



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES
COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN
RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Médicas Veterinarias

Autoras:
Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

Tutora:
Veloz Veloz Dina Maricela

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Marcalla Constante Diana Mireya, con cédula de ciudadanía No. 0504638602 y Tulmo Segovia Consuelo Marilin, con cédula de ciudadanía No. 1727853689, declaramos ser autoras del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, siendo la MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg., Tutora del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 15 de agosto del 2024.



Diana Mireya Marcalla Constante
C.C: 0504638602
ESTUDIANTE



Consuelo Marilin Tulmo Segovia
C.C: 1727853689
ESTUDIANTE

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 **MARCALLA CONSTANTE DIANA MIREYA**, identificada con cédula de ciudadanía 0504638602 de estado civil casada, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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.

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

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 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 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 CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, 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 15 días del mes de agosto del 2024.


Diana Mireya Marcalla Constante

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

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 **TULMO SEGOVIA CONSUELO MARILIN**, identificada con cédula de ciudadanía **1727853689** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2018 – Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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:

- e) 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.
- f) La publicación del trabajo de grado.
- g) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- h) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

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 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 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 CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, 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 15 días del mes de agosto del 2024.

Consuelo Marilyn Tulmó Segovia

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación sobre el título:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”, de Marcalla Constante Diana Mireya y Tulmo Segovia Consuelo Marilin, 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 han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 15 de agosto del 2024

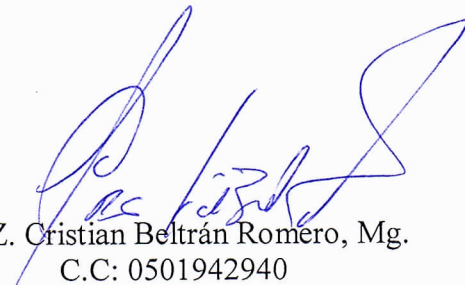

MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.
DOCENTE TUTORA
CC: 1720299302

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

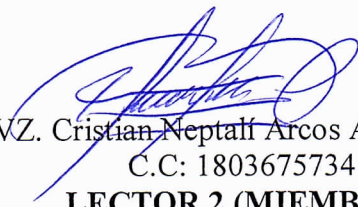
En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, las postulantes: Marcalla Constante Diana Mireya y Tulmo Segovia Consuelo Marilin, con el título de Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúnen los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.


Latacunga, 15 de agosto del 2024



MVZ. Cristian Beltrán Romero, Mg.
C.C: 0501942940
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



MVZ. Cristian Neptali Arcos Álvarez, Mg.
C.C: 1803675734
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, PhD.
C.C: 0501097224
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme fuerzas para continuar en lo adverso, por guiarme en el camino de lo prudente y darme sabiduría para mejorar día a día. Agradezco a mis padres Edgar y María por su amor y apoyo incondicional, a mi esposo Cristian, gracias por ser mi compañero de vida, por tu paciencia, comprensión y por estar siempre dispuesto a apoyarme en cada etapa de este proceso. Tu amor y confianza me han dado la fuerza para superar cada obstáculo. A mi hija Cristina, gracias por ser mi mayor inspiración. Tu presencia en mi vida me motiva a ser mejor cada día y a esforzarme por alcanzar mis metas. A mis hermanos Fernando, Mayda, Andrea y a mi Sobrina Danna, gracias por su apoyo, por los consejos y por estar siempre ahí cuando los he necesitado. Su compañía y cariño han sido fundamentales en este viaje.

Al mismo tiempo quiero agradecer a la doctora Dina Veloz por su guía, paciencia y dedicación han sido esenciales para el desarrollo y culminación de este trabajo. Su apoyo constante y sus valiosos consejos han enriquecido mi experiencia académica, permitiéndole alcanzar este importante logro.

Diana Marcalla

AGRADECIMIENTO

En primer instancia quiero agradecer a Dios, porque sin él no sería nadie, y por su infinito amor y bondad estoy aquí cumpliendo este sueño tan anhelado; en segundo lugar agradezco a mis padres Piedad y Carlos por siempre estar con su apoyo incondicional, a mi compañero de este gran proceso Freddy, gracias por ser mi fortaleza, por tu apoyo leal e incondicional, gracias por tu existencia en mi vida, agradezco a mis hermanas Mónica, Paula y Sofía; gracias por estar conmigo siempre que les necesito, a pesar de cualquier diferencia que tengamos siempre puedo contar con ustedes, a mi gran amor Romina hija mía gracias por darme tu amor infinito cada día, con tus sonrisas y abrazos me llenaste de valentía y resistencia para seguir adelante.

De igual manera quiero agradecer a todos los que forman parte de la Universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas, agradezco a los doctores de la Carrera de Medicina Veterinaria por compartir sus conocimientos conmigo y por ser parte de esta nueva etapa de vida profesional.

Consuelo Tulmo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo con todo mi amor a mi hija Cristina, quien ha sido mi mayor inspiración y la razón detrás de cada esfuerzo. A mi esposo Cristian, por su apoyo incondicional y por ser mi compañero en este viaje. A mis padres, Edgar y María, por su amor, guía y por inculcarme los valores que me han permitido llegar hasta aquí. A mis hermanos Fernando, Mayda, y Andrea, y a mi sobrina Danna, por su constante apoyo y por ser una parte fundamental de mi vida. Este logro es un reflejo del amor y la unión de nuestra familia.

Diana Marcalla

DEDICATORIA

El siguiente trabajo se lo dedicó a mi amor incondicional Romina Charlotte, a mi esposo Freddy, a mi madre Piedad, agradezco a la vida por tenerte conmigo porque tú me enseñaste que cuando se hace las cosas con amor todo saldrá bien, a mi padre Carlos, a mis hermanas Mónica, Paula y Sofia, la vida es gratificante cuando tenemos personas como ustedes alrededor. A la doctora Dina Veloz por brindarme sus conocimientos y ayuda incondicional en todo momento.

Consuelo Tulmo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES
SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

Autoras:
Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

RESUMEN

En la actualidad la valoración del efecto de diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas como el bulldog francés, pequinés, el pug representa un desafío crucial en la reproducción asistida veterinaria. Datos anatómicos específicos de estas razas, como la estructura facial característica que puede predisponer a problemas respiratorios y termorregulatorios, destacan la necesidad de optimizar técnicas de conservación de semen para mejorar la viabilidad espermática. Por ello el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas. En el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se utilizaron 8 machos caninos seleccionados aleatoriamente de raza braquiocefálicas y mestizas con edades comprendidas de 1 a 8 años y condiciones adecuadas de salud. Las muestras seminales se extrajo mediante la técnica de recolección manual, con el uso de la segunda fracción del eyaculado, se evaluó con la ayuda de un microscopio electrónico y una cámara de Neubauer, se analizaron las características macroscópicas como volumen, color, pH y microscópicas como la concentración, motilidad progresiva e individual y vigor del eyaculado canino, se realizaron las valoraciones pre- refrigeración y post- refrigeración, tomando datos puntuales con los dos tratamientos que correspondía a un diluyente de origen animal, el cual se adicionó proteína animal como fue la yema de huevo, y el tratamiento dos correspondía a un diluyente de origen vegetal. Con los datos obtenidos durante el proceso experimental, estos fueron analizados y procesados con la ayuda del programa Excel. Para cada uno de los parámetros evaluados se encontró que existe diferencias significativas de los valores porcentuales entre el uso del diluyente de origen animal obteniéndose resultados óptimos en las características macroscópicas y microscópicas del material seminal tanto en valoración pre-refrigeración y post- refrigeración, mientras que con la utilización del diluyente de origen vegetal se obtuvo bajos resultados en las características microscópicas. Con estos resultados se comprueba que, al usar la muestra seminal con el diluyente de origen animal, produce mejores resultados durante la refrigeración con respecto al uso del diluyente de origen vegetal.

Palabras claves: Razas braquiocefálicas, motilidad, diluyente de origen animal, refrigeración, yema de huevo.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “EVALUATION OF THE EFFECT OF TWO COMMERCIAL DILUENTS ON REFRIGERATED CANINE SEMEN IN BRACHIOCEPHALIC BREEDS”.

Authors:

Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

ABSTRACT

Nowadays, the evaluation of effects of commercial diluents on canine semen refrigerated in brachiocephalic breeds such as the French bulldog, the Pekingese, Pug represents a crucial challenge in veterinary assisted reproduction. Specific anatomical data of these breeds, such as the facial structure characteristic that may predispose to respiratory and thermoregulatory problems highlight the need to optimize semen conservation techniques to improve sperm viability. Therefore, the objective of this research work is to evaluate the effect of two commercial diluents on canine refrigerated canine semen in brachiocephalic breeds. In the laboratory of Reproductive Biotechnology of the Technical University of Cotopaxi, 8 male randomly canines males of brachiocephalic and mixed dogs with ages ranging from 1 to 8 years old and in good health conditions were used. The seminal samples were extracted by manual collection technique, using the second fraction of the ejaculate, evaluated with the help of an electron microscope and a Neubauer chamber, the macroscopic characteristics such as volume, color, pH and microscopic characteristics were analyzed Pre-refrigeration and post-refrigeration evaluations were carried out, taking specific data with the two treatments that corresponded to a diluent of animal origin, to which animal protein such as egg yolk was added, and the second treatment corresponded to a diluent of vegetable origin. The data obtained during the experimental process were analyzed and processed with the help of the Excel program. For each of the parameters evaluated, it was found that there are significant differences in the percentage values between the use of diluent of animal origin, obtaining optimal results in the macroscopic and microscopic characteristics of the seminal material both in pre-assessment cooling and post-cooling, while the use of diluent from vegetal origin obtained low results in microscopic characteristics. These results show that the use of the seminal sample with the animal diluent produces better results during refrigeration that using the diluent of vegetable origin.

Keywords: brachiocephalic breeds, motility, diluent of animal origin, refrigeration, egg yolk.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	viii
AGRADECIMIENTO	ix
DEDICATORIA	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABLAS	xix
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	xx
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
1.1. Título del Proyecto	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1. Directos.....	3
3.2. Indirectos	3
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. General.....	4
5.2. Específicos.....	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	4
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	5
7.1. Anatomía del aparato reproductor del perro.....	6
7.1.1. Testículos.....	6
7.1.2. Escroto	6
7.1.3. Epidídimo	6
7.1.4. Conducto deferente.....	7
7.1.5. Próstata	7
7.1.6. Uretra	7
7.1.7. Pene	7

7.1.8.	Prepucio	8
7.2.	Endocrinología de la reproducción	8
7.2.1.	Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	9
7.2.2.	Hormona Folículo Estimulante y células de Sertolli	10
7.2.3.	Hormona Luteinizante (LH) y células de Leydig	11
7.2.4.	Testosterona	12
7.2.5.	Prolactina	12
7.3.	Fisiología del aparato reproductor del perro	13
7.3.1.	Espermatogénesis	13
7.3.2.	Termorregulación testicular	14
7.4.	Manejo del macho reproductor	15
7.4.1.	Anamnesis	15
7.4.2.	Reseña del animal	15
7.4.3.	Estado general	15
7.4.4.	Examen físico	15
7.4.5.	Pruebas complementarias y de laboratorio	16
7.4.6.	Examen andrológico	16
7.5.	Valoración del reproductor	17
1.1.	Eyaculación	17
7.6.	Métodos de extracción seminal	19
7.6.1.	Estimulación manual	19
7.6.2.	Vagina artificial	21
7.6.3.	Electroeyaculación	21
7.7.	Características semen canino	22
7.7.1.	Características macroscópicas	22
7.7.1.1.	Volumen	23
7.7.1.2.	Color	23
7.7.1.3.	pH	23
7.7.2.	Características microscópicas	23
7.7.2.1.	Motilidad	24
7.7.2.2.	Motilidad en masa	24
7.7.2.3.	Vigor	24
7.7.2.4.	Motilidad individual	25

7.7.2.5.	Morfología	25
7.7.2.6.	Morfo-anomalías	25
7.7.2.6.1.	Anormalidades primarias	26
7.7.2.6.2.	Anormalidades secundarias.....	26
7.7.2.7.	Concentración.....	27
7.7.3.	Factores que afectan las características del semen	28
7.7.3.1.	Pubertad.....	28
7.7.3.2.	Frecuencia de la eyaculación.....	28
7.7.3.3.	Tamaño testicular.....	29
7.8.	Diluyentes.....	29
7.8.1.	Características de los diluyentes.....	30
7.8.2.	Diluyente comercial de origen vegetal.....	30
7.8.3.	Diluyente comercial de origen animal.....	31
7.8.3.1.	7.9.3.1. Proteína (Yema de huevo).....	32
7.9.	Refrigeración del semen	32
8.	PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	34
8.1.	Hipótesis nula (H_0).....	34
8.2.	Hipótesis alternativa (H_a).....	34
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	34
9.1.	Métodos	34
9.2.	Ubicación.....	35
9.2.1.	Situación geográfica	35
9.2.2.	Límites.....	35
9.2.3.	Coordenadas	35
9.2.4.	Clima	36
9.3.	Instalaciones, Materiales y Equipos	36
9.3.1.	Instalaciones	36
9.3.2.	Materiales de oficina	36
9.3.3.	Equipos y materiales de laboratorio	36
9.3.4.	Materiales químicos.....	37
9.3.5.	Materiales biológicos.....	37
9.4.	Población de Estudio	37
9.5.	Metodología experimental.....	38

9.5.1.	Identificación del método de extracción de semen.....	38
9.5.2.	Adiestramiento de los caninos.....	38
9.5.3.	Recolección y evaluación de la muestra.....	39
9.5.4.	Selección y adquisición de diluyentes.....	40
9.5.5.	Preparación del semen con los diluyentes comerciales.....	40
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
11.	IMPACTOS.....	49
11.1.	Impacto Técnico.....	49
11.2.	Impacto Social.....	49
12.	CONCLUSIONES.....	50
13.	RECOMENDACIONES.....	50
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación endocrina y paracrina del testículo.	9
Figura 2. Sistema inhibina-activina-foliatina regulando la función de FSH.	11
Figura 6. Evaluación visual de las diferentes fracciones del eyaculado.	18
Figura 3. Embudos y tubos de plástico utilizados para la recogida seminal.	20
Figura 4. Estimulación manual sobre el glándulo del pene.	20
Figura 5. Materiales para una vagina artificial.	21
Figura 7. Anormalidades spermáticas.	27
Figura 8. Cámara de Neubauer para obtener la concentración espermática.	28
Figura 9. Localización del lugar.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de tareas en relación con los objetivos planteados.	4
Tabla 2. Registro de los caninos donadores de semen.	38
Tabla 3. Variables por evaluar en los eyaculados caninos.	39
Tabla 4. Esquema del experimento.	41
Tabla 5. Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.	42
Tabla 6. Evaluación de las características microscópica.	43
Tabla 7. Motilidad individual (%)	44
Tabla 8. Motilidad progresiva (%)	45
Tabla 9. Vigor espermático.	47

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y de origen vegetal la motilidad individual de espermatozoides de perros braquicéfalos.....	44
Diagrama 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y origen vegetal sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de perros braquicéfalos.....	46
Diagrama 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y sobre vigor de espermatozoides de perros braquicéfalos con el uso de diluyentes comerciales de origen vegetal y origen animal.	47

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Título del Proyecto

Evaluación del efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

Fecha de inicio: Octubre 2023

Fecha de finalización: Agosto 2024

Lugar de ejecución: Provincia Cotopaxi, Cantón Latacunga.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Recursos zoo-genéticos locales, conservación y desarrollo sostenible.

Equipo de Trabajo:

Tutora: Mvz. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

Estudiantes: Marcalla Constante Diana Mireya, Tulmo Segovia Consuelo Marilin

Área de Conocimiento: Ciencias Veterinarias, Genética

Línea de investigación: Análisis, conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad, fauna y recursos naturales para el desarrollo sustentable y la prevención de desastres naturales.

Sub líneas de investigación de la carrera: Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoo-genéticos.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El presente estudio se realizó con el propósito de evaluar la efectividad de diluyentes utilizados para preservar el semen canino refrigerado, asegurando simultáneamente altos niveles de motilidad y viabilidad espermática. El proceso de refrigeración reduce la tasa metabólica de los espermatozoides y prolonga su viabilidad. Los diluyentes empleados durante la refrigeración protegen las membranas espermáticas contra el daño inducido por cambios de temperatura, suministran energía y mantienen estables el pH y la presión osmótica (1).

Hasta hace poco, la inseminación artificial se realizaba únicamente con esperma fresco. Sin embargo, la práctica de usar esperma refrigerado ha ganado popularidad en muchos países europeos y en Estados Unidos, se ha convertido en una práctica habitual, pero esta tendencia aún no se ha extendido en América del Sur. La implementación de este método de conservación de semen presenta ventajas como un bajo costo, facilidad de manejo y requerimientos de infraestructura moderados. Estos factores podrían promover su adopción regular en América del Sur, mejorando así las oportunidades de utilizar semen de reproductores deseados (2).

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores permite preservar espermatozoides con alta capacidad fecundante durante un periodo suficiente para su transporte e inseminación en animales situados en localizaciones geográficas distantes (3).

El incremento del valor y las posibilidades de comercialización y distribución de los cachorros de pura raza genéticamente mejorados es de gran impacto y relevancia, así como el aumento de la importancia de la crianza de la especie canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas, bancos de semen crio-conservado e IA en esta especie (2).

La Inseminación Artificial (IA) ha contribuido significativamente al mejoramiento genético de los perros de raza pura. Gracias al desarrollo de esta tecnología junto con la crioconservación del semen, es posible distribuir material genético a nivel mundial utilizando diversas técnicas de congelación. Esto ayuda a evitar complicaciones como la incompatibilidad comportamental entre macho y hembra, la transmisión de enfermedades o patologías que afectan la reproducción, así como problemas asociados con el tamaño, el peso o la anatomía respiratoria en perros braquiocefálicos, que pueden resultar en dificultades cardiopulmonares y limitaciones para la monta natural (2).

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1.Directos

Todos los habitantes que formen parte del proyecto.

3.2.Indirectos

Estudiantes, docentes e investigadores de Medicina Veterinaria y carreras afines que desarrollen estudios futuros de la refrigeración de los espermatozoides en la especie canina.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la actualidad la valoración del efecto de diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas como el bulldog francés, pequinés, el pug representa un desafío crucial en la reproducción asistida veterinaria. Datos anatómicos específicos de estas razas, como la estructura facial característica que puede predisponer a problemas respiratorios y termorregulatorios, destacan la necesidad de optimizar técnicas de refrigeración y posterior conservación de semen para mejorar la viabilidad espermática. Los diluyentes comerciales, esenciales en la refrigeración del semen, varían en composición y pueden afectar significativamente las características espermáticas como, la motilidad, morfología y viabilidad espermática. La falta de estudios específicos que comparen directamente diluyentes comerciales en razas braquiocefálicas limita actualmente la aptitud de los médicos veterinarios para seleccionar el método más efectivo, exacerbando los desafíos inherentes a la reproducción en estas razas.

Dentro de una problemática crucial se incluye la necesidad de seleccionar diluyentes con composiciones químicas y osmolaridades adecuadas para mantener la viabilidad espermática durante la refrigeración, congelación y descongelación. La variabilidad en la respuesta de diferentes razas y condiciones individuales subraya la importancia de diluyentes que sean compatibles con diversas morfologías espermáticas y sensibilidades a condiciones ambientales. Además, la posible inducción de daño espermático por algunos diluyentes, junto con riesgos de contaminación bacteriana durante el manejo, son aspectos críticos que requieren atención para optimizar la calidad y la efectividad de los programas de reproducción asistida en caninos.

En el contexto ecuatoriano, la situación actual respecto a la criopreservación del semen canino en razas braquiocefálicas no difiere sustancialmente de las tendencias globales. Aunque los avances en técnicas de reproducción asistida han sido adoptados gradualmente, la

implementación específica y optimización de diluyentes comerciales en estas razas específicas aún no ha sido completamente explorada. La relevancia de abordar este problema radica en su potencial impacto en la mejora de las actividades de reproducción asistida veterinaria, beneficiando directamente tanto a criadores como a propietarios de mascotas interesados en mantener la diversidad genética y la salud reproductiva de razas braquiocefálicas populares.

5. OBJETIVOS

5.1.General

- Evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

5.2. Específicos

- Caracterizar macroscópica y microscópicamente el semen puro de los caninos.
- Determinar la calidad espermática de caninos de raza braquiocefálica y mestizos.
- Comparar la viabilidad espermática con el uso de dos diluyentes comerciales post refrigeración.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. Sistema de tareas en relación con los objetivos planteados.

Objetivo 1	Actividad (tareas)	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
Caracterizar macroscópica y microscópicamente el semen puro de los caninos.	Recolección de semen.	Muestras de semen	Masaje en la región dorso abdominal al macho. -guantes -tubos de Eppendorf

Determinar la calidad espermática de caninos de raza braquiocefálica y mestizos.	Observación microscópica	Datos de la viabilidad	Evaluación microscópica - Microscopio - Pipetas - Porta y cubre objetos
Comparar la viabilidad espermática con el uso de dos diluyentes comerciales post refrigeración.	Preparación los dos diluyentes comerciales.	Resultados del diluyente comercial.	-Diluyente - yema de huevo - semen - Refrigeradora

Fuente: Directa

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización de este para realizar IA con semen fresco o criopreservado. Actualmente, la inseminación artificial (IA) se lleva a cabo utilizando semen fresco, refrigerado o congelado, cada uno de los cuales ofrece diferentes oportunidades de aplicación y requiere distintos niveles de complejidad en su manejo. En Sudamérica, la IA con semen fresco se realiza esporádicamente; sin embargo, su uso ha incrementado en la última década, correlacionándose con el avance de la clínica reproductiva canina y el aumento de reproductores de razas en las cuales el servicio natural presenta dificultades. Aunque la IA con semen refrigerado o criopreservado es una práctica común en Europa y Estados Unidos, su aplicación sigue siendo limitada en Sudamérica. Dado el bajo nivel de complejidad requerido para implementar esta técnica con semen fresco o refrigerado, y las ventajas que ofrece, es probable que su uso se generalice en un futuro cercano, siempre que se promueva adecuadamente la técnica, su manejo y sus aplicaciones (4).

La recolección de semen en caninos es una práctica que ofrece importantes ventajas en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede variar en complejidad, desde moderada hasta alta, y en costo, de bajo a medio, dependiendo de la técnica empleada y del tipo de semen utilizado (fresco, refrigerado o congelado). En cada caso, proporciona diversas oportunidades, aportando siempre significativos beneficios para la reproducción canina (5).

7.1. Anatomía del aparato reproductor del perro

El aparato reproductor del macho canino es una agrupación de órganos encargados de constituir un sistema con un fin en común, en este caso la reproducción. Los mismos se clasifican, según su localización anatómica, en genitales internos que comprenden conductos deferentes, próstata y uretra pélvica y genitales externos testículos, epidídimo, pene y prepucio. El testículo también se considera el órgano reproductor primario, mientras que los conductos excretores, las glándulas accesorias, el pene y el prepucio se consideran órganos reproductores secundarios (3).

7.1.1. Testículos

Son dos estructuras ovaladas situadas entre las extremidades posteriores dentro del escroto, variando de tamaño según el peso corporal del animal. Presentan su eje largo anteroposterior en posición oblicua y en dirección dorso caudal. Cada testículo tiene un polo craneal y un polo caudal y dos caras, una lateral y otra medial. Son considerados los principales órganos reproductores masculinos debido a su función, ya que allí se producen espermatozoides y testosterona. También son productores de otras hormonas como la inhibina y los estrógenos; proteína, que es necesaria para el funcionamiento de los espermatozoides; y líquido que funciona como vehículo para los espermatozoides (6).

7.1.2. Escroto

Es una capa epitelial que funciona para cubrir y brindar protección a los testículos. Consiste en la piel que forma la pared exterior del escroto, teniendo un rafe que representa la línea medial de la estructura. La túnica interior se llama Dartos y está formada por tejido conectivo simple. En el interior, el escroto se divide en izquierdo y derecho (7).

7.1.3. Epidídimo

Es un largo tubo que almacena y transporta los espermatozoides, se encuentra ubicada sobre la superficie dorsolateral del testículo, se divide en cabeza, cuerpo y cola, su cabeza se sitúa en el polo craneal del testículo y discurre de medial a lateral para luego continuar con el cuerpo, el cual atraviesa por la superficie dorsolateral, y con la cola, que está unida a la parte caudal del testículo por el propio ligamento del testículo. La función principal es brindar a la carga espermática el ambiente necesario para su maduración otorgándoles motilidad y potencial de fertilidad; además de ser el reservorio de estos (7).

7.1.4. Conducto deferente

Se origina en la cola del epidídimo y asciende como componente del cordón espermático, ingresando a la cavidad abdominal por mediación del canal inguinal. También hay que mencionar que su función es transporte de espermatozoides (7).

7.1.5. Próstata

Es la única glándula accesoria del perro macho. Consta de dos lóbulos, uno derecho y otro izquierdo, separados por un tabique fibroso medio. Está cubierto por una cápsula gruesa que contiene músculo liso y estroma. Se encuentra próximo al cuello de la vejiga, en la unión con la uretra, al nivel del borde del cráneo del hueso púbico. Dependiendo de su tamaño, se conecta dorsalmente al recto y ventralmente con la sínfisis púbica o a la pared abdominal ventral, ya que migra cranealmente consecuentemente a medida que la glándula aumenta de tamaño. Tiene numerosos conductos prostáticos que vierten su contenido dentro de la uretra protática cerca de la abertura de los conductos deferentes, formando los colículos seminales. Su morfología y peso varían relativamente con la edad y estimulación hormonal ya que es un órgano dependiente de andrógenos (8).

7.1.6. Uretra

En su primera sección, se dispersa a lo largo de la zona pélvica, es decir, la uretra pélvica y una parte que continúa por el pene, esto es la uretra peneana o esponjosa, la función es mixta, porque funciona para transportar la orina desde la vejiga y también para transportar los espermatozoides y el líquido prostático durante la eyaculación (9).

7.1.7. Pene

El pene es el órgano copulador masculino, consta de raíces, cuerpos y glande. Dentro de su parte proximal, a nivel de la raíz, se encuentran dos cuerpos cavernosos independizados por un tabique mediano y rodeados por una túnica albugínea gruesa y también por un músculo isquiocavernoso. La raíz del pene está unida al arco isquiático entre las tuberosidades isquiáticas. El cuerpo tiene dos cuerpos eréctiles separados por un tabique central de tejido conectivo y comenzando en la cohesión de dos pilares. Dentro del cuerpo del pene, en la parte ventral, se encuentra la uretra rodeada por el cuerpo esponjoso. La parte distal del pene está formada por el glande. El glande tiene dos partes anatómicas, la parte proximal es el bulbo glandular que es una extensión de tejido esponjoso, y la parte más distal y final del pene es la parte que es alargada, de forma cilíndrica y con un extremo libre puntiagudo (9).

7.1.8. Prepucio

Esta es una membrana tubular que comienza y es continuación de la piel del abdomen y recubre todo el pene flácido. Tiene una mucosa interna lisa y una capa de piel externa cubierta de pelos que convergen en el prepucio. Segrega un líquido verdoso llamado esmegma, que lubrica el pene y es completamente normal (9).

7.2. Endocrinología de la reproducción

La endocrinología de la reproducción en el macho canino regula la producción de espermatozoides y el comportamiento sexual mediante un complejo equilibrio hormonal. El hipotálamo secreta la Gonadotropina Liberadora de Hormona (GnRH), que estimula a la hipófisis para liberar la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH). La LH actúa sobre las células de Leydig en los testículos, promoviendo la producción de testosterona, la hormona clave para el desarrollo de características sexuales secundarias, la libido y la espermatogénesis. La FSH, junto con la testosterona, estimula las células de Sertoli en los túbulos seminíferos, facilitando la producción y maduración de espermatozoides (10).

La testosterona, además de sus funciones reproductivas, participa en mecanismos de retroalimentación negativa, regulando la secreción de GnRH, LH y FSH para mantener el equilibrio hormonal. La inhibina, producida por las células de Sertoli, también regula la FSH, evitando la sobreproducción de espermatozoides. Este sistema hormonal asegura la fertilidad y el comportamiento sexual del macho canino, siendo fundamental para el éxito reproductivo (10).

La función de los testículos es regulada por el sistema nervioso central a través de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, las cuales interactúan con receptores específicos ubicados en las células de Leydig y Sertoli, respectivamente. La producción y liberación de LH y FSH están controladas por la GnRH, una hormona sintetizada en el hipotálamo que llega a la hipófisis mediante el sistema porta hipofisario, donde se une a su receptor en las células gonadotropas de la hipófisis. Aunque la GnRH no parece ser esencial para el desarrollo gonadal durante la etapa fetal, su función se vuelve crucial desde la pubertad, participando en la espermatogénesis, la esteroidogénesis y en los mecanismos de retroalimentación que regulan las hormonas esteroideas producidas en las gónadas (11).

7.2.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un péptido compuesto por diez aminoácidos que regula la función reproductiva en casi todos los vertebrados. Esta hormona es sintetizada por neuronas en el hipotálamo y liberada en los vasos sanguíneos de la eminencia media. Su función principal es controlar la producción y liberación de las hormonas gonadotróficas en la hipófisis, específicamente la (FSH) y (LH) (12).

Estas hormonas a su vez son responsables de iniciar y regular los procesos de producción de esteroides y desarrollo de gametos en las gónadas (12).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se produce en el hipotálamo, situado en la base del encéfalo, y se transporta hacia la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos.

Esta hormona regula de manera específica la liberación de (FSH) y (LH), las cuales desempeñan un importante papel en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (13).

La GnRH se descarga en pulsos aproximadamente cada dos horas, y su secreción puede ser estimulada por la noradrenalina y el estradiol. Además, factores como las feromonas, que actúan sobre el bulbo olfatorio, y señales lumínicas que afectan la retina, también influyen en la liberación de GnRH. Por otro lado, la dopamina, los opioides y las endorfinas tienen un efecto inhibitorio sobre la liberación de esta hormona. Además, el estrés y el uso prolongado de corticosteroides ejercen una retroalimentación negativa sobre la producción de GnRH por parte del hipotálamo. En presencia de altos niveles de estradiol, la GnRH favorece la producción de LH en lugar de FSH. En contraste, niveles elevados de progesterona y bajos de estrógenos promueven la productividad de FSH por parte del hipotálamo (13).

La Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) desempeña un papel fundamental en los procesos de espermatogénesis y esteroidogénesis, así como en las reacciones de retroalimentación que regulan las hormonas esteroides producidas en las gónadas (14).

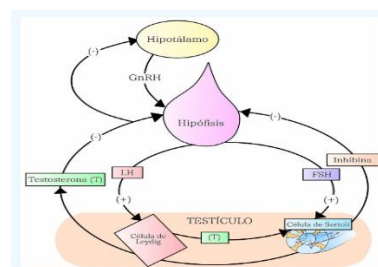


Figura 1. Regulación endocrina y paracrina del testículo.

Fuente: (11).

7.2.2. Hormona Folículo Estimulante y células de Sertoli.

La hormona que induce el crecimiento de los folículos en el ovario y la secreción de estrógenos es la (FSH). En el testículo, por otro lado, estimula la espermatogénesis al favorecer la síntesis proteica en los espermatoцитos primarios. Esta hormona es producida en el lóbulo anterior de la hipófisis (15).

Químicamente, la FSH se define como una glucoproteína que consta de dos cadenas peptídicas, denominadas alfa (α) y beta (β). La cadena alfa es compartida con otras dos hormonas hipofisarias, (LH) y (TSH). La regulación de la FSH involucra la (GnRH), así como los estrógenos y la inhibina. Estas interacciones y las variaciones en los niveles de estas hormonas son cruciales para determinar las diferentes etapas del ciclo estral en los mamíferos (15).

La Hormona Folículo Estimulante promueve la proliferación de las células de Sertoli, y en colaboración con la testosterona, es crucial para mantener la espermatogénesis. Cuando la FSH se une a su receptor específico en la membrana de las células de Sertoli, estimula la producción de inhibina. Esta hormona ejerce una retroalimentación negativa en la hipófisis para reducir la secreción de FSH. Además, la inhibina tiene una acción antagonista respecto a la activina, que estimula la formulación y secreción de FSH (15).

La activina, a su vez, está regulada por la folistatina, una proteína que se une a las subunidades de activina, bloqueando su interacción con los receptores y, por lo tanto, inhibiendo la liberación de FSH (15).

Las células de Sertoli son el órgano blanco tanto de la (FSH) como de la testosterona. Poseen receptores de membrana para la FSH y receptores nucleares para la testosterona. La FSH estimula a las células de Sertoli a producir una proteína llamada proteína ligadora de andrógeno (ABP), la cual es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz de los túbulos seminíferos. Las investigaciones sugieren que la ABP contribuye a mantener concentraciones elevadas de andrógenos en los túbulos seminíferos, lo cual es crucial para el desarrollo normal de la espermatogénesis y la función general de las células de Sertoli (16).

Las células de Sertoli son responsables de la producción de Inhibina, una hormona proteica que ejerce un efecto supresor sobre la secreción de (FSH), posiblemente actuando directamente en las células de la hipófisis (16).

Existen pocos estudios sobre el mecanismo exacto de acción de la inhibina. La FSH es crucial para iniciar la espermatogénesis durante la pubertad, pero una vez iniciada, la FSH parece no ser esencial para mantener este proceso, excepto en situaciones fisiológicas donde se

interrumpe, como bajo el efecto inhibitorio del fotoperíodo, donde se vuelve necesario para continuar con la espermatogénesis (16).

Cada célula de Sertoli es capaz de soportar el desarrollo de un número determinado de células germinales hasta convertirlas en espermatozoides; por lo tanto, teóricamente, el número de células de Sertoli presentes en el testículo determina la capacidad máxima de producción de espermatozoides (16).

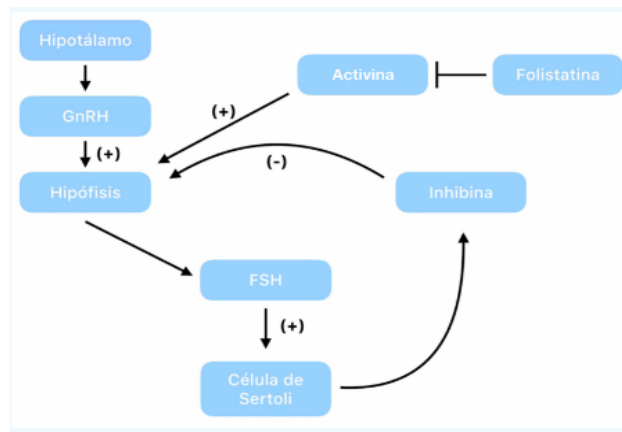


Figura 2. Sistema inhibina-activina-folistatina regulando la función de FSH.

Fuente: (11).

7.2.3. Hormona Luteinizante (LH) y células de Leydig

La hormona luteinizante (LH) es una glucoproteína formada también por dos subunidades, α y β , siendo la cadena α idéntica a la de la FSH. En las hembras, se produce un aumento máximo en la secreción de hormona luteinizante (LH) poco antes de la ovulación. Este incremento hormonal es crucial ya que desencadena la maduración final del ovocito, la ruptura del folículo ovárico y la liberación del gameto femenino hacia el oviducto (17).

Se encuentra en niveles máximos al final del estro esta produce en el lóbulo anterior de la hipófisis. La LH estimula la secreción de andrógenos tanto en las células tecales del ovario como en células intersticiales (Leydig) del testículo y la secreción de progesterona de las células granulosas del ovario (17).

En los machos, la Hormona Luteinizante (LH) desempeña un papel crucial al estimular las células intersticiales (células de Leydig) en los testículos, promoviendo así la producción de testosterona y dihidrotestosterona. Por esta razón, también se conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH). Durante la pubertad, niveles elevados de LH incitan a los testículos a sintetizar testosterona, lo cual es fundamental para la maduración de los espermatozoides (13).

Además, la influencia de la (LH) sobre las células de Leydig puede ser amplificada por la presencia de otras hormonas, como la Prolactina (PRL). La deficiencia de PRL puede causar infertilidad y atrofia testicular, mientras que aumentar significativamente los niveles de prolactina mediante terapias controladas que estimularán la producción espermática y restablece los niveles de testosterona en la sangre. No obstante, niveles elevados de PRL en la sangre pueden inhibir el trabajo testicular y provocar hipogonadismo (16).

Las células de Leydig, también conocidas como células intersticiales, se localizan en el espacio intersticial del testículo, fuera de los túbulos seminíferos. Su función principal es la síntesis de testosterona, crucial para mantener la espermatogénesis. La producción de testosterona está regulada por la Hormona Luteinizante (LH), que se une a los receptores de membrana en las células de Leydig, activando la vía del AMP cíclico (cAMP). Este proceso activa enzimas llamadas proteinquinasas, las cuales catalizan la fosforilación de proteínas dentro de la célula y la conversión de colesterol en pregnenolona, un precursor clave de los esteroides. En ausencia de LH, la producción de testosterona se detiene y las células de Leydig experimentan una notable reducción en tamaño (16).

7.2.4. Testosterona

La testosterona sintetizada por las células de Leydig se transporta hacia los túbulos seminíferos, donde es crucial para promover la espermatogénesis mediante procesos de difusión simple y difusión facilitada. La adecuada espermatogénesis, especialmente durante la fase de meiosis, es esencial para la producción de espermatozoides. Por otro lado, la testosterona tiene un impacto significativo en la libido, la función secretora de los órganos genitales, y en el desarrollo de las características sexuales secundarias y del fenotipo masculino (16).

La testosterona tiene un efecto estimulante en la supervivencia de las células germinales, y la investigación indica que la apoptosis de estas células ocurre después de una disminución en los niveles de esta hormona. La presencia constante de Hormona Luteinizante (LH) es fundamental para el desarrollo normal de la actividad de espermatogénesis (16).

7.2.5. Prolactina

La prolactina es una hormona compuesta por péptidos, principalmente producida por las células lactotropas localizadas en la adenohipófisis. Conforme se ha profundizado en el entendimiento de su fisiología y bioquímica, se ha revelado que esta hormona desempeña más de 300 funciones en diversos tejidos y órganos del cuerpo humano, lo que la caracteriza como una-

hormona con efectos pleiotrópicos. Además de regular la producción de leche, la prolactina también influye en diferentes aspectos del organismo, agrupados en áreas como la regulación del equilibrio hídrico y electrolítico, el crecimiento y desarrollo, funciones endocrinas y metabólicas, el comportamiento y funciones cerebrales, la reproducción, así como la modulación del sistema inmunológico y la protección del cuerpo (18).

La Prolactina estimula la espermatogénesis al aumentar los receptores para la Hormona Luteinizante (LH) en las células de Leydig, según estudios realizados. Esta hormona desempeña un papel crucial durante el periodo de recuperación de las células de Leydig antes del inicio de la temporada reproductiva, facilitando el desarrollo de la capacidad de estas células para responder de manera más efectiva al incremento de LH (16).

7.3. Fisiología del aparato reproductor del perro

La fisiología del macho canino en términos reproductivos se centra en la producción, maduración y liberación de espermatozoides, así como en la secreción de hormonas que regulan estos procesos. Los testículos son los órganos principales responsables de la producción de espermatozoides y de la síntesis de testosterona, la hormona masculina clave. La testosterona es fundamental para el desarrollo de características sexuales secundarias, el mantenimiento del comportamiento sexual, y la regulación de la espermatogénesis (19).

7.3.1. Espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis, que tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos, implica la producción de espermatozoides (gametos masculinos). Las espermatogonias, células precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal en mitosis para generar espermaticitos. Estos espermaticitos luego se dividen mediante meiosis, reduciendo su número de cromosomas a la mitad (haploides con 39 cromosomas) y formando espermátidas (20).

Las espermátidas experimentan una reestructuración significativa, en la cual el núcleo se convierte en la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centriolos contribuyen al desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma residual es absorbida por las células de Sertoli, situadas sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, que regulan la metamorfosis de espermátidas a espermatozoides (20).

La espermatogénesis inicia a los 4 meses de edad, aunque los espermatozoides no están presentes en el eyaculado hasta los 10-12 meses. En los machos reproductores, la producción de semen es proporcional al tamaño testicular. El semen se almacena en los compartimentos

extragonadales del epidídimo y el conducto deferente, y la cantidad reservada depende de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones. La eyaculación frecuente puede disminuir la calidad del semen, ya que vacía las reservas espermáticas, como se observa con una eyaculación diaria durante 5 a 7 días. Una vez agotadas las reservas, la cantidad de espermatozoides depende únicamente de la producción diaria testicular. Por esta razón, la recolección de semen se recomienda cada dos días para permitir la reposición de las reservas espermáticas (21).

Existen escasas evidencias que respalden que el eyaculado de un canino con infrecuente actividad de cubrición contenga una elevada proporción de espermatozoides anormales. En cambio, los machos sometidos a alta demanda reproductiva pueden experimentar periodos de fertilidad subóptima en ciertas fases de su vida reproductiva. (22).

El ciclo completo de la espermatogénesis, desde la división de las espermatogonias hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tiene una duración de 8 semanas, de las cuales 2 semanas son necesarias para la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (22).

7.3.2. Termorregulación testicular

Para que la espermatogénesis se produzca correctamente, la temperatura de los testículos en la mayoría de los mamíferos debe ser 2 grados inferior a la del cuerpo (23).

- Ocurre en el plexo pampiniforme, donde la vena y la arteria testicular están profundamente conectadas, provocando que la sangre arterial con temperatura corporal se enfríe gracias a la sangre venosa proveniente del testículo a menor temperatura (23).
- La constante contracción y relajación del músculo cremáster asegura que el sistema vascular funcione correctamente y que la temperatura corporal esté controlada.
- La difusión de la temperatura hacia el exterior a través de la túnica dartos, que está estrechamente conectada con la túnica vaginal parietal y visceral, contribuye a la termorregulación.
- Las glándulas sudoríparas permiten una disminución de la temperatura cuando hay un aumento de temperatura a nivel del cuerpo o del escroto gracias al hipotálamo, que al detectarse desencadena la sudoración en el escroto (23).

Durante las últimas dos semanas, los espermatozoides completan su maduración en el epidídimo, llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo y completan su maduración durante su paso por el epidídimo (23).

Al entrar en los conductos deferentes, pierden la gota citoplasmática restante y esta es expulsada de los espermatozoides o migra al extremo distal y luego se considera madura. Un extremo del epidídimo se vuelve más delgado y se convierte en el conducto deferente, lo que permite que los espermatozoides salgan del escroto (23).

7.4. Manejo del macho reproductor

El manejo reproductivo se considera crucial en la reproducción asistida de perros, siendo los errores en este manejo responsables de la mayoría de los problemas reproductivos encontrados en clínicas veterinarias (24). Es fundamental elaborar un protocolo de evaluación clínica exhaustiva para los machos reproductores caninos, el cual incluye:

7.4.1. Anamnesis

Información proporcionada por el propietario o responsable del animal mediante preguntas estructuradas permite obtener diversos antecedentes que pueden guiar u orientar sobre las posibles enfermedades que el animal ha padecido o podría haber experimentado (24).

7.4.2. Reseña del animal

Se recopilan datos importantes como la especie del animal, su edad aparente y real, raza, sexo, color y peso. Estos detalles son fundamentales para la evaluación clínica general del animal y para la orientación sobre posibles condiciones médicas que pueda tener o haber tenido (24).

7.4.3. Estado general

Además de los datos básicos mencionados anteriormente, es crucial evaluar la constitución y temperamento del animal, clasificándose como asténico (nervioso), apoplético (sanguíneo) o linfático. También se deben observar las actitudes y comportamientos del animal, así como realizar una inspección general detallada. Estos aspectos proporcionan una comprensión más completa de la salud y el estado general del animal reproductor canino (24).

7.4.4. Examen físico

Es esencial realizar una evaluación de la piel, los ganglios linfáticos, las membranas mucosas, la temperatura corporal y llevar a cabo un examen exhaustivo por sistemas. Estos procedimientos son fundamentales en la evaluación clínica global del macho canino reproductor para identificar posibles anomalías y dirigir adecuadamente el manejo reproductivo asistido (24).

7.4.5. Pruebas complementarias y de laboratorio

Siempre es recomendable integrar el examen físico (semiológico) con los hallazgos obtenidos en pruebas radiográficas o de laboratorio, como el hemograma, la bioquímica sanguínea, los cultivos, entre otras. Esta integración proporciona una evaluación más completa y precisa del estado de salud del macho canino reproductor, facilitando así decisiones informadas en el manejo de la reproducción asistida (24).

7.4.6. Examen andrológico

Un examen andrológico se realiza preferentemente en una sala protectora y consta de tres partes importantes: un examen físico, un examen transrectal de los genitales internos y una evaluación del semen. La morfología y la bioquímica de los espermatozoides se examinan en primer lugar mediante todas las pruebas que se utilizan habitualmente en los laboratorios. Es importante señalar que la fertilidad de una muestra de esperma depende de dos factores: la calidad del esperma y la cantidad de espermatozoides normales. Básicamente, dos características para determinar la calidad del esperma son la viabilidad y la morfología espermática (25).

Al inspeccionar el escroto mediante inspección y palpación, es necesario evaluar el color de la piel, la presencia de lesiones y la elasticidad. Se debe evaluar el número, ubicación, consistencia y sensibilidad de los testículos. Normalmente son firmes y regordetes y volverán a su forma natural cuando los sostengas. Si él se siente plano, puede sugerir hipoplasia y si está muy rígido, puede indicar signos de fibrosis. Se examina la anatomía del glande en busca de secreciones anormales, lesiones o tumores. Y finalmente, verás que el prepucio cubre completamente el pene, sin llagas ni desgarros, permitiendo la entrada y salida normal del pene. Es normal observar una secreción purulenta de color verde moderado, que se debe a la regeneración celular de la mucosa del prepucio (2).

El éxito de la reproducción en caninos está estrechamente ligado a los siguientes factores:

- 1) La salud y la nutrición de los reproductores.
- 2) La detección precisa del momento de máxima fertilidad de la hembra.
- 3) El tipo, manejo y calidad del semen empleado.
- 4) La implementación correcta de técnicas de inseminación artificial (IA).

Estos elementos son cruciales para optimizar las probabilidades de éxito en los programas de reproducción asistida en perros (13).

7.5. Valoración del reproductor

La evaluación del potencial reproductivo de los perros machos es una parte necesaria de un programa reproductivo satisfactorio y la selección de los perros reproductores depende de:

- Capacidad física para copular.
- Su comportamiento durante la cópula (la libido).
- Recogida de muestras de semen normal.

Si alguno de estos factores falla, las posibilidades de que una perra criada o inseminada artificialmente (IA) quede preñada disminuyen. Desde el punto de vista físico, una nutrición adecuada y el ejercicio son fundamentales para garantizar la fertilidad masculina. Los machos utilizados para la reproducción deben someterse a un examen físico completo para su evaluación. Realizar exámenes ortopédicos, neurológicos, endocrinos y del sistema reproductivo antes del apareamiento o la inseminación artificial (13).

1.1. Eyaculación

La eyaculación no es más que la expulsión de líquido biológico al exterior mediante un reflejo en el que se contraen los elementos que componen el aparato reproductor. Dependiendo de la especie animal, existen diferentes tipos de eyaculación. En los perros se trata de un eyaculado trifásico, es decir, que consta de tres fracciones con una duración total de unos 22 minutos (26).

La erección en el perro ocurre fundamentalmente por un aumento en la turgencia debido a que existe más entrada que salida de sangre, generando un aumento de la presión dentro del sistema circulatorio peneano. La estimulación producida por los nervios pélvicos y sacros origina la dilatación de las arterias externas e internas a nivel del cuerpo cavernoso del pene. Asimismo gracias a la contracción de los músculos isquiocavernosos, el retorno venoso del cuerpo cavernoso es restringido, permitiendo que la sangre quede retenida en el interior de este tejido causando un aumento de volumen del bulbo del pene y un alargamiento del glande, haciendo que este se deslice hacia adelante (26).

La eyaculación se produce tras la estimulación de los nervios simpáticos en el pene, que generan contracciones peristálticas en los músculos bulbo-cavernoso e isquiocavernoso que rodean a la uretra a nivel del bulbo del glande. Por su parte, los conductos deferentes son los encargados de transportar los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta el pene a través de la uretra, desembocando en la próstata craneal. Las contracciones originadas por dichos músculos sobre la uretra permiten la expulsión del semen (26).

La primera fracción o fracción pre espermática procede de la próstata y se caracteriza por tener escasos espermatozoides e incluso una ausencia completa de ellos. Tiene una consistencia acuosa, transparente, se presenta en el principio la erección es muy rápida y corta corresponde al 2% o 3% del volumen total. Se excreta rápidamente en 30 a 1 minuto y su función es limpiar y eliminar todos los posibles residuos de orina y contaminación de la uretra (26).

La segunda fracción proviene del epidídimo y es más retardada y lenta por contener espermatozoides tiene un color que varía entre el blanco lechoso y el gris, por lo que su consistencia es más viscosa que la anterior. El tiempo de emisión es de 1 a 2 minutos. Esta fracción es rica en espermatozoides (26).

La tercera fracción o fracción prostática es liberada lentamente durante varios minutos, la secreción tiene una consistencia acuosa se crea después de la fracción de esperma, tiene un color transparente y se añade cuando los animales se unen en direcciones opuestas. Esta proporción representa el 90% del volumen total de la eyaculación, y su eliminación puede durar de 3 a 30 minutos (26).



Figura 3. Evaluación visual de las diferentes fracciones del eyaculado.

Fuente: (26).

Durante las últimas dos semanas, los espermatozoides completan su maduración en el epidídimo, llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo y completan su maduración durante su paso por el epidídimo (23).

Al entrar en los conductos deferentes, pierden la gota citoplasmática restante y esta es expulsada de los espermatozoides o migra al extremo distal y luego se considera madura. Un extremo del epidídimo se vuelve más delgado y se convierte en el conducto deferente, lo que permite que los espermatozoides salgan del escroto (23).

7.6. Métodos de extracción seminal

La recolección de semen se realiza habitualmente mediante masturbación, aunque la electroeyaculación puede ser empleada en animales extremadamente agresivos o en aquellos que no logran eyacular mediante la técnica manual. La recolección de la fracción espermática es suficiente para llevar a cabo la inseminación artificial; parte de la fracción prostática puede también ser recolectada únicamente para garantizar que se ha obtenido completamente la segunda fracción (4).

7.6.1. Estimulación manual

Es el método más utilizado en la especie canina y se desarrolla mediante la estimulación manual del bulbo del pene. Siempre que sea posible es recomendable la presencia de una hembra en celo. Para conseguir un mayor grado de excitación puede permitirse la presencia de una hembra en celo, y que el macho olfatee la región vulvar, incluso que dé un salto sobre ella, con objeto de obtener la estimulación necesaria que facilite la recogida. Es la mejor técnica en machos muy jóvenes o sin excesiva experiencia sexual. Cuando no se dispone de hembra, es factible el uso de gasas o algodones impregnados en secreciones vaginales de una hembra en celo, que pueden guardarse congelados y ser descongelados 15 min antes de su uso. También puede ser útil recoger la orina de una perra en celo y congelarla, y proceder a descongelarla cuando sea preciso (26).

También se puede recurrir a una hembra sumisa, a la que, si es posible, se le impregna la cola con secreciones u orina de una hembra en celo, si no resulta posible disponer de monturas vivas, se puede llevar a cabo una estimulación manual del bulbo del pene, aunque el macho no esté previamente excitado, consiguiendo en machos entrenados que el bulbo se estimule con bastante facilidad aunque no esté presente una hembra en celo.

En cualquier caso, el procedimiento consiste en estimular el bulbo del pene y, una vez que se haya conseguido aumentar su tamaño un 40-50%, se exterioriza el bulbo fuera del prepucio. Es importante que el técnico deslice el prepucio hacia caudal antes de que el bulbo del glande se congestione totalmente. En aquellos casos en que el bulbo haya aumentado demasiado de tamaño y la abertura prepucial no permita su salida, debe detenerse la estimulación unos pocos minutos para permitir su detumescencia. Pasado este tiempo se puede volver a iniciar el proceso de estimulación (26).

Cuando se ha alcanzado un tamaño suficiente se realizan sobre el bulbo ligeras contracciones, simulando las que se producen de forma fisiológica en la vagina de la hembra; con ello se

consigue que la erección se complete. En este momento, muchos perros ya inician la eyaculación, si bien la mayoría requiere una rotación del pene en sentido caudal (180°); con esta rotación se consigue una oclusión de la vena emisaria del glande que impide que la erección disminuya. Una vez iniciada la eyaculación, el semen debe ser recogido en un recipiente previamente atemperado con una temperatura que oscile entre los 37°C , siendo el instrumental comúnmente usado un tubo de cristal acoplado a un embudo también de cristal, aunque puede utilizarse embudos de plástico (26).



Figura 4. Embudos y tubos de plástico utilizados para la recogida seminal.

Fuente: (26).



Figura 5. Estimulación manual sobre el glande del pene.

Fuente: (26).

De manera general, se intenta recoger las tres fracciones por separado, o al menos recoger de manera individual la fracción rica en semen. Finalizada la eyaculación, o tras haber obtenido la fracción de interés, la erección desaparece escasos minutos después de liberar el pene de la presión digital, si bien se considera interesante controlar que el pene vuelva a su información y localización normales en el interior del prepucio. En algunas ocasiones, el prepucio puede enrollarse sobre sí mismo e impedir el regreso del pene a su interior, lo que provoca sequedad y exposición de este a posibles traumas (26).

7.6.2. Vagina artificial

Está formada básicamente por un cilindro rígido de unos 15 cm de longitud que se encuentra rodeado por una camisa de caucho donde se deposita agua a 40 °C a través de una válvula; en algunos casos también es posible insuflar aire para aumentar la presión. En un extremo del cilindro se coloca un embudo de caucho que está unido a un tubo colector graduado a 37 °C, que se va cambiando conforme se van recogiendo las diferentes fracciones del eyaculado (27).

La técnica consiste en introducir el pene dentro de la vagina artificial cuando haya alcanzado más de un 50% de erección. El pene se coloca en el interior de la vagina una vez que está erecto y que se haya exteriorizado el bulbo, colocando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la vagina artificial hasta conseguir la eyaculación (27).



Figura 6. Materiales para una vagina artificial.

Fuente: (26).

7.6.3. Electroeyaculación.

La técnica de electroeyaculación consiste en obtener semen mediante la aplicación de un estímulo eléctrico. Este estímulo se administra a través de un electrodo que se inserta en el recto del animal. Este método facilita la recolección de semen de manera repetitiva en animales que están en cautiverio, en semicautiverio o en animales domésticos que no han sido entrenados para eyacular en una vagina artificial (28).

Un equipo de electroeyaculación está compuesto por varios elementos, que incluyen la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de la batería, el cable de alimentación, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el recipiente de recolección. facilitar la distribución de material genético valioso comercialmente, además de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades. Esta metodología se basa en la estimulación eléctrica aplicada a través de un transductor rectal, estimular los nervios pélvicos simpáticos y

parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección penénea y eyaculación (29).

La eyaculación es un proceso que ocurre en dos fases: primero se produce la emisión, seguida por la erección y la eyaculación en sí. Cuando se aplica una estimulación adecuada, esta se transmite a través del nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral. Desde allí, la respuesta viaja a través de los nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexo hipogástrico), lo que provoca la contracción de la musculatura lisa que rodea la próstata, las glándulas vesiculares y los conductos deferentes, asegurando el avance del semen hacia la uretra pélvica. Simultáneamente, la respuesta nerviosa también se transmite a través de los nervios parasimpáticos, lo que provoca la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso y uretral), resultando en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha (30).

Esta técnica se fundamenta en la aplicación regular de un estímulo eléctrico a través del recto, activando tanto el sistema nervioso autónomo como el somático. Esto provoca la secreción de fluidos de las glándulas accesorias y culmina en la eyaculación (29). El perro recibe un total de 240 estímulos eléctricos, divididos en 4 conjuntos de 60 estímulos y un voltaje de 6 V, el intervalo entre estímulos es de 3,0 segundos (2). Es un método experimental, que requiere anestesia general (31).

7.7. Características semen canino

La consideración de ciertos parámetros permitirá determinar el propósito de la eyaculación. Es decir, si el material seminal analizado cualitativamente, mediante evaluación macroscópica y microscópica, se encuentra en condiciones de ser procesado (2).

El análisis seminal, o espermiograma, comprende una serie de pruebas que evalúan diferentes factores y funciones de las células espermáticas. A partir de este análisis, se determina si la muestra es apta o no para su uso en inseminación artificial. El análisis rutinario incluye tanto un examen macroscópico como microscópico del eyaculado, en el cual se evalúan el volumen, la concentración, la motilidad, el estado del acrosoma y las anomalías morfológicas de los espermatozoides (32).

7.7.1. Características macroscópicas

En la evaluación macroscópica se lleva a cabo una observación inicial de la apariencia general del eyaculado, enfocándose en su consistencia, olor y volumen (33). El análisis macroscópico

del semen implica examinar las características fundamentales del eyaculado a simple vista, sin necesidad de utilizar un microscopio (34). Entre los aspectos seminales macroscópicos más relevantes se incluyen los siguientes:

7.7.1.1. Volumen

El volumen de eyaculado variará dependiendo de diversos factores como raza, edad, tamaño del animal, edad, tipo de comida, excitación, experiencia, etc. Según varios estudios realizados en razas de diferentes tamaños, se ha encontrado que, en perros pequeños como Chihuahua, Pequinés, Pincher, Schnauzer Miniatura, etc. el volumen es de aproximadamente 1,5 a 5,0 ml (2).

7.7.1.2. Color

El color normal del semen varía desde el gris transparente hasta el blanco lechoso, esta variación depende directamente de la concentración de espermatozoides. Un color anormal debería alertarte de un problema en el tracto genital masculino, por ejemplo, el rojo indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie del pene o de la próstata, el amarillo indica la presencia de orina y las partículas blancas indican la presencia de leucocitos (35).

7.7.1.3. pH

El pH debe medirse inmediatamente después de la recolección del eyaculado. Para ello se aplica una gota de esperma sobre un papel de pH y se lee al cabo de 30 segundos. El pH normal del semen canino está en el rango de 6,3 a 7 y depende de la cantidad de líquido. Una caída del pH puede deberse a una eyaculación incompleta o a una inflamación de los testículos y el epidídimo (36).

7.7.2. Características microscópicas

El análisis microscópico del semen permite evaluar la movilidad, vitalidad, concentración y morfología de los espermatozoides, además de detectar la presencia de células y/o elementos acompañantes distintos a los espermatozoides, como leucocitos, células progenitoras espermáticas, células inflamatorias, bacterias y cristales (37).

En el análisis microscópico inicial, es esencial evaluar la presencia de células no espermáticas, leucocitos, filamentos de moco, cristales (como el fosfato de espermina), hematíes, espermatozoides aglutinados y otros elementos, como: *Trichomonas vaginalis* y levaduras (37).

7.7.2.1. Motilidad

Es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizar y deberá evaluarse a 37°C (35).

En la valoración de la motilidad tomamos en cuenta la motilidad masal y la individual. Puede alterarse por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección El valor normal de la motilidad del semen fresco en los perros oscila entre 85- 95% (38).

Cuando se habla de la motilidad del semen después de la congelación, se considera que tiene buena calidad si los valores son superiores al 50%. Se ha comprobado que 200 x 10⁶ espermatozoides móviles en fresco, es un buen valor para obtener tasas de fertilidad comparables a los obtenidos mediante monta natural. Al usar semen congelado y realizar una inseminación intrauterina se recomiendan que entre 150-200 x 10⁶ espermatozoides sean móviles (38).

7.7.2.2. 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 (31).

Calificación

5Muy 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 (31).

7.7.2.3.Vigor

Es una medida que indica la intensidad del desplazamiento progresivo en línea recta, y se evalúa utilizando la misma preparación que se emplea para analizar el movimiento individual (32). Es considerable porque entre mayor vigor mayor vitalidad posee el esperma (39). Para la

evaluación del vigor, hay que tener en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de olas (40). La clasificación se realizó según lo propuesto por Restrepo et al de 1-5 (1 malo 5 excelente), evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3 (41).

7.7.2.4. 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 (31).

Calificación

Muy buena (80-100%) (38).

Buena (60-79%)

Regular (40-59%)

Pobre (<40%)

7.7.2.5. Morfología

Es importante en la valoración de la fertilidad, con el fin de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anormalidades. Existe una alta correlación entre los defectos espermáticos e infertilidad (38).

La tinción más utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. Otra técnica de tinción es la de la de Azul de metileno, que de igual manera sirve para la viabilidad seminal y evaluación de las membranas, ayudándonos a diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (38).

