en el espermatozoide, las cuales son conocidas como choque térmico <sup>17</sup>.

### 7.10.1. Choque térmico

La fertilidad se puede ver comprometida total o parcialmente debido al deterioro producido por las bajas temperaturas al que es sometido el espermatozoide canino durante el proceso de criopreservación; el cual sufre alteraciones físicas y químicas a nivel de la membrana celular. Dichas variaciones están representadas por la pérdida rápida de motilidad, disminución del

metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática, acompañada de pérdida de los componentes intracelulares <sup>32</sup>.

El choque térmico se puede considerar como un estado extremo de un estrés celular continuo. Un descenso en relación entre los ácidos grasos saturados y polinsaturados unidos a los fosfolípidos de la membrana, condicionaría el grado de sensibilidad al choque térmico <sup>7</sup>.

### **7.10.2. Estrés osmótico**

Los cambios en osmolaridad de la célula son importantes en el proceso de la criopreservación; la célula espermática durante este se somete a un mediohipertónico, que induce deshidratación, bajada del volumen celular con la entrada del crioprotector a la célula esta retoma su volumen normal. Estos cambios suceden durante la fase de estabilización antes de iniciar el enfriamiento rápido. El estrés osmótico se relaciona a menudo con los grandes cambios en la presión osmótica generada durante los procesos de congelación y descongelación produciendo daño de la célula espermática <sup>37,38</sup>.

### **7.11. Características de un buen diluyente**

En referencia a las características que debe poseer un diluyente para garantizar una adecuada preservación del material seminal:

- Un buen diluyente debe impedir el shock térmico, el cual puede afectar al espermatozoide. La leche descremada y la yema de huevo son empleados para conservar semen a menos de 5°C.
- Debe contener sustancias que sean capaces de nutrir y dar energía a los espermatozoides. La leche descremada, la yema de huevo, la fructuosa y la glucosa se pueden utilizar cuando se requiere refrigerar o congelar semen, ya que estas sustancias aportan energía a los espermatozoides.
- Además, dentro de la constitución del diluyente, este debe contar con reguladores de pH seminal. Los reguladores de pH más utilizados son la yema de huevo, citrato de sodio, ácido cítrico, fosfatos y bicarbonatos.
- Otro componente fundamental de un buen diluyente son los antibióticos, su función es impedir la contaminación del semen, estos a su vez no deben dañar la calidad del semen. La cantidad de 500-1000 UI penicilina-estreptomicina por mililitro de diluyente <sup>10</sup>.

### 7.11.1. Composición

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

- Agua bidestilada.
- Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio.
- Un energético capaz de atravesar la membrana plasmática
- Macromoléculas protectoras de membranas.
- Agentes crioprotectores que garanticen la integridad celular ante los cambios de estado del agua penetrantes de la membrana.
- Aditivos, como enzimas, aminoácidos y otros compuestos.
- Azúcares no permeables a través de la membrana plasmática
- Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano<sup>11</sup>.

### 7.11.2. Agentes crioprotectores

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se logrará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más desecada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido, los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular<sup>34</sup>.

### 7.11.3. Los crioprotectores penetrantes

Son de menor peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son manejados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada

rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han propuesto las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana <sup>36</sup>.

#### **7.11.4. Agentes crioprotectores no-penetrantes**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la acción del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. La adición del criopreservante per se genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACP durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula<sup>4, 12</sup>.

#### **7.11.5. Tipos**

Entre los principales tipos están:

- CaniPro
- Triladyl
- Diluyente de Andersen
- Diluyente Upssala
- Diluyente TRIS-fructosa
- Diluyente TRIS-glucosa
- Diluyente a base de Lactosa
- Diluyente TRIS-citrato
- Diluyente Laiciphos <sup>9</sup>.

### **7.12. Técnicas para la conservación y criopreservación de semen canino**

#### **7.12.1. Refrigeración:**

La refrigeración a 4°C está entre las técnicas 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 de semen es recomendable cuando se quiere hacer inseminaciones repetidas en el mismo ciclo de una perra. Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C. a pesar de esto no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C. 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 del aguante de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura<sup>25</sup>.

#### **7.12.2. Congelación**

La congelación por almacenaje en nitrógeno líquido, es estimada como la mejor técnica para preservar semen a través del tiempo, debido a que se obtiene un porcentaje de espermatozoides móviles descongelados entre el 60 y 70%, y una tasa de fertilidad del 60%. Otras técnicas de criopreservación de semen canino incluyen el uso de hielo seco o congeladores automáticos para congelar las pajillas de semen, sin embargo, requieren de igual manera de nitrógeno líquido para el almacenamiento final de las pajillas<sup>4,10,12</sup>.

#### **7.12.3. Congelación ultrarrápida o vitrificación**

La congelación ultrarrápida o vitrificación es uno de las técnicas más significativa de los avances de la criobiología reciente; esta técnica previene la formación de cristales de hielo al interior de la célula, evitando el daño celular. Se considera un método de congelación ultrarrápida, dado que para la vitrificación se emplean tasas de congelación de hasta 15.000 a 30.000 °C/min, y todo el proceso tarda solo algunos segundos. Las ventajas de la vitrificación son grandes respecto a los métodos tradicionales de congelación, por los menores costos de los equipos, la simplicidad de los procedimientos, y la disminución del tiempo de congelación<sup>29,30</sup>.

### **8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS:**

**H1:**

La adición de yema de huevo y crema de leche en el eyaculado canino influye sobre la calidad espermática.

## **9. METODOLOGÍA:**

### **9.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO**

La investigación se llevó a cabo en la provincia de Cotopaxi cantón Latacunga, en las instalaciones del Campus Salache, dentro del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria, dedicado a la investigación de proyectos agropecuarios con una duración de la presente investigación de 65 días.

#### **9.1.1. Características del lugar de ejecución del proyecto**

- **País:** Ecuador.
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Parroquia:** Salache
- **Institución:** Universidad Técnica de Cotopaxi  
Laboratorio de Biotecnología de la reproducción

### **9.2. MATERIALES**

#### **Instalaciones, Materiales y Equipos:**

##### **9.2.1. Instalaciones**

- Campus Salache
- Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción

##### **9.2.2. Materiales de oficina**

- Resma de papel
- Internet (Horas)
- Anillados
- Empastados
- Copias
- Lápiz, marcadores y esferográficos
- Memory Flash

### **9.2.3. Físicos o de campo**

- Correa de sujeción
- Guantes de manejo
- Tubos Falcón
- Gasas o algodón
- Suero Fisiológico
- Cooler
- Papel de Aluminio
- Termómetro

### **9.2.4. Laboratorio**

- Microscopio simple
- Colorantes (Eosina)
- Tubos con las muestras Seminales
- Gotero
- Puntas de Pipetas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de Neubauer
- Jeringuillas de 3, 5ml
- Tanque de Baño María
- Gradillas de Nivel Metálica
- Placa Térmica
- Micro Tubos
- Vasos de Precipitación
- Pajuelas
- Centrifugadora
- Tanque de Nitrógeno líquido
- Cooler
- Rampilla metálica
- Termómetro