7.7.2.6. Morfo-anomalías

Las anormalidades de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anormalidades en primarias y secundarias. La suma entre anormalidades primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20%, para poder considerar un semen apto para usar (31).

7.7.2.6.1. Anormalidades primarias

Ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden manifestarse a nivel del acrosoma (como pérdida del borde apical, abultamiento, arrugamiento, incompleto o desdoblado), de la cabeza (piriforme, flagelada, lanceolada, irregular, angosta, doble, macrocéfalo, microcéfalo), del cuello (con fractura, retroacción o presencia de gota citoplasmática), y de la cola (corta, doble, retorcida o con gota citoplasmática) (42).

- Doble flagelo (13).
- Cola doblada.
- Microcéfalo.
- Macrocéfalo.
- Cabeza alargada.
- Cabeza doble.
- Cabeza periforme

7.7.2.6.2. Anormalidades secundarias

Se producen durante el transporte de los espermatozoides desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su expulsión por la uretra durante la eyaculación (42).

Debido a errores durante la manipulación del semen por parte del examinador, como la persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados y ruptura del acrosoma, pueden surgir problemas (31).

En el caso específico de la gota citoplasmática proximal, se ha observado que afecta la fertilidad en perros. Sin embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece influir en la fertilidad canina. El porcentaje normal de incidencia es de 10-20% (31).

Anomalías de la cabeza:

- Desprendimiento o separación prematura del acrosoma.
- Acrosomas protuberantes.
- Defecto de cráter (13).

Anomalías del cuello:

- Cuello torcido.
- Cuello roto.
- Gota citoplasmática intermedia.

Anomalías en la pieza media:

- Gota citoplasmática distal.
- Unión al cuello.

Anomalías en la cola:

- Cola torcida.
- Cola enrollada (13).



Figura 7. Anormalidades spermáticas.

Fuente: (31).

7.7.2.7. Concentración

La concentración es el número de espermatozoides por ml de semen. El número de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la concentración por el volumen total colectado. La concentración seminal puede fluctuar según la edad, raza, estado fisiológico, salud, tamaño de los testículos, actividad sexual, temporada del año y frecuencia de recolección. Los espermatozoides se cuentan con la ayuda de la cámara Neubauer, Burker o fotocolorímetro (35).

En una pipeta se hará la dilución de solución salina al 2.9 % de 1:100, después se llenará la cámara Neubauer y se contabilizarán los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. La cámara Neubauer tiene 2 cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se dividen entre dos para sacar el promedio y el resultado (número de espermatozoides) se multiplica por 5×10^6 según el factor de dilución (1:100 es por 5×10^6), obteniéndose así la concentración espermática por ml de eyaculado. Se multiplicará la concentración obtenida en cada ml., por el volumen colectado; dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado. En un eyaculado normal existen en promedio de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro y por lo menos 100 millones son necesarios para gestar una perra, siempre y cuando se inseminan con

semen fresco. Cuando el semen es congelado la concentración espermática debe ser mayor debido a la muerte de espermatozoides ocasionada por los procesos de congelamiento y descongelamiento (35).

Para el perro se considera normal de 200 a 500 millones de espermatozoides normales/eyaculado. Cuando es semen congelado se ha estipulado que son necesarios entre 150 y 200 millones de espermatozoides por inseminación con una tasa de sobrevivencia del 50% para obtener resultados satisfactorios. Una vez recolectado el semen puede ser almacenado, congelado o refrigerado a 5-10°C manteniendo la viabilidad de los espermatozoides durante un lapso de 18 a 21 horas (24).

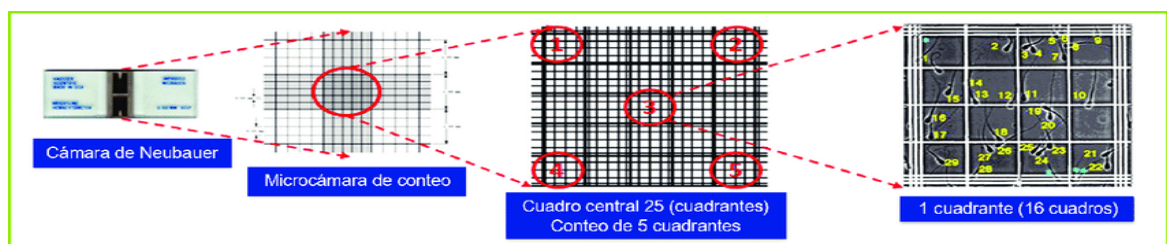


Figura 8. Cámara de Neubauer para obtener la concentración espermática.

Fuente: (24).

7.7.3. Factores que afectan las características del semen

La calidad del semen eyaculado se ve influenciada por varios factores, como la edad, la frecuencia de eyaculación, la excitación del animal y la manera en que se manipula la muestra durante la recolección y evaluación (43).

7.7.3.1. Pubertad

La eyaculación temprana de un perro después de alcanzar la pubertad a menudo contiene espermatozoides anormalmente muertos. En la siguiente eyaculación, la concentración de espermatozoides aumenta, la cantidad de espermatozoides anormales disminuye y el semen tiene una cantidad normal de espermatozoides maduros (44).

7.7.3.2. Frecuencia de la eyaculación.

La frecuencia de la eyaculación afecta directamente el volumen de semen y la concentración de espermatozoides. Se demostró una ligera disminución en el recuento total de espermatozoides en la eyaculación cuando se tomaron muestras una o dos veces al día en comparación con dos o tres veces al día, una semana. Esta disminución se asocia con una disminución en el suministro de espermatozoides en el epidídimo. Cuando se agota, la disminución en el recuento de

espermatozoides se estabiliza y la disminución posterior depende de la tasa de producción en los testículos. Por lo tanto, aunque la cantidad de espermatozoides en la eyaculación disminuye con un mayor uso, la cantidad total de espermatozoides producidos por semana es relativamente constante e incluso puede aumentar con una mayor actividad sexual. La cantidad total de espermatozoides en la eyaculación puede aumentar después de unos días de descanso, probablemente debido a la reposición de la reserva epididimaria. La libido permanece normal incluso si el perro se ve obligado a eyacular diariamente (31).

7.7.3.3. Tamaño testicular.

Se ha demostrado que el tamaño del parénquima testicular y por tanto el tamaño de la glándula tiene una correlación directa con la producción diaria de esperma. El ancho escrotal proporciona una medida objetiva del tamaño testicular y un método para identificar perros con testículos más pequeños de lo normal. Es normal que el ancho del escroto se ajuste según el peso corporal. Sin embargo, el ancho escrotal no es un indicador preciso; Se observan variaciones significativas en el ancho escrotal en perros de cualquier peso corporal, debido en parte a diferencias raciales. Además, el ancho escrotal "normal" no significa que el perro esté produciendo esperma (2).

7.8. Diluyentes

El diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir la dosis necesaria, conservar las características de funcionalidad de las células espermáticas, manteniendo el nivel de fertilidad preciso (45).

Para cumplir con el control biológico sobre el medio que rodea al espermatozoide, un diluyente debe cumplir los siguientes requisitos:

- Poseer una presión osmótica isotónica con la de la sangre del macho y ser capaz de conservarla durante el almacenamiento a un nivel aproximado.
- Proporcionar un equilibrio adecuado de elementos minerales esenciales para la vida de las células espermáticas.
- Aportar los nutrientes que precisan los zoospermos, para su metabolismo aerobio y anaerobio.

- Suministrar lipoproteínas y/o lecitinas que protegen a los monospermos del choque térmico. Proveen de sustancias químicas que tengan poder tampón sobre los productos finales del metabolismo citospermático.
- Aportar sustancias reductoras para proteger las enzimas celulares dotadas de grupos sulfhídricos (45).

Mediante la adición de diluyentes, el semen puede ser refrigerado, lo que facilita su conservación y transporte. Las bajas temperaturas reducen las tasas metabólicas de los espermatozoides, extendiendo así su viabilidad. Los diluyentes protegen las membranas espermáticas del daño inducido por las variaciones de temperatura, proporcionan energía y mantienen el pH y la osmolalidad estables. Además, los antibióticos incorporados en los diluyentes previenen la proliferación bacteriana, especialmente en aquellos que contienen yema de huevo (4).

7.8.1. Características de los diluyentes

Los diluyentes seminales tienen como objetivo principal preservar la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos diluyentes suministran fuentes de energía y contribuyen a mantener condiciones estables de pH y osmolaridad en el entorno extracelular. Se han evaluado distintos tipos de diluyentes seminales, ya sean comerciales o formulados en laboratorio, en cuanto a su capacidad para preservar el potencial fecundante del semen canino refrigerado (46).

7.8.2. Diluyente comercial de origen vegetal.

En años recientes, se ha identificado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) obtenidas de la yema de huevo (YH) ofrecen una mejor protección a los espermatozoides frente al choque térmico en comparación con el uso de la yema de huevo completa. No obstante, algunos investigadores han señalado que estos componentes de origen animal podrían implicar un riesgo de contaminación microbiana durante los procedimientos de inseminación artificial en animales domésticos (47).

Es un diluyente desarrollado para la preservación de semen canino. Este diluyente está formulado para mantener la viabilidad y motilidad espermática durante el almacenamiento en frío, siendo adecuado tanto para la refrigeración como para la congelación de semen (48).

Como uno de los fosfolípidos, la lecitina (o fosfatidilcolina) se distribuye ampliamente en las plantas y desempeña un papel importante en la regulación de la función fisiológica de la biomembrana de las células animales (49).

Los derivados de la soja, en particular la lecitina de soja, se han destacado como sustitutos efectivos de la yema de huevo debido a su origen no animal. La lecitina de soja es una combinación natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos, como el esteárico, oleico y palmítico, que proporcionan estabilidad estructural a las membranas celulares. Se han obtenido resultados *in vitro* similares al usar diluyentes comerciales basados en soja para la criopreservación de esperma (49).

7.8.3. Diluyente comercial de origen animal.

En años recientes, se ha identificado que las lipoproteínas de baja densidad obtenidas de la yema de huevo ofrecen una mejor protección a los espermatozoides frente al choque térmico en comparación con el uso de la yema de huevo completa. No obstante, algunos investigadores han señalado que estos componentes de origen animal podrían implicar un riesgo de contaminación microbiana durante los procedimientos de inseminación artificial en animales domésticos (47).

Posteriormente, los primeros estudios demostraron que la yema de huevo tiene un efecto protector sobre los espermatozoides contra el daño causado por el choque térmico durante el proceso de criopreservación. Se ha propuesto que los fosfolípidos contenidos en la yema de huevo pueden integrarse en la membrana del espermatozoide, sustituyendo algunos de los fosfolípidos originales y reduciendo así la temperatura en la que la membrana cambia de fase (50).

Además, la lecitina y las lipoproteínas de baja densidad presentes en la yema de huevo pueden unirse a las membranas plasmática y acrosomal, mejorando su estabilidad durante la criopreservación (50).

Composición:

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

- Antioxidantes
- Componentes propios del fabricante
- Glicerina
- Antibiótico (Minitub Manual (38)).

7.8.3.1.7.9.3.1. Proteína (Yema de huevo)

La yema de huevo es ampliamente utilizada como componente en los diluyentes de criopreservación de semen en diversas especies, debido a su capacidad protectora sobre las membranas de los espermatozoides durante el proceso de congelación. Este efecto protector se debe a las lipoproteínas de baja densidad (LBD) presentes en la yema, las cuales contienen triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Las LBD ayudan a prevenir la formación de cristales de hielo y protegen la integridad de la membrana plasmática frente al daño por frío. Además, diversos estudios han demostrado que eliminar las lipoproteínas de alta densidad (LAD) puede mejorar la calidad del semen tanto antes como después de su congelación (51).

7.9.Refrigeración del semen

La tecnología de refrigeración y almacenamiento de semen es crucial en la gestión reproductiva canina. Desde 1954, cuando se logró la primera aplicación exitosa de semen refrigerado en perros, el uso de semen canino conservado en frío para la inseminación artificial (IA) ha ganado considerable popularidad en las últimas décadas. Como resultado, el mercado internacional de semen canino refrigerado ha experimentado un crecimiento notable, y su manipulación y transporte, tanto a distancias cortas como largas, se ha convertido en una práctica común. Entre las principales ventajas de emplear semen refrigerado se encuentran la facilidad en su procesamiento y envío, los costos relativamente bajos debido a la ausencia de necesidad de equipo especializado, y menos complicaciones legales en su importación y exportación en comparación con el semen congelado. Además, cuando se aplican métodos igualmente eficaces para la sincronización del ciclo estral y la inseminación artificial, las tasas de preñez y el tamaño de las camadas son superiores en comparación con los obtenidos con semen congelado y descongelado (52).

Generalmente, el semen refrigerado se envía en un recipiente térmico común o dentro de una caja de poliestireno con bolsas de hielo. Este embalaje es liviano y no requiere ser devuelto al origen, lo cual ayuda a mantener bajos los costos de envío. Con el uso de diluyentes apropiados,

el semen puede refrigerarse a 4°C, lo que disminuye la tasa metabólica de los espermatozoides y prolonga su longevidad (53).

La refrigeración puede realizarse en laboratorios de baja complejidad y puede utilizarse además de una estabilización prolongada antes de la congelación en centros con equipo adecuado y personal capacitado. El semen refrigerado puede depositarse fácilmente por vía intravaginal sin necesidad de entrenamiento y equipamiento que necesariamente requiere la deposición intrauterina de semen congelado en esta especie con características anatómicas muy particulares del aparato genital posterior (53).

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío (53).

Para la refrigeración, se recolecta la fracción espermática del semen y se mezcla con el diluyente seleccionado, el cual debe estar a la misma temperatura que el semen al momento de la dilución. Es importante mantener una proporción de 1:3 o 1:4 entre semen y diluyente, ya que un exceso de diluyente puede afectar negativamente la motilidad espermática. El semen preparado de esta manera puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse en inseminación artificial, logrando tasas de preñez aceptables dentro de las primeras 24-48 horas. Antes de la inseminación, el semen refrigerado debe ser llevado gradualmente a temperatura ambiente (4).

El uso de semen refrigerado con diluyentes protectores, como el tris-buffer con un 20 % de yema de huevo, permite preservar espermatozoides con buena capacidad fecundante durante un tiempo suficiente para transportar el semen e inseminar animales en ubicaciones geográficas distantes (4).

La refrigeración del semen a temperaturas que fluctúan entre los 4 y 6 °C, es una alternativa simple para la conservación de espermatozoides caninos con adecuada capacidad fecundante. La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática (plasmalema) al daño causado por los cambios de temperatura (shock térmico) (46).

En perros, la dilución y refrigeración de semen a 4°C permite conservar espermatozoides con capacidad fecundante por períodos que van desde 2-3 días hasta 10 días mediante técnicas especializadas. Este tiempo es suficiente para transportar y utilizar el semen de un reproductor en diferentes ubicaciones del país y en naciones vecinas. Las regulaciones para el transporte y

exportación de semen refrigerado son significativamente menos complejas y costosas en comparación con las del semen congelado o el traslado del propio animal (53).

El semen canino puede ser preservado a través de métodos de refrigeración o criopreservación, lo cual reduce la tasa metabólica y extiende la viabilidad espermática. Los medios diluyentes empleados en estos procesos actúan protegiendo las membranas espermáticas contra los daños térmicos, proporcionando energía, y manteniendo la estabilidad del pH y la presión osmótica. La yema de huevo es un componente común en estos diluyentes debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad ofrecen protección al espermatozoide contra el choque térmico.

El semen preparado con distintos diluyentes puede ser refrigerado a 4°C o 15°C y utilizado en inseminación artificial, obteniendo tasas de preñez satisfactorias en las primeras 24-48 horas. Antes de proceder con la inseminación artificial, el semen refrigerado debe ser llevado gradualmente a la temperatura ambiente (54).

8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

8.1. Hipótesis nula (H₀)

Los diluyentes comerciales A y B tienen efectos significativamente diferentes en la viabilidad espermática del semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

8.2. Hipótesis alternativa (H_a)

Los diluyentes comerciales A y B no tienen efectos significativamente diferentes en la viabilidad espermática del semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Métodos

En la presente investigación se utilizó la técnica de observación, al registrar los datos obtenidos de cada muestra a estudiarse basándose en los indicadores principales motilidad, vitalidad y vigor espermático para su posterior análisis.

Una vez realizada la recopilación de información, se utilizaron los métodos cuantitativo e inductivo, los cuales permitieron identificar si hubo variaciones en las muestras refrigeradas con los diferentes diluyentes de origen animal y vegetal con los diferentes periodos de tiempo que se desarrolló en el estudio.

9.2. Ubicación

La presente investigación se realizó en la ciudad de Latacunga, Barrio Salache perteneciente a la Provincia de Cotopaxi, en la Clínica Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción.



Figura 9. Localización del lugar.

Fuente: Google Earth

9.2.1. Situación geográfica

Está localizado al sur Occidente de la ciudad de Latacunga, parroquia Eloy Alfaro, Barrio Salache Bajo.

9.2.2. Límites

Norte: Predio de la señora Olga Estupiñan de Alarcón y Quebrada seca s/n.

Sur: Lotes Teresa Acurio, Ángel Acurio, Herederos Acurio.

Oriente: El río Salache. Occidente: Hacienda de San Agustín y comunas de Alpamalag.

9.2.3. Coordenadas

Latitud: 00°59'47,68" N

Longitud: 78°37'19,16" E.

9.2.4. Clima

La Facultad de CAREN se encuentra dentro de la región bioclimática Subhúmedo temperado. Esta región se extiende desde los 2000 a 3000 m.s.n.m., con una temperatura media anual que varía entre los 12 y 18° C. En la localidad su temperatura media anual es alrededor de 14. 5° C y la precipitación media anual es superior a 300mm., e inferior a 600mm. (55)

9.3. Instalaciones, Materiales y Equipos

9.3.1. Instalaciones

- Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción (Campus Salache)

9.3.2. Materiales de oficina

- Computadora
- Calculadora
- Resma de papel
- Internet (Horas)
- Copias
- Lápiz, marcadores y esferográficos
- Memory Flash
- Materiales físicos o de campo
- Correa de sujeción
- Guantes de manejo
- Cofia
- Mascarilla

9.3.3. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio
- Tubos para las muestras Seminales
- Conos desechables para la colecta
- Pipeta mecánica
- Puntas de Pipetas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de Neubauer

- Jeringuillas de 1, 3, 5ml
- Gradillas de Nivel Metálica
- Placa Térmica
- Tubos Eppendorf
- Pajillas
- Tiras de pH
- Refrigeradora
- Termómetro digital

9.3.4. Materiales químicos

- Agua destilada
- Diluyentes de origen vegetal y origen animal.

9.3.5. Materiales biológicos

- Semen canino
- Yema de huevo

9.4. Población de Estudio

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 8 machos caninos de distintas edades comprendidas entre los 1 y 8 años. Los individuos de la muestra tuvieron características similares en cuanto a la alimentación y estado sanitario. Se utilizó semen fresco de ocho caninos donantes: Representado como (Perro 1) un American Bully de nombre “Negro”, el mismo que contó con la edad de 1 año 3 meses, (Perro 2) un Bulldog Inglés, de nombre “Negro” con una edad de 1 año 3 meses, (Perro 3) un Pequinés de nombre “Oddy”, con una edad de 1 año, un Pequinés de nombre Sparky con una edad de 8 años que nominaremos (Perro 4), y cuatro perros mestizos de nombre “Pablo”, “Simba”, “Pepe”, “Skay”, con edades de 2 años, 2 años, 3 años, 2 años 6 meses respectivamente representados como (Perro 5, 6, 7, 8) los cuales gozaban de un perfecto estado de salud, apto para la reproducción, los ochos caninos pertenecientes a diferentes dueños.

Tabla 2. Registro de los caninos donadores de semen.

Nombre	Raza	Edad	Peso	Perro
Negro	American Bully	1a 3m	17kg	1
Negro	Bulldog Inglés	1a 3m	15kg	2
Oddy	Pequinés	1 a	6.5 kg	3
Sparky	Pequinés	8a	6.2kg	4
Pablo	Mestizo	2a	6.75kg	5
Simba	Mestizo	2 a	6.75 kg	6
Pepe	Mestizo	3a	7.2kg	7
Skay	Mestizo	2a 6m	6.8kg	8

Fuente: Directa.

9.5. Metodología experimental.

La metodología experimental que se utilizó para el desarrollo práctico y cumplimiento de los objetivos planteados del estudio principalmente se destaca lo siguiente:

9.5.1. Identificación del método de extracción de semen

El semen se recolectó mediante estimulación manual sobre el bulbo peneano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico graduado y atemperado. Se obtenía 1 eyaculado por semana de cada perro, durante un total de tres semanas consecutivas. Por lo tanto, en este experimento se utilizaron tres eyaculados de cada uno de los ocho machos caninos.

Para el estudio se usó la segunda fracción del eyaculado (fracción espermática). Inmediatamente después de la recolección, las fracciones de esperma se analizan en cuanto a su volumen, color, pH, concentración, motilidad individual, motilidad progresiva, vigor. Para esta evaluación se utilizó un microscopio binocular de contraste de fases. El volumen de semen se determina directamente en el tubo de recogida.

9.5.2. 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.

9.5.3. Recolección y evaluación de la muestra

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo peneano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico. Se obtenía 1 eyaculado por semana de cada perro, durante un total de 3 semanas consecutivas. La recolección de semen se la hizo en horas de la mañana (09:00 a.m.), se procedió a la limpieza del área genital haciendo especial énfasis en el área prepucial, se usó suero fisiológico, con el fin de evitar agentes que contaminen la muestra espermática, se elimina la humedad del área con toallas desechables se subió al perro a la mesa auxiliar de laboratorio, a continuación la persona encargada de la extracción se colocó un par de guantes desechables de látex, y procedió a provocar la erección del miembro masculino del animal; y, producirá la eyaculación y la colecta del material seminal en un termo.

Seguido 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 del diluyente de origen vegetal y animal con adición de yema de huevo, todas a una temperatura constante de 37°C para evitar el shock de frío y posteriormente con la ayuda de una pipeta se coloca en la cámara de Neubauer, para la obtención de los datos y después valorar.

El volumen seminal se determinaba directamente en el tubo de recogida. Para calcular la concentración, una parte proporcional de semen se diluyó (5:85), es decir 5 microlitros de semen puro y 95 de agua.

El porcentaje de motilidad se calculaba por valoración de una muestra de semen puro, usando un microscopio y placas porta y cubre objetos que debían estar temperados (37°C) en una platina térmica.

Tabla 3. Variables por evaluar en los eyaculados caninos.

VARIABLES	UNIDADES DE MEDIDA
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA	
Volumen colectado	mL
Color	Blanco lechoso, blanco cremoso, blanco acuoso, blanco opalescente
PH	Ácido, Neutro, Básico

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Concentración	% concentración (M/ mL)
Motilidad individual	Porcentaje
Motilidad progresiva	Porcentaje
Vigor	1-5

Fuente: Directa

9.5.4. Selección y adquisición de diluyentes

Los parámetros en estudio se realizaron mediante la adquisición de los diluyentes comerciales de origen vegetal y animal el cual necesitaba la adición de proteína animal donde se utilizó yema de huevo, y para la valoración de características microscópicas del eyaculado, se realizó con la ayuda de un microscopio electrónico.

9.5.5. Preparación del semen con los diluyentes comerciales

Diluyente de origen vegetal se obtiene por una mezcla de 10 ml agua destilada con 20gr de diluyente que se encuentra en presentación sólida.

Diluyente de origen animal presentación líquida y se obtiene el resultado final con adición de 1,25 ml de diluyente y 0,25 ml de yema de huevo.

A continuación, se colocó la muestra biológica en un tubo graduado, luego se incorporó respectivamente los diluyentes con una relación de 1:2 y se mezcló ligeramente para homogeneizar. Una vez evaluada la calidad espermática en fresco y con los diluyentes, posteriormente se realizó la refrigeración, evaluando las características microscópicas.

La muestra biológica se dividió en dos porciones equitativas y por consiguiente la primera porción del material seminal se preparó con el diluyente comercial de origen vegetal, a continuación, se empajillo algunas dosis para la respectiva evaluación prevista a las 2h, 6h, 12h, 24h. La segunda porción del material seminal se hizo una mezcla con el diluyente de origen animal, con el mismo parámetro de evaluación, relevante mencionar que las muestras debían mantenerse bajo refrigeración a una temperatura de 4°C. Dentro de la evaluación microscópica post-refrigeración se evaluaba motilidad individual, motilidad progresiva, vigor.

Tabla 4. Esquema del experimento.

Tratamientos	Diluyentes	# de repeticiones
T1	Origen animal	3
T2	Origen vegetal	3
TOTAL		6

Fuente: Directa

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente análisis experimental, cumplió con la comparación de varios parámetros espermáticos con la utilización de diluyentes comerciales, como crioprotectores de las estructuras celulares del semen canino, dentro de estos diluyentes se manejó el de origen animal con la adición de yema de huevo y el diluyente de origen vegetal estos presentaron su contribución durante las diferentes etapas de enfriamiento para la evaluación microscópica.

Resultados sobre la evaluación macroscópica y microscópica del semen puro.

Evaluación macroscópica.

La evaluación macroscópica del eyaculado en fresco, se realizó en cada uno de los ejemplares, este procedimiento se desarrollaba posterior a la colecta donde se analizó variables cualitativas como volumen, pH, color, donde el Perro 1 proporcionó un promedio de 2,5ml, esto se obtiene acorde a las tres tomas correspondientes para el estudio, de igual manera el Perro 2, proporcionó 1,66ml, seguido del Perro 3 el cual dio un volumen de 2,66ml, el Perro 4 dio 1,66ml, por otro lado el Perro 5 eyaculo un promedio de 0,83ml, mientras que el Perro 6 apporto 2,83ml, continuando con el Perro 7, ejemplar que proporcionó 2,16ml, y por último el Perro 8 presentó un volumen de 1,33ml, el 50% de los caninos manejados presentaron un color seminal designado blanco acuoso, y el otro 50% blanco opalescente, y respectivamente el 100% de las muestras presentaron un pH de 7, todos estos datos recolectados se encuentran dentro del rango normal (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.

Evaluación macroscópica del eyaculado canino en fresco			
Perro	Volumen	Color	pH
1	2,5 ml	Blanco acuoso	7
2	1,66 ml	Blanco cremoso	7
3	2,66 ml	Blanco opalescente	7
4	1,66 ml	Blanco cremoso	7
5	0,83 ml	Blanco acuoso	7
6	2,83 ml	Blanco opalescente	7
7	2,16 ml	Blanco acuoso	7
8	1,33 ml	Blanco opalescente	7

Fuente: Directa

Discusión.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación macroscópica del eyaculado fresco obtenido manualmente se puede manifestar que el perro 6, de raza mestizo presenta un promedio de 2,83ml con respecto a volumen, su color blanco opalescente refleja un eyaculado normal y saludable, relacionándolo con una concentración adecuada de espermatozoides, validando un estado reproductivo sano y funcional, mientras que el pH refleja el equilibrio ácido-base del semen lo cual es muy importante para la viabilidad y movilidad de los espermatozoides. Por lo tanto, se asemeja a los resultados obtenidos por Bonilla & Ballesteros (24) mencionando que al tomar la muestra de semen por método manual se obtuvo un promedio de 1 a 7.5ml de eyaculado de color opalescente. También en el estudio desarrollado por Alamo (27) detalla que del total de eyaculados recogidos, el valor medio (\pm SEM) del volumen osciló entre 0.95 ± 0.1 y 3.8 ± 0.6 mL. Se observó una enorme variabilidad individual en cuanto al volumen aportado en cada eyaculado entre los machos.

Evaluación microscópica.

La evaluación microscópica de la muestra seminal en fresco brinda los siguientes resultados, se recalca que estos son un promedio cuantitativo de las tres tomas realizadas respectivamente, en cuanto a mortalidad individual el Perro 1 presentó un 94,3%, mientras que el Perro 2 se manifiesta en un 92,6%, seguido del Perro 3 con un 85%, el Perro 4 con un 90%, a continuación se manifiesta el Perro 5 con un promedio de 90%, al igual que el Perro 6 con 90%, el Perro 7 con 86,6% y finalmente el Perro 8 con un promedio del 90%.

Con respecto a la motilidad progresiva se obtuvo en el Perro 1 un promedio de 96,6%, en el Perro 2 93,3%, seguido del Perro 3 con un 76,7%, mientras que el Perro 4 manifestó un 88,3%, el Perro 5 reportó un 85%, seguido del Perro 6 que obtuvo un 88,3%, el Perro 7 manifestó un promedio de 86,7%, y por último en el Perro 8 se describe un 91,7%. En cuanto al vigor espermático se estructura los promedios de la siguiente manera: el Perro 1 y 2 se presentó con 5, seguido del Perro 3 con 4,3 de promedio, mientras que el Perro 4 se calificó un vigor de 4,7; a continuación, el Perro 5 presentó 4,3 de vigor, y por último el Perro 6,7,8 manifestaron un vigor promedio de 4,7 respectivamente. Seguidamente se describe la variable concentración espermática por ml, el Perro 1 oscila entre 285,7 M/mL, a continuación, tenemos del Perro 2 un promedio de 366 M/mL, el Perro 3 presentó 173,3M/mL, el Perro 4 con 227,3M/mL, seguido del Perro 5 con 223,7 M/mL, continuando con el Perro 6 que manifestó 160,3 M/mL, y para finalizar en el Perro 7 y 8 se describe 268,3 M/mL y 185,7M/mL respectivamente. (Tabla 6)

Tabla 6. Evaluación de las características microscópica.