### **9.2.5. Químicos**

- Nitrógeno líquido

- Agua destilada
- Diluyente AndroMed CSS One Step

### 9.2.6. Biológicos

- Semen canino
- Yema de huevo
- Crema de leche

## 9.3. UNIDADES EXPERIMENTALES

Para el desarrollo de la presente investigación, se empleó un muestreo no probabilístico, el cual consiste en seleccionar de manera aleatoria a los individuos que van a ser parte de la investigación. La muestra que se utilizó consiste en tres machos caninos de distintas edades comprendidas entre los 2 y 6 años. Los individuos de la muestra tuvieron características similares en cuanto a la alimentación y estado sanitario. Se utilizó semen fresco de tres caninos donantes: Representado como (Perro 1) un Pitbull de nombre “Zeus”, el mismo que contó con la edad de 5 años, (Perro 2) un perro mestizo, de nombre “Pedro” con una edad de 2 años y un perro ShihTzu de nombre “Cristofer” será representado como (Perro 3), con una edad de 6 años, de los cuales gozaban de un perfecto estado de salud, apto para la reproducción, los tres animales pertenecientes a diferentes dueños. (Tabla 5)

### 9.3.1. REGISTRO DE LOS PERROS DONADORES DE SEMEN.

**Tabla 5.** Cuadro de información de los perros.

Datos	Perro 1	Perro 2	Perro 3
<b>Propietario</b>	Karen Saltos	Paulina Nacimba	Erika Onofre
<b>Especie</b>	Canino	Canino	Canino
<b>Nombre</b>	Zeus	Pedro	Cristofer
<b>Edad</b>	5 años	2 años	6 años
<b>Raza</b>	Pitbull (Grande)	Mestizo (mediano)	ShihTzu (Pequeño)
<b>Sexo</b>	Macho	Macho	Macho
<b>Color</b>	Café	Café	Blanco y Café
<b>Genero de servicio</b>	Compañía	Compañía	Compañía

**Fuente:** Directa

## **9.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **9.4.1. Selección y adquisición de Diluyentes**

Los parámetros en estudio se realizaron mediante la adquisición de los diluyentes comerciales “AndroMed CSS One Step”, que necesita la adición de proteína animal donde se utilizó la adición de la yema de huevo y la crema de leche para la valoración de características macroscópicas y microscópicas del eyaculado, con la ayuda de la cámara de Neubauer.

### **9.4.2. Toma y envió de muestras**

Se realizó una ficha clínica y la medición de testosterona en sangre mediante los exámenes del laboratorio, para cerciorarnos que los animales en estudio se encuentren en un buen estado de salud y andrológico, cuyos resultados fueron obtenidos al día siguiente post envió al laboratorio.

### **9.4.3. Identificación del método de extracción de semen**

El enfoque en el entrenamiento de los caninos y la identificación del método de extracción de semen más eficaz fue la técnica de extracción manual. Y así poder obtener la valoración espermática en fresco.

### **9.4.4. Adiestramiento de los caninos.**

Para la ejecución del adiestramiento del canino macho, se evaluó previamente a nivel clínico y andrológico y se realizó los adiestramientos una vez por semana. Y posteriormente dos veces por semana hasta lograr el eyaculado necesario y una buena calidad espermática.

### **9.4.5. Recolección de la muestra**

Se realiza el proceso de agitación donde se procedió a tomar la muestra sedimentada con la ayuda de una pipeta, para observar y valorar en la cámara de Neubauer.

Se realizó el conteo con la ayuda de la cámara de Neubauer en cuatro cuadrantes diferentes mediante esta regla de conteo de espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y morfo-anormalidades, sin nada de diluyentes.

### **9.4.6. Valoración carga espermática**

Posterior a su valoración se procedió a concentrar la carga espermática con la ayuda de un agitador (Vortex) por unos minutos.

### **9.4.7. Valoración de la calidad espermática en fresco con la adición de yema de huevo y crema de leche.**

Una vez evaluado la calidad espermática en fresco, posteriormente se realizó el conteo en la cámara de Neubauer ya con el agregado de yema de huevo y de crema de leche pre-congelación, evaluando de igual manera las características tanto macroscópicas y microscópicas.

#### **9.4.8. Valorar las características macroscópicas y microscópicas del semen canino con la yema de huevo.**

Se toma la muestra seminal de cada uno de los perros donde se evaluó las características macroscópicas del eyaculado canino en fresco, donde se observa el color, se percibe el olor, se mide el pH y para la evaluación de las características microscópicas se midió la concentración, la motilidad masal e individual y se calculó el porcentaje de mortalidad espermática por ello la muestra seminal se dividió en dos partes iguales, para adicionar una cantidad de yema de huevo y otra parte con crema de leche, todas a una temperatura constante de 37°C para evitar el shock de frío y posteriormente con la ayuda de una pipeta se Thomas de 10µL y se coloca en la cámara de Neubauer, para la obtención de los datos y después valorar.

#### **9.4.9. Proceso de empaquetamiento de las pajillas**

Con las muestras seminales ya divididas en dos partes iguales, una con el agregado de yema de huevo y otra con la crema de leche se procede al empaquetamiento en pajillas de 0,50mL, para posterior colocar a enfriar las muestras a una temperatura de 4°C por 15min y después se lo lleva a la cámara de vapores de nitrógeno por 45min en una distancia de 10cm de distancia de las pajuellas con nitrógeno y después se transporta las pajillas al termo de nitrógeno líquido.

#### **9.4.10. Evaluación de las pajillas post- descongelación del semen.**

Para la evaluación de las pajillas post- congelación, se descongela a baño maría a una temperatura de 37°C, y se coloca una muestra de material seminal en la cámara de Neubauer y se lo observa en el microscopio primero con el lente 10x y después con el lente de 40x, para valorar las características macroscópicas y microscópicas.

#### **9.4.11. Interpretación de datos y resultados**

Se obtienen los datos y se procede a cargar en la hoja de cálculo de Excel siendo cada una de las muestras; una con el agregado de yema de huevo y otra con la yema de huevo mediante. La regla de conteo de espermatozoides vivos, espermatozoides muertos y morfo-anormalidades, sacando porcentuales y se determina cuál de los dos diluyentes nos dan los mejores resultados siendo valorizados.

## **9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el estudio estadístico se tuvieron en cuenta valores de estadística descriptiva como las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado canino, en esta última se revisarán los rangos máximos, mínimos y promedio, y valores porcentuales. Los antecedentes fueron detallados en tablas, el cual a más de detallar la estadística descriptiva también se maneja parámetros sobre las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado fresco, con la yema de huevo y la crema de leche, mediante el programa Excel se realizó el análisis estadístico para conseguir los valores antes mencionados.