Evaluación microscópica del eyaculado canino en fresco				
Perro	Motilidad individual %	Motilidad progresiva %	Vigor	Concentración M/mL
1	94,3	96,6	5,0	285,7
2	92,6	93,3	5,0	366,0
3	85	76,7	4,3	173,3
4	90	88,3	4,7	227,3
5	90	85,0	4,3	223,7
6	90	88,3	4,7	160,3
7	86,6	86,7	4,7	268,3
8	90	91,7	4,7	185,7

Fuente: Directa

Discusión

Con el desarrollo del análisis microscópico de los eyaculados de semen fresco se logra describir que dentro de los parámetros como: motilidad individual, motilidad progresiva, vigor y concentración espermática el mayor promedio se presenta en perros de raza pura como American Bully con MI= 94,3%, MP=96,6%, V= 5, C= 285M/MI y Bulldog Inglés MI= 92,6%, MP=93,3%, V=5, C= 366M/mL por lo tanto estos parámetros se correlacionan con altos índices en fertilidad y vitalidad espermática. De igual forma en su estudio Alamo (27), interpreta que en referencia a la motilidad individual progresiva observada en cada eyaculado, los valores medios individuales oscilaron entre un 85.0 y un 92.5%. Con referencia a este parámetro,

comprobamos que existía escasa variación individual entre ejemplares ($p>0.1$), manteniéndose este valor siempre por encima del 85%, mientras que, dentro del mismo individuo, los valores obtenidos en los diferentes eyaculados eran prácticamente similares. Por otro lado, nuestro estudio presenta resultados que oscilan con el estudio realizado por Cañar (56) el cual describe dentro de los parámetros de motilidad individual un 90,38%; viabilidad un 97,44%.

Resultados de la evaluación microscópica post- refrigeración con la adición de los diluyentes comerciales.

Motilidad Individual.

Los resultados de motilidad individual de semen refrigerado se muestran en la tabla 7. En el diluyente de origen animal mostró una motilidad individual de 89.3 ± 6.68 , 80.4 ± 12.0 , 66.9 ± 18.04 , 52.7 ± 17.8 , 33.5 ± 13.9 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 88.5 ± 6.83 , 76.9 ± 13.7 , 52.1 ± 22.4 , 33.5 ± 20.9 , 11.7 ± 9.35 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 7. Motilidad individual (%)

Diluyente		Tiempo de refrigeración (horas)				
		0	2	6	12	24
Origen	animal	89.3 ± 6.68	80.4 ± 12.0	66.9 ± 18.04	52.7 ± 17.8	33.5 ± 13.9
(n=24)						
Origen	vegetal	88.5 ± 6.83	76.9 ± 13.7	52.1 ± 22.4	33.5 ± 20.9	11.7 ± 9.35
(n=24)						

Fuente: Directa.

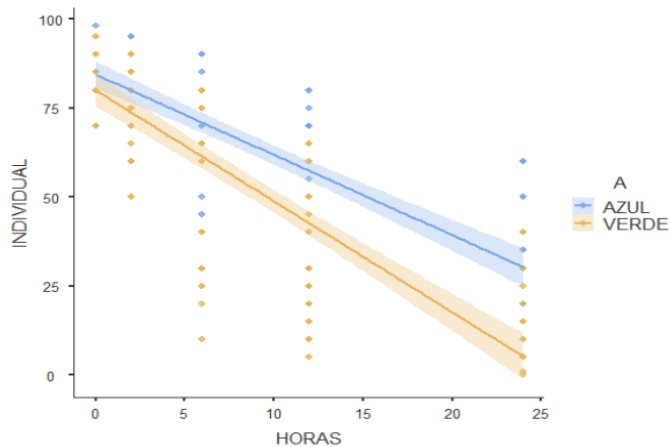


Diagrama 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y de origen vegetal la motilidad individual de espermatozoides de perros braquicéfalos.

Discusión.

La evaluación morfológica de semen comprende la diferenciación cualitativa y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales, y la distinción de otras células no espermáticas. (57)

Resultados de nuestro estudio se manifiesta que el diluyente de origen animal con adición de yema de huevo mostró una motilidad individual de 89.3 ± 6.68 , 80.4 ± 12.0 , 66.9 ± 18.04 , 52.7 ± 17.8 , 33.5 ± 13.9 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 88.5 ± 6.83 , 76.9 ± 13.7 , 52.1 ± 22.4 , 33.5 ± 20.9 , 11.7 ± 9.35 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mencionando que al tiempo de 2 horas bajo refrigeración de 4 °C mantenían un buen porcentaje de motilidad individual. De la misma manera Restrepo y demás autores (58) mencionan en su estudio que la refrigeración a 4°C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin embargo, la refrigeración 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.

Motilidad progresiva

Los resultados de motilidad progresiva de semen refrigerado se muestran en la tabla 8. En el diluyente de origen animal mostró una motilidad progresiva de 89.5 ± 6.28 , 79.7 ± 11.1 , 68.5 ± 20.9 , 54.4 ± 17.7 , 36.7 ± 14.6 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 89.6 ± 5.88 , 72.5 ± 15.4 , 49.8 ± 21.1 , 31.0 ± 18.4 , 13.5 ± 12.1 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 8. Motilidad progresiva (%)

Diluyente	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	2	6	12	24
Origen animal (n=24)	89.5 ± 6.28	79.7 ± 11.1	68.5 ± 20.9	54.4 ± 17.7	36.7 ± 14.6
Origen vegetal (n=24)	89.6 ± 5.88	72.5 ± 15.4	49.8 ± 21.1	31.0 ± 18.4	13.5 ± 12.1

Fuente: Directa.

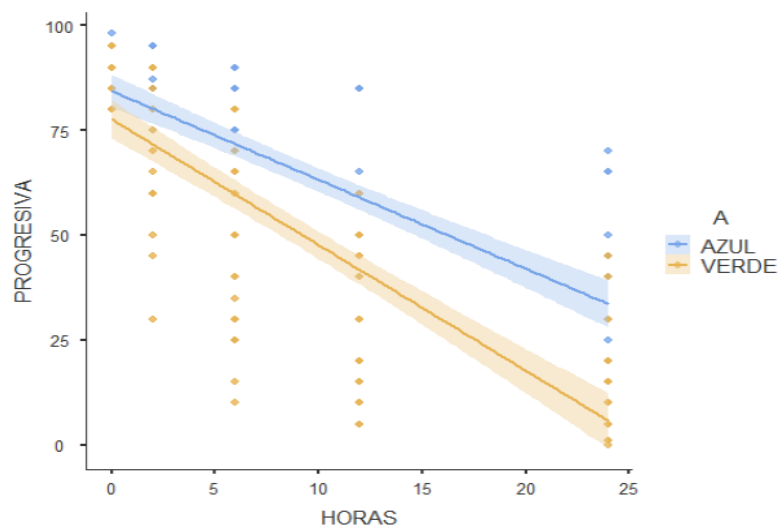


Diagrama 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y origen vegetal sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de perros braquicéfalos.

En el presente estudio se obtiene los siguientes resultados con respecto a motilidad progresiva donde el diluyente de origen animal mostró una motilidad progresiva de 89.5 ± 6.28 , 79.7 ± 11.1 , 68.5 ± 20.9 , 54.4 ± 17.7 , 36.7 ± 14.6 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 89.6 ± 5.88 , 72.5 ± 15.4 , 49.8 ± 21.1 , 31.0 ± 18.4 , 13.5 ± 12.1 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h consecutivamente, estableciendo que existió una significativa alteración en motilidad con el transcurso de las horas bajo refrigeración. Algo similar ocurre con el estudio de Manosalva y coautores (59) que dan los siguientes resultados la motilidad total (73.0 ± 7.0 y 82.4 ± 7.0) y la motilidad progresiva (66.5 ± 10.0 y 80.7 ± 7.0) fueron significativamente menores en espermatozoides refrigerados que en frescos ($p < 0.05$). En base a los resultados se podría sugerir que la motilidad, viabilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción del acrosoma son afectados por la refrigeración. Esto sería una indicación que la vulnerabilidad de la membrana acrosomal y de la membrana mitocondrial ocasionaría la disminución de la motilidad espermática.

A diferencia del estudio que desarrollo Batista (60) donde menciona que la motilidad espermática permaneció prácticamente inalterada en el semen refrigerado, con porcentajes medios superiores al 70% durante las 48 horas; asimismo, no se detectaron diferencias entre las muestras refrigeradas (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control. La motilidad espermática no se modifica marcadamente durante las primeras 48 horas de conservación a 4°C , con valores medios entre 60 y 80%. (61)

Vigor espermático.

Los resultados del vigor espermático de semen refrigerado se muestran en la tabla 9. En el diluyente de origen animal mostró un vigor de 4.58 ± 0.504 , 4.33 ± 0.702 , 3.38 ± 0.824 , 2.92 ± 0.584 , 2.67 ± 0.565 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 4.63 ± 0.495 , 4.21 ± 0.833 , 2.96 ± 0.908 , 2.25 ± 1.15 , 1.25 ± 0.608 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 9. Vigor espermático.

Diluyente	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	2	6	12	24
Origen animal (n=24)	4.58 ± 0.504	4.33 ± 0.702	3.38 ± 0.824	2.92 ± 0.584	2.67 ± 0.565
Origen vegetal (n=24)	4.63 ± 0.495	4.21 ± 0.833	2.96 ± 0.908	2.25 ± 1.15	1.25 ± 0.608

Fuente: Directa.

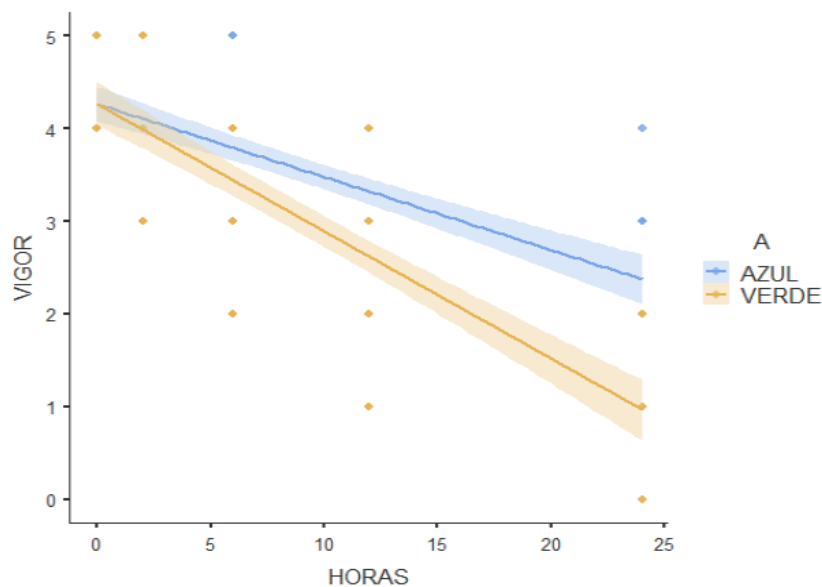


Diagrama 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y sobre vigor de espermatozoides de perros braquicéfalos con el uso de diluyentes comerciales de origen vegetal y origen animal.

Discusión.

El diluyente de origen animal con adición de yema de huevo de gallina utilizado en nuestro estudio mostro mejores resultados en vigor 4.58 ± 0.504 , 4.33 ± 0.702 , 3.38 ± 0.824 , 2.92 ± 0.584 , 2.67 ± 0.565 0,2,6,12,24 h respectivamente en comparación con el dilutor de origen vegetal. Lo que se asemeja con el estudio realizado por Corrales & Bedoya (62) donde evaluaron que el diluyente a base de EYT mostró mayores valores de motilidad progresiva entre las 24 y 96 horas de refrigeración ($93.0 \pm 4.5 - 85.0 \pm 6.5$), explicado gracias a que la composición que incluye sustancias buffer y azúcares, como también lipoproteínas, tienen la capacidad de estabilizar la membrana en condiciones de shock térmico cuando interactúa con la estructura lipídica de la plasmalema.

Discusión final.

En nuestro estudio se evidenció que una estabilidad adecuada con diferentes tiempos de refrigeración da como resultado un alto índice de supervivencia espermática como lo describe Restrepo y demás autores en su estudio que la refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura. (58)

Díaz (53) caracteriza que, mediante el agregado de diluyentes apropiados, el semen puede refrigerarse a 4°C y de esta manera ser conservado. Las bajas temperaturas disminuyen la tasa metabólica del espermatozoide y prolongan su longevidad. Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad. Además, los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en aquellos diluyentes que contienen yema de huevo. Al igual que el estudio realizado por Díaz, se relaciona con el nuestro puesto que al utilizar diluyentes comerciales de origen vegetal y de origen animal permitió prolongar la vida celular espermática, evitando un alto estrés osmótico durante la refrigeración a 4 °C. A su vez Santana (63) explica en su estudio que la temperatura es uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de preservar la calidad del semen, de forma que una disminución controlada y progresiva de la misma nos permite una conservación de los eyaculados, desde varias horas hasta varios días. En este sentido, la refrigeración del semen se convierte en una herramienta muy útil en la cría canina; además, si a esto añadimos la sencillez de la técnica, los bajos costes y el alto nivel de éxitos, explicaría que la refrigeración del semen en la especie

canina se haya convertido en una de las técnicas de preservación seminal en los últimos años por veterinarios clínicos.

La refrigeración de nuestro estudio se llevó sobre los 4 °C por un período de 24h, con análisis microscópico a las 2,6,12,24h evaluando motilidad progresiva, individual y vigor, distintamente de los dos dilutores manejados, donde se valoró que tienen un buen nivel de supervivencia post refrigeración. Algo similar ocurre con Santana (63) que en su estudio estableció que, tras la correspondiente dilución, el semen se enfría a 4 °C gradualmente, durante un periodo de 1,5 a 2 horas y, luego, se almacena a dicha temperatura intentando utilizarlo en las primeras 24 horas, si bien los espermatozoides pueden mantener la supervivencia de 2 a 4 días, incluso 7 si se trata de semen de buena calidad.

De igual forma se correlaciona con los resultados de López y demás (64) demostrando que la vitalidad e Integridad de la Membrana Plasmática fueron superiores ($P < 0,05$) en aquellas muestras congeladas con TCG–YH. Los resultados de la presente investigación demuestran que la YH protegió mejor a los EE de perro durante la congelación que el APV.

La movilidad es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores utilizan este parámetro como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores. (65)

11. IMPACTOS

11.1. Impacto Técnico

El presente estudio posee un impacto técnico significativo, ya que proporciona datos cruciales que pueden catalizar futuras investigaciones. Esto se manifiesta en los resultados obtenidos a partir de análisis microscópicos detallados y la recopilación de datos estadísticos precisos sobre parámetros críticos como la motilidad, vitalidad y vigor espermático en semen refrigerado durante diferentes periodos de tiempo.

11.2. Impacto Social.

Este estudio tiene un impacto social al proporcionar a los dueños de perros información sobre métodos de reproducción alternativos que presentan menor riesgo para sus mascotas. Este enfoque considera integralmente el bienestar animal, abarcando aspectos cruciales como la salud, el cuidado y el manejo responsable, además de minimizar la transmisión de enfermedades de origen sexual.

12. CONCLUSIONES

- Mediante la identificación de las características macroscópicas se puede mencionar que el perro de raza mestiza número 6 presenta mayor volumen de eyaculado, mientras que en la evaluación microscópicas el perro de raza braquiocefálica American Bully número 1, brinda una mejor calidad espermática y viabilidad, permaneciendo dentro de los rangos establecidos en los distintos periodos de evaluación.
- Se pudo determinar mediante la evaluación seminal que el macho de raza braquiocefálica mantiene mejor motilidad individual, progresiva y de vigor, permitiendo obtener óptima calidad espermática, aspecto trascendental para conocer la fertilidad y optimizar los procedimientos de reproducción asistida. También es importante mencionar que la raza mestiza en cuanto a calidad espermática no alcanza los estándares requeridos.
- En conclusión, el estudio comparativo entre los tratamientos de origen vegetal y origen animal ha demostrado diferencias significativas en la motilidad individual, progresiva y vigor del semen canino. A lo largo de las mediciones realizadas a las 0, 2, 6, 12 y 24 horas, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre los dos diluyentes. El diluyente de origen animal mostró un mejor desempeño, con una reducción más lenta en la motilidad del semen en comparación con el diluyente de origen vegetal.

13. RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los propietarios de las mascotas o criaderos interesados en mantener la diversidad genética y la salud reproductiva, optar por la raza American Bully, ya que en los estudios realizados se puede observar e identificar de manera clara que brinda mejores características microscópicas siendo fundamental en la reproducción de caninos.
- Como grupo investigador recomendamos en cuanto a calidad espermática utilizar los caninos de raza braquiocefálica debido a que brinda mejor calidad en motilidad individual, progresiva y de vigor, de tal manera este reproductor es la mejor opción que se puede difundir para la reproducción canina.
- Según los resultados del presente estudio se recomienda utilizar el diluyente de origen animal ya que en el estudio realizado se determina que es la opción más adecuada para la preservación de semen canino refrigerado, especialmente cuando se busca mantener la calidad seminal durante un período prolongado.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Chwin Khye K, Laswardi Yusuf T, Satrio F, Kurniani Karja. CALIDAD DEL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN EXTENSOR DE YEMA DE HUEVO TRIS SUPLEMENTADO CON SERICINA. Revista indonesia de ciencias veterinarias. 2021 Marzo; 15(1): p. 15-20.
2. Acurio Aguiar. “CRIOCONSERVACION DE SEMEN EN PERROS DOMESTICOS (Canis Lupus Familiaris), EN LA CLINICA ANIMAL KINGDOM.”. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. Latacunga, Ecuador: UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI, MEDICINA VETERINARIA; 2019.
3. Paramo R, Balcázar. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Departamento de Reproducción. [Online].; 2005 [cited 2024 Julio 2. Available from: https://www.abogadogeneral.unam.mx/sites/default/files/archivos/RepositorioCont/1_Facultades/11_FacMedVeterinariayZootecnia/71_ManualdePracticasenManejoReproductivodePerros.pdf.
4. Stornelli M. AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS. Spermova Asociación Peruana de Reproducción Animal. 2017; XII(2): p. 77- 84.
5. Hernández E. Evaluación del volumen y concentración de semen fresco en caninos de la Comarca Lagunera. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Ciencias Agropecuarias y Biotecnología; 2005.
6. Stornelli MA, Luzbel de la Sota R. MANUAL DE REPRODUCCIÓN DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y COMPAÑÍA. Primera ed. 978-950-34-1381-4 I, editor. La Plata: Edulp; 2016.
7. Valera M. Policlínica Veterinaria Centauro. [Online].; 2009 [cited 2024 Julio 02. Available from: <https://centauroveterinarios.com/wp-content/uploads/2016/03/reproduccionCanina.pdf>.
8. Urgerfeld R. Reproducción de los animales domésticos. Primera ed. Smeraldi Costanza ISBN 8418339659 9, editor. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica SL; 2020.
9. Cortés F. Manual de prácticas de clínica de perros y gatos. [Online]. Tuxpan - Veracruz; 2015 [cited 2024 Julio 03. Available from: <https://www.uv.mx/pozarica/cba/files/2017/09/Manual-de-practic-as-de-clinica-de-perros-y-gatos.pdf>.

10. Matamoros Pinel R, Salinas Pérez P. Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos. Primera ed. Editores R, editor.; 2017.
11. Valdez G, Guerrero H. Reproducción de los animales domésticos. [Online].; 2021 [cited 2024 Julio 15. Available from: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo4/index.html>.
12. Soto A, Zuccolilli G. PHYLOGENETIC STUDY OF THE POPULATION OF GONADOTROPHIN-RELEASING HORMONE (GNRH) NEURONS OF THE VERTEBRATES. Trabajos de Investigación. Buenos Aires: Instituto de Anatomía, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata., Anatomía Comparada; 2021. Report No.: ISSN 1514-2590.
13. De León J. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO. [Online].; 2008 [cited 2024 Julio 03. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2740/TESIS%20JORGE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
14. Díaz V, Marqués Y, Merchant H. Universidad Nacional Autónoma de México. [Online].; 2021 [cited 2024 Julio 3. Available from: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo1/autores.html>.
15. Sánchez JM. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. [Online].; 2010 [cited 2024 Julio 3. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/bitstream/handle/123456789/7657/JOSE%20MARIA%20SANCHEZ%20ESCAMILA.pdf?sequence=1>.
16. Huanca. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. [Online].; 2014 [cited 2024 Julio 3. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/323353372.pdf>.
17. Bustos , Torres. Seasonal Reproduction in the Male. International Journal of Morphology. 2012 Febrero 21; 30(4): p. 1266-1279.
18. Méndez I, Cariño C, Díaz L. Prolactin in the immune system: synthesis and biological effects. Revista de investigación clínica. 2005 Junio; 57(3): p. 447-456.
19. Escamilla A. APLICACIÓN DE CLORHIDRATO DE XILACINA (0.05 mg/kg) EN TOROS COMO FACILITADOR DE LA COLECTA DE SEMEN CON EL MÉTODO DE ELECTROEYACULADOR. Tesis de tercer nivel. Guatemala: UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, MEDICINA VETERINARIA; 2005.

20. Wanke , Gobello. Reproducción en caninos y felinos domésticos España: Inter- Medica; 2006.
21. Davol P. Reproducción canina. [Online].; 2008 [cited 2024 Julio 4. Available from: <https://www.labbies.com/reproduction1.htm>.
22. Barrios. Asociación Venezolana de Producción Animal. [Online].; 2002 [cited 2024 Julio 4. Available from: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/diegobarrios.PDF.
23. Cunningham. Fisiología veterinaria. Segunda ed. Interamericana MH, editor. Mexico; 2019.
24. Bonilla Hernández , Ballesteros Mejía. UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA. [Online].; 2007 [cited 2024 Julio 5. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1348&context=medicina_veterinaria.
25. Oporta Rodríguez E, Martínez JS. Examen andrológico en toros con encaste Bos indicus y Bos taurus en edades reproductivas. Trabajo de Graduación. Managua, Nicaragua : UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA, MEDICINA VETERINARIA; 2021.
26. Pérez Marín C, Gil Huerta L, Quintela Arias. Técnicas Reproductivas En Las Especies Animales: Manuales Clínicos de Veterinaria. Primera ed. Juan Morgaz Rodríguez PMRAGR, editor. Barcelona : Elsevier Health Sciences; 2023.
27. Alamo Santana D. CRIOCONSERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE CANINA: UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO LÍQUIDO VS ULTRACONGELADOR DE – 152 °C. Proyecto de Investigación. España : UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS; 2007.
28. Ávalos A, González J, Vargas A, Herrera J. Recolección y manipulación seminal in vitro. Primera ed. Coria DPO, editor. México; 2018.
29. Molina Mosquera , Polo Caquimbo , Tovar Clavijo M. Design and Implementation of a Prototype Electroejaculator Scalable for use in more than one Species. Investigación. Colombia: Universidad Surcolombiana -Neiva, Ingeniería; 2011.
30. Arieta R, Fernández J, Menchaca J. Métodos de extracción de semen bovino. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2014 Junio; 15(5): p. 1.8.

31. Proaño Montesdeoca. EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO. Proyecto de Investigación. Latacunga - Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, MEDICINA VETERINARIA; 2019.
32. Veloz. Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGÍSTER. Cuenca: UNIVERSIDAD DE CUENCA, Ciencias Agropecuarias; 2017.
33. Valverde A, Barquero V, Carvajal V. Biotecnología aplicada al estudio de la movilidad del semen porcino. *Agronomía Mesoamericana*. 2021 Agosto ; 32(2): p. 662–680.
34. Espejo , Barraquero , Rogel S, Salvador Z. Reproducción Asistida ORG. [Online].; 2024 [cited 2024 Julio 28. Available from: [https://www.reproduccionasistida.org/resultados-de-seminograma/#:~:text=valores%20de%20referencia%3A-.Examen%20macrosc%C3%B3pico,mide%20en%20mililitros%20\(mL\).](https://www.reproduccionasistida.org/resultados-de-seminograma/#:~:text=valores%20de%20referencia%3A-.Examen%20macrosc%C3%B3pico,mide%20en%20mililitros%20(mL).)
35. Altamirano Chiriboga , Pereira Castro. EVALUACION DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN CANINO FRESCO Y CONGELADO, EN UN PERRO DE RAZA PITBULL TERRIER, UTILIZANDO 3 DILUYENTES EN LA CLINICA VETERINARIA LOS ANDES EN QUITO. TESIS DE GRADO. Guaranda - Ecuador: UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR., CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE.; 2011.
36. Toro Montoya. Espermograma. *Medigraphic, literatura biomédica*. 2009 Febrero ; 15(11): p. 145-169.
37. Ariagno J, Mormandi E. Guía práctica para la evaluación del semen. *RevistaByPC*. 2016 Abril; 80(3): p. 29-36.
38. Tello Landeta. Universidad Técnica de Ambato. [Online].; 2015 [cited 2024 Julio 6. Available from: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22578/1/Tesis%2048%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20398.pdf>.
39. Maroto M. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN FRESCO UTILIZANDO DOS DILUYENTES COMERCIALES EN DIFERENTES HORAS DE EXTRACCIÓN.

- Tesis de tercer nivel. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Ciencias Agropecuarias; 2020.
40. Gómez M, Migliorisi A. Sitio Argentino de Producción Animal. [Online].; 2017 [cited 2024 Julio 31. Available from: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf.
 41. Bravo C, Sánchez. Effect of adding autologous or heterologous prostatic fluid on canine sperm quality. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2013 Diciembre; 24(4): p. 466-472.
 42. Delgado B. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN DE OVINO TRATADO POR LA TÉCNICA DE GRADIENTE DE DENSIDAD. Tesis para obtener título de tercer nivel. Lima: UNIVERSIDAD RICARDO PALMA, CIENCIAS BIOLÓGICAS; 2013.
 43. Challco C. Universidad Científica del Sur. [Online].; 2019 [cited 2024 Julio 5. Available from: [https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/690/TB-Challco_Salas.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20espermatog%C3%A9nesis%20comienza%20cuando%20a%C3%BAn,eyaculado%20\(Allen%2C%201992\).](https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/690/TB-Challco_Salas.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20espermatog%C3%A9nesis%20comienza%20cuando%20a%C3%BAn,eyaculado%20(Allen%2C%201992).)
 44. Feldman E, Nelson R. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. Primera ed. Interamericana MH, editor. México; 2017.
 45. Villalba. Biblioteca de documentos digitales Scribd. [Online].; 2017 [cited 2024 Julio 6. Available from: <https://es.scribd.com/document/363209162/Caracteristicas-de-Un-Diluyente>.
 46. Sánchez , Cartagena A, Berland. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2006 Junio; 17(1).
 47. Moreno S. USO DE DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO CABRÍO. Tesis doctoral. Torreón: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO; 2021.
 48. Martínez Barbitta , Rivera Salina. Evaluación de semen canino refrigerado diluido con activador de esperma. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022 Febrero; 8(3).
 49. Jiménez S, Rivera del Álamo M, Hidalgo C, Peña A, Muiño R, Rodríguez J, et al. Evaluación in vitro de diluyentes a base de yema de huevo, lecitina de soja y liposomas para la criopreservación de semen de toros lecheros. *Ciencia de la reproducción animal*. 2020 Abril; 215.

50. Zhang H, Ye H, Shao Y, Shenming Z. Efectos de la concentración de yema de huevo y del tamaño de las partículas en la conservación del semen de burro. *Revista de Ciencias Veterinarias Equinas*. 2018 Junio; 65: p. 19 - 24.
51. Loeza Concha , Domínguez Rebolledo , Copas Medina , Vivas Rodríguez J, Escalera Valente , Ramón Ugalde. Efecto de la yema de huevo sobre la criopreservación espermática de zángano (*Apis mellifera*). *Abanico veterinario SciELO*. 2021 Marzo 5; 9(2).
52. Ródenas C, Parrilla Y, Roca J, Martínez E, Lucas X. Calidad de espermatozoides caninos refrigerados y almacenados en frío (5 °C) sometidos a diferentes velocidades de enfriamiento rápido. *Teriogenología*. 2014 Septiembre; 82(41): p. 621-626.
53. Díaz , Corrada , Gobello. Instituto de Genética Veterinaria. [Online].; 2016 [cited 2024 Julio 8. Available from: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/102886/CONICET_Digital_Nro.dde3c19f-d1b8-4b43-ac32-4ea0e2e451e7_B.pdf?sequence=7&isAllowed=y.
54. Rendon , Arango Rodriguez M. EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO, SOMETIDO A CONGELACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL COMO CRIOPROTECTOR. Tesis para titulación tercer nivel. Medellín-Colombia: Universidad CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2009.
55. Lloacana Troya. GUÍA FOTOGRÁFICO–DESCRIPTIVA DE LA FLORA DEL CAMPUS. Proyecto de Investigación. Latacunga: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES - TURISMO; 2022.
56. Cañar M. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN. Tesis para tercer nivel. Loja: Universidad Nacional de Loja, Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2015.
57. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli A. La Microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Investigación. Argentina: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2014.
58. Restrepo Betancur G, Vásquez Araque N, García E. CRYOPRESERVATION OF CANINE SEMEN AND ITS APPLICATION IN ARTIFICIAL INSEMINATION. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2009 Diciembre; 4(2): p. 119-129.

59. Manosalva I, Cortés C, Leyva V, Valdivia , De los Reyes , Barros , et al. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, Integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2005 Diciembre; 16(2): p. 114-128.
60. Batista M, Santana M, Álamo D, Cabrera F, Garcia A. Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales? *REVISTA CANARIA DE LAS CIECIAS VETERINARIAS*. 2014 Septiembre; 8(2).
61. Nizanski W, Klimowicz M, Savic M. Efectos de la inclusión de Equex STM en el extensor basado en Tris sobre la motilidad de los espermatozoides de perro incubados a 5 grados C. *Reproducción de animación doméstica*. 2009 Julio; 44(2).
62. Corrales E, Bedoya H, Echeverry J. Description of canine semen cryopreservation techniques. Proyecto final. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Medicina Veterinaria y Zootecnia.; 2020.
63. Santana Cruz M. Revisión de las técnicas de reproducción asistida en perros. *Portal Veterinaria*. 2021 Junio; 3(1).
64. López , Dumas , Samaniego , Galarza , Argudo. Evaluation of two extenders in Canine epididymal spermatozoa freezing (Polyvinyl alcohol and egg yolk). *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2022 Septiembre; 32(1): p. 1-14.
65. Uribe Valderrama R, Arango Rodríguez , Rendón Álvarez , Acevedo Naranjo. Evaluaton of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2011 Junio; 6(1): p. 21-30.

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 **MARCALLA CONSTANTE DIANA MIREYA**, identificada con cédula de ciudadanía 0504638602 de estado civil casada, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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.

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

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 **TULMO SEGOVIA CONSUELO MARILIN**, identificada con cédula de ciudadanía **1727853689** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2018 – Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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:

- e) 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.
- f) La publicación del trabajo de grado.
- g) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- h) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

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 CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES
COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN
RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Médicas Veterinarias

Autoras:
Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

Tutora:
Veloz Veloz Dina Maricela

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Marcalla Constante Diana Mireya, con cédula de ciudadanía No. 0504638602 y Tulmo Segovia Consuelo Marilyn, con cédula de ciudadanía No. 1727853689, declaramos ser autoras del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, siendo la MVZ. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg., Tutora del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 15 de agosto del 2024.