## **9.6. MEDICIÓN Y VALORACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES DEL SEMEN CANINO.**

### **9.6.1. Variables analizadas referentes a la calidad macroscópica del semen**

#### **9.6.1.1. Color del eyaculado**

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

Alteraciones en la coloración

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

El color se evalúa por observación directa en el tubo graduado en el que se recoge la muestra <sup>37</sup>.

#### **9.6.1.2. Volumen del eyaculado**

Se expresa en mililitros (mL). Este parámetro varía en función de la especie y raza, edad, estado fisiológico del individuo, método de recolección, estado nutricional, periodicidad de la recolección, excitación sexual, época del año y peso vivo del animal <sup>37</sup>.

Los valores normales son:

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

### **9.6.1.3. Ph del eyaculado**

Su valoración es muy sencilla con las tiras reactivas específicas para tal fin, colocando unas gotas de semen en ellas, estando sostenidas por una pinza y después observándose la coloración final de la tira.

El Ph del semen canino es de 6,3 – 7. La variación del Ph disminuye la motilidad, por lo que es importante tomar en cuenta estas características en el uso de los diluyentes y de las sustancias tampón <sup>38</sup>.

## **9.6.2. VARIABLES ANALIZADAS REFERENTES A LA CALIDAD**

### **MICROSCÓPICA DEL SEMEN**

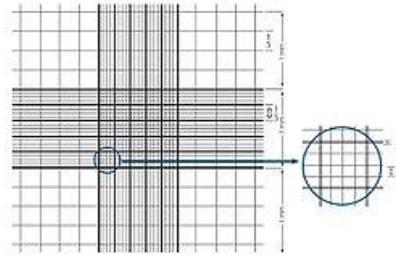
Dentro de las características microscópicas del eyaculado se evaluó: concentración, motilidad individual y en masa y mortalidad.

#### **9.6.2.1. Evaluación de la concentración espermática**

En el perro oscilan entre  $300-2000 \times 10^6$  espermatozoides/mL, considerándose normal para un perro de tamaño mediano  $300 \times 10^6$  esp/mL.

- Se homogeniza el eyaculado,
- Con la ayuda de la pipeta de Thomas se toma del volumen requerido de eyaculado, es decir hasta la marca de 10 µl de la pipeta.
- Se coloca una gota del contenido de la pipeta en la cámara de Neubauer, observamos al microscopio una vez ubicado el cuadro central con el lente de menor aumento y cambiamos al lente de 40x y se hace el conteo del número de espermatozoides de cuatro cuadrantes mayores.
- Luego se procedió a la lectura de 5 cuadrantes de los 25 existentes con un microscopio a 40x tomándose en cuenta a los espermatozoides que se encontraban en el cuadrado y los que se encontraban sobre la raya superior y derecha sin tomar en cuenta a los que se encontraban sobre la raya inferior e izquierda <sup>38</sup>.

Para la determinación de la concentración espermática se utilizó la siguiente formula:



**Figura 5.** Conteo Celular con la cámara de Neubauer <sup>38</sup>.

- ✓ Se aplicó la siguiente formula.

$$\text{Esp./mm}^3 = (\text{AxBxCxE})/\text{F}$$

- ✓ En la cual se la puede expresar de la siguiente manera:
  - A: Numero de espermatozoides contados
  - B: Tamaño del cuadradito ( $400\text{mm}^2$ )
  - C: Dilución Realizada 0.5 ml
  - D: Altura de la cámara (0.1mm)
  - E: Se multiplica por 10 para que el resultado quede expresado en  $1\text{mm}^3$
  - F: Numero de cuadraditos contados

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

- Eyaculación incompleta por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos.
- Perros tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos.
- Recolección excesiva de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal.
- En una aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes.
- Estructuras testiculares fibrosas, por traumatismos o infecciones.
- Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal e inflamaciones como orquitis o epididimitis.
- Anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc <sup>37</sup>.

### 9.6.2.2. Motilidad espermática

Se mide el porcentaje de espermatozoides en movimiento, se considera el movimiento flagelar productivo en progresión rápida y lineal.

Se coloca una gota de semen en una placa portaobjetos previamente calentada en la plancha térmica calibrada a  $37^\circ\text{C}$  y luego se coloca encima un cubreobjetos.

Observación al microscopio. El microscopio tiene incorporada una plancha térmica que estar calibrada a 37°C, con el lente 10x. En la valoración de la motilidad tomamos en cuenta la motilidad masal y la individual observados con el lente 40x <sup>38</sup>.

Puede alterarse por una inadecuada temperatura como la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección.

El valor normal de la motilidad del semen fresco en los perros oscila entre 85 – 95%.

En referencia a la motilidad seminal post- congelación se describen valores superiores a 50% para considerar que tiene buena calidad <sup>39</sup>. (**Tabla 6**)

<b>Puntuación</b>	<b>Características</b>	<b>Descripción</b>
0	Muertos	No existe actividad en ningún espermatozoide
1	Muy pobre	Solo el 10% de los espermatozoides muestran signos de vitalidad.
2	Pobre	Ausencia de ondas. Actividad espermática del 20-40%
3	Regular	Bajo movimientos de ondas. 45-65% de actividad espermática.
4	Bueno	Movimiento vigoroso. Actividad espermática del 70-85%
5	Muy bueno	Ondas rápidas. Actividad mayor 90% de los espermatozoides.

**Tabla 6.** Cuantificación del vigor de las ondas y la actividad espermática <sup>20</sup>.

### 9.6.2.3. Mortalidad espermática

Se evalúa con la ayuda de la cámara de Neubauer a través de la observación de diferentes cuadrantes, en el microscopio con el lente 40x; realizando un conteo de espermatozoides vivos y muertos de cada uno de los cuadrantes, obteniendo un total en cada uno de ellos, que se realizara una regla de tres y se saca el porcentaje de mortalidad <sup>32,38, 39</sup>.

Se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco. En cuanto al semen congelado, el valor mínimo aceptable de vitalidad es del 80% <sup>38,39</sup>.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\# \text{ de espermatozoides teñidos}}{\# \text{ de espermatozoides totales contados}} \times 100$$

#### 9.6.2.4. Morfoanomalías

Las anomalías de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anomalías en primarias y secundarias. La suma entre anomalías primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20%, para poder considerar un semen apto para usar <sup>32</sup>.