Diana Mireya Marcalla Constante
C.C: 0504638602
ESTUDIANTE

Consuelo Marilyn Tulmo Segovia
C.C: 1727853689
ESTUDIANTE

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 **MARCALLA CONSTANTE DIANA MIREYA**, identificada con cédula de ciudadanía 0504638602 de estado civil casada, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Marzo – Agosto 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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.

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 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 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 CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, 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 15 días del mes de agosto del 2024.

Diana Mireya Marcalla Constante

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

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 **TULMO SEGOVIA CONSUELO MARILIN**, identificada con cédula de ciudadanía **1727853689** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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 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 DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2018 – Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutora: MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

Tema: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

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 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 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:

- e) 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.
- f) La publicación del trabajo de grado.
- g) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- h) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

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 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 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 CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, 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 15 días del mes de agosto del 2024.

Consuelo Marilyn Tulmo Segovia

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación sobre el título:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”, de Marcalla Constante Diana Mirella y Tulmo Segovia Consuelo Marilin, 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 han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 15 de agosto del 2024

MVZ. Veloz Veloz Dina Maricela, Mg.

DOCENTE TUTORA

CC: 1720299302

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, las postulantes: Marcalla Constante Diana Mirella y Tulmo Segovia Consuelo Marilin, con el título de Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**, han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 15 de agosto del 2024

MVZ. Cristian Beltrán Romero, Mg.
C.C: 0501942940
LECTOR 1 (PRESIDENTE)

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Álvarez, Mg.
C.C: 1803675734
LECTOR 2 (MIEMBRO)

Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, PhD.
C.C: 0501097224
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme fuerzas para continuar en lo adverso, por guiarme en el camino de lo prudente y darme sabiduría para mejorar día a día. Agradezco a mis padres Edgar y María por su amor y apoyo incondicional, a mi esposo Cristian, gracias por ser mi compañero de vida, por tu paciencia, comprensión y por estar siempre dispuesto a apoyarme en cada etapa de este proceso. Tu amor y confianza me han dado la fuerza para superar cada obstáculo. A mi hija Cristina, gracias por ser mi mayor inspiración. Tu presencia en mi vida me motiva a ser mejor cada día y a esforzarme por alcanzar mis metas. A mis hermanos Fernando, Mayda, Andrea y a mi Sobrina Danna, gracias por su apoyo, por los consejos y por estar siempre ahí cuando los he necesitado. Su compañía y cariño han sido fundamentales en este viaje.

Al mismo tiempo quiero agradecer a la doctora Dina Veloz por su guía, paciencia y dedicación han sido esenciales para el desarrollo y culminación de este trabajo. Su apoyo constante y sus valiosos consejos han enriquecido mi experiencia académica, permitiéndole alcanzar este importante logro.

Diana Marcalla

AGRADECIMIENTO

En primer instancia quiero agradecer a Dios, porque sin él no sería nadie, y por su infinito amor y bondad estoy aquí cumpliendo este sueño tan anhelado; en segundo lugar agradezco a mis padres Piedad y Carlos por siempre estar con su apoyo incondicional, a mi compañero de este gran proceso Freddy, gracias por ser mi fortaleza, por tu apoyo leal e incondicional, gracias por tu existencia en mi vida, agradezco a mis hermanas Mónica, Paula y Sofía; gracias por estar conmigo siempre que les necesito, a pesar de cualquier diferencia que tengamos siempre puedo contar con ustedes, a mi gran amor Romina hija mía gracias por darme tu amor infinito cada día, con tus sonrisas y abrazos me llenaste de valentía y resistencia para seguir adelante.

De igual manera quiero agradecer a todos los que forman parte de la Universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas, agradezco a los doctores de la Carrera de Medicina Veterinaria por compartir sus conocimientos conmigo y por ser parte de esta nueva etapa de vida profesional.

Consuelo Tulmo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo con todo mi amor a mi hija Cristina, quien ha sido mi mayor inspiración y la razón detrás de cada esfuerzo. A mi esposo Cristian, por su apoyo incondicional y por ser mi compañero en este viaje. A mis padres, Edgar y María, por su amor, guía y por inculcarme los valores que me han permitido llegar hasta aquí. A mis hermanos Fernando, Mayda, y Andrea, y a mi sobrina Danna, por su constante apoyo y por ser una parte fundamental de mi vida. Este logro es un reflejo del amor y la unión de nuestra familia.

Diana Marcalla

DEDICATORIA

El siguiente trabajo se lo dedicó a mi amor incondicional Romina Charlotte, a mi esposo Freddy, a mi madre Piedad, agradezco a la vida por tenerte conmigo porque tú me enseñaste que cuando se hace las cosas con amor todo saldrá bien, a mi padre Carlos, a mis hermanas Mónica, Paula y Sofia, la vida es gratificante cuando tenemos personas como ustedes alrededor. A la doctora Dina Veloz por brindarme sus conocimientos y ayuda incondicional en todo momento.

Consuelo Tulmo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DOS DILUYENTES COMERCIALES
SOBRE EL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN RAZAS BRAQUIOCEFÁLICAS”**

Autoras:
Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

RESUMEN

En la actualidad la valoración del efecto de diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas como el bulldog francés, pequinés, el pug representa un desafío crucial en la reproducción asistida veterinaria. Datos anatómicos específicos de estas razas, como la estructura facial característica que puede predisponer a problemas respiratorios y termorregulatorios, destacan la necesidad de optimizar técnicas de conservación de semen para mejorar la viabilidad espermática. Por ello el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas. En el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se utilizaron 8 machos caninos seleccionados aleatoriamente de raza braquiocefálicas y mestizas con edades comprendidas de 1 a 8 años y condiciones adecuadas de salud. Las muestras seminales se extrajeron mediante la técnica de recolección manual, con el uso de la segunda fracción del eyaculado, se evaluó con la ayuda de un microscopio electrónico y una cámara de Neubauer, se analizaron las características macroscópicas como volumen, color, pH y microscópicas como la concentración, motilidad progresiva e individual y vigor del eyaculado canino, se realizaron las valoraciones pre- refrigeración y post- refrigeración, tomando datos puntuales con los dos tratamientos que correspondía a un diluyente de origen animal, el cual se adicionó proteína animal como fue la yema de huevo, y el tratamiento dos correspondía a un diluyente de origen vegetal. Con los datos obtenidos durante el proceso experimental, estos fueron analizados y procesados con la ayuda del programa Excel. Para cada uno de los parámetros evaluados se encontró que existe diferencias significativas de los valores porcentuales entre el uso del diluyente de origen animal obteniéndose resultados óptimos en las características macroscópicas y microscópicas del material seminal tanto en valoración pre-refrigeración y post- refrigeración, mientras que con la utilización del diluyente de origen vegetal se obtuvo bajos resultados en las características microscópicas. Con estos resultados se comprueba que, al usar la muestra seminal con el diluyente de origen animal, produce mejores resultados durante la refrigeración con respecto al uso del diluyente de origen vegetal.

Palabras claves: Razas braquiocefálicas, motilidad, diluyente de origen animal, refrigeración, yema de huevo.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “EVALUATION OF THE EFFECT OF TWO COMMERCIAL DILUENTS ON REFRIGERATED CANINE SEMEN IN BRACHIOCEPHALIC BREEDS”.

Authors:

Marcalla Constante Diana Mireya
Tulmo Segovia Consuelo Marilin

ABSTRACT

Nowadays, the evaluation of effects of commercial diluents on canine semen refrigerated in brachiocephalic breeds such as the French bulldog, the Pekingese, Pug represents a crucial challenge in veterinary assisted reproduction. Specific anatomical data of these breeds, such as the facial structure characteristic that may predispose to respiratory and thermoregulatory problems highlight the need to optimize semen conservation techniques to improve sperm viability. Therefore, the objective of this research work is to evaluate the effect of two commercial diluents on canine refrigerated canine semen in brachiocephalic breeds. In the laboratory of Reproductive Biotechnology of the Technical University of Cotopaxi, 8 male randomly canines males of brachiocephalic and mixed dogs with ages ranging from 1 to 8 years old and in good health conditions were used. The seminal samples were extracted by manual collection technique, using the second fraction of the ejaculate, evaluated with the help of an electron microscope and a Neubauer chamber, the macroscopic characteristics such as volume, color, pH and microscopic characteristics were analyzed Pre-refrigeration and post-refrigeration evaluations were carried out, taking specific data with the two treatments that corresponded to a diluent of animal origin, to which animal protein such as egg yolk was added, and the second treatment corresponded to a diluent of vegetable origin. The data obtained during the experimental process were analyzed and processed with the help of the Excel program. For each of the parameters evaluated, it was found that there are significant differences in the percentage values between the use of diluent of animal origin, obtaining optimal results in the macroscopic and microscopic characteristics of the seminal material both in pre-assessment cooling and post-cooling, while the use of diluent from vegetal origin obtained low results in microscopic characteristics. These results show that the use of the seminal sample with the animal diluent produces better results during refrigeration that using the diluent of vegetable origin.

Keywords: brachiocephalic breeds, motility, diluent of animal origin, refrigeration, egg yolk.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	viii
AGRADECIMIENTO	ix
DEDICATORIA	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABLAS	xix
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	xx
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
1.1. Título del Proyecto	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1. Directos.....	3
3.2. Indirectos	3
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. General.....	4
5.2. Específicos.....	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	4
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	5
7.1. Anatomía del aparato reproductor del perro.....	6
7.1.1. Testículos.....	6
7.1.2. Escroto	6
7.1.3. Epidídimo	6
7.1.4. Conducto deferente.....	7
7.1.5. Próstata	7
7.1.6. Uretra	7
7.1.7. Pene	7

7.1.8.	Prepucio	8
7.2.	Endocrinología de la reproducción	8
7.2.1.	Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	9
7.2.2.	Hormona Folículo Estimulante y células de Sertolli	10
7.2.3.	Hormona Luteinizante (LH) y células de Leydig	11
7.2.4.	Testosterona	12
7.2.5.	Prolactina	12
7.3.	Fisiología del aparato reproductor del perro	13
7.3.1.	Espermatogénesis	13
7.3.2.	Termorregulación testicular	14
7.4.	Manejo del macho reproductor	15
7.4.1.	Anamnesis	15
7.4.2.	Reseña del animal	15
7.4.3.	Estado general	15
7.4.4.	Examen físico	15
7.4.5.	Pruebas complementarias y de laboratorio	16
7.4.6.	Examen andrológico	16
7.5.	Valoración del reproductor	17
1.1.	Eyaculación	17
7.6.	Métodos de extracción seminal	19
7.6.1.	Estimulación manual	19
7.6.2.	Vagina artificial	21
7.6.3.	Electroeyaculación	21
7.7.	Características semen canino	22
7.7.1.	Características macroscópicas	22
7.7.1.1.	Volumen	23
7.7.1.2.	Color	23
7.7.1.3.	pH	23
7.7.2.	Características microscópicas	23
7.7.2.1.	Motilidad	24
7.7.2.2.	Motilidad en masa	24
7.7.2.3.	Vigor	24
7.7.2.4.	Motilidad individual	25

7.7.2.5.	Morfología	25
7.7.2.6.	Morfo-anomalías	25
7.7.2.6.1.	Anormalidades primarias	26
7.7.2.6.2.	Anormalidades secundarias.....	26
7.7.2.7.	Concentración.....	27
7.7.3.	Factores que afectan las características del semen	28
7.7.3.1.	Pubertad.....	28
7.7.3.2.	Frecuencia de la eyaculación.....	28
7.7.3.3.	Tamaño testicular.....	29
7.8.	Diluyentes.....	29
7.8.1.	Características de los diluyentes.....	30
7.8.2.	Diluyente comercial de origen vegetal.....	30
7.8.3.	Diluyente comercial de origen animal.....	31
7.8.3.1.	7.9.3.1. Proteína (Yema de huevo).....	32
7.9.	Refrigeración del semen	32
8.	PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	34
8.1.	Hipótesis nula (H ₀).....	34
8.2.	Hipótesis alternativa (H _a).....	34
9.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	34
9.1.	Métodos	34
9.2.	Ubicación.....	35
9.2.1.	Situación geográfica	35
9.2.2.	Límites.....	35
9.2.3.	Coordenadas	35
9.2.4.	Clima	36
9.3.	Instalaciones, Materiales y Equipos	36
9.3.1.	Instalaciones	36
9.3.2.	Materiales de oficina	36
9.3.3.	Equipos y materiales de laboratorio	36
9.3.4.	Materiales químicos.....	37
9.3.5.	Materiales biológicos.....	37
9.4.	Población de Estudio	37
9.5.	Metodología experimental.....	38

9.5.1.	Identificación del método de extracción de semen.....	38
9.5.2.	Adiestramiento de los caninos.....	38
9.5.3.	Recolección y evaluación de la muestra.....	39
9.5.4.	Selección y adquisición de diluyentes.....	40
9.5.5.	Preparación del semen con los diluyentes comerciales.....	40
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
11.	IMPACTOS.....	49
11.1.	Impacto Técnico.....	49
11.2.	Impacto Social.....	49
12.	CONCLUSIONES.....	50
13.	RECOMENDACIONES.....	50
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación endocrina y paracrina del testículo.	9
Figura 2. Sistema inhibina-activina-foliatina regulando la función de FSH.	11
Figura 6. Evaluación visual de las diferentes fracciones del eyaculado.	18
Figura 3. Embudos y tubos de plástico utilizados para la recogida seminal.	20
Figura 4. Estimulación manual sobre el glande del pene.	20
Figura 5. Materiales para una vagina artificial.	21
Figura 7. Anormalidades spermáticas.	27
Figura 8. Cámara de Neubauer para obtener la concentración espermática.	28
Figura 9. Localización del lugar.	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de tareas en relación con los objetivos planteados.	4
Tabla 2. Registro de los caninos donadores de semen.	38
Tabla 3. Variables por evaluar en los eyaculados caninos.	39
Tabla 4. Esquema del experimento.	41
Tabla 5. Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.	42
Tabla 6. Evaluación de las características microscópica.	43
Tabla 7. Motilidad individual (%)	44
Tabla 8. Motilidad progresiva (%)	45
Tabla 9. Vigor espermático.	47

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y de origen vegetal la motilidad individual de espermatozoides de perros braquicéfalos.....	44
Diagrama 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y origen vegetal sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de perros braquicéfalos.....	46
Diagrama 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y sobre vigor de espermatozoides de perros braquicéfalos con el uso de diluyentes comerciales de origen vegetal y origen animal.	47

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Título del Proyecto

Evaluación del efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

Fecha de inicio: Octubre 2023

Fecha de finalización: Agosto 2024

Lugar de ejecución: Provincia Cotopaxi, Cantón Latacunga.

Facultad que auspicia: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado: Recursos zoo-genéticos locales, conservación y desarrollo sostenible.

Equipo de Trabajo:

Tutora: Mvz. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

Estudiantes: Marcalla Constante Diana Mireya, Tulmo Segovia Consuelo Marilin

Área de Conocimiento: Ciencias Veterinarias, Genética

Línea de investigación: Análisis, conservación y aprovechamiento racional de la biodiversidad, fauna y recursos naturales para el desarrollo sustentable y la prevención de desastres naturales.

Sub líneas de investigación de la carrera: Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoo-genéticos.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El presente estudio se realizó con el propósito de evaluar la efectividad de diluyentes utilizados para preservar el semen canino refrigerado, asegurando simultáneamente altos niveles de motilidad y viabilidad espermática. El proceso de refrigeración reduce la tasa metabólica de los espermatozoides y prolonga su viabilidad. Los diluyentes empleados durante la refrigeración protegen las membranas espermáticas contra el daño inducido por cambios de temperatura, suministran energía y mantienen estables el pH y la presión osmótica (1).

Hasta hace poco, la inseminación artificial se realizaba únicamente con esperma fresco. Sin embargo, la práctica de usar esperma refrigerado ha ganado popularidad en muchos países europeos y en Estados Unidos, se ha convertido en una práctica habitual, pero esta tendencia aún no se ha extendido en América del Sur. La implementación de este método de conservación de semen presenta ventajas como un bajo costo, facilidad de manejo y requerimientos de infraestructura moderados. Estos factores podrían promover su adopción regular en América del Sur, mejorando así las oportunidades de utilizar semen de reproductores deseados (2).

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores permite preservar espermatozoides con alta capacidad fecundante durante un periodo suficiente para su transporte e inseminación en animales situados en localizaciones geográficas distantes (3).

El incremento del valor y las posibilidades de comercialización y distribución de los cachorros de pura raza genéticamente mejorados es de gran impacto y relevancia, así como el aumento de la importancia de la crianza de la especie canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas, bancos de semen crio-conservado e IA en esta especie (2).

La Inseminación Artificial (IA) ha contribuido significativamente al mejoramiento genético de los perros de raza pura. Gracias al desarrollo de esta tecnología junto con la crioconservación del semen, es posible distribuir material genético a nivel mundial utilizando diversas técnicas de congelación. Esto ayuda a evitar complicaciones como la incompatibilidad comportamental entre macho y hembra, la transmisión de enfermedades o patologías que afectan la reproducción, así como problemas asociados con el tamaño, el peso o la anatomía respiratoria en perros braquiocefálicos, que pueden resultar en dificultades cardiopulmonares y limitaciones para la monta natural (2).

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1.Directos

Todos los habitantes que formen parte del proyecto.

3.2.Indirectos

Estudiantes, docentes e investigadores de Medicina Veterinaria y carreras afines que desarrollen estudios futuros de la refrigeración de los espermatozoides en la especie canina.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la actualidad la valoración del efecto de diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas como el bulldog francés, pequinés, el pug representa un desafío crucial en la reproducción asistida veterinaria. Datos anatómicos específicos de estas razas, como la estructura facial característica que puede predisponer a problemas respiratorios y termorregulatorios, destacan la necesidad de optimizar técnicas de refrigeración y posterior conservación de semen para mejorar la viabilidad espermática. Los diluyentes comerciales, esenciales en la refrigeración del semen, varían en composición y pueden afectar significativamente las características espermáticas como, la motilidad, morfología y viabilidad espermática. La falta de estudios específicos que comparen directamente diluyentes comerciales en razas braquiocefálicas limita actualmente la aptitud de los médicos veterinarios para seleccionar el método más efectivo, exacerbando los desafíos inherentes a la reproducción en estas razas.

Dentro de una problemática crucial se incluye la necesidad de seleccionar diluyentes con composiciones químicas y osmolaridades adecuadas para mantener la viabilidad espermática durante la refrigeración, congelación y descongelación. La variabilidad en la respuesta de diferentes razas y condiciones individuales subraya la importancia de diluyentes que sean compatibles con diversas morfologías espermáticas y sensibilidades a condiciones ambientales. Además, la posible inducción de daño espermático por algunos diluyentes, junto con riesgos de contaminación bacteriana durante el manejo, son aspectos críticos que requieren atención para optimizar la calidad y la efectividad de los programas de reproducción asistida en caninos.

En el contexto ecuatoriano, la situación actual respecto a la criopreservación del semen canino en razas braquiocefálicas no difiere sustancialmente de las tendencias globales. Aunque los avances en técnicas de reproducción asistida han sido adoptados gradualmente, la

implementación específica y optimización de diluyentes comerciales en estas razas específicas aún no ha sido completamente explorada. La relevancia de abordar este problema radica en su potencial impacto en la mejora de las actividades de reproducción asistida veterinaria, beneficiando directamente tanto a criadores como a propietarios de mascotas interesados en mantener la diversidad genética y la salud reproductiva de razas braquiocefálicas populares.

5. OBJETIVOS

5.1.General

- Evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales sobre el semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

5.2. Específicos

- Caracterizar macroscópica y microscópicamente el semen puro de los caninos.
- Determinar la calidad espermática de caninos de raza braquiocefálica y mestizos.
- Comparar la viabilidad espermática con el uso de dos diluyentes comerciales post refrigeración.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1. Sistema de tareas en relación con los objetivos planteados.

Objetivo 1	Actividad (tareas)	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
Caracterizar macroscópica y microscópicamente el semen puro de los caninos.	Recolección de semen.	Muestras de semen	Masaje en la región dorso abdominal al macho. -guantes -tubos de Eppendorf

Determinar la calidad espermática de caninos de raza braquiocefálica y mestizos.	Observación microscópica	Datos de la viabilidad	Evaluación microscópica - Microscopio - Pipetas - Porta y cubre objetos
Comparar la viabilidad espermática con el uso de dos diluyentes comerciales post refrigeración.	Preparación los dos diluyentes comerciales.	Resultados del diluyente comercial.	-Diluyente - yema de huevo - semen - Refrigeradora

Fuente: Directa

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización de este para realizar IA con semen fresco o criopreservado. Actualmente, la inseminación artificial (IA) se lleva a cabo utilizando semen fresco, refrigerado o congelado, cada uno de los cuales ofrece diferentes oportunidades de aplicación y requiere distintos niveles de complejidad en su manejo. En Sudamérica, la IA con semen fresco se realiza esporádicamente; sin embargo, su uso ha incrementado en la última década, correlacionándose con el avance de la clínica reproductiva canina y el aumento de reproductores de razas en las cuales el servicio natural presenta dificultades. Aunque la IA con semen refrigerado o criopreservado es una práctica común en Europa y Estados Unidos, su aplicación sigue siendo limitada en Sudamérica. Dado el bajo nivel de complejidad requerido para implementar esta técnica con semen fresco o refrigerado, y las ventajas que ofrece, es probable que su uso se generalice en un futuro cercano, siempre que se promueva adecuadamente la técnica, su manejo y sus aplicaciones (4).

La recolección de semen en caninos es una práctica que ofrece importantes ventajas en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede variar en complejidad, desde moderada hasta alta, y en costo, de bajo a medio, dependiendo de la técnica empleada y del tipo de semen utilizado (fresco, refrigerado o congelado). En cada caso, proporciona diversas oportunidades, aportando siempre significativos beneficios para la reproducción canina (5).

7.1. Anatomía del aparato reproductor del perro

El aparato reproductor del macho canino es una agrupación de órganos encargados de constituir un sistema con un fin en común, en este caso la reproducción. Los mismos se clasifican, según su localización anatómica, en genitales internos que comprenden conductos deferentes, próstata y uretra pélvica y genitales externos testículos, epidídimo, pene y prepucio. El testículo también se considera el órgano reproductor primario, mientras que los conductos excretores, las glándulas accesorias, el pene y el prepucio se consideran órganos reproductores secundarios (3).

7.1.1. Testículos

Son dos estructuras ovaladas situadas entre las extremidades posteriores dentro del escroto, variando de tamaño según el peso corporal del animal. Presentan su eje largo anteroposterior en posición oblicua y en dirección dorso caudal. Cada testículo tiene un polo craneal y un polo caudal y dos caras, una lateral y otra medial. Son considerados los principales órganos reproductores masculinos debido a su función, ya que allí se producen espermatozoides y testosterona. También son productores de otras hormonas como la inhibina y los estrógenos; proteína, que es necesaria para el funcionamiento de los espermatozoides; y líquido que funciona como vehículo para los espermatozoides (6).

7.1.2. Escroto

Es una capa epitelial que funciona para cubrir y brindar protección a los testículos. Consiste en la piel que forma la pared exterior del escroto, teniendo un rafe que representa la línea medial de la estructura. La túnica interior se llama Dartos y está formada por tejido conectivo simple. En el interior, el escroto se divide en izquierdo y derecho (7).

7.1.3. Epidídimo

Es un largo tubo que almacena y transporta los espermatozoides, se encuentra ubicada sobre la superficie dorsolateral del testículo, se divide en cabeza, cuerpo y cola, su cabeza se sitúa en el polo craneal del testículo y discurre de medial a lateral para luego continuar con el cuerpo, el cual atraviesa por la superficie dorsolateral, y con la cola, que está unida a la parte caudal del testículo por el propio ligamento del testículo. La función principal es brindar a la carga espermática el ambiente necesario para su maduración otorgándoles motilidad y potencial de fertilidad; además de ser el reservorio de estos (7).

7.1.4. Conducto deferente

Se origina en la cola del epidídimo y asciende como componente del cordón espermático, ingresando a la cavidad abdominal por mediación del canal inguinal. También hay que mencionar que su función es transporte de espermatozoides (7).

7.1.5. Próstata

Es la única glándula accesoria del perro macho. Consta de dos lóbulos, uno derecho y otro izquierdo, separados por un tabique fibroso medio. Está cubierto por una cápsula gruesa que contiene músculo liso y estroma. Se encuentra próximo al cuello de la vejiga, en la unión con la uretra, al nivel del borde del cráneo del hueso púbico. Dependiendo de su tamaño, se conecta dorsalmente al recto y ventralmente con la sínfisis púbica o a la pared abdominal ventral, ya que migra cranealmente consecuentemente a medida que la glándula aumenta de tamaño. Tiene numerosos conductos prostáticos que vierten su contenido dentro de la uretra protática cerca de la abertura de los conductos deferentes, formando los colículos seminales. Su morfología y peso varían relativamente con la edad y estimulación hormonal ya que es un órgano dependiente de andrógenos (8).

7.1.6. Uretra

En su primera sección, se dispersa a lo largo de la zona pélvica, es decir, la uretra pélvica y una parte que continúa por el pene, esto es la uretra peneana o esponjosa, la función es mixta, porque funciona para transportar la orina desde la vejiga y también para transportar los espermatozoides y el líquido prostático durante la eyaculación (9).

7.1.7. Pene

El pene es el órgano copulador masculino, consta de raíces, cuerpos y glande. Dentro de su parte proximal, a nivel de la raíz, se encuentran dos cuerpos cavernosos independizados por un tabique mediano y rodeados por una túnica albugínea gruesa y también por un músculo isquiocavernoso. La raíz del pene está unida al arco isquiático entre las tuberosidades isquiáticas. El cuerpo tiene dos cuerpos eréctiles separados por un tabique central de tejido conectivo y comenzando en la cohesión de dos pilares. Dentro del cuerpo del pene, en la parte ventral, se encuentra la uretra rodeada por el cuerpo esponjoso. La parte distal del pene está formada por el glande. El glande tiene dos partes anatómicas, la parte proximal es el bulbo glandular que es una extensión de tejido esponjoso, y la parte más distal y final del pene es la parte que es alargada, de forma cilíndrica y con un extremo libre puntiagudo (9).

7.1.8. Prepucio

Esta es una membrana tubular que comienza y es continuación de la piel del abdomen y recubre todo el pene flácido. Tiene una mucosa interna lisa y una capa de piel externa cubierta de pelos que convergen en el prepucio. Segrega un líquido verdoso llamado esmegma, que lubrica el pene y es completamente normal (9).

7.2. Endocrinología de la reproducción

La endocrinología de la reproducción en el macho canino regula la producción de espermatozoides y el comportamiento sexual mediante un complejo equilibrio hormonal. El hipotálamo secreta la Gonadotropina Liberadora de Hormona (GnRH), que estimula a la hipófisis para liberar la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH). La LH actúa sobre las células de Leydig en los testículos, promoviendo la producción de testosterona, la hormona clave para el desarrollo de características sexuales secundarias, la libido y la espermatogénesis. La FSH, junto con la testosterona, estimula las células de Sertoli en los túbulos seminíferos, facilitando la producción y maduración de espermatozoides (10).

La testosterona, además de sus funciones reproductivas, participa en mecanismos de retroalimentación negativa, regulando la secreción de GnRH, LH y FSH para mantener el equilibrio hormonal. La inhibina, producida por las células de Sertoli, también regula la FSH, evitando la sobreproducción de espermatozoides. Este sistema hormonal asegura la fertilidad y el comportamiento sexual del macho canino, siendo fundamental para el éxito reproductivo (10).

La función de los testículos es regulada por el sistema nervioso central a través de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, las cuales interactúan con receptores específicos ubicados en las células de Leydig y Sertoli, respectivamente. La producción y liberación de LH y FSH están controladas por la GnRH, una hormona sintetizada en el hipotálamo que llega a la hipófisis mediante el sistema porta hipofisario, donde se une a su receptor en las células gonadotropas de la hipófisis. Aunque la GnRH no parece ser esencial para el desarrollo gonadal durante la etapa fetal, su función se vuelve crucial desde la pubertad, participando en la espermatogénesis, la esteroidogénesis y en los mecanismos de retroalimentación que regulan las hormonas esteroideas producidas en las gónadas (11).

7.2.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un péptido compuesto por diez aminoácidos que regula la función reproductiva en casi todos los vertebrados. Esta hormona es sintetizada por neuronas en el hipotálamo y liberada en los vasos sanguíneos de la eminencia media. Su función principal es controlar la producción y liberación de las hormonas gonadotróficas en la hipófisis, específicamente la (FSH) y (LH) (12).

Estas hormonas a su vez son responsables de iniciar y regular los procesos de producción de esteroides y desarrollo de gametos en las gónadas (12).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) se produce en el hipotálamo, situado en la base del encéfalo, y se transporta hacia la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos.

Esta hormona regula de manera específica la liberación de (FSH) y (LH), las cuales desempeñan un importante papel en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (13).

La GnRH se descarga en pulsos aproximadamente cada dos horas, y su secreción puede ser estimulada por la noradrenalina y el estradiol. Además, factores como las feromonas, que actúan sobre el bulbo olfatorio, y señales lumínicas que afectan la retina, también influyen en la liberación de GnRH. Por otro lado, la dopamina, los opioides y las endorfinas tienen un efecto inhibitorio sobre la liberación de esta hormona. Además, el estrés y el uso prolongado de corticosteroides ejercen una retroalimentación negativa sobre la producción de GnRH por parte del hipotálamo. En presencia de altos niveles de estradiol, la GnRH favorece la producción de LH en lugar de FSH. En contraste, niveles elevados de progesterona y bajos de estrógenos promueven la productividad de FSH por parte del hipotálamo (13).

La Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) desempeña un papel fundamental en los procesos de espermatogénesis y esteroidogénesis, así como en las reacciones de retroalimentación que regulan las hormonas esteroides producidas en las gónadas (14).

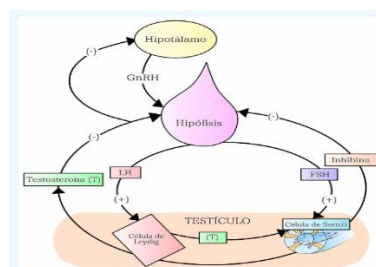


Figura 1. Regulación endocrina y paracrina del testículo.