### 9.7. COMPOSICIÓN DE LOS DILUYENTES

#### 9.7.1. YEMA DE HUEVO DE GALLINA

##### *Composición:*

- Proteínas: 17.5%
  - Lípidos: 32.5%
  - Agua: 48% de agua
  - Minerales: 2% de minerales.
  - Rico en vitaminas, aunque carece de vitamina C:
  - Vitamina A: 144 µg,
  - Tiamina: 0.66 mg
  - Riboflavina 0.5 mg
  - Ácido pantoténico
  - Ácido fólico
  - Igualmente, es rica en fosfolípidos, en especial fosfatidilcolina o lecitina y ácidos grasos omega tres. Colina: 225 mg y 424 mg de colesterol
- Minerales:
- Calcio: 50 mg
  - Fósforo: 172 mg
  - Hierro: 1.2 mg
  - Magnesio: 10 mg
  - Potasio: 126 mg
  - Zinc: 1 mg

### **9.7.2. CREMA DE LECHE**

#### ***Composición:***

- Carbohidratos: 0 g
- Fibra dietética: 0 g
- Azúcar: 0 g
- Grasas: 13 g
- Saturadas: 8 g
- Poliinsaturados: 0 g
- Monoinsaturados: 5 g
- Trans: 0 g
- Proteínas: 1 g
- Sodio: 10 mg
- Potasio: 0 mg
- Colesterol: 38 mg
- Vitamina A: 0 %
- Vitamina C: 0 %
- Calcio: 0 %
- Hierro: 0 %

### **9.7.3. AndroMed CSS One Step**

#### ***Composición:***

- Fosfolípidos
- TRIS
- Ácido Cítrico
- Azucres
- Antioxidantes
- Buffers
- Glycerol
- Agua purificada

## 10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis experimental, comparó la influencia físico estructural del semen canino con la adición de crema de leche y yema de huevo en el eyaculado canino, cómo crioprotector. También se tomó en cuenta la actividad del diluyente “AndroMed CSS One Step” con el semen recolectado y su contribución para la evaluación microscópica y macroscópica de los espermatozoides analizados.

### 10.1. RESULTADOS

#### Evaluación de las características macroscópicas del Eyaculado canino en fresco

La evaluación del eyaculado en fresco, se realizó en cada uno de los ejemplares machos caninos, apenas se recolectaba la muestra se analizaba las variables cualitativas que en este caso son las características macroscópicas del eyaculado, donde “Perro 1”, nos proporcionó un eyaculado de 1,5ml, seguido del “Perro 2” con un eyaculado de 2ml y por último el “Perro 3” con una cantidad de 10ml de eyaculado, todos ellos con un eyaculado de color blanco lechoso, con un olor propia de la especie y con un pH de 7, todos estos datos recolectados, ubicados dentro del rango de lo normal. (Tabla 7)

**Tabla 7.** Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.

<b>Características macroscópicas del eyaculado canino en fresco</b>				
<b>Perro</b>	<b>Volumen</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>pH</b>
1	1.5 ml	Blanco lechoso	Propio de la especie	7
2	10 ml	Blanco lechoso	Propio de la especie	7
3	2 ml	Blanco lechoso	Propio de la especie	7

**Fuente:** Directa

#### Evaluación de las características microscópicas del Eyaculado canino en fresco

La evaluación de las características microscópicas del eyaculado en fresco, se realizó en cada uno de los ejemplares machos caninos, apenas se recolectaba la muestra se analizaba las variables cuantitativas que en este caso son las características microscópicas del eyaculado, donde “Perro 1” posee una motilidad masal de un 85% con una motilidad individual buena, una mortalidad espermática del 13% y el 20% de morfoanomalías, seguido del “Perro 3” y “Perro 2” con una motilidad masal del 90% y una motilidad individual muy buena, teniendo en cuenta

que en este parámetro se evalúa el vigor de las ondas de movimiento y la dirección de estas, “Perro 2” posee una mortalidad espermática del 15% y “Perro 3” del 10% y por ultimo “Perro 2” posee un porcentaje de morfoanomalías del 14% y “Perro 3” del 12%, todos estos datos recolectados, ubicados dentro del rango de lo normal <sup>38,39</sup>. **(Tabla 8)**

**Tabla 8.** Características microscópicas del eyaculado.

<b>Características microscópicas del eyaculado canino en fresco</b>				
<b>Perro</b>	<b>Motilidad</b>		<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Morfoanomalías</b>
	<b>Masal (%)</b>	<b>Individual</b>		
1	85%	Bueno	13%	20%
2	90%	Muy bueno	15%	14%
3	90%	Muy bueno	10%	12%

**Fuente:** Directa

**Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo y crema de leche pre- congelación.**

En las características macroscópicas en los tres eyaculados se obtuvo los mismos resultados el color amarillento por la coloración específica de la yema de huevo, con un pH de 7, mientras que los valores obtenidos en la evaluación de las características microscópicas del eyaculado con la yema de huevo, en “Perro 2” se obtuvo una concentración espermática de  $92 \times 10^6$  y una mortalidad del 27%, seguido de “Perro 3” con  $40 \times 10^6$  y una mortalidad del 28% y por ultimo seguido de “Perro 1” con  $13 \times 10^6$  con una mortalidad del 16%, todos tres con una motilidad buena, donde en el cuadro de calificación, denota un resultado de la observación de un movimiento vigoroso y una actividad espermática del 70% al 85%, donde este resultado es importante para que el espermatozoide al momento de la inseminación pueda recorrer de una correcta forma y velocidad para alcanzar el ovocito y fecundar <sup>5,7</sup>. **(Tabla 9 y 10)**

**Tabla 9.** Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado con la yema de huevo y la crema de leche pre- congelación y post- descongelación.

<b>Características macroscópicas del eyaculado canino con la yema de huevo y la crema de leche pre-congelación y post- descongelación</b>				
<b>Perro</b>	<b>Color</b>		<b>pH</b>	
	<b>Yema de huevo</b>	<b>Crema de leche</b>	<b>Yema de huevo</b>	<b>Crema de leche</b>
1	Amarillo	Blanco lechoso	7	7
2	Amarillo	Blanco lechoso	7	7
3	Amarillo	Blanco lechoso	7	7

**Fuente:** Directa

**Tabla 10.** Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo, pre- congelación.

<b>Características microscópicas del eyaculado canino con el agregado de yema de huevo pre- congelación</b>			
<b>Perro</b>	<b>Concentración (x10<sup>6</sup> células/ml)</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
1	13x10 <sup>6</sup>	Bueno	16%
2	92x10 <sup>6</sup>	Bueno	27%
3	40x10 <sup>6</sup>	Bueno	28%

**Fuente:** Directa

En las características macroscópicas en los tres eyaculados se obtuvo los mismos resultados el color Blanco por la coloración específica de la crema de leche, con un pH de 7, mientras que los valores obtenidos en la evaluación de las características microscópicas del eyaculado con la crema de leche, en “Perro 2” hubo una concentración espermática de 32x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 53%, seguido de “Perro 3” con 11x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 49% y por ultimo seguido de “Perro 1” con 10x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 41%, todos tres con una motilidad regular, donde en el cuadro de calificación, denota un resultado en la observación de un bajo movimiento vigoroso de la actividad espermática del 45% al 65%, donde este resultado es considerado bueno ya que, según Tello una calificación de 3 es considerada buena, ya que es importante

recalcar que esto al momento de la inseminación el espermatozoide pueda alcanzar el ovocito y fecundar <sup>5,7</sup>. (Tabla 9 y 11)

**Tabla 11.** Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de crema de leche, pre- congelación.

<b>Características microscópicas del eyaculado canino con el agregado de Crema de leche pre- congelación y post – descongelación</b>			
<b>Perro</b>	<b>Concentración (x10<sup>6</sup> células/ml)</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
1	10x10 <sup>6</sup>	Regular	41%
2	32x10 <sup>6</sup>	Regular	53%
3	11x10 <sup>6</sup>	Regular	49%

**Fuente:** Directa

**Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo y crema de leche post- descongelación.**

En las características macroscópicas en los tres eyaculados se obtuvo los mismos resultados el color amarillento por la coloración específica de la yema de huevo, con un pH de 7, mientras que los valores obtenidos en la evaluación de las características microscópicas del eyaculado con la yema de huevo, en “Perro 2” se obtuvo una concentración espermática de 60x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 32%, seguido de “Perro 3” con 10x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 31% y por ultimo seguido de “Perro 1” con 7x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 29%, don de la mortalidad de espermatozoides de los tres caninos ya sobrepasa el rango normal, mientras que todos tres caninos poseen una motilidad regular, donde en el cuadro de calificación, denota un resultado de la observación de un bajo movimiento de los espermatozoides y una actividad espermática del 45% al 65%, donde este resultado es considerado todavía óptimo para lograr una fecundación del ovocito, esto debido a la baja densidad que posee la yema de huevo <sup>38,40</sup>. (Tabla 9 y 12)

**Tabla 12.** Características microscópicas del eyaculado canino con la adición de yema de huevo, post- descongelaación.

<b>Características microscópicas del eyaculado canino con el agregado de yema de huevo post- descongelaación</b>			
<b>Perro</b>	<b>Concentraci3n (x10<sup>6</sup> c3lulas/ml)</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
<b>1</b>	7x10 <sup>6</sup>	Regular	29%
<b>2</b>	60x10 <sup>6</sup>	Regular	32%
<b>3</b>	10x10 <sup>6</sup>	Regular	31%

**Fuente:** Directa

En las características macroscópicas en los tres eyaculados se obtuvo los mismos resultados el color blanco por la coloraci3n específica de la crema de leche, con un pH de 7, mientras que los valores obtenidos en la evaluaci3n de las características microscópicas del eyaculado con la crema de leche, en “Perro 2” se obtuvo una concentraci3n espermática de 10x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 90%, seguido de “Perro 3” con 4x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 90% y por ultimo seguido de “Perro 1” con 3x10<sup>6</sup> y una mortalidad del 95%, donde la mortalidad de espermatozoides de los tres caninos ya sobrepasa el rango normal, mientras que todos tres caninos poseen una motilidad muy pobre, donde solo el 10% de espermatozoides muestran movimientos, donde este resultado ya no es considerado óptimo para lograr la fecundaci3n de un ovocito, debido a que la crema de leche, posee una viscosidad muy alta, por ende imposibilitando que la motilidad espermática se mantenga <sup>38,39,40</sup>. (**Tabla 9 y 13**)

**Tabla 13.** Características microscópicas del eyaculado canino con la adici3n de crema de leche, post- descongelaación.

<b>Características microscópicas del eyaculado canino con el agregado de Crema de leche post- descongelaación</b>			
<b>Perro</b>	<b>Concentraci3n (x10<sup>6</sup> c3lulas/ml)</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
<b>1</b>	3x10 <sup>6</sup>	Muy pobre	95%
<b>2</b>	10x10 <sup>6</sup>	Muy pobre	90%
<b>3</b>	4x10 <sup>6</sup>	Muy pobre	90%

**Fuente:** Directa

## 10.2. DISCUSIÓN FINAL

Según Carpio dice que la baja viabilidad de los espermatozoides post- descongelación se debe a cambios de temperatura, estrés osmótico, formación de hielo intracelular y toxicidad, lo que se traduce en la utilización de un mal diluyente. Los resultados de motilidad del presente estudio, para las variables microscópicas pre- congelación fue de una calificación de 4 para yema de huevo y de 3 para crema de leche y los resultados post – descongelación fue de una calificación de 3 para yema de huevo y una calificación de 1 para crema de leche, teniendo en cuenta que la calificación de 3 es considerado óptimo para que el espermatozoide pueda fecundar el ovocito, mientras que el 1 ya no está dentro del rango óptimo de motilidad y vitalidad, esto se debe posiblemente según Quintanilla dice que la fracción yema de huevo de baja densidad, compuesta principalmente de lipoproteínas de baja densidad, que podría ser en gran parte responsable de la resistencia contra el choque de frío y para la mejora de la motilidad tras el almacenamiento, y los valores bajos obtenidos con la crema de leche posiblemente se deba a la densidad del medio del diluyente que interviene en las características de motilidad, según Carpio, el empleo de la leche descremada como diluyente de semen, no siempre da resultados uniformes por la variabilidad en su composición. Tomando en cuenta que la crema de leche posee mayor densidad y pegajosidad a comparación de la leche descremada, que posiblemente por ello al adicionar en el eyaculado, bajamos la motilidad espermática, y esto conlleva a que en el momento que se quiera realizar una inseminación artificial los espermatozoides no puedan llegar, o tener un acceso limitado, para fecundar un ovocito <sup>38,40</sup>.

**11. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO:**

<b>PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO</b>			
<b>Recursos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>V. Unitario (\$)</b>	<b>Valor Total (\$)</b>
<b>Transporte</b>	4 viajes	5 \$	20
<b>Pajuelas y tapones</b>	100	0.25 ctvs	25
<b>Guantes</b>	5	0.25 ctvs	1.25
<b>Frascos de muestra de orina</b>	5	0.10 ctvs	0.50
<b>Huevos</b>	6	0.25 ctvs	1.50
<b>Crema de leche</b>	3	0.60 ctvs	1.80
<b>Tiras de pH</b>	1	2 \$	2
<b>Frasco de AndroMed CSS One Step</b>	1	320\$	320
<b>Exámenes de laboratorio (medición de testosterona)</b>	3	12\$	36
		<b>TOTAL</b>	<b>408.05</b>

**12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:** Actividades relacionadas a la elaboración del Proyecto

**12.1. PLANIFICACIÓN DEL ENTRENAMIENTO DE LOS CANINOS**

Se utilizó tres donantes caninos, de diferentes tamaños teniendo un ejemplar de raza grande, mediana y pequeña, el entrenamiento fue de manera individual y aislada de otros animales. Familiarizándonos con los caninos mediante juegos, comidas y juguetes, el adiestramiento y la extracción de los eyaculados tuvo una duración de 5 semanas en la cual se obtuvo a partir de la tercera y quinta semana un buen eyaculado donde se pudo observar las características macroscópicas y microscópicas de la muestra seminal. (**Tabla 14**)

**Tabla 14.** Planificación del entrenamiento de los caninos donantes y de la elaboración de las pajuelas, con los diferentes diluyentes.