Fuente: (11).

7.2.2. Hormona Folículo Estimulante y células de Sertoli.

La hormona que induce el crecimiento de los folículos en el ovario y la secreción de estrógenos es la (FSH). En el testículo, por otro lado, estimula la espermatogénesis al favorecer la síntesis proteica en los espermatoцитos primarios. Esta hormona es producida en el lóbulo anterior de la hipófisis (15).

Químicamente, la FSH se define como una glucoproteína que consta de dos cadenas peptídicas, denominadas alfa (α) y beta (β). La cadena alfa es compartida con otras dos hormonas hipofisarias, (LH) y (TSH). La regulación de la FSH involucra la (GnRH), así como los estrógenos y la inhibina. Estas interacciones y las variaciones en los niveles de estas hormonas son cruciales para determinar las diferentes etapas del ciclo estral en los mamíferos (15).

La Hormona Folículo Estimulante promueve la proliferación de las células de Sertoli, y en colaboración con la testosterona, es crucial para mantener la espermatogénesis. Cuando la FSH se une a su receptor específico en la membrana de las células de Sertoli, estimula la producción de inhibina. Esta hormona ejerce una retroalimentación negativa en la hipófisis para reducir la secreción de FSH. Además, la inhibina tiene una acción antagonista respecto a la activina, que estimula la formulación y secreción de FSH (15).

La activina, a su vez, está regulada por la folistatina, una proteína que se une a las subunidades de activina, bloqueando su interacción con los receptores y, por lo tanto, inhibiendo la liberación de FSH (15).

Las células de Sertoli son el órgano blanco tanto de la (FSH) como de la testosterona. Poseen receptores de membrana para la FSH y receptores nucleares para la testosterona. La FSH estimula a las células de Sertoli a producir una proteína llamada proteína ligadora de andrógeno (ABP), la cual es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz de los túbulos seminíferos. Las investigaciones sugieren que la ABP contribuye a mantener concentraciones elevadas de andrógenos en los túbulos seminíferos, lo cual es crucial para el desarrollo normal de la espermatogénesis y la función general de las células de Sertoli (16).

Las células de Sertoli son responsables de la producción de Inhibina, una hormona proteica que ejerce un efecto supresor sobre la secreción de (FSH), posiblemente actuando directamente en las células de la hipófisis (16).

Existen pocos estudios sobre el mecanismo exacto de acción de la inhibina. La FSH es crucial para iniciar la espermatogénesis durante la pubertad, pero una vez iniciada, la FSH parece no ser esencial para mantener este proceso, excepto en situaciones fisiológicas donde se

interrumpe, como bajo el efecto inhibitorio del fotoperíodo, donde se vuelve necesario para continuar con la espermatogénesis (16).

Cada célula de Sertoli es capaz de soportar el desarrollo de un número determinado de células germinales hasta convertirlas en espermatozoides; por lo tanto, teóricamente, el número de células de Sertoli presentes en el testículo determina la capacidad máxima de producción de espermatozoides (16).

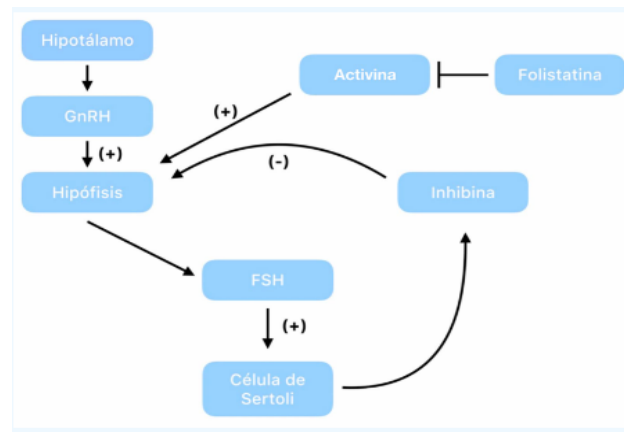


Figura 2. Sistema inhibina-activina-folistatina regulando la función de FSH.

Fuente: (11).

7.2.3. Hormona Luteinizante (LH) y células de Leydig

La hormona luteinizante (LH) es una glucoproteína formada también por dos subunidades, α y β , siendo la cadena α idéntica a la de la FSH. En las hembras, se produce un aumento máximo en la secreción de hormona luteinizante (LH) poco antes de la ovulación. Este incremento hormonal es crucial ya que desencadena la maduración final del ovocito, la ruptura del folículo ovárico y la liberación del gameto femenino hacia el oviducto (17).

Se encuentra en niveles máximos al final del estro esta produce en el lóbulo anterior de la hipófisis. La LH estimula la secreción de andrógenos tanto en las células tecales del ovario como en células intersticiales (Leydig) del testículo y la secreción de progesterona de las células granulosas del ovario (17).

En los machos, la Hormona Luteinizante (LH) desempeña un papel crucial al estimular las células intersticiales (células de Leydig) en los testículos, promoviendo así la producción de testosterona y dihidrotestosterona. Por esta razón, también se conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH). Durante la pubertad, niveles elevados de LH incitan a los testículos a sintetizar testosterona, lo cual es fundamental para la maduración de los espermatozoides (13).

Además, la influencia de la (LH) sobre las células de Leydig puede ser amplificada por la presencia de otras hormonas, como la Prolactina (PRL). La deficiencia de PRL puede causar infertilidad y atrofia testicular, mientras que aumentar significativamente los niveles de prolactina mediante terapias controladas que estimularán la producción espermática y restablece los niveles de testosterona en la sangre. No obstante, niveles elevados de PRL en la sangre pueden inhibir el trabajo testicular y provocar hipogonadismo (16).

Las células de Leydig, también conocidas como células intersticiales, se localizan en el espacio intersticial del testículo, fuera de los túbulos seminíferos. Su función principal es la síntesis de testosterona, crucial para mantener la espermatogénesis. La producción de testosterona está regulada por la Hormona Luteinizante (LH), que se une a los receptores de membrana en las células de Leydig, activando la vía del AMP cíclico (cAMP). Este proceso activa enzimas llamadas proteinquinasas, las cuales catalizan la fosforilación de proteínas dentro de la célula y la conversión de colesterol en pregnenolona, un precursor clave de los esteroides. En ausencia de LH, la producción de testosterona se detiene y las células de Leydig experimentan una notable reducción en tamaño (16).

7.2.4. Testosterona

La testosterona sintetizada por las células de Leydig se transporta hacia los túbulos seminíferos, donde es crucial para promover la espermatogénesis mediante procesos de difusión simple y difusión facilitada. La adecuada espermatogénesis, especialmente durante la fase de meiosis, es esencial para la producción de espermatozoides. Por otro lado, la testosterona tiene un impacto significativo en la libido, la función secretora de los órganos genitales, y en el desarrollo de las características sexuales secundarias y del fenotipo masculino (16).

La testosterona tiene un efecto estimulante en la supervivencia de las células germinales, y la investigación indica que la apoptosis de estas células ocurre después de una disminución en los niveles de esta hormona. La presencia constante de Hormona Luteinizante (LH) es fundamental para el desarrollo normal de la actividad de espermatogénesis (16).

7.2.5. Prolactina

La prolactina es una hormona compuesta por péptidos, principalmente producida por las células lactotropas localizadas en la adenohipófisis. Conforme se ha profundizado en el entendimiento de su fisiología y bioquímica, se ha revelado que esta hormona desempeña más de 300 funciones en diversos tejidos y órganos del cuerpo humano, lo que la caracteriza como una-

hormona con efectos pleiotrópicos. Además de regular la producción de leche, la prolactina también influye en diferentes aspectos del organismo, agrupados en áreas como la regulación del equilibrio hídrico y electrolítico, el crecimiento y desarrollo, funciones endocrinas y metabólicas, el comportamiento y funciones cerebrales, la reproducción, así como la modulación del sistema inmunológico y la protección del cuerpo (18).

La Prolactina estimula la espermatogénesis al aumentar los receptores para la Hormona Luteinizante (LH) en las células de Leydig, según estudios realizados. Esta hormona desempeña un papel crucial durante el periodo de recuperación de las células de Leydig antes del inicio de la temporada reproductiva, facilitando el desarrollo de la capacidad de estas células para responder de manera más efectiva al incremento de LH (16).

7.3. Fisiología del aparato reproductor del perro

La fisiología del macho canino en términos reproductivos se centra en la producción, maduración y liberación de espermatozoides, así como en la secreción de hormonas que regulan estos procesos. Los testículos son los órganos principales responsables de la producción de espermatozoides y de la síntesis de testosterona, la hormona masculina clave. La testosterona es fundamental para el desarrollo de características sexuales secundarias, el mantenimiento del comportamiento sexual, y la regulación de la espermatogénesis (19).

7.3.1. Espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis, que tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos, implica la producción de espermatozoides (gametos masculinos). Las espermatogonias, células precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal en mitosis para generar espermaticitos. Estos espermaticitos luego se dividen mediante meiosis, reduciendo su número de cromosomas a la mitad (haploides con 39 cromosomas) y formando espermátidas (20).

Las espermátidas experimentan una reestructuración significativa, en la cual el núcleo se convierte en la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centriolos contribuyen al desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma residual es absorbida por las células de Sertoli, situadas sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, que regulan la metamorfosis de espermátidas a espermatozoides (20).

La espermatogénesis inicia a los 4 meses de edad, aunque los espermatozoides no están presentes en el eyaculado hasta los 10-12 meses. En los machos reproductores, la producción de semen es proporcional al tamaño testicular. El semen se almacena en los compartimentos

extragonadales del epidídimo y el conducto deferente, y la cantidad reservada depende de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones. La eyaculación frecuente puede disminuir la calidad del semen, ya que vacía las reservas espermáticas, como se observa con una eyaculación diaria durante 5 a 7 días. Una vez agotadas las reservas, la cantidad de espermatozoides depende únicamente de la producción diaria testicular. Por esta razón, la recolección de semen se recomienda cada dos días para permitir la reposición de las reservas espermáticas (21).

Existen escasas evidencias que respalden que el eyaculado de un canino con infrecuente actividad de cubrición contenga una elevada proporción de espermatozoides anormales. En cambio, los machos sometidos a alta demanda reproductiva pueden experimentar periodos de fertilidad subóptima en ciertas fases de su vida reproductiva. (22).

El ciclo completo de la espermatogénesis, desde la división de las espermatogonias hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tiene una duración de 8 semanas, de las cuales 2 semanas son necesarias para la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (22).

7.3.2. Termorregulación testicular

Para que la espermatogénesis se produzca correctamente, la temperatura de los testículos en la mayoría de los mamíferos debe ser 2 grados inferior a la del cuerpo (23).

- Ocurre en el plexo pampiniforme, donde la vena y la arteria testicular están profundamente conectadas, provocando que la sangre arterial con temperatura corporal se enfríe gracias a la sangre venosa proveniente del testículo a menor temperatura (23).
- La constante contracción y relajación del músculo cremáster asegura que el sistema vascular funcione correctamente y que la temperatura corporal esté controlada.
- La difusión de la temperatura hacia el exterior a través de la túnica dartos, que está estrechamente conectada con la túnica vaginal parietal y visceral, contribuye a la termorregulación.
- Las glándulas sudoríparas permiten una disminución de la temperatura cuando hay un aumento de temperatura a nivel del cuerpo o del escroto gracias al hipotálamo, que al detectarse desencadena la sudoración en el escroto (23).

Durante las últimas dos semanas, los espermatozoides completan su maduración en el epidídimo, llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo y completan su maduración durante su paso por el epidídimo (23).

Al entrar en los conductos deferentes, pierden la gota citoplasmática restante y esta es expulsada de los espermatozoides o migra al extremo distal y luego se considera madura. Un extremo del epidídimo se vuelve más delgado y se convierte en el conducto deferente, lo que permite que los espermatozoides salgan del escroto (23).

7.4. Manejo del macho reproductor

El manejo reproductivo se considera crucial en la reproducción asistida de perros, siendo los errores en este manejo responsables de la mayoría de los problemas reproductivos encontrados en clínicas veterinarias (24). Es fundamental elaborar un protocolo de evaluación clínica exhaustiva para los machos reproductores caninos, el cual incluye:

7.4.1. Anamnesis

Información proporcionada por el propietario o responsable del animal mediante preguntas estructuradas permite obtener diversos antecedentes que pueden guiar u orientar sobre las posibles enfermedades que el animal ha padecido o podría haber experimentado (24).

7.4.2. Reseña del animal

Se recopilan datos importantes como la especie del animal, su edad aparente y real, raza, sexo, color y peso. Estos detalles son fundamentales para la evaluación clínica general del animal y para la orientación sobre posibles condiciones médicas que pueda tener o haber tenido (24).

7.4.3. Estado general

Además de los datos básicos mencionados anteriormente, es crucial evaluar la constitución y temperamento del animal, clasificándose como asténico (nervioso), apoplético (sanguíneo) o linfático. También se deben observar las actitudes y comportamientos del animal, así como realizar una inspección general detallada. Estos aspectos proporcionan una comprensión más completa de la salud y el estado general del animal reproductor canino (24).

7.4.4. Examen físico

Es esencial realizar una evaluación de la piel, los ganglios linfáticos, las membranas mucosas, la temperatura corporal y llevar a cabo un examen exhaustivo por sistemas. Estos procedimientos son fundamentales en la evaluación clínica global del macho canino reproductor para identificar posibles anomalías y dirigir adecuadamente el manejo reproductivo asistido (24).

7.4.5. Pruebas complementarias y de laboratorio

Siempre es recomendable integrar el examen físico (semiológico) con los hallazgos obtenidos en pruebas radiográficas o de laboratorio, como el hemograma, la bioquímica sanguínea, los cultivos, entre otras. Esta integración proporciona una evaluación más completa y precisa del estado de salud del macho canino reproductor, facilitando así decisiones informadas en el manejo de la reproducción asistida (24).

7.4.6. Examen andrológico

Un examen andrológico se realiza preferentemente en una sala protectora y consta de tres partes importantes: un examen físico, un examen transrectal de los genitales internos y una evaluación del semen. La morfología y la bioquímica de los espermatozoides se examinan en primer lugar mediante todas las pruebas que se utilizan habitualmente en los laboratorios. Es importante señalar que la fertilidad de una muestra de esperma depende de dos factores: la calidad del esperma y la cantidad de espermatozoides normales. Básicamente, dos características para determinar la calidad del esperma son la viabilidad y la morfología espermática (25).

Al inspeccionar el escroto mediante inspección y palpación, es necesario evaluar el color de la piel, la presencia de lesiones y la elasticidad. Se debe evaluar el número, ubicación, consistencia y sensibilidad de los testículos. Normalmente son firmes y regordetes y volverán a su forma natural cuando los sostengas. Si él se siente plano, puede sugerir hipoplasia y si está muy rígido, puede indicar signos de fibrosis. Se examina la anatomía del glande en busca de secreciones anormales, lesiones o tumores. Y finalmente, verás que el prepucio cubre completamente el pene, sin llagas ni desgarros, permitiendo la entrada y salida normal del pene. Es normal observar una secreción purulenta de color verde moderado, que se debe a la regeneración celular de la mucosa del prepucio (2).

El éxito de la reproducción en caninos está estrechamente ligado a los siguientes factores:

- 1) La salud y la nutrición de los reproductores.
- 2) La detección precisa del momento de máxima fertilidad de la hembra.
- 3) El tipo, manejo y calidad del semen empleado.
- 4) La implementación correcta de técnicas de inseminación artificial (IA).

Estos elementos son cruciales para optimizar las probabilidades de éxito en los programas de reproducción asistida en perros (13).

7.5. Valoración del reproductor

La evaluación del potencial reproductivo de los perros machos es una parte necesaria de un programa reproductivo satisfactorio y la selección de los perros reproductores depende de:

- Capacidad física para copular.
- Su comportamiento durante la cópula (la libido).
- Recogida de muestras de semen normal.

Si alguno de estos factores falla, las posibilidades de que una perra criada o inseminada artificialmente (IA) quede preñada disminuyen. Desde el punto de vista físico, una nutrición adecuada y el ejercicio son fundamentales para garantizar la fertilidad masculina. Los machos utilizados para la reproducción deben someterse a un examen físico completo para su evaluación. Realizar exámenes ortopédicos, neurológicos, endocrinos y del sistema reproductivo antes del apareamiento o la inseminación artificial (13).

1.1.Eyaculación

La eyaculación no es más que la expulsión de líquido biológico al exterior mediante un reflejo en el que se contraen los elementos que componen el aparato reproductor. Dependiendo de la especie animal, existen diferentes tipos de eyaculación. En los perros se trata de un eyaculado trifásico, es decir, que consta de tres fracciones con una duración total de unos 22 minutos (26).

La erección en el perro ocurre fundamentalmente por un aumento en la turgencia debido a que existe más entrada que salida de sangre, generando un aumento de la presión dentro del sistema circulatorio peneano. La estimulación producida por los nervios pélvicos y sacros origina la dilatación de las arterias externas e internas a nivel del cuerpo cavernoso del pene. Asimismo gracias a la contracción de los músculos isquiocavernosos, el retorno venoso del cuerpo cavernoso es restringido, permitiendo que la sangre quede retenida en el interior de este tejido causando un aumento de volumen del bulbo del pene y un alargamiento del glande, haciendo que este se deslice hacia adelante (26).

La eyaculación se produce tras la estimulación de los nervios simpáticos en el pene, que generan contracciones peristálticas en los músculos bulbo-cavernoso e isquiocavernoso que rodean a la uretra a nivel del bulbo del glande. Por su parte, los conductos deferentes son los encargados de transportar los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta el pene a través de la uretra, desembocando en la próstata craneal. Las contracciones originadas por dichos músculos sobre la uretra permiten la expulsión del semen (26).

La primera fracción o fracción pre espermática procede de la próstata y se caracteriza por tener escasos espermatozoides e incluso una ausencia completa de ellos. Tiene una consistencia acuosa, transparente, se presenta en el principio la erección es muy rápida y corta corresponde al 2% o 3% del volumen total. Se excreta rápidamente en 30 a 1 minuto y su función es limpiar y eliminar todos los posibles residuos de orina y contaminación de la uretra (26).

La segunda fracción proviene del epidídimo y es más retardada y lenta por contener espermatozoides tiene un color que varía entre el blanco lechoso y el gris, por lo que su consistencia es más viscosa que la anterior. El tiempo de emisión es de 1 a 2 minutos. Esta fracción es rica en espermatozoides (26).

La tercera fracción o fracción prostática es liberada lentamente durante varios minutos, la secreción tiene una consistencia acuosa se crea después de la fracción de esperma, tiene un color transparente y se añade cuando los animales se unen en direcciones opuestas. Esta proporción representa el 90% del volumen total de la eyaculación, y su eliminación puede durar de 3 a 30 minutos (26).



Figura 3. Evaluación visual de las diferentes fracciones del eyaculado.

Fuente: (26).

Durante las últimas dos semanas, los espermatozoides completan su maduración en el epidídimo, llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo y completan su maduración durante su paso por el epidídimo (23).

Al entrar en los conductos deferentes, pierden la gota citoplasmática restante y esta es expulsada de los espermatozoides o migra al extremo distal y luego se considera madura. Un extremo del epidídimo se vuelve más delgado y se convierte en el conducto deferente, lo que permite que los espermatozoides salgan del escroto (23).

7.6. Métodos de extracción seminal

La recolección de semen se realiza habitualmente mediante masturbación, aunque la electroeyaculación puede ser empleada en animales extremadamente agresivos o en aquellos que no logran eyacular mediante la técnica manual. La recolección de la fracción espermática es suficiente para llevar a cabo la inseminación artificial; parte de la fracción prostática puede también ser recolectada únicamente para garantizar que se ha obtenido completamente la segunda fracción (4).

7.6.1. Estimulación manual

Es el método más utilizado en la especie canina y se desarrolla mediante la estimulación manual del bulbo del pene. Siempre que sea posible es recomendable la presencia de una hembra en celo. Para conseguir un mayor grado de excitación puede permitirse la presencia de una hembra en celo, y que el macho olfatee la región vulvar, incluso que dé un salto sobre ella, con objeto de obtener la estimulación necesaria que facilite la recogida. Es la mejor técnica en machos muy jóvenes o sin excesiva experiencia sexual. Cuando no se dispone de hembra, es factible el uso de gasas o algodones impregnados en secreciones vaginales de una hembra en celo, que pueden guardarse congelados y ser descongelados 15 min antes de su uso. También puede ser útil recoger la orina de una perra en celo y congelarla, y proceder a descongelarla cuando sea preciso (26).

También se puede recurrir a una hembra sumisa, a la que, si es posible, se le impregna la cola con secreciones u orina de una hembra en celo, si no resulta posible disponer de monturas vivas, se puede llevar a cabo una estimulación manual del bulbo del pene, aunque el macho no esté previamente excitado, consiguiendo en machos entrenados que el bulbo se estimule con bastante facilidad aunque no esté presente una hembra en celo.

En cualquier caso, el procedimiento consiste en estimular el bulbo del pene y, una vez que se haya conseguido aumentar su tamaño un 40-50%, se exterioriza el bulbo fuera del prepucio. Es importante que el técnico deslice el prepucio hacia caudal antes de que el bulbo del glande se congestione totalmente. En aquellos casos en que el bulbo haya aumentado demasiado de tamaño y la abertura prepucial no permita su salida, debe detenerse la estimulación unos pocos minutos para permitir su detumescencia. Pasado este tiempo se puede volver a iniciar el proceso de estimulación (26).

Cuando se ha alcanzado un tamaño suficiente se realizan sobre el bulbo ligeras contracciones, simulando las que se producen de forma fisiológica en la vagina de la hembra; con ello se

consigue que la erección se complete. En este momento, muchos perros ya inician la eyaculación, si bien la mayoría requiere una rotación del pene en sentido caudal (180°); con esta rotación se consigue una oclusión de la vena emisaria del glande que impide que la erección disminuya. Una vez iniciada la eyaculación, el semen debe ser recogido en un recipiente previamente atemperado con una temperatura que oscile entre los 37°C , siendo el instrumental comúnmente usado un tubo de cristal acoplado a un embudo también de cristal, aunque puede utilizarse embudos de plástico (26).



Figura 4. Embudos y tubos de plástico utilizados para la recogida seminal.

Fuente: (26).



Figura 5. Estimulación manual sobre el glande del pene.

Fuente: (26).

De manera general, se intenta recoger las tres fracciones por separado, o al menos recoger de manera individual la fracción rica en semen. Finalizada la eyaculación, o tras haber obtenido la fracción de interés, la erección desaparece escasos minutos después de liberar el pene de la presión digital, si bien se considera interesante controlar que el pene vuelva a su información y localización normales en el interior del prepucio. En algunas ocasiones, el prepucio puede enrollarse sobre sí mismo e impedir el regreso del pene a su interior, lo que provoca sequedad y exposición de este a posibles traumas (26).

7.6.2. Vagina artificial

Está formada básicamente por un cilindro rígido de unos 15 cm de longitud que se encuentra rodeado por una camisa de caucho donde se deposita agua a 40 °C a través de una válvula; en algunos casos también es posible insuflar aire para aumentar la presión. En un extremo del cilindro se coloca un embudo de caucho que está unido a un tubo colector graduado a 37 °C, que se va cambiando conforme se van recogiendo las diferentes fracciones del eyaculado (27).

La técnica consiste en introducir el pene dentro de la vagina artificial cuando haya alcanzado más de un 50% de erección. El pene se coloca en el interior de la vagina una vez que está erecto y que se haya exteriorizado el bulbo, colocando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la vagina artificial hasta conseguir la eyaculación (27).



Figura 6. Materiales para una vagina artificial.

Fuente: (26).

7.6.3. Electroeyaculación.

La técnica de electroeyaculación consiste en obtener semen mediante la aplicación de un estímulo eléctrico. Este estímulo se administra a través de un electrodo que se inserta en el recto del animal. Este método facilita la recolección de semen de manera repetitiva en animales que están en cautiverio, en semicautiverio o en animales domésticos que no han sido entrenados para eyacular en una vagina artificial (28).

Un equipo de electroeyaculación está compuesto por varios elementos, que incluyen la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de la batería, el cable de alimentación, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el recipiente de recolección. facilitar la distribución de material genético valioso comercialmente, además de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades. Esta metodología se basa en la estimulación eléctrica aplicada a través de un transductor rectal, estimular los nervios pélvicos simpáticos y

parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección penénea y eyaculación (29).

La eyaculación es un proceso que ocurre en dos fases: primero se produce la emisión, seguida por la erección y la eyaculación en sí. Cuando se aplica una estimulación adecuada, esta se transmite a través del nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral. Desde allí, la respuesta viaja a través de los nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexo hipogástrico), lo que provoca la contracción de la musculatura lisa que rodea la próstata, las glándulas vesiculares y los conductos deferentes, asegurando el avance del semen hacia la uretra pélvica. Simultáneamente, la respuesta nerviosa también se transmite a través de los nervios parasimpáticos, lo que provoca la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso y uretral), resultando en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha (30).

Esta técnica se fundamenta en la aplicación regular de un estímulo eléctrico a través del recto, activando tanto el sistema nervioso autónomo como el somático. Esto provoca la secreción de fluidos de las glándulas accesorias y culmina en la eyaculación (29). El perro recibe un total de 240 estímulos eléctricos, divididos en 4 conjuntos de 60 estímulos y un voltaje de 6 V, el intervalo entre estímulos es de 3,0 segundos (2). Es un método experimental, que requiere anestesia general (31).

7.7. Características semen canino

La consideración de ciertos parámetros permitirá determinar el propósito de la eyaculación. Es decir, si el material seminal analizado cualitativamente, mediante evaluación macroscópica y microscópica, se encuentra en condiciones de ser procesado (2).

El análisis seminal, o espermiograma, comprende una serie de pruebas que evalúan diferentes factores y funciones de las células espermáticas. A partir de este análisis, se determina si la muestra es apta o no para su uso en inseminación artificial. El análisis rutinario incluye tanto un examen macroscópico como microscópico del eyaculado, en el cual se evalúan el volumen, la concentración, la motilidad, el estado del acrosoma y las anomalías morfológicas de los espermatozoides (32).

7.7.1. Características macroscópicas

En la evaluación macroscópica se lleva a cabo una observación inicial de la apariencia general del eyaculado, enfocándose en su consistencia, olor y volumen (33). El análisis macroscópico

del semen implica examinar las características fundamentales del eyaculado a simple vista, sin necesidad de utilizar un microscopio (34). Entre los aspectos seminales macroscópicos más relevantes se incluyen los siguientes:

7.7.1.1. Volumen

El volumen de eyaculado variará dependiendo de diversos factores como raza, edad, tamaño del animal, edad, tipo de comida, excitación, experiencia, etc. Según varios estudios realizados en razas de diferentes tamaños, se ha encontrado que, en perros pequeños como Chihuahua, Pequinés, Pincher, Schnauzer Miniatura, etc. el volumen es de aproximadamente 1,5 a 5,0 ml (2).

7.7.1.2. Color

El color normal del semen varía desde el gris transparente hasta el blanco lechoso, esta variación depende directamente de la concentración de espermatozoides. Un color anormal debería alertarte de un problema en el tracto genital masculino, por ejemplo, el rojo indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie del pene o de la próstata, el amarillo indica la presencia de orina y las partículas blancas indican la presencia de leucocitos (35).

7.7.1.3. pH

El pH debe medirse inmediatamente después de la recolección del eyaculado. Para ello se aplica una gota de esperma sobre un papel de pH y se lee al cabo de 30 segundos. El pH normal del semen canino está en el rango de 6,3 a 7 y depende de la cantidad de líquido. Una caída del pH puede deberse a una eyaculación incompleta o a una inflamación de los testículos y el epidídimo (36).

7.7.2. Características microscópicas

El análisis microscópico del semen permite evaluar la movilidad, vitalidad, concentración y morfología de los espermatozoides, además de detectar la presencia de células y/o elementos acompañantes distintos a los espermatozoides, como leucocitos, células progenitoras espermáticas, células inflamatorias, bacterias y cristales (37).

En el análisis microscópico inicial, es esencial evaluar la presencia de células no espermáticas, leucocitos, filamentos de moco, cristales (como el fosfato de espermina), hematíes, espermatozoides aglutinados y otros elementos, como: *Trichomonas vaginalis* y levaduras (37).

7.7.2.1. Motilidad

Es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizar y deberá evaluarse a 37°C (35).

En la valoración de la motilidad tomamos en cuenta la motilidad masal y la individual. Puede alterarse por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección El valor normal de la motilidad del semen fresco en los perros oscila entre 85- 95% (38).

Cuando se habla de la motilidad del semen después de la congelación, se considera que tiene buena calidad si los valores son superiores al 50%. Se ha comprobado que 200 x 10⁶ espermatozoides móviles en fresco, es un buen valor para obtener tasas de fertilidad comparables a los obtenidos mediante monta natural. Al usar semen congelado y realizar una inseminación intrauterina se recomiendan que entre 150-200 x 10⁶ espermatozoides sean móviles (38).

7.7.2.2. 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 (31).

Calificación

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 (31).

7.7.2.3. Vigor

Es una medida que indica la intensidad del desplazamiento progresivo en línea recta, y se evalúa utilizando la misma preparación que se emplea para analizar el movimiento individual (32). Es considerable porque entre mayor vigor mayor vitalidad posee el esperma (39). Para la

evaluación del vigor, hay que tener en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de olas (40). La clasificación se realizó según lo propuesto por Restrepo et al de 1-5 (1 malo 5 excelente), evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3 (41).

7.7.2.4. 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 (31).

Calificación

Muy buena (80-100%) (38).

Buena (60-79%)

Regular (40-59%)

Pobre (<40%)

7.7.2.5. Morfología

Es importante en la valoración de la fertilidad, con el fin de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anormalidades. Existe una alta correlación entre los defectos espermáticos e infertilidad (38).

La tinción más utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. Otra técnica de tinción es la de la de Azul de metileno, que de igual manera sirve para la viabilidad seminal y evaluación de las membranas, ayudándonos a diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (38).

7.7.2.6. Morfo-anomalías

Las anormalidades de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anormalidades en primarias y secundarias. La suma entre anormalidades primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20%, para poder considerar un semen apto para usar (31).

7.7.2.6.1. Anormalidades primarias

Ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden manifestarse a nivel del acrosoma (como pérdida del borde apical, abultamiento, arrugamiento, incompleto o desdoblado), de la cabeza (piriforme, flagelada, lanceolada, irregular, angosta, doble, macrocéfalo, microcéfalo), del cuello (con fractura, retroacción o presencia de gota citoplasmática), y de la cola (corta, doble, retorcida o con gota citoplasmática) (42).