<b>ACTIVIDADES</b>	<b>FECHA</b>
Selección de los machos donantes.	15 Abril 2019
Familiarización con los machos caninos objetos de experimentación.	22 Abril 2019
Elaboración de fichas clínicas y recolección de datos.	29 Abril 2019
Elección de la mejor técnica de extracción de semen, que en este caso se usó la técnica de extracción manual, estimulación y ejerciendo presión en el bulbo peneano.	06 Mayo 2019
Extracción del semen	03 Junio 2019
Evaluación del semen, macroscópica y microscópica.	10 Junio 2019
Procesamiento del semen con una parte de “AndroMed CSS One Step”, adicionando la yema de huevo y otra muestra de eyaculado adicionado la crema de leche.	24 Junio 2019
Colocación de las pajuelas en el congelador por 15min.	24 Junio 2019
Elaboración de pajuelas con Vapores de Nitrógeno Líquido por 45 min.	24 Junio 2019
Almacenamiento en Nitrógeno Líquido	24 Junio 2019
Evaluación post congelación	25 Junio 2019
Análisis de resultados.	01 Julio 2019

### **13. CONCLUSIONES**

La adición de yema de huevo como crioprotector permite mantener las características macroscópicas y microscópicas del semen con una calificación de 4 que representa de un 70% a 85% de motilidad espermática y un bajo porcentaje de mortalidad, manteniéndose con un pH neutro.

Las características macroscópicas y microscópicas del material seminal con la adición de la crema de leche como crioprotector, presento muy bajos resultados en cuanto a las variables de motilidad y alto porcentaje de mortalidad espermática observando también una estabilidad del pH seminal.

Después de realizar el análisis comparativo de las muestras en las fase de pre – congelación y post- descongelación se concluye que el eyaculado con la adición de yema de huevo fue mejor, presentando un 45% a 65% de las características de motilidad que es considerado viable para la inseminación artificial, mientras que el eyaculado adicionado la crema de leche registró muy baja calidad post descongelación reduciendo las características de motilidad de la muestra a un 10%.

### **14. RECOMENDACIONES**

En base a los resultados se recomienda utilizar el AndroMed con la adición de yema de huevo por que mantienen mejores porcentajes de motilidad y de espermatozoides vivos.

Se recomienda ampliar la investigación, utilizando otros diluyentes comerciales, y otros diluyentes de origen de proteína animal.

Ser muy estrictos en lo que se refiere a mantener el semen a una temperatura adecuada.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. González J, Tadeo C, Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Revista de Salud Animal- SciELO* [Internet]. 2013 Sep [cita 2019 Feb 08]; Vol.35(2): Habana. Disponible. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2013000200010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000200010)
2. Armas S, Fernández V, Vásquez M, Santiani A, Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú- SciELO* [Internet]. 2011 Jul/Sep [cita 2019 Feb 08]; Vol.22(3): Lima. Disponible. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172011000300004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300004)
3. Cunningham, J. G. 1999. *Fisiología Veterinaria*. 2º ed México: McGraw-Hill. p. 561-70.
4. Wanke M, Gobello C. *Reproducción en Caninos y Felinos Domésticos*. 1ª ed. termédica; 2008.
5. Root Kustritz M. (2005) *Manual de reproducción del perro y del gato*. Estados Unidos. Elsevier Science.
6. Gobello C, Olivera M. 2005. *El libro latinoamericano de la reproducción canina y felina*. 2da ed. Medellín. Colombia: Editorial Biogénesis.
7. Valera M. *Reproducción Canina*, 2008. [Internet]. [cita 2019 Feb 08]; Disponible en: [www.centauroveterinarios.com/tenes/reproduccionCanina.pdf](http://www.centauroveterinarios.com/tenes/reproduccionCanina.pdf)
8. Restrepo G, Vásquez N, García A. Criopreservación de Semen Canino y su Aplicación en la Inseminación Artificial. *Revista Electrónica CES* [Internet]. [cita 2019 Feb 08] Disponible en: [http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo\\_12.pdf](http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo_12.pdf)

9. Savignone C, Tttarelli C, Stornelli M, Gimenez F, Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo. Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Revista de Medicina Veterinaria del Uruguay [Internet]. 2007 Jul/Sep [cita 2018 Feb 08]; Vol.42(167) Pag15-22: Montevideo. Disponible. <http://www.revistasmvu.com.uy/revistas/numero167.pdf#page=15>
10. Restrepo G, Vásquez N, García E, Criopreservación de semen cganino y su aplicación en la inseminación artificial. Revista CES / Medicina Veterinaria y Zootecnia [CD]. 2009 Jul/Dic [cita 2019 Feb 08]; Vol.4(2): Medellin.
11. Páramo, R. (nd). Anatomía del aparato reproductor del macho. . [online] Manual de prácticas en el manejo reproductivo del perro. [cita 2019 Feb 08]; Disponible en: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/52\\_Reproduccion\\_Perros.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/52_Reproduccion_Perros.pdf)
12. Bonilla C, Ballesteros R, Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente trisglucosa-yema de huevo. Universidad la Salle [Internet]. Bogotá-Colombia: 2007. [cita 2019 Feb 09] Disponible en. <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6032/14002011.pdf?sequence=1>
13. Reatiga O, Determinación del efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la viabilidad de la célula espermática canina para la raza pastor belga mallinois. [Universidad la Salle [Internet]. Bogotá- Colombia: 2015. [cita 2019 Feb 10] Disponible en. [http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/18364/76122206\\_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/18364/76122206_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
14. Latorre M, Veloza F, Comparación del efecto de la yema de huevo de pata y de gallina sobre parámetros espermáticos en semen canino refrigerado. Universidad la Salle [Internet]. Bogotá- Colombia: 2014. [cita 2019 Feb 11] Disponible en.

- <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17488/T14.14%20L351c.pdf?sequence=3>
15. Bohórquez R, De Ondíz, A, Palomares R, y Gallardo F, Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino: reporte preliminar. Unidad de Reproducción Animal, Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela: 2005. [cita 2019 Feb 12]
  16. Sánchez A, Uso de la prueba Hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado [Internet]. Valdivia 2002. [cita 2019 Feb 12] Disponible en. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0301732x200200014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0301732x200200014&script=sci_arttext)
  17. Universidad de Córdoba. Reproducción animal. [Internet]. España: Universidad de Córdoba. [cita 2019 Feb 12]. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/medicina-cirugia/reproduccion/proyecto/metodos1.html>
  18. MedVet.com. Congelación semen canino [Internet]. Buenos Aires: 2012 [cita 2018 Feb 12]: Disponible en. <http://www.medvet.com.ar/index.php/comisiones-y-departamentos/186>
  19. Corti L, Evaluacion de la capacidad Fecundante del semen congelado del perro (canis familiaris), en Ova Recuperadas de perras en celo inducido [Internet]. Valdivia- Chile [cita 2018 Feb 12]: Disponible en. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc829e/doc/fvc829e.pdf>
  20. Ochoa A, Torres L, “Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial” Universidad de Cuenca [Internet]. Ecuador: 2012 [cita 2018 Feb 12]: Disponible en. [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/384/1/Tesis.pdf?fbclid=IwAR27wd2LbR9SjIw6nAw8tKvoYR6Sm6BDVkVXM9g7fRE5LhDmLUzosE3S\\_ws](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/384/1/Tesis.pdf?fbclid=IwAR27wd2LbR9SjIw6nAw8tKvoYR6Sm6BDVkVXM9g7fRE5LhDmLUzosE3S_ws)