- Doble flagelo (13).
- Cola doblada.
- Microcéfalo.
- Macrocéfalo.
- Cabeza alargada.
- Cabeza doble.
- Cabeza periforme

7.7.2.6.2. Anormalidades secundarias

Se producen durante el transporte de los espermatozoides desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su expulsión por la uretra durante la eyaculación (42).

Debido a errores durante la manipulación del semen por parte del examinador, como la persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados y ruptura del acrosoma, pueden surgir problemas (31).

En el caso específico de la gota citoplasmática proximal, se ha observado que afecta la fertilidad en perros. Sin embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece influir en la fertilidad canina. El porcentaje normal de incidencia es de 10-20% (31).

Anomalías de la cabeza:

- Desprendimiento o separación prematura del acrosoma.
- Acrosomas protuberantes.
- Defecto de cráter (13).

Anomalías del cuello:

- Cuello torcido.
- Cuello roto.
- Gota citoplasmática intermedia.

Anomalías en la pieza media:

- Gota citoplasmática distal.
- Unión al cuello.

Anomalías en la cola:

- Cola torcida.
- Cola enrollada (13).



Figura 7. Anormalidades spermáticas.

Fuente: (31).

7.7.2.7. Concentración

La concentración es el número de espermatozoides por ml de semen. El número de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la concentración por el volumen total colectado. La concentración seminal puede fluctuar según la edad, raza, estado fisiológico, salud, tamaño de los testículos, actividad sexual, temporada del año y frecuencia de recolección. Los espermatozoides se cuentan con la ayuda de la cámara Neubauer, Burker o fotocolorímetro (35).

En una pipeta se hará la dilución de solución salina al 2.9 % de 1:100, después se llenará la cámara Neubauer y se contabilizarán los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. La cámara Neubauer tiene 2 cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se dividen entre dos para sacar el promedio y el resultado (número de espermatozoides) se multiplica por 5×10^6 según el factor de dilución (1:100 es por 5×10^6), obteniéndose así la concentración espermática por ml de eyaculado. Se multiplicará la concentración obtenida en cada ml., por el volumen colectado; dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado. En un eyaculado normal existen en promedio de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro y por lo menos 100 millones son necesarios para gestar una perra, siempre y cuando se inseminan con

semen fresco. Cuando el semen es congelado la concentración espermática debe ser mayor debido a la muerte de espermatozoides ocasionada por los procesos de congelamiento y descongelamiento (35).

Para el perro se considera normal de 200 a 500 millones de espermatozoides normales/eyaculado. Cuando es semen congelado se ha estipulado que son necesarios entre 150 y 200 millones de espermatozoides por inseminación con una tasa de sobrevivencia del 50% para obtener resultados satisfactorios. Una vez recolectado el semen puede ser almacenado, congelado o refrigerado a 5-10°C manteniendo la viabilidad de los espermatozoides durante un lapso de 18 a 21 horas (24).

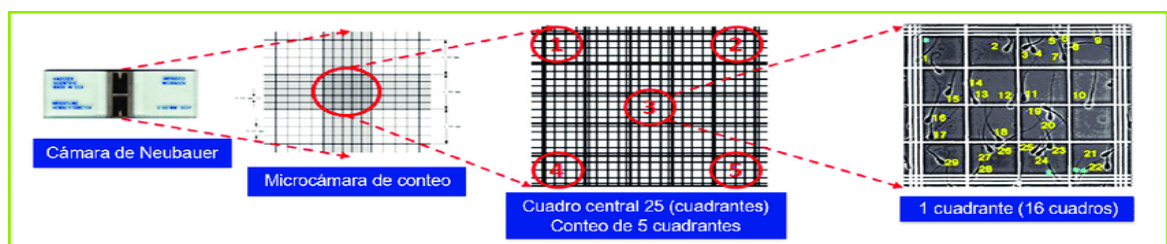


Figura 8. Cámara de Neubauer para obtener la concentración espermática.

Fuente: (24).

7.7.3. Factores que afectan las características del semen

La calidad del semen eyaculado se ve influenciada por varios factores, como la edad, la frecuencia de eyaculación, la excitación del animal y la manera en que se manipula la muestra durante la recolección y evaluación (43).

7.7.3.1. Pubertad

La eyaculación temprana de un perro después de alcanzar la pubertad a menudo contiene espermatozoides anormalmente muertos. En la siguiente eyaculación, la concentración de espermatozoides aumenta, la cantidad de espermatozoides anormales disminuye y el semen tiene una cantidad normal de espermatozoides maduros (44).

7.7.3.2. Frecuencia de la eyaculación.

La frecuencia de la eyaculación afecta directamente el volumen de semen y la concentración de espermatozoides. Se demostró una ligera disminución en el recuento total de espermatozoides en la eyaculación cuando se tomaron muestras una o dos veces al día en comparación con dos o tres veces al día, una semana. Esta disminución se asocia con una disminución en el suministro de espermatozoides en el epidídimo. Cuando se agota, la disminución en el recuento de

espermatozoides se estabiliza y la disminución posterior depende de la tasa de producción en los testículos. Por lo tanto, aunque la cantidad de espermatozoides en la eyaculación disminuye con un mayor uso, la cantidad total de espermatozoides producidos por semana es relativamente constante e incluso puede aumentar con una mayor actividad sexual. La cantidad total de espermatozoides en la eyaculación puede aumentar después de unos días de descanso, probablemente debido a la reposición de la reserva epididimaria. La libido permanece normal incluso si el perro se ve obligado a eyacular diariamente (31).

7.7.3.3. Tamaño testicular.

Se ha demostrado que el tamaño del parénquima testicular y por tanto el tamaño de la glándula tiene una correlación directa con la producción diaria de esperma. El ancho escrotal proporciona una medida objetiva del tamaño testicular y un método para identificar perros con testículos más pequeños de lo normal. Es normal que el ancho del escroto se ajuste según el peso corporal. Sin embargo, el ancho escrotal no es un indicador preciso; Se observan variaciones significativas en el ancho escrotal en perros de cualquier peso corporal, debido en parte a diferencias raciales. Además, el ancho escrotal "normal" no significa que el perro esté produciendo esperma (2).

7.8. Diluyentes

El diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir la dosis necesaria, conservar las características de funcionalidad de las células espermáticas, manteniendo el nivel de fertilidad preciso (45).

Para cumplir con el control biológico sobre el medio que rodea al espermatozoide, un diluyente debe cumplir los siguientes requisitos:

- Poseer una presión osmótica isotónica con la de la sangre del macho y ser capaz de conservarla durante el almacenamiento a un nivel aproximado.
- Proporcionar un equilibrio adecuado de elementos minerales esenciales para la vida de las células espermáticas.
- Aportar los nutrientes que precisan los zoospermos, para su metabolismo aerobio y anaerobio.

- Suministrar lipoproteínas y/o lecitinas que protegen a los monospermos del choque térmico. Proveer de sustancias químicas que tengan poder tampón sobre los productos finales del metabolismo citospermático.
- Aportar sustancias reductoras para proteger las enzimas celulares dotadas de grupos sulfhídricos (45).

Mediante la adición de diluyentes, el semen puede ser refrigerado, lo que facilita su conservación y transporte. Las bajas temperaturas reducen las tasas metabólicas de los espermatozoides, extendiendo así su viabilidad. Los diluyentes protegen las membranas espermáticas del daño inducido por las variaciones de temperatura, proporcionan energía y mantienen el pH y la osmolalidad estables. Además, los antibióticos incorporados en los diluyentes previenen la proliferación bacteriana, especialmente en aquellos que contienen yema de huevo (4).

7.8.1. Características de los diluyentes

Los diluyentes seminales tienen como objetivo principal preservar la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos diluyentes suministran fuentes de energía y contribuyen a mantener condiciones estables de pH y osmolaridad en el entorno extracelular. Se han evaluado distintos tipos de diluyentes seminales, ya sean comerciales o formulados en laboratorio, en cuanto a su capacidad para preservar el potencial fecundante del semen canino refrigerado (46).

7.8.2. Diluyente comercial de origen vegetal.

En años recientes, se ha identificado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) obtenidas de la yema de huevo (YH) ofrecen una mejor protección a los espermatozoides frente al choque térmico en comparación con el uso de la yema de huevo completa. No obstante, algunos investigadores han señalado que estos componentes de origen animal podrían implicar un riesgo de contaminación microbiana durante los procedimientos de inseminación artificial en animales domésticos (47).

Es un diluyente desarrollado para la preservación de semen canino. Este diluyente está formulado para mantener la viabilidad y motilidad espermática durante el almacenamiento en frío, siendo adecuado tanto para la refrigeración como para la congelación de semen (48).

Como uno de los fosfolípidos, la lecitina (o fosfatidilcolina) se distribuye ampliamente en las plantas y desempeña un papel importante en la regulación de la función fisiológica de la biomembrana de las células animales (49).

Los derivados de la soja, en particular la lecitina de soja, se han destacado como sustitutos efectivos de la yema de huevo debido a su origen no animal. La lecitina de soja es una combinación natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos, como el esteárico, oleico y palmítico, que proporcionan estabilidad estructural a las membranas celulares. Se han obtenido resultados *in vitro* similares al usar diluyentes comerciales basados en soja para la criopreservación de esperma (49).

7.8.3. Diluyente comercial de origen animal.

En años recientes, se ha identificado que las lipoproteínas de baja densidad obtenidas de la yema de huevo ofrecen una mejor protección a los espermatozoides frente al choque térmico en comparación con el uso de la yema de huevo completa. No obstante, algunos investigadores han señalado que estos componentes de origen animal podrían implicar un riesgo de contaminación microbiana durante los procedimientos de inseminación artificial en animales domésticos (47).

Posteriormente, los primeros estudios demostraron que la yema de huevo tiene un efecto protector sobre los espermatozoides contra el daño causado por el choque térmico durante el proceso de criopreservación. Se ha propuesto que los fosfolípidos contenidos en la yema de huevo pueden integrarse en la membrana del espermatozoide, sustituyendo algunos de los fosfolípidos originales y reduciendo así la temperatura en la que la membrana cambia de fase (50).

Además, la lecitina y las lipoproteínas de baja densidad presentes en la yema de huevo pueden unirse a las membranas plasmática y acrosomal, mejorando su estabilidad durante la criopreservación (50).

Composición:

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

- Antioxidantes
- Componentes propios del fabricante
- Glicerina
- Antibiótico (Minitub Manual (38)).

7.8.3.1.7.9.3.1. Proteína (Yema de huevo)

La yema de huevo es ampliamente utilizada como componente en los diluyentes de criopreservación de semen en diversas especies, debido a su capacidad protectora sobre las membranas de los espermatozoides durante el proceso de congelación. Este efecto protector se debe a las lipoproteínas de baja densidad (LBD) presentes en la yema, las cuales contienen triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Las LBD ayudan a prevenir la formación de cristales de hielo y protegen la integridad de la membrana plasmática frente al daño por frío. Además, diversos estudios han demostrado que eliminar las lipoproteínas de alta densidad (LAD) puede mejorar la calidad del semen tanto antes como después de su congelación (51).

7.9.Refrigeración del semen

La tecnología de refrigeración y almacenamiento de semen es crucial en la gestión reproductiva canina. Desde 1954, cuando se logró la primera aplicación exitosa de semen refrigerado en perros, el uso de semen canino conservado en frío para la inseminación artificial (IA) ha ganado considerable popularidad en las últimas décadas. Como resultado, el mercado internacional de semen canino refrigerado ha experimentado un crecimiento notable, y su manipulación y transporte, tanto a distancias cortas como largas, se ha convertido en una práctica común. Entre las principales ventajas de emplear semen refrigerado se encuentran la facilidad en su procesamiento y envío, los costos relativamente bajos debido a la ausencia de necesidad de equipo especializado, y menos complicaciones legales en su importación y exportación en comparación con el semen congelado. Además, cuando se aplican métodos igualmente eficaces para la sincronización del ciclo estral y la inseminación artificial, las tasas de preñez y el tamaño de las camadas son superiores en comparación con los obtenidos con semen congelado y descongelado (52).

Generalmente, el semen refrigerado se envía en un recipiente térmico común o dentro de una caja de poliestireno con bolsas de hielo. Este embalaje es liviano y no requiere ser devuelto al origen, lo cual ayuda a mantener bajos los costos de envío. Con el uso de diluyentes apropiados,

el semen puede refrigerarse a 4°C, lo que disminuye la tasa metabólica de los espermatozoides y prolonga su longevidad (53).

La refrigeración puede realizarse en laboratorios de baja complejidad y puede utilizarse además de una estabilización prolongada antes de la congelación en centros con equipo adecuado y personal capacitado. El semen refrigerado puede depositarse fácilmente por vía intravaginal sin necesidad de entrenamiento y equipamiento que necesariamente requiere la deposición intrauterina de semen congelado en esta especie con características anatómicas muy particulares del aparato genital posterior (53).

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío (53).

Para la refrigeración, se recolecta la fracción espermática del semen y se mezcla con el diluyente seleccionado, el cual debe estar a la misma temperatura que el semen al momento de la dilución. Es importante mantener una proporción de 1:3 o 1:4 entre semen y diluyente, ya que un exceso de diluyente puede afectar negativamente la motilidad espermática. El semen preparado de esta manera puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse en inseminación artificial, logrando tasas de preñez aceptables dentro de las primeras 24-48 horas. Antes de la inseminación, el semen refrigerado debe ser llevado gradualmente a temperatura ambiente (4).

El uso de semen refrigerado con diluyentes protectores, como el tris-buffer con un 20 % de yema de huevo, permite preservar espermatozoides con buena capacidad fecundante durante un tiempo suficiente para transportar el semen e inseminar animales en ubicaciones geográficas distantes (4).

La refrigeración del semen a temperaturas que fluctúan entre los 4 y 6 °C, es una alternativa simple para la conservación de espermatozoides caninos con adecuada capacidad fecundante. La refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática (plasmalema) al daño causado por los cambios de temperatura (shock térmico) (46).

En perros, la dilución y refrigeración de semen a 4°C permite conservar espermatozoides con capacidad fecundante por períodos que van desde 2-3 días hasta 10 días mediante técnicas especializadas. Este tiempo es suficiente para transportar y utilizar el semen de un reproductor en diferentes ubicaciones del país y en naciones vecinas. Las regulaciones para el transporte y

exportación de semen refrigerado son significativamente menos complejas y costosas en comparación con las del semen congelado o el traslado del propio animal (53).

El semen canino puede ser preservado a través de métodos de refrigeración o criopreservación, lo cual reduce la tasa metabólica y extiende la viabilidad espermática. Los medios diluyentes empleados en estos procesos actúan protegiendo las membranas espermáticas contra los daños térmicos, proporcionando energía, y manteniendo la estabilidad del pH y la presión osmótica. La yema de huevo es un componente común en estos diluyentes debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad ofrecen protección al espermatozoide contra el choque térmico.

El semen preparado con distintos diluyentes puede ser refrigerado a 4°C o 15°C y utilizado en inseminación artificial, obteniendo tasas de preñez satisfactorias en las primeras 24-48 horas. Antes de proceder con la inseminación artificial, el semen refrigerado debe ser llevado gradualmente a la temperatura ambiente (54).

8. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

8.1. Hipótesis nula (H₀)

Los diluyentes comerciales A y B tienen efectos significativamente diferentes en la viabilidad espermática del semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

8.2. Hipótesis alternativa (H_a)

Los diluyentes comerciales A y B no tienen efectos significativamente diferentes en la viabilidad espermática del semen canino refrigerado en razas braquiocefálicas.

9. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Métodos

En la presente investigación se utilizó la técnica de observación, al registrar los datos obtenidos de cada muestra a estudiarse basándose en los indicadores principales motilidad, vitalidad y vigor espermático para su posterior análisis.

Una vez realizada la recopilación de información, se utilizaron los métodos cuantitativo e inductivo, los cuales permitieron identificar si hubo variaciones en las muestras refrigeradas con los diferentes diluyentes de origen animal y vegetal con los diferentes periodos de tiempo que se desarrolló en el estudio.

9.2. Ubicación

La presente investigación se realizó en la ciudad de Latacunga, Barrio Salache perteneciente a la Provincia de Cotopaxi, en la Clínica Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción.



Figura 9. Localización del lugar.

Fuente: Google Earth

9.2.1. Situación geográfica

Está localizado al sur Occidente de la ciudad de Latacunga, parroquia Eloy Alfaro, Barrio Salache Bajo.

9.2.2. Límites

Norte: Predio de la señora Olga Estupiñan de Alarcón y Quebrada seca s/n.

Sur: Lotes Teresa Acurio, Ángel Acurio, Herederos Acurio.

Oriente: El río Salache. Occidente: Hacienda de San Agustín y comunas de Alpamalag.

9.2.3. Coordenadas

Latitud: 00°59'47,68" N

Longitud: 78°37'19,16" E.

9.2.4. Clima

La Facultad de CAREN se encuentra dentro de la región bioclimática Subhúmedo temperado. Esta región se extiende desde los 2000 a 3000 m.s.n.m., con una temperatura media anual que varía entre los 12 y 18° C. En la localidad su temperatura media anual es alrededor de 14. 5° C y la precipitación media anual es superior a 300mm., e inferior a 600mm. (55)

9.3. Instalaciones, Materiales y Equipos

9.3.1. Instalaciones

- Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción (Campus Salache)

9.3.2. Materiales de oficina

- Computadora
- Calculadora
- Resma de papel
- Internet (Horas)
- Copias
- Lápiz, marcadores y esferográficos
- Memory Flash
- Materiales físicos o de campo
- Correa de sujeción
- Guantes de manejo
- Cofia
- Mascarilla

9.3.3. Equipos y materiales de laboratorio

- Microscopio
- Tubos para las muestras Seminales
- Conos desechables para la colecta
- Pipeta mecánica
- Puntas de Pipetas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cámara de Neubauer

- Jeringuillas de 1, 3, 5ml
- Gradillas de Nivel Metálica
- Placa Térmica
- Tubos Eppendorf
- Pajillas
- Tiras de pH
- Refrigeradora
- Termómetro digital

9.3.4. Materiales químicos

- Agua destilada
- Diluyentes de origen vegetal y origen animal.

9.3.5. Materiales biológicos

- Semen canino
- Yema de huevo

9.4. Población de Estudio

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 8 machos caninos de distintas edades comprendidas entre los 1 y 8 años. Los individuos de la muestra tuvieron características similares en cuanto a la alimentación y estado sanitario. Se utilizó semen fresco de ocho caninos donantes: Representado como (Perro 1) un American Bully de nombre “Negro”, el mismo que contó con la edad de 1 año 3 meses, (Perro 2) un Bulldog Inglés, de nombre “Negro” con una edad de 1 año 3 meses, (Perro 3) un Pequinés de nombre “Oddy”, con una edad de 1 año, un Pequinés de nombre Sparky con una edad de 8 años que nominaremos (Perro 4), y cuatro perros mestizos de nombre “Pablo”, “Simba”, “Pepe”, “Skay”, con edades de 2 años, 2 años, 3 años, 2 años 6 meses respectivamente representados como (Perro 5, 6, 7, 8) los cuales gozaban de un perfecto estado de salud, apto para la reproducción, los ochos caninos pertenecientes a diferentes dueños.

Tabla 2. Registro de los caninos donadores de semen.

Nombre	Raza	Edad	Peso	Perro
Negro	American Bully	1a 3m	17kg	1
Negro	Bulldog Inglés	1a 3m	15kg	2
Oddy	Pequinés	1 a	6.5 kg	3
Sparky	Pequinés	8a	6.2kg	4
Pablo	Mestizo	2a	6.75kg	5
Simba	Mestizo	2 a	6.75 kg	6
Pepe	Mestizo	3a	7.2kg	7
Skay	Mestizo	2a 6m	6.8kg	8

Fuente: Directa.

9.5. Metodología experimental.

La metodología experimental que se utilizó para el desarrollo práctico y cumplimiento de los objetivos planteados del estudio principalmente se destaca lo siguiente:

9.5.1. Identificación del método de extracción de semen

El semen se recolectó mediante estimulación manual sobre el bulbo peneano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico graduado y atemperado. Se obtenía 1 eyaculado por semana de cada perro, durante un total de tres semanas consecutivas. Por lo tanto, en este experimento se utilizaron tres eyaculados de cada uno de los ocho machos caninos.

Para el estudio se usó la segunda fracción del eyaculado (fracción espermática). Inmediatamente después de la recolección, las fracciones de esperma se analizan en cuanto a su volumen, color, pH, concentración, motilidad individual, motilidad progresiva, vigor. Para esta evaluación se utilizó un microscopio binocular de contraste de fases. El volumen de semen se determina directamente en el tubo de recogida.

9.5.2. 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.

9.5.3. Recolección y evaluación de la muestra

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo peneano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico. Se obtenía 1 eyaculado por semana de cada perro, durante un total de 3 semanas consecutivas. La recolección de semen se la hizo en horas de la mañana (09:00 a.m.), se procedió a la limpieza del área genital haciendo especial énfasis en el área prepucial, se usó suero fisiológico, con el fin de evitar agentes que contaminen la muestra espermática, se elimina la humedad del área con toallas desechables se subió al perro a la mesa auxiliar de laboratorio, a continuación la persona encargada de la extracción se colocó un par de guantes desechables de látex, y procedió a provocar la erección del miembro masculino del animal; y, producirá la eyaculación y la colecta del material seminal en un termo.

Seguido 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 del diluyente de origen vegetal y animal con adición de yema de huevo, todas a una temperatura constante de 37°C para evitar el shock de frío y posteriormente con la ayuda de una pipeta se coloca en la cámara de Neubauer, para la obtención de los datos y después valorar.

El volumen seminal se determinaba directamente en el tubo de recogida. Para calcular la concentración, una parte proporcional de semen se diluyó (5:85), es decir 5 microlitros de semen puro y 95 de agua.

El porcentaje de motilidad se calculaba por valoración de una muestra de semen puro, usando un microscopio y placas porta y cubre objetos que debían estar temperados (37°C) en una platina térmica.

Tabla 3. Variables por evaluar en los eyaculados caninos.

VARIABLES	UNIDADES DE MEDIDA
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA	
Volumen colectado	mL
Color	Blanco lechoso, blanco cremoso, blanco acuoso, blanco opalescente
PH	Ácido, Neutro, Básico

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Concentración	% concentración (M/ mL)
Motilidad individual	Porcentaje
Motilidad progresiva	Porcentaje
Vigor	1-5

Fuente: Directa

9.5.4. Selección y adquisición de diluyentes

Los parámetros en estudio se realizaron mediante la adquisición de los diluyentes comerciales de origen vegetal y animal el cual necesitaba la adición de proteína animal donde se utilizó yema de huevo, y para la valoración de características microscópicas del eyaculado, se realizó con la ayuda de un microscopio electrónico.

9.5.5. Preparación del semen con los diluyentes comerciales

Diluyente de origen vegetal se obtiene por una mezcla de 10 ml agua destilada con 20gr de diluyente que se encuentra en presentación sólida.

Diluyente de origen animal presentación líquida y se obtiene el resultado final con adición de 1,25 ml de diluyente y 0,25 ml de yema de huevo.

A continuación, se colocó la muestra biológica en un tubo graduado, luego se incorporó respectivamente los diluyentes con una relación de 1:2 y se mezcló ligeramente para homogeneizar. Una vez evaluada la calidad espermática en fresco y con los diluyentes, posteriormente se realizó la refrigeración, evaluando las características microscópicas.

La muestra biológica se dividió en dos porciones equitativas y por consiguiente la primera porción del material seminal se preparó con el diluyente comercial de origen vegetal, a continuación, se empajillo algunas dosis para la respectiva evaluación prevista a las 2h, 6h, 12h, 24h. La segunda porción del material seminal se hizo una mezcla con el diluyente de origen animal, con el mismo parámetro de evaluación, relevante mencionar que las muestras debían mantenerse bajo refrigeración a una temperatura de 4°C. Dentro de la evaluación microscópica post-refrigeración se evaluaba motilidad individual, motilidad progresiva, vigor.

Tabla 4. Esquema del experimento.

Tratamientos	Diluyentes	# de repeticiones
T1	Origen animal	3
T2	Origen vegetal	3
TOTAL		6

Fuente: Directa

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente análisis experimental, cumplió con la comparación de varios parámetros espermáticos con la utilización de diluyentes comerciales, como crioprotectores de las estructuras celulares del semen canino, dentro de estos diluyentes se manejó el de origen animal con la adición de yema de huevo y el diluyente de origen vegetal estos presentaron su contribución durante las diferentes etapas de enfriamiento para la evaluación microscópica.

Resultados sobre la evaluación macroscópica y microscópica del semen puro.

Evaluación macroscópica.

La evaluación macroscópica del eyaculado en fresco, se realizó en cada uno de los ejemplares, este procedimiento se desarrollaba posterior a la colecta donde se analizó variables cualitativas como volumen, pH, color, donde el Perro 1 proporcionó un promedio de 2,5ml, esto se obtiene acorde a las tres tomas correspondientes para el estudio, de igual manera el Perro 2, proporcionó 1,66ml, seguido del Perro 3 el cual dio un volumen de 2,66ml, el Perro 4 dio 1,66ml, por otro lado el Perro 5 eyaculo un promedio de 0,83ml, mientras que el Perro 6 aportó 2,83ml, continuando con el Perro 7, ejemplar que proporcionó 2,16ml, y por último el Perro 8 presentó un volumen de 1,33ml, el 50% de los caninos manejados presentaron un color seminal designado blanco acuoso, y el otro 50% blanco opalescente, y respectivamente el 100% de las muestras presentaron un pH de 7, todos estos datos recolectados se encuentran dentro del rango normal (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de las características macroscópicas del eyaculado en fresco.

Evaluación macroscópica del eyaculado canino en fresco			
Perro	Volumen	Color	pH
1	2,5 ml	Blanco acuoso	7
2	1,66 ml	Blanco cremoso	7
3	2,66 ml	Blanco opalescente	7
4	1,66 ml	Blanco cremoso	7
5	0,83 ml	Blanco acuoso	7
6	2,83 ml	Blanco opalescente	7
7	2,16 ml	Blanco acuoso	7
8	1,33 ml	Blanco opalescente	7

Fuente: Directa

Discusión.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación macroscópica del eyaculado fresco obtenido manualmente se puede manifestar que el perro 6, de raza mestizo presenta un promedio de 2,83ml con respecto a volumen, su color blanco opalescente refleja un eyaculado normal y saludable, relacionándolo con una concentración adecuada de espermatozoides, validando un estado reproductivo sano y funcional, mientras que el pH refleja el equilibrio ácido-base del semen lo cual es muy importante para la viabilidad y movilidad de los espermatozoides. Por lo tanto, se asemeja a los resultados obtenidos por Bonilla & Ballesteros (24) mencionando que al tomar la muestra de semen por método manual se obtuvo un promedio de 1 a 7.5ml de eyaculado de color opalescente. También en el estudio desarrollado por Alamo (27) detalla que del total de eyaculados recogidos, el valor medio (\pm SEM) del volumen osciló entre 0.95 ± 0.1 y 3.8 ± 0.6 mL. Se observó una enorme variabilidad individual en cuanto al volumen aportado en cada eyaculado entre los machos.

Evaluación microscópica.

La evaluación microscópica de la muestra seminal en fresco brinda los siguientes resultados, se recalca que estos son un promedio cuantitativo de las tres tomas realizadas respectivamente, en cuanto a mortalidad individual el Perro 1 presentó un 94,3%, mientras que el Perro 2 se manifiesta en un 92,6%, seguido del Perro 3 con un 85%, el Perro 4 con un 90%, a continuación se manifiesta el Perro 5 con un promedio de 90%, al igual que el Perro 6 con 90%, el Perro 7 con 86,6% y finalmente el Perro 8 con un promedio del 90%.

Con respecto a la motilidad progresiva se obtuvo en el Perro 1 un promedio de 96,6%, en el Perro 2 93,3%, seguido del Perro 3 con un 76,7%, mientras que el Perro 4 manifestó un 88,3%, el Perro 5 reportó un 85%, seguido del Perro 6 que obtuvo un 88,3%, el Perro 7 manifestó un promedio de 86,7%, y por último en el Perro 8 se describe un 91,7%. En cuanto al vigor espermático se estructura los promedios de la siguiente manera: el Perro 1 y 2 se presentó con 5, seguido del Perro 3 con 4,3 de promedio, mientras que el Perro 4 se calificó un vigor de 4,7; a continuación, el Perro 5 presentó 4,3 de vigor, y por último el Perro 6,7,8 manifestaron un vigor promedio de 4,7 respectivamente. Seguidamente se describe la variable concentración espermática por ml, el Perro 1 oscila entre 285,7 M/mL, a continuación, tenemos del Perro 2 un promedio de 366 M/mL, el Perro 3 presentó 173,3M/mL, el Perro 4 con 227,3M/mL, seguido del Perro 5 con 223,7 M/mL, continuando con el Perro 6 que manifestó 160,3 M/mL, y para finalizar en el Perro 7 y 8 se describe 268,3 M/mL y 185,7M/mL respectivamente. (Tabla 6)

Tabla 6. Evaluación de las características microscópica.

Evaluación microscópica del eyaculado canino en fresco				
Perro	Motilidad individual %	Motilidad progresiva %	Vigor	Concentración M/mL
1	94,3	96,6	5,0	285,7
2	92,6	93,3	5,0	366,0
3	85	76,7	4,3	173,3
4	90	88,3	4,7	227,3
5	90	85,0	4,3	223,7
6	90	88,3	4,7	160,3
7	86,6	86,7	4,7	268,3
8	90	91,7	4,7	185,7

Fuente: Directa

Discusión

Con el desarrollo del análisis microscópico de los eyaculados de semen fresco se logra describir que dentro de los parámetros como: motilidad individual, motilidad progresiva, vigor y concentración espermática el mayor promedio se presenta en perros de raza pura como American Bully con MI= 94,3%, MP=96,6%, V= 5, C= 285M/MI y Bulldog Inglés MI= 92,6%, MP=93,3%, V=5, C= 366M/mL por lo tanto estos parámetros se correlacionan con altos índices en fertilidad y vitalidad espermática. De igual forma en su estudio Alamo (27), interpreta que en referencia a la motilidad individual progresiva observada en cada eyaculado, los valores medios individuales oscilaron entre un 85.0 y un 92.5%. Con referencia a este parámetro,

comprobamos que existía escasa variación individual entre ejemplares ($p>0.1$), manteniéndose este valor siempre por encima del 85%, mientras que, dentro del mismo individuo, los valores obtenidos en los diferentes eyaculados eran prácticamente similares. Por otro lado, nuestro estudio presenta resultados que oscilan con el estudio realizado por Cañar (56) el cual describe dentro de los parámetros de motilidad individual un 90,38%; viabilidad un 97,44%.

Resultados de la evaluación microscópica post- refrigeración con la adición de los diluyentes comerciales.

Motilidad Individual.

Los resultados de motilidad individual de semen refrigerado se muestran en la tabla 7. En el diluyente de origen animal mostró una motilidad individual de 89.3 ± 6.68 , 80.4 ± 12.0 , 66.9 ± 18.04 , 52.7 ± 17.8 , 33.5 ± 13.9 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 88.5 ± 6.83 , 76.9 ± 13.7 , 52.1 ± 22.4 , 33.5 ± 20.9 , 11.7 ± 9.35 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 7. Motilidad individual (%)

Diluyente		Tiempo de refrigeración (horas)				
		0	2	6	12	24
Origen	animal	89.3 ± 6.68	80.4 ± 12.0	66.9 ± 18.04	52.7 ± 17.8	33.5 ± 13.9
Origen	vegetal	88.5 ± 6.83	76.9 ± 13.7	52.1 ± 22.4	33.5 ± 20.9	11.7 ± 9.35

Fuente: Directa.

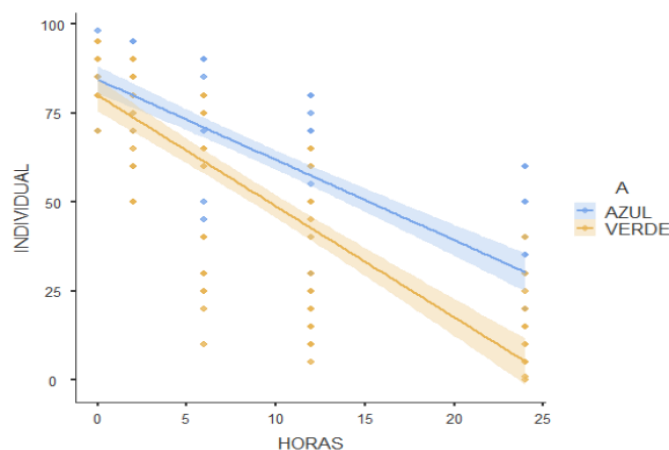


Diagrama 1. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y de origen vegetal la motilidad individual de espermatozoides de perros braquicéfalos.

Discusión.

La evaluación morfológica de semen comprende la diferenciación cualitativa y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales, y la distinción de otras células no espermáticas. (57)

Resultados de nuestro estudio se manifiesta que el diluyente de origen animal con adición de yema de huevo mostró una motilidad individual de 89.3 ± 6.68 , 80.4 ± 12.0 , 66.9 ± 18.04 , 52.7 ± 17.8 , 33.5 ± 13.9 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 88.5 ± 6.83 , 76.9 ± 13.7 , 52.1 ± 22.4 , 33.5 ± 20.9 , 11.7 ± 9.35 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mencionando que al tiempo de 2 horas bajo refrigeración de 4 °C mantenían un buen porcentaje de motilidad individual. De la misma manera Restrepo y demás autores (58) mencionan en su estudio que la refrigeración a 4°C está entre las metodologías más utilizadas para la conservación del semen canino, pero este método posee la limitante del escaso tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de las horas. Sin embargo, la refrigeración 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.

Motilidad progresiva

Los resultados de motilidad progresiva de semen refrigerado se muestran en la tabla 8. En el diluyente de origen animal mostró una motilidad progresiva de 89.5 ± 6.28 , 79.7 ± 11.1 , 68.5 ± 20.9 , 54.4 ± 17.7 , 36.7 ± 14.6 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 89.6 ± 5.88 , 72.5 ± 15.4 , 49.8 ± 21.1 , 31.0 ± 18.4 , 13.5 ± 12.1 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 8. Motilidad progresiva (%)

Diluyente	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	2	6	12	24
Origen animal (n=24)	89.5 ± 6.28	79.7 ± 11.1	68.5 ± 20.9	54.4 ± 17.7	36.7 ± 14.6
Origen vegetal (n=24)	89.6 ± 5.88	72.5 ± 15.4	49.8 ± 21.1	31.0 ± 18.4	13.5 ± 12.1

Fuente: Directa.

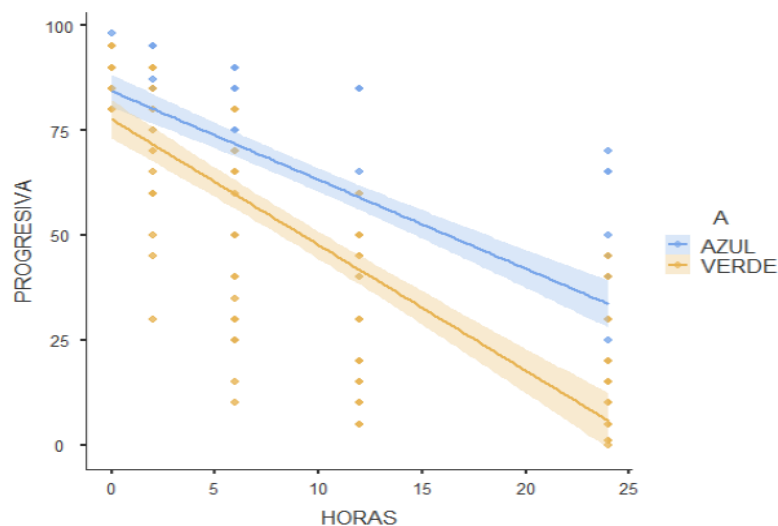


Diagrama 2. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y dilutores de origen animal y origen vegetal sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de perros braquicéfalos.

En el presente estudio se obtiene los siguientes resultados con respecto a motilidad progresiva donde el diluyente de origen animal mostró una motilidad progresiva de 89.5 ± 6.28 , 79.7 ± 11.1 , 68.5 ± 20.9 , 54.4 ± 17.7 , 36.7 ± 14.6 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 89.6 ± 5.88 , 72.5 ± 15.4 , 49.8 ± 21.1 , 31.0 ± 18.4 , 13.5 ± 12.1 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h consecutivamente, estableciendo que existió una significativa alteración en motilidad con el transcurso de las horas bajo refrigeración. Algo similar ocurre con el estudio de Manosalva y coautores (59) que dan los siguientes resultados la motilidad total (73.0 ± 7.0 y 82.4 ± 7.0) y la motilidad progresiva (66.5 ± 10.0 y 80.7 ± 7.0) fueron significativamente menores en espermatozoides refrigerados que en frescos ($p < 0.05$). En base a los resultados se podría sugerir que la motilidad, viabilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción del acrosoma son afectados por la refrigeración. Esto sería una indicación que la vulnerabilidad de la membrana acrosomal y de la membrana mitocondrial ocasionaría la disminución de la motilidad espermática.

A diferencia del estudio que desarrollo Batista (60) donde menciona que la motilidad espermática permaneció prácticamente inalterada en el semen refrigerado, con porcentajes medios superiores al 70% durante las 48 horas; asimismo, no se detectaron diferencias entre las muestras refrigeradas (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control. La motilidad espermática no se modifica marcadamente durante las primeras 48 horas de conservación a 4°C , con valores medios entre 60 y 80%. (61)

Vigor espermático.

Los resultados del vigor espermático de semen refrigerado se muestran en la tabla 9. En el diluyente de origen animal mostró un vigor de 4.58 ± 0.504 , 4.33 ± 0.702 , 3.38 ± 0.824 , 2.92 ± 0.584 , 2.67 ± 0.565 h respectivamente, mientras que en el diluyente de origen vegetal la motilidad fue 4.63 ± 0.495 , 4.21 ± 0.833 , 2.96 ± 0.908 , 2.25 ± 1.15 , 1.25 ± 0.608 a las 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente.

Tabla 9. Vigor espermático.

Diluyente	Tiempo de refrigeración (horas)				
	0	2	6	12	24
Origen animal (n=24)	4.58 ± 0.504	4.33 ± 0.702	3.38 ± 0.824	2.92 ± 0.584	2.67 ± 0.565
Origen vegetal (n=24)	4.63 ± 0.495	4.21 ± 0.833	2.96 ± 0.908	2.25 ± 1.15	1.25 ± 0.608

Fuente: Directa.

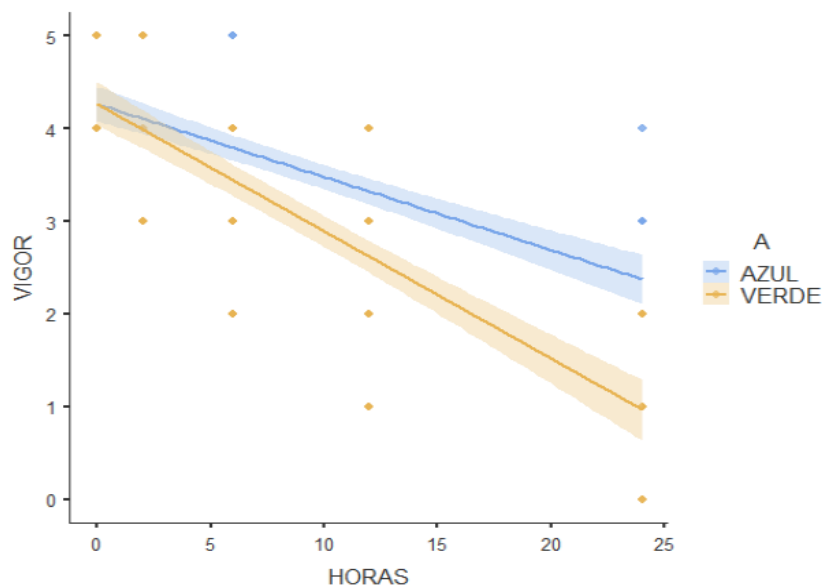


Diagrama 3. Interacción entre tiempos de refrigeración (0, 2, 6, 12, 24 h) y sobre vigor de espermatozoides de perros braquicéfalos con el uso de diluyentes comerciales de origen vegetal y origen animal.

Discusión.

El diluyente de origen animal con adición de yema de huevo de gallina utilizado en nuestro estudio mostro mejores resultados en vigor 4.58 ± 0.504 , 4.33 ± 0.702 , 3.38 ± 0.824 , 2.92 ± 0.584 , 2.67 ± 0.565 0,2,6,12,24 h respectivamente en comparación con el dilutor de origen vegetal. Lo que se asemeja con el estudio realizado por Corrales & Bedoya (62) donde evaluaron que el diluyente a base de EYT mostró mayores valores de motilidad progresiva entre las 24 y 96 horas de refrigeración ($93.0 \pm 4.5 - 85.0 \pm 6.5$), explicado gracias a que la composición que incluye sustancias buffer y azúcares, como también lipoproteínas, tienen la capacidad de estabilizar la membrana en condiciones de shock térmico cuando interactúa con la estructura lipídica de la plasmalema.

Discusión final.

En nuestro estudio se evidenció que una estabilidad adecuada con diferentes tiempos de refrigeración da como resultado un alto índice de supervivencia espermática como lo describe Restrepo y demás autores en su estudio que la refrigeración del semen condiciona una menor tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia por periodos cortos. Se ha descrito que el potencial fecundante de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática al daño causado por los cambios de temperatura. (58)

Díaz (53) caracteriza que, mediante el agregado de diluyentes apropiados, el semen puede refrigerarse a 4°C y de esta manera ser conservado. Las bajas temperaturas disminuyen la tasa metabólica del espermatozoide y prolongan su longevidad. Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad. Además, los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en aquellos diluyentes que contienen yema de huevo. Al igual que el estudio realizado por Díaz, se relaciona con el nuestro puesto que al utilizar diluyentes comerciales de origen vegetal y de origen animal permitió prolongar la vida celular espermática, evitando un alto estrés osmótico durante la refrigeración a 4 °C. A su vez Santana (63) explica en su estudio que la temperatura es uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de preservar la calidad del semen, de forma que una disminución controlada y progresiva de la misma nos permite una conservación de los eyaculados, desde varias horas hasta varios días. En este sentido, la refrigeración del semen se convierte en una herramienta muy útil en la cría canina; además, si a esto añadimos la sencillez de la técnica, los bajos costes y el alto nivel de éxitos, explicaría que la refrigeración del semen en la especie

canina se haya convertido en una de las técnicas de preservación seminal en los últimos años por veterinarios clínicos.

La refrigeración de nuestro estudio se llevó sobre los 4 °C por un período de 24h, con análisis microscópico a las 2,6,12,24h evaluando motilidad progresiva, individual y vigor, distintamente de los dos dilutores manejados, donde se valoró que tienen un buen nivel de supervivencia post refrigeración. Algo similar ocurre con Santana (63) que en su estudio estableció que, tras la correspondiente dilución, el semen se enfría a 4 °C gradualmente, durante un periodo de 1,5 a 2 horas y, luego, se almacena a dicha temperatura intentando utilizarlo en las primeras 24 horas, si bien los espermatozoides pueden mantener la supervivencia de 2 a 4 días, incluso 7 si se trata de semen de buena calidad.

De igual forma se correlaciona con los resultados de López y demás (64) demostrando que la vitalidad e Integridad de la Membrana Plasmática fueron superiores ($P < 0,05$) en aquellas muestras congeladas con TCG–YH. Los resultados de la presente investigación demuestran que la YH protegió mejor a los EE de perro durante la congelación que el APV.

La movilidad es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores utilizan este parámetro como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores. (65)

11. IMPACTOS

11.1. Impacto Técnico

El presente estudio posee un impacto técnico significativo, ya que proporciona datos cruciales que pueden catalizar futuras investigaciones. Esto se manifiesta en los resultados obtenidos a partir de análisis microscópicos detallados y la recopilación de datos estadísticos precisos sobre parámetros críticos como la motilidad, vitalidad y vigor espermático en semen refrigerado durante diferentes periodos de tiempo.

11.2. Impacto Social.

Este estudio tiene un impacto social al proporcionar a los dueños de perros información sobre métodos de reproducción alternativos que presentan menor riesgo para sus mascotas. Este enfoque considera integralmente el bienestar animal, abarcando aspectos cruciales como la salud, el cuidado y el manejo responsable, además de minimizar la transmisión de enfermedades de origen sexual.

12. CONCLUSIONES

- Mediante la identificación de las características macroscópicas se puede mencionar que el perro de raza mestiza número 6 presenta mayor volumen de eyaculado, mientras que en la evaluación microscópicas el perro de raza braquiocefálica American Bully número 1, brinda una mejor calidad espermática y viabilidad, permaneciendo dentro de los rangos establecidos en los distintos periodos de evaluación.
- Se pudo determinar mediante la evaluación seminal que el macho de raza braquiocefálica mantiene mejor motilidad individual, progresiva y de vigor, permitiendo obtener óptima calidad espermática, aspecto trascendental para conocer la fertilidad y optimizar los procedimientos de reproducción asistida. También es importante mencionar que la raza mestiza en cuanto a calidad espermática no alcanza los estándares requeridos.
- En conclusión, el estudio comparativo entre los tratamientos de origen vegetal y origen animal ha demostrado diferencias significativas en la motilidad individual, progresiva y vigor del semen canino. A lo largo de las mediciones realizadas a las 0, 2, 6, 12 y 24 horas, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre los dos diluyentes. El diluyente de origen animal mostró un mejor desempeño, con una reducción más lenta en la motilidad del semen en comparación con el diluyente de origen vegetal.

13. RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los propietarios de las mascotas o criaderos interesados en mantener la diversidad genética y la salud reproductiva, optar por la raza American Bully, ya que en los estudios realizados se puede observar e identificar de manera clara que brinda mejores características microscópicas siendo fundamental en la reproducción de caninos.
- Como grupo investigador recomendamos en cuanto a calidad espermática utilizar los caninos de raza braquiocefálica debido a que brinda mejor calidad en motilidad individual, progresiva y de vigor, de tal manera este reproductor es la mejor opción que se puede difundir para la reproducción canina.
- Según los resultados del presente estudio se recomienda utilizar el diluyente de origen animal ya que en el estudio realizado se determina que es la opción más adecuada para la preservación de semen canino refrigerado, especialmente cuando se busca mantener la calidad seminal durante un período prolongado.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Chwin Khye K, Laswardi Yusuf T, Satrio F, Kurniani Karja. CALIDAD DEL SEMEN CANINO REFRIGERADO EN EXTENSOR DE YEMA DE HUEVO TRIS SUPLEMENTADO CON SERICINA. Revista indonesia de ciencias veterinarias. 2021 Marzo; 15(1): p. 15-20.
2. Acurio Aguiar. “CRIOCONSERVACION DE SEMEN EN PERROS DOMESTICOS (Canis Lupus Familiaris), EN LA CLINICA ANIMAL KINGDOM.”. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. Latacunga, Ecuador: UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI, MEDICINA VETERINARIA; 2019.
3. Paramo R, Balcázar. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Departamento de Reproducción. [Online].; 2005 [cited 2024 Julio 2. Available from: https://www.abogadogeneral.unam.mx/sites/default/files/archivos/RepositorioCont/1_Facultades/11_FacMedVeterinariayZootecnia/71_ManualdePracticasenManejoReproductivodePerros.pdf.
4. Stornelli M. AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS. Spermova Asociación Peruana de Reproducción Animal. 2017; XII(2): p. 77- 84.
5. Hernández E. Evaluación del volumen y concentración de semen fresco en caninos de la Comarca Lagunera. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Ciencias Agropecuarias y Biotecnología; 2005.
6. Stornelli MA, Luzbel de la Sota R. MANUAL DE REPRODUCCIÓN DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y COMPAÑÍA. Primera ed. 978-950-34-1381-4 I, editor. La Plata: Edulp; 2016.
7. Valera M. Policlínica Veterinaria Centauro. [Online].; 2009 [cited 2024 Julio 02. Available from: <https://centauroveterinarios.com/wp-content/uploads/2016/03/reproduccionCanina.pdf>.
8. Urgerfeld R. Reproducción de los animales domésticos. Primera ed. Smeraldi Costanza ISBN 8418339659 9, editor. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica SL; 2020.
9. Cortés F. Manual de prácticas de clínica de perros y gatos. [Online]. Tuxpan - Veracruz; 2015 [cited 2024 Julio 03. Available from: <https://www.uv.mx/pozarica/cba/files/2017/09/Manual-de-practic-as-de-clinica-de-perros-y-gatos.pdf>.

10. Matamoros Pinel R, Salinas Pérez P. Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos. Primera ed. Editores R, editor.; 2017.
11. Valdez G, Guerrero H. Reproducción de los animales domésticos. [Online].; 2021 [cited 2024 Julio 15. Available from: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo4/index.html>.
12. Soto A, Zuccolilli G. PHYLOGENETIC STUDY OF THE POPULATION OF GONADOTROPHIN-RELEASING HORMONE (GNRH) NEURONS OF THE VERTEBRATES. Trabajos de Investigación. Buenos Aires: Instituto de Anatomía, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata., Anatomía Comparada; 2021. Report No.: ISSN 1514-2590.
13. De León J. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO. [Online].; 2008 [cited 2024 Julio 03. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2740/TESIS%20JORGE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
14. Díaz V, Marqués Y, Merchant H. Universidad Nacional Autónoma de México. [Online].; 2021 [cited 2024 Julio 3. Available from: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo1/autores.html>.
15. Sánchez JM. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. [Online].; 2010 [cited 2024 Julio 3. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/bitstream/handle/123456789/7657/JOSE%20MARIA%20SANCHEZ%20ESCAMILLA.pdf?sequence=1>.
16. Huanca. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. [Online].; 2014 [cited 2024 Julio 3. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/323353372.pdf>.
17. Bustos , Torres. Seasonal Reproduction in the Male. International Journal of Morphology. 2012 Febrero 21; 30(4): p. 1266-1279.
18. Méndez I, Cariño C, Díaz L. Prolactin in the immune system: synthesis and biological effects. Revista de investigación clínica. 2005 Junio; 57(3): p. 447-456.
19. Escamilla A. APLICACIÓN DE CLORHIDRATO DE XILACINA (0.05 mg/kg) EN TOROS COMO FACILITADOR DE LA COLECTA DE SEMEN CON EL MÉTODO DE ELECTROEYACULADOR. Tesis de tercer nivel. Guatemala: UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, MEDICINA VETERINARIA; 2005.

20. Wanke , Gobello. Reproducción en caninos y felinos domésticos España: Inter- Medica; 2006.
21. Davol P. Reproducción canina. [Online].; 2008 [cited 2024 Julio 4. Available from: <https://www.labbies.com/reproduction1.htm>.
22. Barrios. Asociación Venezolana de Producción Animal. [Online].; 2002 [cited 2024 Julio 4. Available from: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/diegobarrios.PDF.
23. Cunningham. Fisiología veterinaria. Segunda ed. Interamericana MH, editor. Mexico; 2019.
24. Bonilla Hernández , Ballesteros Mejía. UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA. [Online].; 2007 [cited 2024 Julio 5. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1348&context=medicina_veterinaria.
25. Oporta Rodríguez E, Martínez JS. Examen andrológico en toros con encaste Bos indicus y Bos taurus en edades reproductivas. Trabajo de Graduación. Managua, Nicaragua : UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA, MEDICINA VETERINARIA; 2021.
26. Pérez Marín C, Gil Huerta L, Quintela Arias. Técnicas Reproductivas En Las Especies Animales: Manuales Clínicos de Veterinaria. Primera ed. Juan Morgaz Rodríguez PMRAGR, editor. Barcelona : Elsevier Health Sciences; 2023.
27. Alamo Santana D. CRIOCONSERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE CANINA: UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO LÍQUIDO VS ULTRACONGELADOR DE – 152 °C. Proyecto de Investigación. España : UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS; 2007.
28. Ávalos A, González J, Vargas A, Herrera J. Recolección y manipulación seminal in vitro. Primera ed. Coria DPO, editor. México; 2018.
29. Molina Mosquera , Polo Caquimbo , Tovar Clavijo M. Design and Implementation of a Prototype Electroejaculator Scalable for use in more than one Species. Investigación. Colombia: Universidad Surcolombiana -Neiva, Ingeniería; 2011.
30. Arieta R, Fernández J, Menchaca J. Métodos de extracción de semen bovino. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2014 Junio; 15(5): p. 1.8.

31. Proaño Montesdeoca. EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE YEMA DE HUEVO Y CREMA DE LECHE AL DILUYENTE, PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO. Proyecto de Investigación. Latacunga - Ecuador: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, MEDICINA VETERINARIA; 2019.
32. Veloz. Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGÍSTER. Cuenca: UNIVERSIDAD DE CUENCA, Ciencias Agropecuarias; 2017.
33. Valverde A, Barquero V, Carvajal V. Biotecnología aplicada al estudio de la movilidad del semen porcino. *Agronomía Mesoamericana*. 2021 Agosto ; 32(2): p. 662–680.
34. Espejo , Barraquero , Rogel S, Salvador Z. Reproducción Asistida ORG. [Online].; 2024 [cited 2024 Julio 28. Available from: [https://www.reproduccionasistida.org/resultados-de-seminograma/#:~:text=valores%20de%20referencia%3A-.Examen%20macrosc%C3%B3pico,mide%20en%20mililitros%20\(mL\).](https://www.reproduccionasistida.org/resultados-de-seminograma/#:~:text=valores%20de%20referencia%3A-.Examen%20macrosc%C3%B3pico,mide%20en%20mililitros%20(mL).)
35. Altamirano Chiriboga , Pereira Castro. EVALUACION DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN CANINO FRESCO Y CONGELADO, EN UN PERRO DE RAZA PITBULL TERRIER, UTILIZANDO 3 DILUYENTES EN LA CLINICA VETERINARIA LOS ANDES EN QUITO. TESIS DE GRADO. Guaranda - Ecuador: UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR., CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE.; 2011.
36. Toro Montoya. Espermograma. *Medigraphic, literatura biomédica*. 2009 Febrero ; 15(11): p. 145-169.
37. Ariagno J, Mormandi E. Guía práctica para la evaluación del semen. *RevistaByPC*. 2016 Abril; 80(3): p. 29-36.
38. Tello Landeta. Universidad Técnica de Ambato. [Online].; 2015 [cited 2024 Julio 6. Available from: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22578/1/Tesis%2048%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20398.pdf>.
39. Maroto M. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN FRESCO UTILIZANDO DOS DILUYENTES COMERCIALES EN DIFERENTES HORAS DE EXTRACCIÓN.

- Tesis de tercer nivel. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Ciencias Agropecuarias; 2020.
40. Gómez M, Migliorisi A. Sitio Argentino de Producción Animal. [Online].; 2017 [cited 2024 Julio 31. Available from: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf.
 41. Bravo C, Sánchez. Effect of adding autologous or heterologous prostatic fluid on canine sperm quality. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2013 Diciembre; 24(4): p. 466-472.
 42. Delgado B. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN DE OVINO TRATADO POR LA TÉCNICA DE GRADIENTE DE DENSIDAD. Tesis para obtener título de tercer nivel. Lima: UNIVERSIDAD RICARDO PALMA, CIENCIAS BIOLÓGICAS; 2013.
 43. Challco C. Universidad Científica del Sur. [Online].; 2019 [cited 2024 Julio 5. Available from: [https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/690/TB-Challco_Salas.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20espermatog%C3%A9nesis%20comienza%20cuando%20a%C3%BAn,eyaculado%20\(Allen%2C%201992\)](https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/690/TB-Challco_Salas.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20espermatog%C3%A9nesis%20comienza%20cuando%20a%C3%BAn,eyaculado%20(Allen%2C%201992)).
 44. Feldman E, Nelson R. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. Primera ed. Interamericana MH, editor. México; 2017.
 45. Villalba. Biblioteca de documentos digitales Scribd. [Online].; 2017 [cited 2024 Julio 6. Available from: <https://es.scribd.com/document/363209162/Caracteristicas-de-Un-Diluyente>.
 46. Sánchez , Cartagena A, Berland. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2006 Junio; 17(1).
 47. Moreno S. USO DE DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL MACHO CABRÍO. Tesis doctoral. Torreón: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO; 2021.
 48. Martínez Barbitta , Rivera Salina. Evaluación de semen canino refrigerado diluido con activador de esperma. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022 Febrero; 8(3).
 49. Jiménez S, Rivera del Álamo M, Hidalgo C, Peña A, Muiño R, Rodríguez J, et al. Evaluación in vitro de diluyentes a base de yema de huevo, lecitina de soja y liposomas para la criopreservación de semen de toros lecheros. *Ciencia de la reproducción animal*. 2020 Abril; 215.

50. Zhang H, Ye H, Shao Y, Shenming Z. Efectos de la concentración de yema de huevo y del tamaño de las partículas en la conservación del semen de burro. *Revista de Ciencias Veterinarias Equinas*. 2018 Junio; 65: p. 19 - 24.
51. Loeza Concha , Domínguez Rebolledo , Copas Medina , Vivas Rodríguez J, Escalera Valente , Ramón Ugalde. Efecto de la yema de huevo sobre la criopreservación espermática de zángano (*Apis mellifera*). *Abanico veterinario SciELO*. 2021 Marzo 5; 9(2).
52. Ródenas C, Parrilla Y, Roca J, Martínez E, Lucas X. Calidad de espermatozoides caninos refrigerados y almacenados en frío (5 °C) sometidos a diferentes velocidades de enfriamiento rápido. *Teriogenología*. 2014 Septiembre; 82(41): p. 621-626.
53. Díaz , Corrada , Gobello. Instituto de Genética Veterinaria. [Online].; 2016 [cited 2024 Julio 8. Available from: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/102886/CONICET_Digital_Nro.dde3c19f-d1b8-4b43-ac32-4ea0e2e451e7_B.pdf?sequence=7&isAllowed=y.
54. Rendon , Arango Rodriguez M. EVALUACIÓN DEL SEMEN CANINO, SOMETIDO A CONGELACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL COMO CRIOPROTECTOR. Tesis para titulación tercer nivel. Medellín-Colombia: Universidad CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2009.
55. Lloacana Troya. GUÍA FOTOGRÁFICO–DESCRIPTIVA DE LA FLORA DEL CAMPUS. Proyecto de Investigación. Latacunga: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES - TURISMO; 2022.
56. Cañar M. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y REFRIGERADO DEL SEMEN DE PERRO (*Canis familiaris*) PROVENIENTE DE COLECTA IN VIVO Y EN EPIDÍDIMOS POST CASTRACIÓN. Tesis para tercer nivel. Loja: Universidad Nacional de Loja, Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2015.
57. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli A. La Microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Investigación. Argentina: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2014.
58. Restrepo Betancur G, Vásquez Araque N, García E. CRYOPRESERVATION OF CANINE SEMEN AND ITS APPLICATION IN ARTIFICIAL INSEMINATION. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2009 Diciembre; 4(2): p. 119-129.

59. Manosalva I, Cortés C, Leyva V, Valdivia , De los Reyes , Barros , et al. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, Integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2005 Diciembre; 16(2): p. 114-128.
60. Batista M, Santana M, Álamo D, Cabrera F, Garcia A. Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales? *REVISTA CANARIA DE LAS CIECIAS VETERINARIAS*. 2014 Septiembre; 8(2).
61. Nizanski W, Klimowicz M, Savic M. Efectos de la inclusión de Equex STM en el extensor basado en Tris sobre la motilidad de los espermatozoides de perro incubados a 5 grados C. *Reproducción de animación doméstica*. 2009 Julio; 44(2).
62. Corrales E, Bedoya H, Echeverry J. Description of canine semen cryopreservation techniques. Proyecto final. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Medicina Veterinaria y Zootecnia.; 2020.
63. Santana Cruz M. Revisión de las técnicas de reproducción asistida en perros. *Portal Veterinaria*. 2021 Junio; 3(1).
64. López , Dumas , Samaniego , Galarza , Argudo. Evaluation of two extenders in Canine epididymal spermatozoa freezing (Polyvinyl alcohol and egg yolk). *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2022 Septiembre; 32(1): p. 1-14.
65. Uribe Valderrama R, Arango Rodríguez , Rendón Álvarez , Acevedo Naranjo. Evaluaton of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2011 Junio; 6(1): p. 21-30.