21. Tello R, Efecto del diluyente sobre la viabilidad espermática para la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos. Universidad Técnica de Ambato [Internet]. Ambato- Ecuador: 2015. [cita 2019 Feb 12] Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22578/1/Tesis%2048%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20398.pdf>
22. Pazos J. Tipos de Inseminación Artificial. [Internet]. [cita 2019 Feb 12] Disponible en: [www.san-bernardos.es/tiposde.htm](http://www.san-bernardos.es/tiposde.htm)
23. Hernández J, Colección y Evaluación del semen. [Internet]. Club Rottweiler. Mexico: 2007. [cita 2019 Feb 12] Disponible en: <http://www.clubrottweiler.net/foro/showthread.php?t=204>
24. Alamo S, Crioconservación y viabilidad espermática en la Especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152° C. [tesis doctoral]. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 2007. [cita 2019 Feb 13] Disponible en: <http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/1910/1/3031.pdf>
25. Andrade A, Influencia de la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid 2005. [cita 2019 Feb 14] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t28575.pdf>
26. Stornelli M, De la Sota R. Fertilidad y Supervivencia del Semen Canino Criopreservado. [Internet]. La Plata. [cita 2019 Feb 14] Disponible en: [http://www.voraus.com/adiestramientocanino/modules/wfsection/html/a000502\\_115\\_Stornelli\\_criopreservacion.pdf](http://www.voraus.com/adiestramientocanino/modules/wfsection/html/a000502_115_Stornelli_criopreservacion.pdf)
27. Davila M, Congelación de semen canino con Estensores Cani PRO. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro [Internet]. Torreón, Coahuila: 2009. [cita 2019 Feb 22] Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2963/MARIA%20ELENA%20DAVILA%20GUTIERREZ.pdf?sequence=1>

28. Latinpedia. Examen de la calidad del semen para su uso en inseminación artificial [Internet] Disponible en: <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Examen-de-la-calidad-de-semen-para-su-uso-en-inseminacion-artificial-ad498.html>
29. Foster R, y Smith M, Artificial Insemination (AI). PetEducation.2002 . [cita 2019 Feb 22] Disponible en. <http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>.
30. Lopez J, R. Vet. Colecta de semen en las distintas especies [Internet]. 2014 Jul/Dic [cita 2018 Feb 15] Disponible en. <https://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/colecta-de-semen/>
31. Pontón A, Lagos J, evaluación de los efectos de la refrigeración y crioconservación sobre la motilidad y mortalidad de espermatozoides caninos. Universidad Central del Ecuador [Internet]. Quito- Ecuador: 2014: [cita 2018 Feb 15] Disponible en. [http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12701/1/T-UCE-0014-062-2014.pdf?fbclid=IwAR0R8aJgQeA1FuAKh6MgMUTdCO9g8\\_-bU5RBSstwFzf3BoH2KXdvySFzhHis](http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12701/1/T-UCE-0014-062-2014.pdf?fbclid=IwAR0R8aJgQeA1FuAKh6MgMUTdCO9g8_-bU5RBSstwFzf3BoH2KXdvySFzhHis)
32. Palma G, Biotecnología de la reproducción. Machala-Ecuador 2012. 1era edición. [cita 2018 Feb 16] Disponible en: [http://books.google.com.ec/books?id=zmHbayu\\_hfIC&pg=PA537&lpg=PA537&dq=s+shock+termico+en+espermatozoides&source=bl&ots=YJnerJES9n&sig=LoGqAh828gTTjN9om8z6luFU-VI&hl=es-419&sa=X&ei=PqxIUcHXJIbc9QTYvoGgAQ&sqi=2&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=shock%20termico%20en%20espermatozoides&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=zmHbayu_hfIC&pg=PA537&lpg=PA537&dq=s+shock+termico+en+espermatozoides&source=bl&ots=YJnerJES9n&sig=LoGqAh828gTTjN9om8z6luFU-VI&hl=es-419&sa=X&ei=PqxIUcHXJIbc9QTYvoGgAQ&sqi=2&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=shock%20termico%20en%20espermatozoides&f=false)
33. Andrade A, Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis de grado de Doctor en Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. [Internet]. 2005: [cita 2018 Feb 16]; Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/vet/ucm-t28575.pdf>

34. Avila E, Factores que afectan el comportamiento sexual en los perros. [Internet]. [cita 2018 Feb 16]; Disponible en: <http://www.veterinariadelbosque.com/articulos/factores-que-afectan-el-comportamiento-sexual-en-los-perros.aspx>
35. Hernández J, Colección y Evaluación del semen. [Internet]. México: Club Rottweiler. [cita 2018 Feb 16]. Disponible en: <http://www.clubrottweiler.net/foro/showthread.php?t=204>
36. Fariña J, Inseminación artificial en caninos, semen congelado, su importancia. [Internet]. 2008: [cita 2018 Feb 16]; Disponible en: <http://www.badenbadendobermann.com/articulos/detalle/id/8>
37. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli A, La Microscopía Electrónica como Herramienta en la Evaluación del Semen Canino. [Internet]. La Plata. [cita 2018 Feb 18]; Disponible en: [http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/138\\_Jurado\\_ME\\_semen\\_canino.pdf](http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/138_Jurado_ME_semen_canino.pdf)
38. Ávila M, Madero J, Lopez C, Leon M, Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología [Internet]. 2006: [cita 2018 Feb 18]; Vol.54(4): Disponible. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>
39. Carpio S, Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: Yema de huevo vs Leche descremada. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca [Internet]. Cuenca- Ecuador: 2015: [cita 2018 Junio 01] Disponible en. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>
40. Quintanilla M, Efecto de los dilutores Tris, usando la Leche descremada sobre características espermáticas del semen refrigerado de canino. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Purímac [Internet]. Unamba- Perú: 2018: [cita 2018 Junio 01] Disponible en. [http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/727/T\\_0440.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/727/T_0440.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

## 16. ANEXOS

### Anexo 1

#### ESTUDIANTE

#### CURRICULUM VITAE

#### DATOS PERSONALES:

**Apellidos** : Proaño Montesdeoca  
**Nombres** : Paola Estefania  
**Fecha De Nacimiento** : 07/01/1996  
**Edad** : 23 Años  
**Estado Civil** : Soltera  
**Nacionalidad** : Ecuatoriana  
**Domicilio Actual** : Ambato  
**Teléfono Celular** : 0998901740  
**Cédula** : 180494499-7



#### ESTUDIOS REALIZADOS:

**Primaria** : Escuela “Augusto N. Martínez”  
**Secundaria** : Instituto Tecnológico Agropecuario “Luis A. Martínez”  
**Superior** : Universidad Técnica de Cotopaxi

#### TÍTULOS OBTENIDOS:

Técnico en Agropecuaria  
Proceso de Médico Veterinario y Zootecnista

**Anexo 2****TUTOR DE TITULACIÓN****CURRICULUM VITAE****INFORMACIÓN PERSONAL**

NOMBRES Y APELLIDOS	Juan Eduardo Sambache Tayupanta
FECHA DE NACIMIENTO	Febrero, 22 de 1989
CEDULA DE CIUDADANÍA	1721796751
ESTADO CIVIL	Soltero
NUMEROS TELÉFONICOS	022315247 / 0998937933
E-MAIL	<a href="mailto:juan.sambache@utc.edu.ec">juan.sambache@utc.edu.ec</a> edusambache@gmailcom

**FORMACIÓN ACADÉMICA**

NIVEL PRIMARIO	Unidad Educativa “Mariano Negrete”
NIVEL SECUNDARIO	Colegio Particular Dominicano “San Fernando”
TERCER NIVEL	Universidad de las Américas “Udla” Médico Veterinario y Zootecnista

CUARTO NIVEL (MAESTRIA) Universidad Politécnica de Valencia  
“Master oficial en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción” Valencia, España (Julio. 2016)

CUARTO NIVEL (MAESTRIA) Universidad Autónoma de Barcelona “Master of Science in animal breeding y reproduccion biotechnology”. Barcelona, España (Julio, 2015)”

CUARTO NIVEL (DIPLOMADO) Instituto de altos estudios del mediterráneo (Ciheam)  
“Diplomado in animal breeding and genetics”. Paris, Francia (Julio. 2015)

**EXPERIENCIA ACADÉMICA E INVESTIGATIVA****PUBLICACIONES**

“análisis genómico de la calidad de la carne y del metabolismo de los ácidos grasos en porcino”.  
(julio, 2016)

Selección y detección de indels en el genoma porcino a partir de datos de secuenciación paralela masiva. (marzo, 2016)

Efectos de la incorporación de grasa bypass en la dieta de vacas en diferentes etapas de la lactancia (mayo, 2013)

#### CONTRIBUCIONES A CONGRESOS, SEMINARIOS

PONENCIAS Y COMUNICACIONES “ACTEON”. Valencia – Spain (Marzo, 2016)

#### CAPACITACIONES

##### Nacionales

- Jornadas veterinarias. Quito, 2012.
- Encuentro nacional de inseminadores, mejía 2011
- Seminario de ecografía veterinaria. Quito, 2011.
- Manejo de la vaca lechera. Mejía, 2010
- Manejo productivo de animales de granja. Cuenca 2008
- Curso de inseminación artificial en bovinos. Mejía, 2007

##### Internacionales

- Jornadas aida, Saragoza Spain. (Abril. 2016)
- Imagenología veterinaria, Asturias, Spain (Febrero. 2016)
- Congreso acteon, Valencia, Spain (Septiembre, 2015)
- Comunicaciones irta, Barcelona, Spain (Noviembre. 2015)
- PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
- Proyecto Mineco Agl2014-56369-C2-R desarrollado en colaboración entre el instituto nacional de investigaciones agrarias (inia) y el centre de recerca en agrigenomica (crag). 2015
- Proyecto ibmap centre de recerca en agrigenomica (crag). (Barcelona, Spain 2015)

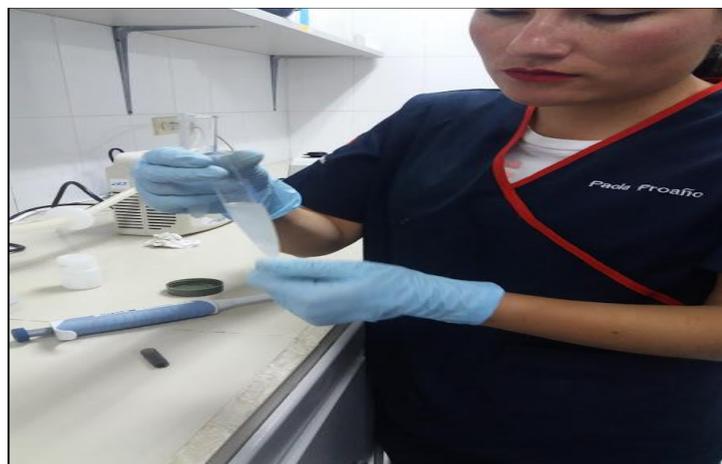
**Anexo 4.** Atemperar todos los materiales a una temperatura de 37°C, antes de extraer las muestras.



**Anexo 5.** Extracción de la muestra seminal, utilizando la técnica de recolección manual, ejerciendo una presión sobre el bulbo peneano.



**Anexo 6.** Valoración de las características macroscópica de la muestra recolectada.



**Anexo 7.** Valoración del pH de las muestras seminales.



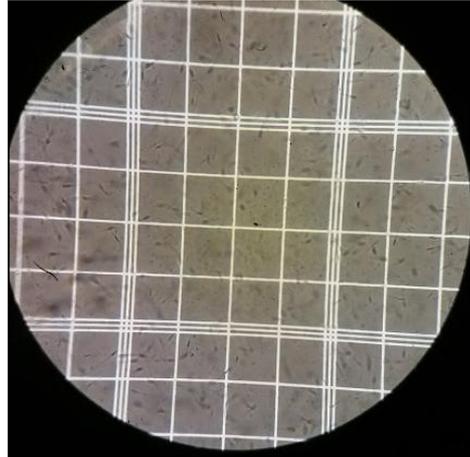
**Anexo 8.** Colocación de una alícuota de muestra seminal, en la cámara de Neubauer.



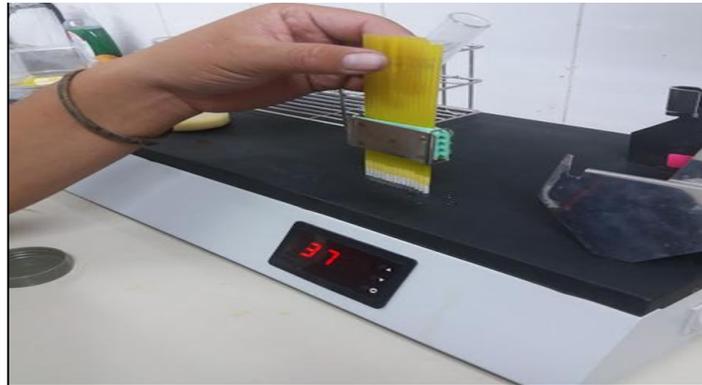
**Anexo 9.** Valoración de las características microscópica de la muestra recolectada, de con la ayuda del microscopio.



**Anexo 10.** Recuento espermático, en la placa de Newbauer.



**Anexo 11.** Empaquetamiento, de las muestras seminales en pajuelas de 0.50



**Anexo12.** Congelación de las pajuelas, en vapores de nitrógeno.

